



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AEROMONADALES
MÓVILES AISLADAS DE PECES CULTIVADOS EN URUGUAY**

Alejandro Perretta

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2016



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AEROMONADALES
MÓVILES AISLADAS DE PECES CULTIVADOS EN URUGUAY**

Alejandro Perretta

Dr. Pablo Zunino
Director de Tesis

Dra. Karina Antúnez
Codirectora de Tesis

2016

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Claudia Piccini; MS, PhD
Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" -
Ministerio de Educación y Cultura - Uruguay

Laura Bentancor; MS, PhD
Departamento de Bacteriología y Virología
Instituto de Higiene - Facultad de Medicina
Universidad de la República - Uruguay

Martín Fraga; MS, PhD
Plataforma de Salud Animal
Instituto de Investigaciones Agropecuarias - Uruguay

2016

DEDICATORIA

...para Federico, Anaclara y Valeria

AGRADECIMIENTOS

- A Pablo Zunino y Karina Antúnez, gracias por compartir el conocimiento conmigo, abrireme las puertas del IIBCE para poder llevar a cabo este trabajando y por la paciencia y el apoyo en todo momento.
- A Daniel Carnevia por el apoyo continuo y la colaboración brindada en cada uno de mis emprendimientos.
- A todo el personal docente y no docente del Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de Veterinaria por tantos años de apoyo y colaboración.
- A Belén Branchiccela y todo el personal del Departamento de Microbiología del IIBCE por el apoyo y la colaboración en todas las tareas llevadas a cabo allí.
- A Rodrigo Puentes, Uruguaysito Benavides y todo el personal del Área Inmunología de la Facultad de Veterinaria por la colaboración con las tareas de biología molecular llevadas a cabo.
- A Amy Carnahan, P. Srinivasan, Pol Huedo y Boris Jovanovic por la colaboración en aspectos relacionados con la identificación de aeromonadales y la evaluación de virulencia de los mismos.
- A los acuaristas, productores y veterinarios que aportaron casos clínicos para ésta investigación.
- A Claudia Piccini, Laura Bentancor, Martín Fraga, Leonardo Galli, Rolando Mazzoni y Daniel Carnevia por la revisión crítica y los aportes realizados al documento final de tesis.
- A *Sci-Hub* y toda la comunidad de investigadores que trabajan por una ciencia *open access*.
- A mi familia!!! Por ser el motorcito que me impulsa día a día.

ÍNDICE

Resumen	xii
Summary	xiii
1. Introducción	1
1.1. Aspectos taxonómicos	1
1.2. Principales características de los aeromonadales móviles	3
1.3. Aislamiento e identificación	5
1.3.1. Identificación por métodos bioquímicos	6
1.3.2. Identificación por métodos moleculares	6
1.4. Antecedentes en la caracterización de Aeromonas spp.	7
1.4.1. Caracterización bioquímica	7
1.4.1.1. Resistencia a antibióticos	9
1.4.2. Caracterización molecular	10
1.5. La enfermedad en los peces	10
1.5.1. Signos clínicos	11
1.5.2. Patogenia	11
1.5.3. Hallazgos anatomopatológicos y paraclínicos	12
1.5.4. Epizootiología	13
1.6. Importancia para la salud humana	13
2. Hipótesis	15
3. Objetivos	15
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. Materiales y Métodos	16
4.1. Origen de los aislamientos	16
4.2. Identificación fenoespecífica y caracterización bioquímica	16
4.2.1. Actividad hemolítica	17
4.2.2. Antibiograma	17
4.3. Identificación y caracterización molecular	19
4.3.1. Búsqueda de genes vinculados a factores de virulencia	20
4.3.2. Tipificación mediante técnicas de <i>rep</i>-PCR	20
4.3.3. Análisis de conglomerados a partir de la tipificación de los aislamientos	21
4.3.4. Análisis filogenéticos en base a las secuencias de los genes ARNr 16S y <i>gyrB</i>	21
4.4. Caracterización patológica	22
4.4.1. Modelo <i>in vivo</i> para la evaluación de virulencia	22
4.4.1.1. Sujetos experimentales	22
4.4.1.2. Confección del inóculo y administración a los peces	23
4.4.2. Hallazgos de histopatología	24
4.5. Análisis estadísticos	24
5. Resultados	25
5.1. Origen e identificación de los aislamientos	25
5.2. Caracterización bioquímica	27
5.3. Antibiograma	28
5.4. Genes de virulencia	30
5.5. Caracterización genética	34
5.5.1. Tipificación con técnicas <i>rep</i>-PCR	34
5.5.1.1. Empleo de <i>primers</i> BOX	34
5.5.1.2. Empleo de <i>primers</i> ERIC	37
5.5.1.3. Empleo de <i>primers</i> REP	40
5.5.2. Análisis filogenético a partir de las secuencias del ARNr 16S	41
5.5.2.1. Análisis intraespecífico para las especies nacionales	41
5.5.2.2. Análisis interespecífico de los aislamientos nacionales	42
5.5.2.3. Análisis filogenético realizado entre los aislamientos nacionales y las secuencias depositadas en RDP	43
5.5.3. Análisis filogenético a partir de las secuencias del gen <i>gyrB</i>	45
5.5.3.1. Análisis intraespecífico para las especies nacionales	45

5.5.3.2. Análisis interespecífico de los aislamientos nacionales	46
5.5.3.3. Análisis filogenético entre los aislamientos nacionales y las secuencias depositadas en <i>Aeromonas</i> MLST <i>Databases</i>	46
5.6. Caracterización patológica	53
5.6.1. Elección de aislamientos candidatos	53
5.6.2. Cálculo de DL50 ₉₆ para cada aislamiento seleccionado	54
5.6.2.1. Aislamiento H2	54
5.6.2.2. Aislamiento H11	56
5.6.2.3. Aislamiento V2	57
5.6.2.4. Aislamiento V6	59
5.6.3. Comparación entre aislamientos	59
5.6.4. Hallazgos histopatológicos en los peces infectados	60
6. Discusión	63
6.1. Origen e identificación de los aislamientos	63
6.1.1. Hallazgos epizootiológicos	65
6.2. Caracterización bioquímica	66
6.3. Antibiograma	68
6.3.1. Índice de Multirresistencia a Antibióticos (MAR)	69
6.4. Caracterización genética	70
6.4.1. Genes de virulencia	70
6.4.1.1. <i>Aeromonas allosaccharophila</i>	72
6.4.1.2. <i>Aeromonas bestiarium</i>	72
6.4.1.3. <i>Aeromonas caviae/punctata</i>	72
6.4.1.4. <i>Aeromonas hydrophila</i>	73
6.4.1.5. <i>Aeromonas veronii</i>	74
6.4.2. Tipificación mediante técnicas de <i>rep</i> -PCR	75
6.4.2.1. Tipificación de <i>Aeromonas hydrophila</i>	76
6.4.2.2. Tipificación de <i>Aeromonas caviae/punctata</i>	78
6.4.2.3. Tipificación de <i>Aeromonas veronii</i>	79
6.4.3. Análisis filogenéticos	79
6.4.3.1. Empleo de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S	80
6.4.3.2. Empleo de la secuencia del gen <i>gyrB</i>	80
6.5. Caracterización patológica	83
7. Conclusiones	86
8. Bibliografía	88
Anexo 1: Composición de medios de cultivo	106
Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN y composición de solución fijadora de Davidson	107
Anexo 3: Perfiles de identificación molecular de los aislamientos nacionales de <i>Aeromonas</i> spp. para los genes ARNr 16S y <i>gyrB</i>	108
Anexo 4: Árboles filogenéticos correspondientes al análisis de los genes ARNr 16S y <i>gyrB</i> de los aislamientos nacionales de <i>Aeromonas</i> spp.	143

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los rasgos fenotípicos de *Aeromonas* spp. móviles en los que se halló 66
discrepancia entre los perfiles obtenidos de aislamientos de peces de Uruguay y la información
publicada (Chong *et al.*, 1980, Carnahan *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 2003).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con primers BOX realizada 35
sobre *Aeromonas hydrophila* (H) y *A. punctata* (P) aisladas de peces cultivados en Uruguay (L:
ladder 10 kb).

Figura 2. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con primers BOX de 35
Aeromonas allosaccharophila (A), *A. bestiarium* (B) y *A. veronii* (V) aisladas de peces cultivados
en Uruguay (L: ladder 10 kb).

Figura 3. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 36
tipificación de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H1 a H13) con primers BOX mediante
empleo del software Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de bootstrap
calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*: indican aislamientos procedentes de un mismo
brote epizootico).

Figura 4. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 36
tipificación de aislamientos de *Aeromonas veronii* (V1 a V11) con primers BOX mediante
empleo del software Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de bootstrap
calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*, +: símbolos iguales indican aislamientos
procedentes de un mismo brote epizootico).

Figura 5. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 37
tipificación de aislamientos de *Aeromonas punctata* (P1, P2, P4 y P5) con primers BOX
mediante empleo del software Gelcompar II[®]. El número indica el valor de bootstrap calculado
sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*: aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

Figura 6. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con primers ERIC realizada 37
sobre *Aeromonas allosaccharophila* (A), *A. hydrophila* (H) y *A. punctata* (P) aisladas de peces
cultivados en Uruguay. L: ladder 10kb.

Figura 7. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con primers ERIC y REP 38
realizada sobre *Aeromonas bestiarium* (B) y *A. veronii* (V) aisladas de peces cultivados en
Uruguay. L: ladder 10kb.

Figura 8. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 39
tipificación de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H1 a H3 y H5 a H13) con primers ERIC
mediante empleo del software Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de
bootstrap calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*: aislamientos procedentes de un mismo
brote epizootico).

Figura 9. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 39
tipificación de aislamientos de *Aeromonas veronii* (V1 a V11) con primers ERIC mediante
empleo del software Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de bootstrap
calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*, +: símbolos iguales indican aislamientos
procedentes de un mismo brote epizootico).

Figura 10. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 39
tipificación de aislamientos de *Aeromonas punctata* (P1 a P4) con primers ERIC mediante
empleo del software Gelcompar II[®]. El número indica el valor de bootstrap calculado sobre 500
repeticiones ($p < 0,05$) (*: aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

Figura 11. Corrida electroforética en la que se muestran los resultados de la PCR empleando 40
primers REP realizada sobre *Aeromonas allosaccharophila* (A), *A. hydrophila* (H) y *A. punctata*
(P) aisladas de peces cultivados en Uruguay (L: ladder 10kb).

Figura 12. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 41
tipificación de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H1, H2, H4, H6 y H8 a H12) con primers
REP mediante empleo del software Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de
bootstrap calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$).

