

Efecto inmunosupresor en linfocitos humanos de *Aeromonas hydrophila* biotipo 296 aisladas de ostiones en la Ciudad de México

Palabras clave: *Aeromonas hydrophila*, México, ostiones, linfocitos, inmunosupresor.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, México, large oysters, lymphocytes, immunosuppressive.

Recibido: 13/05/2009

Aceptado: 18/05/2009

Rosalino Vázquez-López,* Sandra Solano Gálvez,** AM Fernández Presas,** R Barragán Jain,* J Ruy-Díaz,* Tomás Barrientos Fortes*

* Escuela de Medicina, Universidad Anáhuac.

** Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia:

Dr. Rosalino Vázquez-López

Colima 114 Depto. 102, Ampliación Miguel Hidalgo, 14250 México, D.F.

Tel: 5606 7713 E-mail: rosalino.vazquez@correo.unam.mx

rosalino.vazquez@anahuac.mx

117

Resumen

En la Escuela de Medicina de la Universidad Anáhuac, se aisló *Aeromonas hydrophila* biotipo 296 a partir de ostiones expendidos en restaurantes de la Ciudad de México y se identificó con un factor de confianza de 0.9958. Este hallazgo señala la importancia de conocer más sobre la frecuencia de *Aeromonas* en este tipo de alimentos, ya que sugieren un riesgo potencial de salud, pues esta bacteria está asociada con cuadros severos de enteritis. En la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México se reseñaron las colonias puras de esta bacteria en infusión cerebro corazón (BHI); el sobrenadante fue empleado en la prueba de proliferación blastoide para determinar su efecto en linfocitos humanos de sangre periférica. Los linfocitos fueron cultivados en presencia de dos diferentes concentraciones de proteína obtenidas del sobrenadante (20 y 50 µg). Los resultados mostraron que el sobrenadante de *Aeromonas hydrophila* produce *in vitro* un potente efecto inmunosupresor dosis-dependen-

Abstract

At the College of Medicine in the Anáhuac Universidad, it was isolated *Aeromonas hydrophila* biotype 296 oysters obtained from Mexico City restaurants. It was identified by a confidence interval of 0.9958. This finding indicates that it is very important to investigate about the frequency of appearance of *Aeromonas* in this kind of food. Isolation of *Aeromonas* implies a potential health risk, since this bacterium is associated with serious enteritis cases. At the College of Medicine of the National Autonomous University of Mexico, pure colonies of that mentioned bacteria were seeded in brain heart infusion (BHI) broth; the supernatant obtained was used to perform the blastoid proliferation assay in order to determine its effect over human lymphocytes from peripheral blood. The lymphocytes were incubated in the presence of two different concentrations of proteins obtained from the supernatant (20 and 50 µg). *Aeromonas hydrophila* produces, *in vitro*, a powerful dose-dependent immunosuppressive effect ($p < 0.001$).

diente ($p < 0.001$). Estas observaciones nos hacen suponer que este efecto inmunosupresor podría ser un nuevo mecanismo de patogenicidad producido por la *Aeromonas hydrophila*. De ocurrir este fenómeno *in vivo*, aportaría valiosos elementos para entender más la fisiopatología de las diferentes enfermedades producidas por esta bacteria. Es decir, en caso de que ocurriera un efecto inmunosupresor en el tejido infectado, se induciría la inhibición de la proliferación linfocitaria local necesaria durante la generación de la respuesta inmune.

These observations suggest that the immunosuppressive effect might be a new pathogenicity mechanism produced by *Aeromonas hydrophila*. If this phenomenon occurs *in vivo*, it could give very important elements in order to get a better knowledge about the physiopathology of diverse diseases produced by this bacterium. This is to say, if an immunosuppressive effect in the infected tissue happened, it would be induced a local inhibition of lymphocyte proliferation, needed during the immune response induction.