Figura 13. Análisis de clusters realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la 41

tipificación de aislamientos de <i>Aeromonas veronii</i> (V1, V2 y V5 a V8) con <i>primers</i> REP mediante empleo del <i>software</i> Gelcompar II [®] . El número en cada nodo indica el valor de <i>bootstrap</i> calculado sobre 500 repeticiones (p<0,05).	
Figura 14. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del ARNr 16S de <i>Aeromonas hydrophila</i> aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (*: indica aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).	41
Figura 15. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del ARNr 16S de <i>Aeromonas punctata</i> aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (*,+ : signos iguales indica aislamientos procedentes de un mismo brote).	42
Figura 16. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del ARNr 16S de <i>Aeromonas veronii</i> aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (*: indica aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).	42
Figura 17. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre todas las secuencias del ARNr 16S de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (a, b, c, d, e: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).	42
Figura 18. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen ARNr 16S de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos RDP en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos: A2 de <i>Aeromonas allosaccharophila</i> ; B1 y B2 de <i>A. bestiarium</i> ; H2, H3, H5 a H13 de <i>A. hydrophila</i> y V1 a V9 de <i>A. veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]).	43
Figura 19. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen ARNr 16S de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos RDP en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento A1 de <i>Aeromonas allosaccharophila</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]).	44
Figura 20. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen ARNr 16S de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos RDP en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos: C1 de <i>Aeromonas caviae</i> , H4 de <i>A. hydrophila</i> y P1 a P5 de <i>A. punctata</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]).	44
Figura 21. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas hydrophila</i> (H2 a H13) aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (*: indica aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).	45
Figura 22. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas veronii</i> (V1 a V11) aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (*,+ : signos iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).	45
Figura 23. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas punctata</i> (P1 a P5) aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (*,+ : signos iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).	45
Figura 24. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre todas las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (<i>software</i> MEGA6 [®]) (a, b, c, d, e: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).	46
Figura 25. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento B2 de <i>Aeromonas bestiarium</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por	47

	el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	
Figura 26.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H2, H6, H11 y H12 de <i>Aeromonas hydrophila</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	47
Figura 27.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento H4 de <i>Aeromonas hydrophila</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	48
Figura 28.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H5 y H8 de <i>Aeromonas hydrophila</i> y el aislamiento A2 de <i>Aeromonas allosaccharophila</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	48
Figura 29.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos P1 a P5 de <i>Aeromonas punctata</i> y el aislamiento C1 de <i>Aeromonas caviae</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	48
Figura 30.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H3 y H4 de <i>Aeromonas hydrophila</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	49
Figura 31.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H7, H9, H10 y H13 de <i>Aeromonas hydrophila</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	50
Figura 32.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V1 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	50
Figura 33.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V2 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	51
Figura 34.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V3 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	51
Figura 35.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V4 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	51
Figura 36.	Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos V5 y V6 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6 [®]).	52

Figura 37. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos V8 y V9 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6®).	52
Figura 38. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V7 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6®).	52
Figura 39. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/ <i>Aeromonas</i> en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos V10 y V11 de <i>Aeromonas veronii</i> . La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método <i>Maximum Composite Likelihood</i> (software MEGA6®).	53
Figura 40. Gráfico en el que se representa la ecuación de regresión simple correspondientes al modelo: $\%mort_{H2} = \sqrt{(-2019,28 + 0,148485\sqrt{[H2]})}$, utilizado para el cálculo de DL50 ₉₆ del aislamiento H2 de <i>Aeromonas hydrophila</i> (trazo continuo: representación gráfica de la función, trazo punteado: límites de confianza del modelo).	55
Figura 41. Gráfico en el que se representa la ecuación de regresión simple correspondientes al modelo: $\%mort_{H11} = \sqrt{(-279,163 + 0,00000218502 * [H11])}$, utilizado para el cálculo de DL50 ₉₆ del aislamiento H11 de <i>Aeromonas hydrophila</i> (trazo continuo: representación gráfica de la función, trazo punteado: límites de confianza del modelo).	57
Figura 42. Gráfico en el que se representa la ecuación de regresión simple correspondientes al modelo: $\%mort_{V2} = \sqrt{(-734,483 + 0,00000254089 * [V2])}$, utilizado para el cálculo de DL50 ₉₆ del aislamiento V2 de <i>Aeromonas veronii</i> (trazo continuo: representación gráfica de la función, trazo punteado: límites de confianza del modelo).	58

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Principales hallazgos histopatológicos observados en branquias de *Australoheros facetus* infectados experimentalmente con distintos aislamientos de *A. hydrophila* (H2 y H11) y *A. veronii* (V2 y V6) procedentes de peces cultivados en Uruguay (C: animales no infectados) (400x). Los asteriscos indican zonas de hemorragia al interior de los filamentos branquiales y las flechas indican edema lamelar.

Imagen 2. Principales hallazgos histopatológicos observados en hígado de *Australoheros facetus* infectados experimentalmente con distintos aislamientos de *A. hydrophila* (H2 y H11) y *A. veronii* (V2 y V6) procedentes de peces cultivados en Uruguay (C: animales no infectados) (200x). Las flechas indican distintos grados de vacuolización del parénquima hepático.

Imagen 3. Principales hallazgos histopatológicos observados en riñón posterior de *Australoheros facetus* infectados experimentalmente con distintos aislamientos de *A. hydrophila* (H2 y H11) y *A. veronii* (V2 y V6) procedentes de peces cultivados en Uruguay (C: animales no infectados) (400x). Las flechas de trazo fino muestran acúmulos de células necróticas, las flechas de trazo grueso indican depósitos de material hialino y los asteriscos ocupan el espacio de Bowman aumentado.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fenoespecies y genopecies dentro del género <i>Aeromonas</i> (modificado de Martin-Carnahan y Joseph, 2005).	2
Tabla 2. principales características bioquímicas de <i>Aeromonas hydrophila</i> (tomada de Aoki, 1999).	4
Tabla 3. Estándares de sensibilidad empleados para la determinación de resistencia en los aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. móviles provenientes de peces de Uruguay, mediante el método de difusión en placa (Kirby-Bauer).	18
Tabla 4. Características de los <i>primers</i> empleados para realizar la identificación molecular de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces cultivados en Uruguay.	19
Tabla 5. Secuencia de nucleótidos de los <i>primers</i> empleados en la identificación de los factores de virulencia de los aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. y tamaño en pares de base (pb) del producto de reacción esperado.	20
Tabla 6. Características de los <i>primers</i> empleados para la tipificación genética (<i>rep</i> -PCR) de los aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. realizados a partir de peces cultivados en Uruguay.	21
Tabla 7. Principales características de los aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. móviles, realizados a partir de peces cultivados en Uruguay.	25
Tabla 8. Prueba de independencia entre las variables epizootiológicas y las especies de <i>Aeromonas</i> spp. móviles que se aíslan de peces cultivados en Uruguay.	27
Tabla 9. Características bioquímicas de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de organismos acuáticos cultivados en Uruguay. Los valores corresponden a resultados positivos expresados como porcentajes del total de aislamientos, el número entre paréntesis corresponde al total de aislamientos evaluados para cada especie.	27
Tabla 10. Resultados del antibiograma realizado sobre <i>Aeromonas</i> spp. móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. Se empleo la técnica de difusión en placa según protocolo de CLSI (2006). Los valores corresponden al diámetro del halo de inhibición en milímetros.	28
Tabla 11. Índices de multiresistencia a antibióticos (MAR) calculados para <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces cultivados en Uruguay sobre un total de seis antibióticos evaluados.	30
Tabla 12. Frecuencias de detección (en porcentaje) de cinco genes de virulencia relevados en <i>Aeromonas</i> spp. móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay.	31
Tabla 13. Genotipos de aeromonadales aislados de peces cultivados en Uruguay, obtenidos a partir de la búsqueda de cinco genes de virulencia con <i>primers</i> genéricos, frecuencia de identificación de cada uno y relación con la actividad hemolítica de los aislamientos.	32
Tabla 14: Prueba de independencia entre las variables gen de virulencia y actividad hemolítica para distintos aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. procedentes de peces cultivados en Uruguay.	32
Tabla 15. Prueba de independencia (χ^2) entre la variable genotipos de virulencia y variables epizootiológicas en <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces de Uruguay con algunas variables epizootiológicas.	33
Tabla 16. Índices de mortalidad (%) observados en <i>Australoheros facetus</i> infectados experimentalmente con distintos aislamientos de <i>Aeromonas hydrophila</i> (H2 y H11) y <i>Aeromonas veronii</i> (V2 y V6).	54
Tabla 17. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento H2 de <i>Aeromonas hydrophila</i> , inoculado en <i>Australoheros facetus</i> .	54
Tabla 18. Características de los distintos modelos regresión simple evaluados para el cálculo de DL50 ₉₆ del aislamiento H2 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	55
Tabla 19. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento H11 de <i>Aeromonas hydrophila</i> , inoculado en <i>Australoheros facetus</i> .	56
Tabla20. Características de los distintos modelos regresión simple evaluados para el cálculo de DL50 ₉₆ del aislamiento H11 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	56
Tabla21. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento V2 de <i>Aeromonas veronii</i> , inoculado en <i>Australoheros facetus</i> .	57
Tabla 22. Características de los distintos modelos regresión simple evaluados para el cálculo de DL50 ₉₆ del aislamiento V2 de <i>Aeromonas veronii</i> .	58
Tabla 23. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento V6 de <i>Aeromonas veronii</i> , inoculado en <i>Australoheros facetus</i> .	59
Tabla 24. Dosis letal 50 en 96 horas (DL50 ₉₆) para distintos aislamientos de <i>Aeromonas hydrophila</i> (H2 y H11) y <i>Aeromonas veronii</i> (V2 y V6) obtenidas a partir de infección experimental del pez <i>Australoheros facetus</i> .	59

RESUMEN

Las bacterias aeromonadales móviles se ubican entre los patógenos más importantes para la salud de los sistemas de acuicultura de agua dulce a nivel mundial, siendo responsables de epizootias con mortandades masivas de peces en cortos períodos de tiempo que afectan de manera drástica la economía de las piscigranjas a cualquier escala. Son consideradas a su vez agentes zoonóticos de creciente relevancia dado que a partir de síndromes intestinales o infecciones extraintestinales son capaces de alterar de manera grave la salud del paciente humano. A pesar de la relevancia que poseen estos microorganismos existen varias discrepancias en aspectos relacionados con la identificación de especies y la caracterización de cepas o patotipos diferentes. Distintos miembros del género *Aeromonas* han sido identificados en nuestro país como el agente infeccioso más prevalente entre los peces de cultivo, ya sea con destino al consumo humano u ornamentales. El objetivo de esta tesis fue caracterizar las cepas de *Aeromonas* móviles aisladas de peces cultivados en nuestro país desde el punto de vista fenotípico, genético y patológico. Para ello se emplearon 33 aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de distintas especies de peces provenientes de diversos sistemas de cultivo. Además de ser identificados a nivel bioquímico (*kit* API 20NE[®]) y molecular (secuenciación de los genes ARNr 16S y *gyrB*), se evaluó en cada aislamiento la susceptibilidad a diez antibióticos (amoxicilina ácido clavulánico, ampicilina con y sin dicloxacilina, enrofloxacin, eritromicina, nitrofurantoína, oxitetraciclina, penicilina, sulfametoxazole trimetoprim y tiamfenicol) y la presencia/ausencia de cinco genes de virulencia (*act*, *alt*, *ast*, *ela* y *lip*). Se llevó a cabo a su vez una caracterización global del genoma de cada aislamiento mediante técnicas *rep*-PCR empleando los *primers* BOX, ERIC y REP y un estudio filogenético utilizando las secuencias de los genes ARNr 16S y *gyrB*. La virulencia de los aislamientos más representativos se determinó mediante cálculo de dosis letal cincuenta en peces (*Australoheros facetus*). Se identificaron por primera vez para el país las especies *A. allosacharophila*, *A. bestiarium* y *A. punctata*; siendo *Aeromonas hydrophila* y *A. veronii* las especies con mayor prevalencia (38,2% y 32,4% respectivamente). Todos los aislamientos fueron resistentes a por lo menos tres de los antibióticos evaluados, detectándose multirresistencia en el 82,3% de los mismos. Se identificaron diez genotipos de virulencia diferentes, correlacionados con la especie de *Aeromonas* que lo posee y la actividad hemolítica del aislamiento. *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium* y *A. punctata* presentan estabilidad en la distribución de sus genes de virulencia. El genotipo *act*⁺/*alt*⁺/*ast*⁺/*ela*⁺/*lip*⁺ fue el más prevalente (26,5%). Los distintos aislamientos de *A. punctata* poseen estructura clonal para las técnicas de tipificación genómica usadas, mientras que el resto de las especies poseen elevada diversidad genética. La virulencia de los aislamientos de aeromonadales móviles fue proporcional a la cantidad de genes de virulencia que poseen.

SUMMARY

Motile aeromonads are one of the most important pathogens in worldwide freshwater aquaculture. They are responsible of epizooties with massive mortalities of fishes in short periods of time that affects drastically the economy of any scale farms. Because they are responsible of severe human health damage, by intestinal or extra-intestinal syndromes, this group of bacteria are considered, at the same time, zoonotic agents with increasing importance. Despite the relevance of this microorganisms, there are discrepancies in those aspects related with species identification and characterization of different strains or pathotypes. Some members of *Aeromonas* genus were identified in Uruguay as the most prevalent infectious agent in human consumption and ornamental cultured fishes. The aim of this thesis was to characterize the strains of motile *Aeromonas* isolated from uruguayan aquaculture fishes in a phenotypic, genotypic and pathogenic approach. For that we use 33 *Aeromonas* spp. isolated from different species of fishes cultured in several types of systems. The strains were identified at phenotypical (API 20NE[®]) and molecular (16S rRNA and *gyrB* sequentiation) level and the susceptibility of ten antibiotics was evaluated (amoxicillin clavulanate, ampicillin with and without dicloxacillin, enrofloxacin, erythromycin, nitrofurantoin, oxytetracycline, penicillin, sulfametoxazole trimethoprim and thiamphenicol). Also was evaluated the presence/absence of five virulence genes in each strain (*act*, *alt*, *ast*, *ela* y *lip*) and was conducted a global genome characterization using the rep-PCR technique, employing BOX, ERIC and REP primers. A phylogenetic analysis of 16S rRNA and *gyrB* gene sequences was conducted too. Virulence of some representative isolates was determined by fifty lethal dose in fishes (*Australoheros facetus*). The species *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium* and *A. punctata* were identified for the first time in Uruguay. *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* were the most prevalent species in uruguayan aquaculture (38,2% and 32,4% respectively). All the isolates were resistant of at least three antibiotics and 82,3% of them were multiresistant. We identified ten different virulence genotypes and its was correlated with the *Aeromonas* species and their haemolytic activity. *act*⁺/*alt*⁺/*ast*⁺/*ela*⁺/*lip*⁺ was the most prevalent virulence genotype identified (26,5%). The genome of *Aeromonas punctata* presented clonal structure by rep-PCR techniques, while the rest of species had high genetic diversity. Motile aeromonads virulence was proportional with the number of virulence genes of each isolate.

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pertenecientes al orden Aeromonadales (clase Gammaproteobacteria) son esencialmente ubicuos en toda la biósfera microbiana y pueden ser aislados a partir de prácticamente todos los nichos medioambientales donde existen ecosistemas bacterianos, entre los que se incluyen ambientes acuáticos, peces, alimentos, mascotas, aves, garrapatas, insectos y suelos naturales, entre otros (Janda y Abbott, 2010).

Aeromonadacea, la familia representativa del orden, está compuesta por bacilos Gram negativos, aerobios facultativos, catalasa y oxidasa positivos (a excepción de *Tolomonas* spp.). El género tipo dentro de la familia es *Aeromonas*, que incluye bacterias primariamente acuáticas aisladas frecuentemente de agua dulce y estuarina y en asociación con animales acuáticos, aunque también pueden ser aisladas de aguas residuales, aguas para consumo y sedimentos, entre otros. Algunas especies son patógenas para el ser humano y otros vertebrados endotermos, así como también lo son para varias especies de ectotermos (anfibios, peces, reptiles) e invertebrados (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

1.1. Aspectos taxonómicos

La taxonomía de los aeromonadales es compleja y ha sido objeto de confusiones y controversias. El solapamiento de perfiles bioquímicos y la pobre correlación entre identificaciones fenotípicas y genotípicas, junto con la alta similaridad interespecífica en la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (96,7 a 100%) han llevado a continuas revisiones del estatus taxonómico de los miembros de *Aeromonas* (Soler *et al.*, 2003; Figueras, 2005; Ormen *et al.*, 2005; Martínez-Murcia *et al.*, 2007).

Clásicamente se han establecido dos grupos con características fenotípicas diferenciales dentro del género *Aeromonas*. Por un lado están las especies psicrófilas, bacterias inmóviles que no crecen a 37°C y cuyo principal representante es *A. salmonicida*, importante patógeno principalmente en salmonicultura. Por otro lado está el grupo de especies mesófilas, móviles, que pueden crecer a 37°C. Los representantes más típicos de este último grupo son *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* y *A. veronii*, microorganismos que son reconocidos como agentes causales de un síndrome en peces conocido como "septicemia hemorrágica bacteriana" ó "septicemia por *Aeromonas* móviles" (SAM), entre otras denominaciones. A su vez estas bacterias han sido implicadas en diversas afecciones en humanos y animales domésticos y silvestres (Janda y Duffey, 1988; Joseph y Carnahan, 1994; Janda y Abbott, 1998; Cipriano, 2001; Korbsrisate *et al.*, 2002).

La primera identificación de un microorganismo aeromonadal fue realizada por Zimmerman en 1890, quien aisló del agua de la red domiciliaria de la ciudad de Gemnitz (Alemania) un bacilo Gram negativo móvil que denominó *Bacillus punctatus*. Posteriormente Sanarelli (1891), aisló una bacteria similar de la sangre y linfa de ranas a la cual denomina *Bacillus hydrophilus fuscus*, nombre que es cambiado en 1901 por el de *Bacterium hydrophilium* a sugerencia de Chester. En la primera edición del Manual Bergey's (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1923), esta especie fue erróneamente designada como *Proteus hydrophilus*. El género *Aeromonas*, propuesto por Kluyver y van Niel en 1936, es finalmente adoptado en la séptima edición del Manual Bergey's (1957), momento en

el que se clasifica como *Aeromonas hydrophila*, miembro de la familia *Vibrionaceae*, al microorganismo primeramente aislado por Zimmerman (Poobalane, 2007).

En 1976, Popoff y Véron proponen un esquema basado en 59 variables bioquímicas para esclarecer la clasificación de *Aeromonas* spp. móviles a nivel fenotípico, dado que hasta el momento existían varias especies, sinónimos y subespecies que determinaban complejos específicos poco delimitados, tal es así que establecen la existencia de tres únicas feno especies de *Aeromonas* móviles, a saber: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* (Popoff y Véron, 1976). Esta definición de tres especies fue confirmada posteriormente por análisis de oligosacáridos (Shaw y Hodder, 1978) e hibridación de ADN (Popoff *et al.*, 1981), reconociéndose a su vez que dentro de estas especies existen subgrupos.

Posteriormente se demostró que las feno especies de *Aeromonas* móviles descritas anteriormente son en realidad complejos genoespecíficos o *clusters* genéticos que responden a diferentes grupos de hibridación (GH), basados en la cinética de reasociación ADN-ADN con las cepas tipo o de referencia (ver Tabla 1). Esto ha provocado la aparición de un gran número de nuevas especies a partir de la creación de nuevos GH debido a que nuevas cepas aisladas no concuerdan con ninguno de los grupos conocidos (Janda, 1991; Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

Tabla 1. Feno especies y genoespecies dentro del género *Aeromonas* (modificado de Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

Grupo de hibridación	Cepa referencia	Genoespecie	Feno especie
1	ATCC 7966 ^T	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
2	ATCC 14715 ^T	<i>A. bestiarium</i>	<i>A. tipo hydrophila</i>
3	ATCC 33658 ^T	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> subespecie <i>salmonicida</i>
	ATCC 33659 ^T		<i>A. salmonicida</i> subespecie <i>achromogenes</i>
	ATCC 27013 ^T		<i>A. salmonicida</i> subespecie <i>masoucida</i>
	ATCC 49393 ^T		<i>A. salmonicida</i> subespecie <i>smithia</i>
4	CDC 0434-84 (DS) Popoff C316	Sin nombre	<i>A. tipo hydrophila</i>
4	ATCC 15468 ^T	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
5A	CDC 0862-83 (DS)		<i>A. tipo caviae</i>
5B	CDC 0435-84 (DS)	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
5B	ATCC 33907 ^T		
6	ATCC 23309 ^T NCMB 74 ^T	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. caviae</i>
7	CIP 7433 ^T NCMB 12065 ^T	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
8X	CDC 0437-84 (DS)	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>
8Y	ATCC 9071 (RS)		<i>A. veronii</i> biovar. <i>sobria</i>
9	ATCC 49568 ^T	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
10	ATCC 35624 ^T	<i>A. veronii</i> biovar. <i>veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar. <i>veronii</i>
11	ATCC 35941 (RS)	Sin nombre	<i>Aeromonas</i> sp. (ornitina positivo)
12	ATCC 43700 ^T	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>
13	ATCC 43946 (RS)	<i>Aeromonas</i> Grupo 501	<i>A. tipo schubertii</i>
14	ATCC 49657 ^T	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>
15	ATCC 51208 ^T CECT 4199 ^T	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
16	ATCC 51929 ^T CECT 4342 ^T	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
17	LMG 17541 ^T	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>

^T: indica cepa tipo para la especie

En la actualidad, se ha demostrado que *Aeromonas* conforma una unidad monofilética dentro del subgrupo γ -3 de la clase Proteobacteria, por lo que el grupo fue escindido de la familia *Vibrionaceae* por poseer características propias; de este modo se crea la familia *Aeromonadaceae* y un nuevo orden que la contiene, Aeromonadales (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Ruimy *et al.*, 1994; Messner y Sleytr, 2002; Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

Por otro lado cabe destacar que el género *Aeromonas* es también antigénicamente diverso. Se han desarrollado varios esquemas de tipificación serológica, basados principalmente en la presencia de determinantes somáticos (O) termoestables, de los cuales el más aceptado es el de Sakazaki y Shimada (1984). Estos autores documentaron la existencia de 44 serogrupos diferentes, algunos de los cuales han demostrado ser altamente patógenos, por ejemplo el serogrupo O:11, responsable de graves patologías invasivas en humanos como septicemia, meningitis o peritonitis y el serogrupo O:34, responsable de infecciones de heridas en humanos con mionecrosis y epizootias de septicemia en *Carassius auratus* (Janda *et al.*, 1996).