Introducción

Las bacterias del género *Aeromonas* han sido ubicadas como parte de la familia *Vibrionaceae*.¹ Sin embargo, estudios recientes la consideran como una familia independiente a las *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* denominada *Aeromonadaceae*.² Las *Aeromonas* son bacilos gram negativos cortos de entre 0.3-1.0 x 1.0-3.5 μm , aerobios facultativos. Entre las especies más reconocidas se encuentran *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biogrupo *sobria*.³

Estas bacterias son comúnmente aisladas de aguas de estero,⁴ muestras ambientales y verduras,⁵ en peces,⁶ medio marino, y también de pacientes con cuadro diarreico.^{7,8} En la Ciudad de México se han aislado a partir de alimentos obtenidos en supermercados, en cafeterías universitarias, en alimentos que se comercializan en tianguis y en restaurantes.⁹

Dentro de estos aislamientos (ambientales y clínicos) se han identificado algunas cepas citotoxigénicas¹⁰⁻¹² y muchas de éstas muestran amplia resistencia a diversos antibióticos.¹³

Usualmente, esta bacteria ha sido reconocida como patógena en peces.¹⁴ Sin embargo, en la actualidad se ha asociado con cuadros diarreicos severos en humanos. En pacientes pediátricos se ha identificado como agente etiológico de gastroenteritis.¹⁵⁻¹⁸

Las especies principalmente asociadas a enfermedad en humanos son *A. hydrophila* y *A. veronii*,

biotipo *sobria*,¹⁹ ambas con similitud antigenica;²⁰ aunque se ha reportado la variedad antigenica de la proteína S de superficie en *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii* biotipo *sobria*.²¹

Se han descrito diferentes factores de patogenicidad y de virulencia del género *Aeromonas*; entre éstos se han descrito factores de citotoxigenidad, enterotoxigenidad, adherencia a células epiteliales, y otros que incluyen la producción de proteasas, lipasas, elastinas y hemolisinas.²² Se ha reportado como un importante factor de virulencia, la actividad vacuolizante en la línea celular de enterocitos humanos Caco-2,²³ así como la capacidad de adherencia de la bacteria al epitelio intestinal por medio de mucinas.²⁴ Una de las toxinas más reconocidas en el género *Aeromonas* es la aerolisina, proteína bacteriana que puede matar a la célula blanco mediante la formación de canales discretos en la membrana plasmática. La aerolisina de *Aeromonas hydrophila* fue identificada como una proteína 50 kDa en SDS-PAGE, que es similar a la de 53 kDa responsable de actividades hemolíticas identificadas mediante gel de filtración.²⁵ En otros estudios se ha logrado purificar a la aerolisina con un peso de 51.5 kDa.²⁶ Mientras que la aerolisina de *Aeromonas veronii* biovar *sobria* es una proteína de 47 kDa secretada en el sobrenadante del cultivo en forma de precursor o proaerolisina (52 kDa).²⁷

Existen diversos trabajos de identificación y caracterización molecular de los diferentes genes asociados con los factores de patogenicidad; por

ejemplo, la aerolisina^{32,33} y la hemolisina con peso molecular de 69.0 kDa.³⁴

Algunos autores han reportado que no parece existir correlación entre la producción de toxinas y los casos de gastroenteritis en cepas aisladas de niños con diarrea.²⁸ Sin embargo, existen estudios que sugieren que dicha correlación sí se da de forma regular.²⁹

Es posible aislar cepas con efecto enterotóxico, citotóxico y hemolítico en pacientes con cuadro diarreico. Al parecer, el tratamiento con calor del sobrenadante de cultivo de esta bacteria inhibe la actividad citotóxica y citolítica, pero no la enterotóxica; por lo tanto, parece ser que la producción de la enterotoxina citotónica (toxina que induce la acumulación de líquido en células entéricas), es diferente a la de la citotoxina y de hemolisina; es decir que la *Aeromonas* (principalmente la *hydrophila*) posee toxinas termolábiles (citotoxina hemolisina) y toxinas termoestables (enterotoxina citotónica).^{30,31}

Por lo antes expuesto, los objetivos de nuestro trabajo fueron: 1) aislar *Aeromonas hydrophila* a partir de ostiones como producto marino que se consume crudo y determinar si este tipo de alimento pudiera representar un foco de infección de *Aeromonas*. 2) Estudiar el efecto del sobrenadante de cultivo de bacterias sobre linfocitos periféricos humanos para poder proponer un nuevo posible mecanismo de patogenicidad en la *Aeromonas hydrophila* que contribuya a entender más la fisiopatología de las enfermedades producidas por esta bacteria.