En los últimos años se han identificado 16 nuevas especies de *Aeromonas*, a saber: *A. aquatica*, *A. bivalvium*, *A. cavernicola*, *A. diversa*, *A. finlandensis*, *A. fluvialis*, *A. lacus*, *A. molluscorum*, *A. piscicola*, *A. rivipollensis*, *A. rivuli*; *A. sanarelli*; *A. sharmana*, *A. simiae*, *A. taiwanensis* y *A. tecta*. Todas ellas se identificaron y clasificaron en base a estudios filogenéticos e hibridación ADN-ADN y hasta el momento no se han creado nuevos grupos de hibridación que las contengan (Harf-Monteil *et al.*, 2004; Miñana-Galbis *et al.*, 2004; Saha y Chakrabarti, 2006; Miñana-Galbis *et al.*, 2007; Baez-Hidalgo *et al.*, 2009; Alperi *et al.*, 2010a y 2010b; Martínez-Murcia *et al.*, 2010; Miñana-Galbis *et al.*, 2010; Figueras *et al.*, 2011; Baez-Hidalgo *et al.*, 2015; Marti y Balcázar, 2015).

A su vez se reclasificaron las especies *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. aquariorum* como pertenecientes al nuevo taxón: *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb. nov. (Baez-Hidalgo *et al.*, 2013).

Es de destacar, por otra parte, la controversia existente en relación con la nomenclatura de las especies *A. caviae* y *A. punctata*; si bien históricamente han sido consideradas como especies sinónimas y en la actualidad comparten la misma cepa tipo (ATCC 15468), este hecho se debe a un error de anotación ocurrido en 1980 que se arrastra hasta nuestros días. En la actualidad, el taxón *A. punctata* ha dejado de emplearse por la comunidad científica, a pesar de tener prioridad frente a *A. caviae* debido a que fue descrito previamente (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

1.2. Principales características de los aeromonadales móviles

Es inevitable caer en la descripción de *Aeromonas hydrophila* al intentar reseñar las principales características del grupo de los aeromonadales móviles, debido a la extensa bibliografía que existe acerca de esta especie y a la representatividad que tiene sobre el resto de los aeromonadales mesófilos.

Este es un microorganismo ubicuo en los ecosistemas acuáticos y para algunos autores es la bacteria más común de los ambientes de agua dulce (Cipriano, 2001, Abulhamd, 2010). Puede ser aislado tanto de la columna de agua, como de superficies colonizables por microorganismos (animadas o no) en las que desarrolla

biofilm. También se halla presente en el tubo digestivo de peces sanos y otros organismos acuáticos, así como también en sedimentos ricos en materia orgánica (Trust *et al.*, 1974, Austin y Austin, 2007).

Miden en promedio, de 0,3 a 1,0 μm de diámetro por 1,0 a 3,5 μm de largo, no poseen cápsula y tampoco esporulan. La motilidad se debe a la presencia de un flagelo polar (monotrico). Su temperatura óptima de crecimiento es de 28°C, pudiendo crecer entre los 4 y 40°C. Las colonias en agar nutritivo son blancas a rosa pálido, redondeadas y convexas, con bordes completos (indistinguibles entre especies). Son microorganismos anaerobios facultativos, fermentadores de carbohidratos produciendo ácido o ácido y gas. *A. hydrophila* es resistente a 150 μg del agente vibriostático O/129, reduce nitratos a nitritos y no crece en medios de cultivo suplementados con 6,5% de NaCl. Es en general resistente a la ampicilina y carbenicilina y su contenido en GC es del 57 al 63%. Otras características bioquímicas se resumen en la Tabla 2 (McInnes *et al.*, 1976; Aoki, 1999).

Tabla 2. principales características bioquímicas de *Aeromonas hydrophila* (tomada de Aoki, 1999).

Característica	Respuesta
Producción de indol en agua peptonada al 1%	+
Hidrólisis de esculina	+
Crecimiento en caldo de cínica de potasio (KCN)	+
Utilización de L-histidina y L-arginina	+
Formación de acetoina a partir de glucosa (reacción de Voges-Proskauer)	+
Formación de H ₂ S a partir de cisteína	+
Oxidasa	+
Citocromo oxidasa	+
Catalasa	+
Experimento de rojo de metilo	d
Producción de acetilmetilcarbinol	+
Producción de 2,3-butanediol	+
Deshidrogenación de 2,3-butanediol	+
Producción de β -galactosidasa	+
Fosfatasa	+
Reducción de nitrato	+
Ureasa	-
Malonato	-
Licuefacción de gelatina	+
Digestión de caseína	+
Digestión de suero de Loeffler	+
Hidrólisis de almidón	+
Lipasa	+
Lecitinasa	+
Utilización de glucuronato	+
Descarboxilación de ornitina	-
ADNasa	+
ARNasa	+
Hemólisis	+
Descomposición de los siguientes carbohidratos:	
Adonitol	-
Esculina	d
Arabinosa	d
Celobiosa	d
Dextrina	+
Dulcitol	-
Fructosa	+
Galactosa	+
Glucosa	+
Glicerol	+
Glucógeno	+
Inositol	-

Inulina	-
Lactosa	d
Maltosa	+
Manitol	+
Manosa	+
Melesitosa	-
Rafinosa	d
Ramnosa	d
Salicina	d
Sorbitol	d
Sorbosa	-
Almidón	+
Sucrosa	d
Trealosa	+
Xilosa	-

+, típicamente positivo; - típicamente negativo; d, difiere según cepas

A. hydrophila contiene los antígenos termoestable O, termolábil K y flagelar H. Diferentes serotipos del antígeno O han sido observados en bacterias aisladas de diferentes peces, en diferentes lugares y en distintos años sin hallarse correlaciones entre sí (Aoki, 1999), a pesar de ello, Leblanc *et al.* (1981) trabajando en la caracterización de 195 cepas aisladas de peces sanos y moribundos hallaron un serotipo repetitivo entre las cepas de elevada virulencia (serogrupo LL1) y otro entre las cepas de menor virulencia (serogrupo TF2), no encontrando un patrón de correlación entre los serotipos de las cepas patógenas.

Desde los trabajos de Sanarelli en 1891, esta bacteria se ha considerado un patógeno para organismos acuáticos tanto de agua dulce como salobre, siendo identificada históricamente como el agente causal de un conjunto de patologías de elevada importancia para la acuicultura, entre las que se destacan la ascitis infecciosa, el síndrome ulcerativo epizootico, la enfermedad de la boca roja y la septicemia hemorrágica (Austin y Austin, 2007). Algunos autores consideran en la actualidad que este es uno de los patógenos que ocasiona mayores pérdidas económicas a la acuicultura debido a elevadas mortandades y costos de prevención y control de epizootias (Nielsen *et al.*, 2001) siendo además reconocido como patógeno primario u oportunista en anfibios, aves, reptiles, animales de granja y el hombre (Plumb y Hanson, 2011).

En nuestro país se han identificado varias especies del género *Aeromonas* como agentes causales de SAM tanto en peces ornamentales como de cultivo y también han sido aisladas en reiteradas ocasiones como único agente causal o sobregregado en otras patologías, como ser la podredumbre bacteriana de las aletas (*fin rot*) (Carnevia *et al.*, 2009, Letamendia *et al.*, 2009, Carnevia *et al.*, 2010).

1.3. Aislamiento e identificación

El aislamiento de los aeromonadales relativamente simple. *Aeromonas* spp. pueden ser aisladas de peces, alimentos, agua y muestras clínicas, a partir de la siembra en una gran variedad de medios de cultivo de aislamiento primario. Los aeromonadales de significancia clínica crecen bien en los medios de cultivo no inhibitorios utilizados rutinariamente en el laboratorio, así como también en la mayoría de los medios de aislamiento entérico con la excepción del agar tiosulfato-citrato-bilisucrosa (TCBS). Existen medios de cultivo comerciales desarrollados para el aislamiento diferencial de estos microorganismos, tales como el Agar *Aeromonas*

que contiene irgasan como inhibidor y fermenta la D-xylosa como característica diferencial; aunque también se han empleado con eficacia, otros medios selectivos menos específicos, como por ejemplo el agar cefsulodin-irgasan-novobiocina, agar almidón-ampicilina y agar sangre con 10 µg de ampicilina. Al emplear este tipo de medios debe tenerse en cuenta que algunas especies de *Aeromonas* son susceptibles a la ampicilina (*A. trola* y *A. caviae*) e incluso pueden existir variantes en la susceptibilidad dentro de otras especies (Joseph y Carnahan, 1994; Martin-Carnahan y Joseph 2005; Janda y Abbott 2010).

1.3.1. Identificación por métodos bioquímicos

La discriminación de especies de *Aeromonas* mediante métodos bioquímicos clásicos o de rutina es controvertida. Si bien existen investigaciones en las que se demuestra que es posible discriminar entre genespecies mediante pruebas bioquímicas, es necesario el testeo de entre 58 y 63 características fenotípicas diferentes para poder determinar una especie con seguridad. Además de implicar un número excesivo de ensayos bioquímicos para identificar un aislamiento, la determinación de muchas de estas características fenotípicas requiere del empleo de medios de cultivo no convencionales o tiempos de incubación prolongados que dificultan su uso rutinario (Abbott *et al.*; 1993; Abbott *et al.*, 2003).

En lo que respecta a la identificación de aeromonadales mesófilos de importancia clínica, Carnahan *et al.* (1991) desarrollaron un esquema de tipificación eficaz, basado en dieciocho variantes bioquímicas (el esquema *Aerokey II*) que permite discriminar adecuadamente entre siete especies de *Aeromonas* y sus variedades (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandanei*, *A. schubertii*, *A. trola*, *A. veronii* biovar. *sobria* y *A. veronii* biovar. *veronii*). Los caracteres que evalúa *Aerokey II* son hidrólisis de esculina, reacción de Vogues-Proskauer, actividad pirazinamidasa, factor tipo AMPc, fermentación de arabinosa, manitol y sucrosa, susceptibilidad a ampicilina, carbenicilina, cefalotina y colistina, descarboxilación de ornitina y lisina, hidrólisis de arbutina, producción de indol, ácido sulfhídrico y gas a partir de glucosa, hemólisis en TSA con 5% de sangre ovina.

1.3.2. Identificación por métodos moleculares

Se han empleado varios métodos de identificación molecular para *Aeromonas* spp. y al igual que ocurre con su contraparte bioquímica, la identificación de especies a nivel genético mediante métodos clásicos, genera controversias. En particular, el empleo con fines diagnósticos del gen que codifica para el ARNr 16S, puede dar lugar a resultados dispares, debido al solapamiento de especies que se presenta al comparar las secuencias en las bases de datos públicas (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

A raíz de esto se han desarrollado varios métodos de identificación a nivel molecular complementarios del anterior y en algunos casos con efectividad comprobada por varios autores. A continuación se resumen los más destacados.

A fines de la década de 1990 se desarrolló un método de RFLP (por *Restriction Fragment Length Polymorphism*) del gen 16S ARNr capaz de diferenciar todas las especies de *Aeromonas* descritas hasta ese momento (Borrell *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000). Este método ha sido usado con éxito por varios autores en la identificación de *Aeromonas* recuperadas de peces enfermos. Sin embargo, esta técnica no es capaz de diferenciar especies altamente emparentadas que comparten la

misma secuencia génica en 16S ARNr o poseen secuencias muy similares, debido a que producen los mismos patrones de restricción. Un ejemplo de esto lo constituye una especie hallada recientemente, *A. piscicola*, la cual posee el mismo patrón de RFLP que *A. salmonicida* y *A. bestiarium* y cuyas secuencias de 16S ARNr comparten un 99,8 a 100% de similaridad (Baez-Hidalgo y Figueras, 2012). A su vez en un estudio realizado sobre 999 cepas de *Aeromonas* se encontró que el 8,1% de los aislamientos no pudo ser asignado a una especie basándose en ésta técnica molecular (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

Como una herramienta complementaria al empleo del RFLP del gen 16S ARNr en la identificación de aeromonadales, varios autores proponen emplear el análisis de genes que codifican para proteínas esenciales para la sobrevivencia de la bacteria (genes *housekeeping*). De hecho el análisis de cinco genes *housekeeping* es uno de los métodos recomendados por el “*Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology*” para la determinación de nuevos taxones bacterianos (Stackebrandt *et al.*, 2002). Los primeros genes esenciales descritos para la identificación de *Aeromonas* fueron el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad B de la ADN girasa y el gen *rpoD*, que codifica el factor σ^{70} de la ARN polimerasa. Algunos autores recomiendan actualmente la secuenciación de estos genes como método para la identificación específica de *Aeromonas*, a pesar de que reconocen que pueden existir problemas de interpretación de los resultados al comparar las secuencias en la base de datos *GenBank*, especialmente si las mismas son demasiado cortas o de mala calidad, debido a que hasta el momento la base de datos posee únicamente secuencias de cepas tipo y cepas extensamente caracterizadas (Yáñez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004; Baez-Hidalgo y Figueras, 2012).

También se han empleado con éxito en el establecimiento de relaciones filogenéticas tanto inter como intraespecíficas, la secuenciación de otros genes *housekeeping* como *rpoB* (que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa), *dnaJ* (que codifica una proteína de *shock* térmico), *recA* (que codifica una proteína involucrada en la reparación del ADN) y el gen *cpn60* (que codifica la chaperona Cpn60 tipo I) (Baez-Hidalgo y Figueras, 2012).

Martínez-Murcia *et al.* (2011) realizaron MLST (por *Multilocus Sequence Typing*) del género *Aeromonas* utilizando la información concatenada derivada de las secuencias de siete genes *housekeeping* *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* y *atpD*. El árbol filogenético resultante (4705 pb) estuvo acorde con la taxonomía del género reconocida hasta el momento lo que sugiere que ésta podría ser una metodología robusta para la identificación inequívoca de todas las especies.

1.4. Antecedentes en la caracterización de *Aeromonas* spp.

1.4.1. Caracterización bioquímica

En épocas previas al establecimiento de genoespecies de aeromonadales en función de los grupos de hibridación de ADN, los esfuerzos de caracterización apuntaban a hallar rasgos bioquímicos que permitieran por un lado identificar de manera rápida y confiable la especie aislada y por otro, asociar características clínicas con características fenotípicas de modo de obtener información epidemiológica (Abbott *et al.*, 1992; Baez-Hidalgo y Figueras, 2012). A la luz de la existencia de genoespecies, el esfuerzo realizado en la búsqueda de marcadores fenotípicos

intraespecíficos ha dado lugar a confusiones taxonómicas (Joseph y Carnahan, 1994). Existen numerosas investigaciones que comparan los resultados obtenidos en la identificación fenotípica convencional llevada a cabo por los laboratorios clínicos con la identificación genoespecífica., 1990; Joseph y Carnahan, 1994; Borrel *et al.*, 1997; Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Kuifper *et al.*, 1986; Kozinska *et al.*, 2002)

A pesar de lo anterior, existe consenso en la existencia de algunos caracteres constantes dentro de los aeromonadales mesofílicos (Chong *et al.*, 1980, Carnahan *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 2003), como ser:

- reacciones de oxidasa, catalasa y nitratos positivas
- producción de ácido a partir de D-glucosa y D-trealosa
- incapacidad en la utilización de malonato o mucato como única fuente de carbono.
- incapacidad de fermentar adonitol, dulcitol, eritrol y D-xilosa.
- incapacidad de crecer en caldo nutritivo con 0 y 3% de NaCl.
- actividad β -galactosidasa.
- resistencia al agente vibriostático 0/129.
- imposibilidad de hidrolizar urea y degradar pectina.
- imposibilidad de producir ácido a partir de arabitol, D-rafinosa y D-amigdalina.

Por otro lado se destaca también en la literatura (Popoff y Véron, 1976; Janda *et al.*, 1983; Janda *et al.*, 1984, Abbott *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 2003) la extensa variabilidad fenotípica que presentan los aislamientos evaluados con respecto a algunas características bioquímicas, tales como:

- producción de indol, acetil-metil-carbinol y ácido fenilpirúvico.
- utilización de citrato, acetato y ascorbato.
- producción de desoxirribonucleasa, elastasa, hemolisina, estafolisinasa y lipasa.

- hidrólisis de gelatina y esculina.
- crecimiento en caldo KCN.
- actividad de lisina y ornitina descarboxilasas, arginino dihidrolasa y pirazinamidasa.
- producción de pigmento a 25°C.
- formación de H₂S en medio de gelatina-cisteína-tiosulfato.
- oxidación de gluconato.
- susceptibilidad a la ampicilina y cefalotina.
- producción de ácido a partir de arabinosa, ramnosa, celobiosa, lactosa, maltosa, sucrosa, glicerol, manitol, sorbitol, α -metilglucósido, salicina, melobiosa.
- fermentación de manosa.

A pesar de que la caracterización bioquímica de aeromonadales ha sido un aspecto relevante en las investigaciones de muchos grupos en las últimas dos décadas del pasado siglo, existen muy pocos estudios que evalúen las variaciones fenotípicas intraespecíficas. En este sentido, Abulhamd *et al.* (2009) publicaron un artículo en el que se evalúan veintitrés características bioquímicas en diez cepas de *A. hydrophila* identificadas únicamente a nivel fenotípico en el que encuentran variabilidad entre aislamientos para cuatro de las características evaluadas, a saber: formación de ácido a partir de sucrosa, utilización de citrato, hidrólisis de esculina y descarboxilación de lisina. En nuestro país existe, a su vez, una investigación llevada a cabo por Carnevia *et al.* (2003) en la que se evalúa el desempeño de siete cepas diferentes de *A. hydrophila* (también identificadas a nivel fenotípico) provenientes de peces enfermos

frente a 21 variables bioquímicas determinándose que solo una de las cepas evaluadas presentó un perfil bioquímico atípico para las variables asimilación de arabinosa y asimilación de citrato.

Por otro lado se destaca la escasez de estudios que correlacionen las distintas variables bioquímicas halladas dentro de una especie de *Aeromonas* con la patogenicidad de cada cepa o con el origen de las mismas (Kozinska *et al.*, 2002). En este sentido Janda *et al.* (1983) realizaron un estudio de marcadores fenotípicos asociados con gastroenteritis sobre doce cepas de *A. hydrophila* aisladas de niños sintomáticos, tomando como propiedades bioquímicas asociadas a la virulencia la reacción de Vogues-Proskauer (VP), descarboxilación de lisina y hemólisis, no encontrando un patrón claro de presentación de marcadores fenotípicos. Por otra parte, Kozinska *et al.* (2002) observaron que solo las cepas VP positivas de *A. veronii* eran patógenas para carpas comunes (*Cyprinus carpio*) infectadas experimentalmente y Kühn *et al.* (1997) determinaron que los aislamientos de *Aeromonas* spp. realizados a partir de materia fecal de pacientes con diarrea poseían un mayor porcentaje de cepas hemolíticas (46%), que los controles sanos (27%), destacándose a su vez en este estudio un elevado porcentaje de cepas hemolíticas (64%) aisladas del ambiente.

1.4.1.1. Resistencia a antibióticos

Otro aspecto relevante en cuanto a la caracterización fenotípica de *Aeromonas* spp. lo constituyen los ensayos de antibiograma. Para Janda y Abbott (2010) la susceptibilidad *in vitro* de *Aeromonas* spp. a los antibióticos es un área clave del conocimiento de los aeromonadales que ha recibido poca atención en las últimas décadas. A pesar de ello estos autores sostienen que el patrón de susceptibilidad a los quimioterápicos no parece haber cambiado significativamente desde los estudios realizados a mediados de los años 1980 y 1990.

Los primeros registros de disminución de la sensibilidad a ciertos quimioterápicos clásicamente efectivos contra *A. hydrophila* aisladas de organismos acuáticos de cultivo datan de mediados de la década de 1950. El uso indiscriminado de agentes bacteriostáticos (ya sea en el alimento o en el agua de cultivo) llevado a cabo en aquel momento por los acuicultores ocasionó la pronta aparición de cepas resistentes (Aoki *et al.*, 1971).

Existen numerosos estudios que describen los patrones de resistencia a antibióticos *in vitro* en aislamientos de aeromonadales procedentes ya sea de peces enfermos o sanos, alimentos, agua o humanos. El método más comúnmente usado es el de difusión en placa mediante el método de Bauer y los resultados encontrados son variados, hallándose en la amplia mayoría de los casos cepas resistentes a ampicilina y en menor medida a carbenicilina, estreptomina, tetraciclinas, kanamicina, eritromicina, novobiocina y sulfonamidas entre otros. En general no se encuentra una asociación entre resistencia y origen de los aislamientos, pudiendo hallarse cepas multirresistentes tanto en cursos de aguas naturales como en peces de cultivo afectados o sanos (Rahim *et al.*, 1984; Radu *et al.*, 2003; Negrete *et al.*, 2004; Barcellos *et al.*, 2008; Kaskhedikar y Chhabra, 2010; Stojanov *et al.*, 2010; Suhel *et al.*, 2011).

1.4.2. Caracterización molecular

Se han empleado varios métodos de tipificación molecular en *Aeromonas* spp. con la finalidad principal de establecer patrones de identificación específica o evaluando la presencia de plásmidos y genes de virulencia con fines epidemiológicos. Las investigaciones realizadas con especies mesófilas fueron llevadas a cabo principalmente con aislamientos clínicos de humanos o ambientales y son escasos los reportes en los que se realizan caracterizaciones moleculares de cepas de *Aeromonas* spp. con el objetivo de determinar variantes intraespecíficas.