Material y métodos

Aislamiento e identificación. Las muestras de ostiones fueron compradas directamente en 13 restaurantes de diferentes puntos de la Ciudad de México. Los ostiones se encontraban sellados en refrigeración y fueron transportados en cajas térmicas de unicel con bolsas de geles refrigerantes hasta el laboratorio de microbiología de la

Escuela de Medicina de la Universidad Anáhuac. La cubierta exterior de los ostiones fue perfectamente lavada y desinfectada. Posteriormente, bajo condiciones asepticas, los ostiones fueron abiertos y se recolectó el líquido de su interior, empleando para ello jeringas estériles desechables.

Se depositó 0.1 mL del líquido contenido en la jeringa a placas de agar McConkey, *Salmonella-Shigella* y verde brillante, y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Las colonias puras obtenidas fueron resembradas en agar sangre e incubadas por 20 horas a 37 °C.

Las colonias puras obtenidas de agar sangre fueron teñidas con Gram (Golden Bell Reactivos cat. 82000) para realizar posteriormente la prueba de oxidasa (BBL, DMACA cat. 261181), la prueba de indol (BBL, DMACA cat. 261187), y las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana (BD BBL Crystal Identification System Enteric/Nonfermenter ID Kit cat. 245000).

Para la prueba de oxidasa se colocaron en condiciones de esterilidad tres gotas del reactivo en papel Whatman no. 1; se estrió sobre éste una carga de tres a cuatro colonias puras. La lectura se realizó de 10 a 30 segundos y los resultados se interpretaron de la forma siguiente: Positivo: violeta o púrpura y negativo: sin cambio.

El procedimiento en la prueba de indol se realizó de la siguiente forma: En condiciones de esterilidad, se colocaron tres gotas del reactivo en papel Whatman no. 1 y se estrió sobre éste una carga de tres a cuatro colonias puras; la lectura se realizó en un lapso de dos minutos y los resultados se interpretaron, positivo: azul a azul verde y negativo: sin cambio o de coloración rosa.

Para realizar las pruebas bioquímicas, se tomó una colonia pura grande de 2 a 3 mm o cuatro a cinco colonias puras pequeñas (obtenidas en agar sangre) y se depositaron en el tubo de inóculo y se ajustaron a una escala de Mac Farland 1.0, empleando el Nephelometer (BBLTM CrystalspecTM Nephelometer Cat. 245009). La suspensión de bacterias fue transferida en condiciones

de esterilidad a las celdas del sistema Crystal previamente rotuladas, se incubaron sin CO₂, con 40 a 60% de humedad a 37 °C por 18 horas.

Las pruebas fueron leídas en el BD BBL Crystal AutoReader (cat. 245300) empleando para ello el BD BBL Crystal MIND Software (cat. 441010). Las pruebas bioquímicas que constituyen al BD BBL Crystal Identification System Enteric/Nonfermenter ID Kit y sus claves, se muestran en el cuadro I.

Ensayo de proliferación blastoide. Las colonias puras de *Aeromonas hydrophila* aisladas previa-

Cuadro I. Pruebas bioquímicas que constituyen al BD BBL™ Crystal Identification System Enteric/Nonfermenter ID Kit y sus abreviaciones.

OXI:	Oxidase
ARA:	Arabinose
SUC:	Sucrose
RHA:	Rhamnose
MNT:	Manitol
GAL:	Galactose
PHO:	p-n-p Phosphate
NPG:	p-n-p β Galactoside
BPH:	p-n-p Dis - Phosphate
AAR:	p-n-p α Arabinoside
GLR:	p-n-p β Glucuronide
GGI:	γ -L-Glutamyl P-Nitroanilida
PHE:	p-n-DL -Phenylalanine
GLY:	Glycine
MLO:	Malonic acid
ARG:	Arginine
MNS:	Mannose
MEL:	Melibiose
SOR:	Sorbitol
ADO:	Adonitol
INO:	Inositol
BGL:	p-n-p α β Glucoside
PRO:	Proline nitroanilide
BXY:	p-n-p Xyloside
PHC:	p-n-p Phosphorylcholine
NAG:	p-n-p N Acetyl glucosaminide
ESC:	Esculin
URE:	Urea
CIT:	Citrate
TTC:	Triphenyl tetrazolium chloride
LIS:	Lysine
IND:	Indole

mente de agar sangre fueron resembradas en infusión cerebro corazón (BHI) por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂. El sobrenadante obtenido se centrifugó, filtró y se liofilizó, y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford; se utilizó el sobrenadante de cultivo para la prueba de proliferación blastoide.

Las muestras de sangre fueron proporcionadas por dos pacientes voluntarios clínicamente sanos, sin antecedentes de cuadro entérico reciente (en un periodo de por lo menos seis meses) y sin adenomegalia detectable.

La sangre completa heparinizada se diluyó 1:1 con PBS. A partir de ésta se procedió a realizar la purificación de linfocitos humanos con Hystopaque 1077. Se colocaron 3 mL de la solución de Hystopaque en tubos Falcon de 15 mL y encima de éste se colocaron 3 mL de sangre diluida, se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la interfase de los mononucleares, se diluyeron en RPMI incompleto y se centrifugaron a 200 x g por 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 1 mL de RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), penicilina (100 μ g/mL) y estreptomicina (25 μ g/mL) y se procedió a la cuenta de las células viables mediante el uso del colorante de exclusión azul de trípano.

La suspensión celular se ajustó a una concentración de 5 x 10⁶ células/mL; de esta suspensión 100 μ L (500,000 células) se depositaron por triplicado en placas de 96 pozos (Costar) y posteriormente se adicionaron 100 mL de RPMI completo con concanavalina «A» (Sigma) a una concentración de 5 μ g/mL. Se distribuyeron los grupos de la siguiente forma:

1. Linfocitos con RPMI (sin concanavalina A).
2. Linfocitos con RPMI y concanavalina A (Con-A) como mitógeno.
3. Linfocitos con RPMI y Con-A más 20 μ g de proteína del sobrenadante de cultivo de *Aeromonas hydrophila* biotipo 296.

4. Linfocitos con RPMI y Con-A más 50 μ g de proteína del sobrenadante de cultivo de *Aeromonas hydrophila* biotipo 296.

Los cultivos celulares se incubaron por 48 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂. Después de este tiempo fue adicionado a cada cultivo un pulso de 1.0 μ Ci de timidina (³H) (20 μ L de una dilución 1:20 del isótopo radiactivo) durante 16-18 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂; se cosecharon en papel de filtro (Whatman 934-AH) y fueron lavadas con agua utilizando un cosechador múltiple automatizado mu (Nunc, Denmark). La incorporación de timidina tritiada fue medida con el contador de líquido de centelleo (Packard Tri-carb 300 Beckman Instruments, Fullerton, Calif). Los datos son expresados como media del conteo por minuto \pm SE.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE). El extracto antigenico de *Aeromonas hydrophila* se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio a 10%, tal como lo describe Laemmli,³⁵ usando una Mini-protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad). Las muestras se resuspendieron en un buffer de muestra que contenía 2 β -mercaptoetanol y calentadas a 95 °C por cuatro minutos. Se incluyeron marcadores de peso molecular (Kaleidoscope Pre-stained Standard Bio-Rad Cat. 161-0324) que va desde los 7.6 kDa hasta los 218 Kd. Después de la electroforesis, los gels se tiñeron con azul de Coomassie.

Análisis estadístico. Se basó en la comparación de la proliferación inducida por el mitógeno

(grupo 2) observada como incorporación de timidina tritiada (cpm) y la incorporación observada en cada uno de los grupos con presencia del sobrenadante bacteriano; tomando como marca basal la incorporación de la timidina tritiada en células cultivadas exclusivamente con RPMI (en ausencia de mitógeno y sobrenadante).

Todos los resultados obtenidos por triplicado en el ensayo de proliferación blastoide fueron analizados por medio del InStat software y el tratamiento estadístico aplicado fue el análisis de varianza.

Resultados

Aislamiento e identificación. Empleando el sistema BD BBL Crystal AutoReader y el BD BBL Crystal MIND Software, se logró aislar e identificar a la *Aeromonas hydrophila* biotipo 296 con un alto factor de confianza (0.9958) a partir de muestras de ostión expendidos en restaurantes de la Ciudad de México. El perfil bioquímico del biotipo 296 de esta bacteria se describe en el cuadro II.

Proliferación blastoide. En el ensayo de proliferación blastoide, linfocitos humanos de sangre periférica fueron expuestos a diferentes dosis (20 y 50 μ g) del sobrenadante de cultivo de *Aeromonas hydrophila*.

Como control negativo (o blanco) se emplearon linfocitos en medio RPMI sin Con-A ni sobrenadante de la bacteria. En este grupo se observó un conteo promedio de incorporación de la timidina tritiada de 1337.3 cpm.