En un extenso estudio realizado por Szczuka y Kaznowski (2004), se caracterizaron ciento veinte cepas correspondientes a quince genoespecies de *Aeromonas* provenientes de muestras clínicas de humanos, aislamientos de animales (ranas, peces sanos, enfermos y muertos, cobayos) y diferentes fuentes ambientales (ríos, lagunas, mares, efluentes de industrias, red domiciliaria, etc.) de varios países del mundo, empleando las técnicas de RAPD, REP y ERIC-PCR. Estos autores consideran que estos métodos moleculares son excelentes herramientas, tanto para la identificación de clones de *Aeromonas* spp., como para la realización de estudios epidemiológicos. Destacan a su vez el hallazgo de una excelente correlación entre los resultados obtenidos por RAPD y ERIC-PCR.

Los esquemas de MLST han sido reconocidos como la mejor manera de establecer relaciones epidemiológicas entre aislamientos, usando las secuencias de fragmentos internos de varios genes *housekeeping* (aproximadamente 450-500 pb de siete genes) (Baez-Hidalgo y Figueras, 2012). Martino *et al.* (2011) construyeron el primer esquema de MLST de acceso libre para *Aeromonas* (<http://pubmlst.org/aeromonas>) en base a seis genes *housekeeping* (*gyrB*, *groL*, *gltA*, *metG*, *ppsA* y *recA*). Analizando 96 aislamientos de *Aeromonas* pertenecientes tanto a cepas tipo de todas las especies conocidas como a cepas ambientales y de peces afectados principalmente de Italia, estos autores encuentran una considerable divergencia entre las secuencias de los seis alelos concatenados y proponen nuevas relaciones filogenéticas entre grupos previamente establecidos. A su vez encuentran una baja proporción de clones entre las cepas analizadas.

1.5. La enfermedad en los peces

La septicemia por *Aeromonas* móviles ya era conocida por los piscicultores incluso antes de conocerse sus agentes causales. De hecho, algunos de los primeros tratados de patología de peces especulaban con la idea de que las infecciones septicémicas en peces y ranas eran comunes en Europa durante la Edad Media, basándose en los reportes de la época (Cipriano, 2001).

En líneas generales puede decirse que esta es una enfermedad ubicuitaria, que afecta tanto peces silvestres como de cultivo, principalmente en ambientes de agua dulce, ya sea en climas fríos, templados o tropicales. También se han observado casos de SAM en ambientes de aguas salobres, principalmente de América, Asia y Europa. Hasta el momento no se conocen especies de peces resistentes a este complejo bacteriano (Aoki, 1999; Plumb y Hanson, 2011), considerándose a todos los peces de agua dulce susceptibles de contraer SAM. Si bien las *Aeromonas* móviles pueden vivir en agua salobre, la prevalencia de las mismas decrece a medida que aumenta la salinidad (Noga, 1996).

1.5.1. Signos clínicos

Los signos clínicos de SAM son variados e inespecíficos y generalmente se categorizan en conductuales con o sin lesiones externas, aunque en ambos casos pueden existir lesiones internas. Los peces afectados pierden el apetito, se vuelven letárgicos y nadan erráticamente en la superficie. Cuando se estimula el reflejo de huida en un pez afectado que nada atípicamente, éste intenta retornar a aguas profundas, pierde el equilibrio y vuelve a aguas superficiales. Entre los signos externos se destacan las aletas congestivas a hemorrágicas, con bordes erosionados o deshilachadas (Plumb y Hanson, 2011).

En los peces sin escamas se observan lesiones epidérmicas que comienzan como áreas depigmentadas, que eventualmente se desarrollan en lesiones necróticas, con pérdidas de epitelio y desarrollo de soluciones de continuidad con bordes irregulares, blanquecinos a hemorrágicos que pueden llegar a dejar expuesto el tejido muscular. La localización de estas lesiones ulcerosas es variada, pudiendo afectar el pedúnculo caudal, zonas dorsal, ventral o laterales del tronco e incluso la cabeza (Plumb y Hanson, 2011).

En los peces escamados, las lesiones de piel empiezan como una hemorragia en la base de las escamas, el tejido de la zona presenta un área central rojiza (proceso inflamatorio), rodeada de un halo blanquecino (proceso necrótico), cuadro que culmina en la mayoría de los casos con el desprendimiento de la escama. Generalmente las zonas de piel necrótica son colonizadas por el hongo saprófito *Saprolegnia* spp. Los peces afectados por SAM pueden presentar a su vez exoftalmia, con hemorragia u opacidad corneal, ascitis, palidez branquial, musculatura edematosa y en peces escamados se puede observar lepidortosis previo a la pérdida de escamas (Plumb y Hanson, 2011).

En un estudio realizado por Carnevia *et al.* (2010) se caracterizaron las presentaciones clínicas de SAM más prevalentes en peces de acuario de nuestro país, distinguiéndose tres cuadros clínicos diferentes en los animales afectados, a saber:

- Forma septicémica aguda, caracterizada por la aparición de hemorragias petequiales en piel y aletas, anorexia, letargia, opacidad de la piel, aletas replegadas, opérculos abiertos e insuficiencia respiratoria.
- Forma subaguda ascítica, los animales también se presentan anoréxicos y letárgicos, presentando a su vez una ascitis característica con protrusión de escamas (lepidortosis).
- Forma crónica ulcerosa, se caracteriza por la presencia de lesiones erosivas en la piel que no tienden a cicatrizar, acompañada de letargia y pérdida de estado general.

Esta variabilidad en las formas de presentación clínica del agente a llevado a la existencia de una extensa sinonimia de la enfermedad (Cipriano *et al.*, 2001).

1.5.2. Patogenia

Los mecanismos de patogenicidad desarrollados por los aeromonadales mesófilos son multifactoriales y no están del todo aclarados. La ausencia de modelos animales estandarizados que permitan el estudio de la infección y las dificultades en el mantenimiento de la virulencia de las cepas en el laboratorio han ocasionado retrasos en el estudio de la patogenicidad de los microorganismos aeromonadales (Janda y Abbott, 2010). A pesar de ello es bien conocido que las especies del género

Aeromonas secretan un gran número de enzimas extracelulares al medio que juegan un rol vital en la ecología, sobrevivencia y patogenicidad de estos microorganismos (Pemberton *et al.*, 1997) y a su vez es conocido el papel preponderante en la patogenicidad que juegan algunos elementos estructurales de los aeromonadales, como ser la capa S en el desarrollo de la forunculosis por *A. salmonicida* (Janda, 1991).

Entre los elementos que han sido identificados como posibles factores de virulencia de *Aeromonas hydrophila* se incluyen antígenos O, cápsulas, capa S, exotoxinas (como hemolisinas α y β y enterotoxinas Act y Ast) y un repertorio de exoenzimas que digieren componentes celulares, tales como proteasas (proteasa sérica AspA, elastasa AhpB), amilasas y lipasas (Pla, Plc, Sat), ADNasas y adhesinas (pili tipo IV, flagelo polar FlaA y FlaB) entre otras (Sen y Rodgers, 2004; Yu *et al.*, 2004).

Las lipasas o triacilglicerol hidrolasas son producidas por un amplio rango de bacterias patógenas, de hecho la fosfolipasas C es el mayor determinante de patogenicidad en muchas bacterias Gram negativas. Dos lipasas relativamente grandes (70 kDa) han sido clonadas de *A. hydrophila* y expresadas en *E. coli* (lipasas H3 y Apl1), especulándose que ambas enzimas poseen actividad principalmente en animales ectotermos, dado que su actividad óptima se desarrolla a baja temperatura. También se aisló una glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (GCAT) de alrededor de 30 kDa, presente tanto en *A. hydrophila* como en *A. salmonicida*, con actividad similar a la lecitina-colesterol aciltransferasa de mamíferos (Pemberton *et al.*, 1997).

Muchas especies de *Aeromonas* producen a su vez el sideróforo amonabactina y por lo menos dos especies producen a su vez enterobactina, un sideróforo producido por bacterias entéricas. Estos compuestos de elevada afinidad hacia el hierro se han asociado en muchas ocasiones con el establecimiento de infecciones y procesos invasivos (Janda, 1991; Pemberton *et al.*, 1997).

1.5.3. Hallazgos anatomopatológicos y paraclínicos

Los hallazgos de necropsia se caracterizan por la presencia de órganos friables, hiperemia generalizada, riñón e hígado aumentados de tamaño, estómago usualmente con petequias y tubo digestivo sin alimento, friable, hiperémico y con colección de mucus amarillento. La cavidad abdominal puede presentar líquido transparente, aunque generalmente este es turbio y sanguinolento (Plumb y Hanson, 2011). El tubo digestivo se halla en ocasiones distendido, translucido y con presencia de gas, reportándose por algunos autores la frecuente presencia de intususcepción, producto presumiblemente de una hipermotilidad estimulada por la alteración de los ganglios nerviosos ubicados en la serosa del tubo digestivo (Rey *et al.*, 2009).

Histopatológicamente se aprecian principalmente alteraciones de tipo hemodinámico, entre las que se incluyen congestión generalizada, extravasación de proteínas, hemorragia y desprendimiento de la mucosa del tracto gastrointestinal. Es notoria a su vez la inflamación sistémica y necrosis de vísceras abdominales, especialmente en bazo e intestino (Rey *et al.*, 2009). El intestino en particular presenta un notorio catarro descamativo acompañado de necrosis de las vellosidades y de una extensa invasión de bacterias en el epitelio, túnica propia y submucosa (Miyazaki y Kage, 1985).

En el hígado pueden apreciarse somas bacterianas, además de congestión de sinusoides, comúnmente se observa depleción de grasa en los hepatocitos que pueden estar levemente atróficos, el bazo se halla normalmente muy congestivo y con pérdida de la arquitectura normal y destrucción de tejido. Los hallazgos renales se caracterizan por extensas áreas de necrosis con depósito de material hialino en los túbulos (Miyazaki y Yasuhiko, 1985).

1.5.4. Epizootiología

Aunque las especies de *Aeromonas* móviles se pueden aislar a partir del medio acuático en un rango muy amplio de temperaturas y salinidades, la aparición de epizootias en un área suele estar relacionada con incrementos significativos de la densidad de estos microorganismos en el agua, los cuales a su vez están asociados con aumentos de la temperatura y de la materia orgánica. Por otra parte, debido a que estas bacterias constituyen parte de la microbiota normal del intestino de animales ectotermos, cualquier factor inmunosupresivo puede provocar el desencadenamiento de graves epizootias en los peces (Espinosa de los Monteros y Labarta, 1988).

Entre los factores predisponentes se destacan las elevadas temperaturas, altas densidades de peces, contaminación orgánica e hipoxia (Noga, 1996). El agente se transmite únicamente de forma horizontal, pudiendo ser fuentes de los mismos: descargas del tubo digestivo de animales sanos o enfermos, sedimentos ricos en materia orgánica y heridas de animales afectados. Las soluciones de continuidad ocurridas en el epitelio por acción de ectoparásitos y micosis son puertas de entrada para el agente (Aoki, 1999).