121

Cuadro II. Pruebas bioquímicas de *Aeromonas hydrophila* (biotipo 296) aislada de ostiones.

Bacteria	Biotype	CF	OXI	IND	ARA	MNS	SUC	MEL	RHA	SOR	MNT	ADO	GAL	INO	PHO	BGL	NPG
<i>A. hydrophila</i>	296	0.9958	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>			+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-

Como control positivo de la proliferación blastoide inducida por un mitógeno se emplearon linfocitos con RPMI y con Con-A sin sobrenadante de bacteria, donde se apreció un conteo promedio de 13,148 cpm.

En los dos grupos problemas formados por linfocitos en RPMI con Con-A y en presencia de 20 y 50 μ g de proteína del sobrenadante de la bacteria, se observó un conteo de 336.7 y de 99 cpm, respectivamente, ambos datos muy por abajo del valor basal. Esto podría sugerir que el sobrenadante de cultivo de *Aeromonas hydrophila*, además de inhibir la proliferación de los linfocitos, probablemente podría producir lisis celular ya que los resultados mostraron un conteo menor que el basal, es decir, este filtrado resultaría altamente tóxico para los linfocitos humanos.

El tratamiento estadístico de análisis de varianza revela que el valor de *p* entre el control positivo de proliferación y los dos grupos problemas fue mayor de 0.001.

Con base en los resultados obtenidos, podemos sugerir que el sobrenadante de cultivo de *Aeromonas hydrophila* tiene efecto inhibidor en la proliferación blastoide de linfocitos humanos de sangre periférica, además de tener probable actividad lítica sobre éstos.

SDS-PAGE. El perfil electroforético del sobrenadante de *Aeromonas hydrophila* muestra un bandeo que comienza poco antes del marcador de 33.9 kDa y termina poco antes del marcador de 218 kDa. Dicho perfil está compuesto por nueve bandas, cuyos pesos calculados son: 26, 36, 44, 51, 56, 68, 80, 96 y 110 kDa.

Discusión

En el presente estudio se logró aislar e identificar (con factor de confianza de 0.9958) *Aeromonas hydrophila* biotipo 296 a partir de ostiones expendidos en restaurantes de la Ciudad de México.

Si se considera que las *Aeromonas* pueden ser aisladas de muestras ambientales (marinas, por

ejemplo), alimenticias y de pacientes con cuadro diarreico, es fácil suponer que esta bacteria sea habitante frecuente de organismos como los ostiones que son criados en aguas de esteros, donde las aguas de ríos contaminados contactan con las del mar; y porque los ostiones, como otros bivalvos, se nutren de partículas orgánicas presentes en esas aguas.

Los ostiones podrían representar una importante fuente de infección por *Aeromonas*. Estas bacterias son agentes etiológicos de diarreas mal diagnosticadas, tanto en la clínica como en el laboratorio, ya que el médico y el laboratorista se guiarían hacia las bacterias más conocidas. Es necesario realizar más estudios para profundizar en la frecuencia de éste y otros patógenos presentes en ostiones y alimentos similares, y correlacionar los datos con la presentación de cuadros diarreicos.

Por otra parte, logramos comprobar que el sobrenadante de cultivo de *Aeromonas hydrophila*

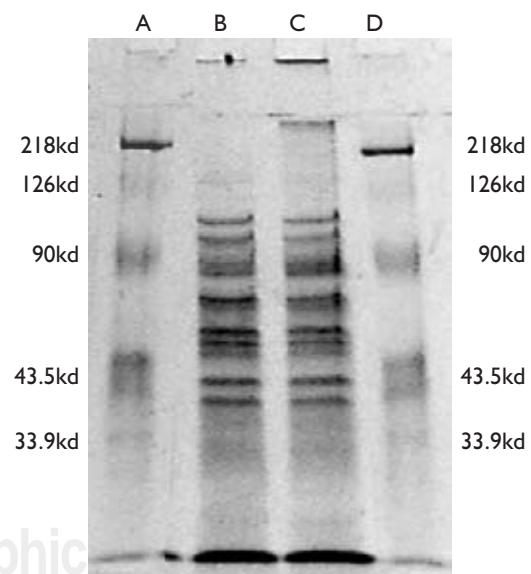


Figura 1. SDS-PAGE, carril A y D son marcadores de pesos moleculares, carriles B y C representan el perfil electroforético del sobrenadante del cultivo de *Aeromonas hydrophila* por duplicado.

produce un efecto inmunosupresor dosis-dependiente sobre linfocitos periféricos humanos. A 20 μg de proteína, la proliferación linfocitaria se vio muy disminuida ($p < 0.001$); pero a 50 μg se notó prácticamente eliminada ($p < 0.001$).

Lo anterior nos hace suponer que, en una infección natural, muy probablemente se pudiera dar el fenómeno de inhibición de la proliferación linfocitaria a nivel local; es decir, bajo ciertas condiciones, la presencia de *Aeromonas hydrophila* y sus productos de excreción pudieran generar inhibición *in situ* de la proliferación de linfocitos. Para la inducción de una adecuada respuesta inmune, se requiere de la proliferación de linfocitos ya sea a nivel mucoso o de cualquier otro órgano linfoide secundario.

Por otra parte, se desconoce mucho sobre los mecanismos de patogenicidad de la *Aeromonas hydrophila*; sin embargo, los resultados reportados por diversos autores muestran diferentes factores de patogenicidad de esta bacteria, incluyendo toxinas termolábiles y termoestables, factores de virulencia como citotoxigenicidad y enterotoxigenicidad, entre otros.

Estos factores de patogenicidad que posee la bacteria podrían participar en la inmunosupresión local, la cual pudiera estar determinada por la concentración *in situ* de los productos de excreción de la bacteria en una relación dosis-dependiente.

De ser así, esperaríamos que el efecto inmunosupresor tendría diferente grado de intensidad, dependiendo si se tratase de un foco inicial o de infección severa; es decir, entre más intensa sea la infección, menor sería la respuesta inmune que se generaría, por lo menos a nivel local. Resulta obvio que de forma complementaria actuarían mecanismos alternos del sistema inmune, así como tejido circundante sano y no afectado. Esto pudiera explicar el grado de severidad con que se presentan los cuadros entéricos asociados a esta bacteria, principalmente en pacientes cuyo diagnóstico y terapia antimicrobiana es tardía o inadecuada.

Por lo anterior, proponemos que la *Aeromonas hydrophila* posee la capacidad de inmunosuprimir (seguramente a nivel local) mediante inhibición de la proliferación linfocitaria. Éste pudiera representar un nuevo mecanismo de patogenicidad que sería interesante estudiar más profundamente.

El perfil electroforético que se observó en *Aeromonas hydrophila* incluye proteínas de variado peso molecular; entre los marcadores 43.5 kDa y los 90 kDa por ejemplo, se aprecia una serie de bandeo, el cual está compuesto por bandas de 44, 51, 56, 68, 80 kDa.

Particularmente la banda de 51 kDa coincide con la proteína de 50 kDa y de 51.5 kDa reportada por otros autores como la aerolisina.

Por otra parte, también se detectó una banda con un peso calculado de 68 kDa, similar a la descrita para la hemolisina de 69.0 kDa.

También fueron detectadas bandas de 26, 36, 96 y 110 kDa, cuyo papel biológico desconocemos hasta el momento.

Estos datos pudieran ser precedente para estudios futuros de purificación e identificación de actividad biológica de cada uno de los componentes proteicos de este sobrenadante.

123

Referencias

- Popoff M. Genus III. *Aeromonas* *kluyveri* and *van Niel* 1936. In: Krieg NR, Holt JG (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 545-548.
- Colwell RR, Mac Donell MT, De Ley J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. Int J Syst Bacteriol 1986; 36: 473-477.
- Castro E, Aguilera AMG, Giono CS, Hernández RCH, Rodríguez CM, Soler FL, Ozores GA, Figueras SMJ. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? Enf Infec Micro 2002; 22 (4): 206-216.
- Williams LA, Larock PA. Temporal occurrence of *Vibrio* species and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments. Applied Environ Microbiol 1985; 50 (6): 1490-1495.
- Callister SM, Agger WA. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. Applied Environ Microbiol 1987; 53: 249-253.
- Ullmann D, Krause G, Knabner D, Weber H, Beutin L. Isolation and characterization of potentially human pathogenic, cytoxin producing *Aeromonas* strains from retailed seafood in Berlin, Germany. J Vet Med 2005; 52: 82-87.