Un hecho a destacar en lo que respecta a la epizootiología de la SAM es la variabilidad en la virulencia que pueden presentar las cepas de *Aeromonas hydrophila* entre distintas localidades, en ocasiones, los aislamientos realizados a partir de peces afectados suelen ser menos virulentos que los realizados a partir del agua (de Figueredo y Plumb, 1977).

1.6. Importancia para la salud humana

El amplio rango de fuentes ambientales desde las cuales se pueden aislar *Aeromonas* spp. lleva fácilmente a la exposición constante e interacciones entre estas bacterias y seres humanos. La adquisición de este microorganismo por parte del hombre puede darse a partir del consumo de agua de bebida o alimentos contaminados, actividades recreativas en ambientes acuáticos, manejo de mascotas acuáticas o no, acuicultura y contacto con animales silvestres y ambientes naturales, entre otras fuentes (Janda y Abbott, 2010).

En las últimas décadas algunas especies de *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública, provocando infecciones intestinales y extra-intestinales (Janda, 2001). Hasta el momento son principalmente tres las especies que han sido reconocidas como patógenos para el ser humano: *A. hydrophila sensu stricto* (GH 1), *A. caviae* (GH 4) y *A. veronii* biovar sobria (HG 8), responsables de un amplio rango de presentaciones clínicas, ya sea en individuos inmunocomprometidos como también en inmunocompetentes (Janda y Abbott, 2010).

Existen pocas bacterias Gram negativas capaces de desarrollar un espectro tan amplio de infecciones en el ser humano como *Aeromonas* spp. Los aeromonadales

son responsables de un elevado número de síndromes y enfermedades intestinales y extraintestinales, que pueden ir desde un trastorno leve, como una gastroenteritis aguda; hasta condiciones con riesgo de vida, tales como: septicemia, fascitis necrotizante y mionecrosis. A su vez se han reportado trastornos por *Aeromonas* spp. que incluyen problemas intraabdominales, enfermedades oculares, infecciones en huesos y articulaciones y menos frecuentemente alteraciones del tracto respiratorio y urogenital (Janda y Abbott, 2010).

La incidencia exacta de las aeromoniasis en humanos a escala global es desconocida, debido en gran medida a que *Aeromonas* no es por el momento un género reportable en la mayoría de los países. A pesar de esto, especulaciones realizadas en base a reportes de prevalencia de algunos hospitales del Reino Unido y los Estados Unidos estiman una incidencia de 1,5 casos de septicemia por *Aeromonas* cada millón de habitantes en Inglaterra, Gales y Estados Unidos (Janda y Abbott, 2010). En un estudio realizado en nuestro país se encontró una prevalencia de *Aeromonas* spp. del 2% en aislamientos realizados a partir de heces de niños con diarrea sanguinolenta (Mota et al., 2010).

2. HIPÓTESIS

Los peces cultivados en nuestro país son afectados por distintas especies de *Aeromonas* móviles cuyas características particulares determinan la variabilidad en la virulencia causada por este patógeno en peces.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar las cepas de *Aeromonas* móviles aisladas de peces de cultivo de nuestro país desde el punto de vista fenotípico, genético y patológico.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Caracterizar bioquímicamente las cepas aisladas.
- 3.2.2. Caracterizar genéticamente las cepas aisladas.
- 3.2.3. Comparar las variantes bioquímicas entre los distintos aislamientos.
- 3.2.4. Comparar el contenido en genes de virulencia entre los distintos aislamientos.
- 3.2.5. Establecer relaciones filogenéticas entre los distintos aislamientos.
- 3.2.6. Determinar la dosis letal cincuenta de aislamientos representativos de los aeromonadales nacionales y establecer su relación con el número de genes de virulencia identificados.
- 3.2.7. Describir los principales hallazgos histopatológicos observados en los animales infectados experimentalmente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Origen de las aislamientos

Las cepas bacterianas empleadas en este estudio fueron aisladas de diversas especies de peces de agua dulce, provenientes en todos los casos de algún tipo de sistema de acuicultura, ya sea acuarios (comerciales u ornamentales) o criaderos (de peces ornamentales o para consumo humano).

Los aislamientos se realizaron tanto a partir casos clínicos individuales con signos de SAM, como también casos poblacionales de epizootias con mortandades superiores al máximo aceptable para el tipo de explotación acuícola.

Para realizar la toma de muestras, los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico según protocolo descrito por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la UdelaR empleando una solución alcohólica al 10% (v/v) de Eugenol[®] (Droguería Industrial Uruguay, código: 41531) en baño a efecto (CHEA, 2006).

Dependiendo de la forma de presentación del cuadro clínico en los peces, se tomaron muestras de distintos órganos o secreciones, a saber:

- líquido ascítico, en casos de distensión abdominal sospechosa
- aletas y lesiones de piel, en casos de sospechas de *fin rot* y forma ulcerosa de SAM respectivamente.
- riñón anterior, en sospechas de septicemia o de casos subclínicos.
- cerebro, en animales procedentes de mortandades inespecíficas.

La siembra primaria de este material se llevo a cabo en el medio de cultivo BBL[®] *Trypticase[®] soy agar (Soybean-Casein Digest Agar)* (TSA) (Becton, Dickinson and Company Laboratories[®], USA, n° catalogo: L007418). Una vez sembradas, las placas se incubaron a 25°C durante 24 a 48 horas en aerobiosis.

En el Anexo 1 se detallan las características de cada uno de los medios de cultivo empleados en este estudio.

4.2. Identificación fenoespecífica y caracterización bioquímica

Se consideraron aislamientos sospechosos de pertenecer al grupo *Aeromonas* móviles a los bacilos Gram negativos móviles, oxidasa y catalasa positivos. Estos aislamientos se sembraron en el *kit* API 20NE[®] de Biomerieux[®] (Francia) y se incubaron en aerobiosis a 25°C durante 24 a 48 horas siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las bacterias identificadas como *Aeromonas* spp. mediante este método, con un porcentaje de identidad igual o superior al 80% para la base de datos Apiweb[®] versión 1.2.1, se consideraron aislamientos adecuados para continuar con los pasos siguientes de la identificación.

Se empleó, a su vez, el perfil bioquímico arrojado por el *kit* para establecer diferencias en las características fenotípicas de cada aislamiento. API 20NE[®] evalúa las siguientes variables bioquímicas:

- reducción de nitratos a nitritos.
- formación de indol.
- fermentación de glucosa
- actividad de las enzimas: arginina dihidrolasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa (hidrólisis de esculina), proteasa y ureasa.

- asimilación de: glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato potásico, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, citrato trisódico y ácido fenilacético.

Una vez obtenidos todos los perfiles bioquímicos, se calculó el Coeficiente de Variación (CV) para tener una idea de la variabilidad que presentan dichos perfiles dentro de cada especie de *Aeromonas* aisladas en Uruguay. El CV se calculó del modo siguiente (Aboubakr *et al.*, 2014):

$$CV = \frac{\text{desvío estándar de los valores numéricos del perfil bioquímico de una especie} \times 100}{\text{media de los valores numéricos del perfil bioquímico de dicha especie}}$$

4.2.1. Actividad hemolítica

Cada aislamiento de *Aeromonas* spp. identificado se subcultivó, a su vez, en una placa de TSA suplementada con 5% de sangre ovina estéril. Luego de 24 hs de incubación a 37°C se observó la presencia o ausencia de actividad hemolítica (Boulanger *et al.*, 1977).

4.2.2. Antibiograma

Se evaluó la susceptibilidad a diferentes antibióticos para cada aislamiento mediante el método de difusión simple en agar desarrollado por Bauer y colaboradores (1966) y empleando como medio de cultivo agar Muller Hinton II[®] (MH) (Becton, Dickinson and Company Laboratories[®], USA, n° catalogo: L007393) según recomendación del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 1997).

Para ello las bacterias se cultivaron en 3 mL de caldo LB, Miller (Luria-Bertani)[®] (LB) (Amresco[®], USA, n° catalogo: J106) a 28°C durante 24 horas y posteriormente se centrifugaron a 8500 rpm durante 5 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en suero fisiológico estéril hasta alcanzar una concentración equivalente a 0,5 en la escala McFarland y posteriormente se sembraron 100 µL de esta suspensión uniformemente con hisopo en un placa de agar MH. Una vez realizada la siembra se depositaron sobre la placa discos conteniendo antibióticos (sensidiscos: BBL *sensidisc*[®]; Becton, Dickinson and Company Laboratories[®], USA) a una distancia entre sí de 3 cm (CLSI, 1997).

Los antibióticos evaluados y sus concentraciones en disco fueron:

- Amoxicilina + ácido clavulánico (2:1): 20µg.
- Ampicilina: 10µg.
- Ampicilina + dicloxacilina (10:1): 10µg.
- Enrofloxacin: 30µg.
- Eritromicina: 15µg.
- Nitrofurantoína: 300µg.
- Oxitetraciclina: 30µg.
- Penicilina: 10U.
- Sulfametoxazole + trimetoprim (19:1): 25µg.
- Tiamfenicol: 65µg.

Las placas se incubaron durante 24 a 48 horas a 25°C y posteriormente se midieron los halos de inhibición con una apreciación de un milímetro.

La discriminación entre bacterias sensibles, resistentes e intermedias se basó en los estándares especificados por CLSI en "*Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated and Fastidious Bacteria; Proposed Guideline, M45-P*" (CLSI, 2006) para *Aeromonas hydrophila*. En los casos en los que dicho estándar no posee información para el antibiótico empleado, se utilizó la información existente para drogas de la misma familia o el estándar de sensibilidad aportado por el fabricante de los *sensidiscs*. En la Tabla 3 se presentan los datos referentes al antibiótico empleado (o un similar emparentado), sus correspondientes diámetros de halo de inhibición y la referencia desde donde se tomó la información.

Tabla 3. Estándares de sensibilidad empleados para la determinación de resistencia en los aislamientos de *Aeromonas* spp. móviles provenientes de peces de Uruguay, mediante el método de difusión en placa (Kirby-Bauer).