- 124
7. Kühn I, Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alabi SA, Islam MS, Neogi P, Huys G, Janssen P, Kersters K, Möllby R. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 369-373.
 8. Krovacek K, Pasquale V, Baloda SV, Soprano V, Conte M, Dumonte S. Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in Southern Italy. *Applied Environ Microbiol* 1994; 60: 1379-1382.
 9. Wood LV, Ferguson LE, Hogan P, Thurman D, Morgan DR, Dupont HL, Ericsson CD. Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. *Applied Environ Microbiol* 1983; 46 (2): 328-332.
 10. Balaji V, Jesudason MV, Sridharan G. Cytotoxin testing of environmental *Aeromonas* spp. in Vero cell culture. *Indian J Med Res* 2004; 119: 186-189.
 11. Heuzenroeder MW, Wong CYF, Flower RLP. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp: Correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol Letters* 1999; 174: 131-136.
 12. Moura ML, Falcon MR, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 237-242.
 13. Vila J, Marco F, Soler L, Chacon M, Figueras MJ. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 49: 697-702.
 14. Rahman M, Colque NN, Kühn I, Huys G, Swings J, Möllby R. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Applied Environ Microbiol* 2002; 68: 650-655.
 15. Agger WA. Diarrhea associated with *Aeromonas hydrophila*. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5: 5106-5108.
 16. Asao T, Kinoshita Y, Kozaki S, Uemura T, Sakaguchi G. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect Immun* 1984; 46: 122-127.
 17. Challapalli M, Tess BR, Cunningham DG, Chopra AK, Houston CW. *Aeromonas*-associated diarrhea in children. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 693-698.
 18. Freij BJ. *Aeromonas*: Biology of the organism and diseases in children. *Pediatr Infect Dis* 1984; 3: 164-175.
 19. Watson IM, Robinson JO, Burke V, Gracey M. Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors, and clinical features. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 48-51.
 20. Kozaki S, Asao T, Kamata Y, Sakaguchi G. Characterization of *Aeromonas sobria* hemolysin by use of monoclonal antibodies against *Aeromonas hydrophila* hemolysins. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1782-1786.
 21. Kostrzynska M, Dooley JSG, Shimojo T, Sakata T, Trust TJ. Antigenic diversity of the s-layer proteins from pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *J Bacteriology* 1992; 174: 40-47.
 22. Daily OP, Joseph LSW, Coolbaugh JC, Walker RI, Merrell BR, Rollins DM, Seidler RJ, Colwell RR, Lissner CR. Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 769-777.
 23. Guimarães MS, Andrade JRC, Freitas-Almeida AC, Ferreira MCS. *Aeromonas hydrophila* vacuolating activity in the Caco-2 human enterocyte cell line as a putative virulence factor. *FEMS Microbiol Letters* 2002; 207: 127-131.
 24. Ascencio F, Martinez AW, Romero MJ, Wadstroem T. Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 20: 219-229.
 25. Bernheimer AW, Avigad LS. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1974; 9 (6): 1016-1021.
 26. Buckley JT, Halasa LN, Lund KD, MacIntyre S. Purification and some properties of the hemolytic toxin aerolysin. *Can J Biochem* 1981; 59 (6): 430-435.
 27. Song T, Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 477-482.
 28. Kindschuh M, Pickering LK, Cleary TG, Ruiz PG. Clinical and biochemical significance of toxin production by *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 916-921.
 29. Kuijper EJ, Bol P, Peeters MF, Steigerwalt AG, Zanen HC, Brenner DJ. Clinical and epidemiologic aspects of members of *Aeromonas* DNA hybridization groups isolated from human feces. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1531-1537.
 30. Chakraborty T, Montenegro MA, Sanyal SC, Helmuth R, Bulling E, Timmis KN. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect Immun* 1984; 46: 435-441.
 31. Chopra AK, Peterson JW, Xu Xin-J, Coppenhaver DH, Houston CW. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathogen* 1996; 21: 357-377.
 32. Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, Kruk TMAC, Caldeira R, Woodward DL, Rodgers FG. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1048-1054.
 33. Pollard DR, Johnson LWM, Lior H, Tyler SD, Roze KR. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2477-2481.
 34. Wong CYF, Heuzenroeder MW, Flower RLP. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology* 1998; 144: 291-298.
 35. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.