Antibiótico	Diámetro del halo en milímetros			Referencia
	S	R	I	
Amoxicilina (20µg) + Ácido clavulánico (10µg)	≥ 18	≤ 13	14 a 17	BBL; CLSI, 2006
Ampicilina (10µg)	≥ 17	≤ 13	14 a 16	BBL
Ciprofloxacina (5µg)	≥ 21	≤ 15	16 a 20	BBL; CLSI, 2006
Cloramfenicol (30µg)	≥ 18	≤ 12	13 a 17	CLSI, 2006
Eritromicina (15µg)	≥ 23	≤ 13	14 a 22	BBL
Levofloxacina (5µg)	≥ 17	≤ 13	14 a 16	BBL; CLSI, 2006
Nitrofurantoina (300µg)	≥ 17	≤ 14	15 a 16	BBL
Penicilina (10U)	≥ 15	≤ 14	sin dato	BBL
Sulfametoxazole (25µg) + Trimetoprim (1,3µg)	≥ 16	≤ 10	11 a 15	BBL; CLSI, 2006
Tetraciclina (30 µg)	≥ 19	≤ 14	15 a 18	BBL; CLSI, 2006

I: sensibilidad intermedia, R: resistente, S: sensible

Se consideraron aislamientos susceptibles a la acción de un antibiótico determinado, a aquellos cuyos halos de inhibición correspondieron tanto a la categoría "sensible", como "intermedia". La adopción de este criterio se basa en lo expuesto por del Río-Rodríguez y Turnbull (2002) y toma en consideración que la mayoría de los estándares de resistencia existentes en la actualidad no han sido evaluados en patógenos de organismos acuáticos y a su vez no se han desarrollado modelos de farmacocinética y farmacodinamia en peces para dichas drogas. En este sentido, cabe destacar que las consideraciones realizadas por Smith *et al.* (2004) acerca de los criterios particulares para la determinación de sensibilidad a antibióticos en bacterias patógenas de organismos acuáticos conciben con el criterio de susceptibilidad adoptado del Río-Rodríguez y Turnbull.

A su vez se calculó el "índice de multiresistencia a antibióticos" (MAR), como el cociente entre el número de antibióticos a los que el aislamiento fue resistente sobre el número de antibióticos evaluados para ese aislamiento. Valores de MAR mayores o iguales a 0,2 son indicativos de aislamientos con alto riesgo de proceder de ambientes donde se hace uso habitual de antibióticos, los valores inferiores o iguales a 0,25 indican aislamientos procedentes de ambientes donde el uso de antibióticos es mínimo o nulo (Krumperman, 1983).

4.3. Identificación y caracterización molecular

Los aislamientos identificados a nivel fenotípico como *Aeromonas* spp. se sometieron a identificación a nivel molecular mediante amplificación y secuenciación de los genes que codifican para la subunidad menor del ARN ribosomal (16S) y la subunidad B de la enzima girasa (*gyrB*) (Yáñez *et al.*, 2003). En la Tabla 4 se presentan las secuencias de los *primers* empleados para tal fin.

Tabla 4. Características de los *primers* empleados para realizar la identificación molecular de *Aeromonas* spp. aisladas de peces cultivados en Uruguay.

Gen a amplificar	Nombre del primer	Posición*	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
16S	27F	27-57	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	Lane, D.; 1991
	1492R	1492-1470	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> 3F	334-354	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1110	Yáñez <i>et al.</i> , 2003
	<i>gyrB</i> 14R	1464-1444	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC		

*referentes al genoma de *E. coli*

Para la extracción de ADN se empleó el *kit DNEasy Blood and Tissue*[®] de Qiagen[®], empleando una colonia pura como fuente de ADN y siguiendo las especificaciones del fabricante (ver Anexo 2).

El programa de PCR empleado en todos los casos consistió en un ciclo inicial de 94°C durante 3 min. y 30 ciclos de 94°C por 1 min., 50°C por 1 min. y 72°C por 1 min. 30 seg., con un ciclo final a 72°C por 10 min (Yáñez *et al.*, 2003) (termociclador: *Thermo Scientific*[®] modelo *Arktik*[®]). Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con *GelRed*[®] (Biotium[®], n° catalogo: 41003).

Los amplicones fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc.[®] (Seoul, Corea del Sur). Se secuenciaron ambas hebras de cada producto empleando los mismos *primers* que para la amplificación y en el caso de la secuenciación del gen del ARNr 16S se agregó a su vez un *primer* interno (518R: 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') para asegurar la calidad y la cobertura de la secuencia completa del gen.

Para análisis posteriores se emplearon las secuencias consenso obtenidas a partir de la alineación de cada una de las hebras secuenciadas por producto de reacción. Las secuencias así obtenidas se compararon con secuencias publicadas en la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando la herramienta BLASTn con el fin de determinar la afiliación de los aislamientos (Altschul *et al.*, 1997).

La identificación definitiva de cada especie se llevó a cabo comparando los resultados obtenidos para cada uno de los genes *housekeeping* secuenciados. Se tomó como criterio para la asignación de especies, la coincidencia en el taxón indicado por ambos genes con un nivel de identidad igual o superior al 98%. En el Anexo 3 se presentan los taxones más representativos obtenidos para cada uno de los aislamientos a partir de la comparación de secuencias mediante BLASTn en *GenBank*.

Todas las tareas de edición, ensamblado y alineación de secuencias se llevaron a cabo mediante el empleo de los *software*:

- Bioedit *Sequence Alignment Editor*[®] version 7.2.5 (Ibis *Biosciences an Abbott Company*[®]) (Hall, T.; 1999).

- Chromas Lite[®] version 2.2.1 (Technelysium Pty Ltd.).
- Crustal X2[®] version 2.0 (University College Dublin).

4.3.1. Búsqueda de genes vinculados a factores de virulencia

Mediante PCR convencional se determinó la presencia/ausencia de los siguientes genes de virulencia en cada uno de los aislamientos: *act* (enterotoxina citotóxica), *alt* (enterotoxina citotónica), *ast* (enterotoxina citotónica), *ela* (elastasa) y *lip* (fosfolipasa).

Se empleó como control positivo para todos los genes, ADN extraído de la cepa tipo de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966[®]), empleando el mismo método de extracción descrito en la sección 4.3.

En la Tabla 5 se muestran las secuencias de los *primers* empleados y el tamaño del producto a obtener.

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos de los *primers* empleados en la identificación de los factores de virulencia de los aislamientos de *Aeromonas* spp. y tamaño en pares de base (pb) del producto de reacción esperado.

Nombre del primer	Secuencia	Tamaño del producto esperado	Referencia
<i>actF</i> <i>actR</i>	5'-AGAAGGTGACCACCAAGAACA-3' 5'-AACTGACATCGGCCCTGAACTC-3'	232 pb	Kingdome <i>et al.</i> , 1999
<i>astF</i> <i>astR</i>	5'-TCTCCATGCTTCCCTTCCACT-3' 5'-GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG-3'	331 pb	Sen y Rodgers, 2004
<i>altF</i> <i>altR</i>	5'-TGACCCAGTCCTGGCACGGC-3' 5'-GGTGATCGATCACCACCAGC-3'	442 pb	Sen y Rodgers, 2004
<i>lipF</i> <i>lipR</i>	5'-ATCTTCTCCGACTGGTTCGG-3' 5'-CCGTGCCAGGACTGGGTCTT-3'	382 pb	Sen y Rodgers, 2004
<i>elaF</i> <i>elaR</i>	5'-ACACGGTCAAGGAGATCAAC-3' 5'-CGCTGGTGTGGCCAGCAGG-3'	513 pb	Sen y Rodgers, 2004

El protocolo de amplificación consistió en un ciclo único inicial de 95°C por 5 min., seguido de 25 ciclos de 95°C durante 25 seg., 55°C durante 30 seg., un minuto a 72°C y finalmente un ciclo único a 70°C durante 5 minutos (Sen y Rodgers, 2004). Se tomaron al azar productos de reacción de cada gen de virulencia de aislamientos diferentes, se secuenciaron de acuerdo a lo descrito anteriormente y mediante el empleo de la herramienta BLASTn se determinó su filiación para asegurar la correspondencia de los amplicones generados con los genes buscados.

Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) teñido con *GelRed*[®] (Biotium[®], n° catalogo: 41003). Se consideró la ausencia de un gen determinado en aquellos casos en que la PCR fue negativa por triplicado para el mismo aislamiento.

4.3.2. Tipificación mediante técnicas de rep-PCR

Se entiende por *rep-PCR* a un conjunto de técnicas moleculares de tipificación global del genoma bacteriano. En general esta metodología emplea *primers* genéricos para amplificar segmentos de ADN ubicados entre regiones repetidas distribuidas

aleatoriamente en el genoma de todas las eubacterias (Versalovic *et al.*, 1991). En particular se emplearon las técnicas: BOX, ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) y REP (*repetitive extragenic palindromic*) para tipificar los aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos en este estudio.

En la Tabla 6 se presentan las secuencias de los primers empleados para cada técnica, el programa de termociclado utilizado en todos los caso fue el siguiente: 5 min a 94 °C, 40 ciclos de: 1 min a 94 °C, 2 min a 40 °C, 8 min a 65 °C, extensión final a 65 °C durante 16 min. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (0,7 %) teñido con *GelRed*[®] (Biotium[®], n° catalogo: 41003).

Tabla 6. Características de los *primers* empleados para la tipificación genética (*rep*-PCR) de los aislamientos de *Aeromonas* spp. realizados a partir de peces cultivados en Uruguay.

Técnica de tipificación	Secuencia de los <i>primers</i> (5' - 3')	Referencia
BOX	BOXA1R: CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
ERIC	ERIC1R: ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC ERIC2: AAGTAAGTACTGGGGGT	
REP	REP1R: IIIGCGCCGICATCAGGCC REP2-Dt: ACGTCTTATCAGGCCTA	Versalovic <i>et al.</i> , 1991

4.3.3 Análisis de conglomerados a partir de la tipificación de los aislamientos

Una vez obtenidas las imágenes de las corridas electroforéticas correspondientes a la tipificación de los aislamientos con técnicas *rep*-PCR, se procedió al análisis del patrón de bandas generado por cada aislamiento con la finalidad de agruparlos en función de sus semejanzas. Para ello se empleó el *software* GelCompar II[®] versión 6.6.11 de *Applied Maths Inc.*[®], con el cual se realizó un análisis de *clusters* mediante el método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973), tomando un valor de *bootstrap* basado en 500 repeticiones y con un nivel de confianza del 95% (Felstein, 1985). Cada carril del gel de electroforesis es tomado por el *software* como una muestra diferente y a partir de esto se determina la similitud entre carriles en función del número, tamaño en pb e intensidad de las bandas existentes.

4.3.4. Análisis filogenéticos en base a las secuencias de los genes ARNr 16S y *gyrB*

Con las secuencias consenso de los genes ARNr 16S y *gyrB* obtenidas para cada aislamiento se procedió a analizar las relaciones filogenéticas existentes, tanto entre ellas, como también con las secuencias de otros representantes del taxón, depositadas en bases de datos específicas.

Para realizar las comparaciones filogenéticas con secuencias externas a este estudio se emplearon las siguientes bases de datos:

- en el caso del gen ARNr 16S, se emplearon secuencias procedentes de la base de datos pública: *The Ribosomal Database Project* (RDP) <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> (Cole *et al.*, 2014). Número total de secuencias de *Aeromonas* spp. depositadas en la base de datos: 2327 (último acceso: octubre de 2015).
- en el caso del gen *gyrB*, se emplearon secuencias procedentes de la base de datos pública: *Aeromonas* MLST *Databases*, desarrollada por Keith Jolley y publicada por la Universidad de Oxford (<http://pubmlst.org/aeromonas>) (Jolley y Maiden, 2010).

Número total de secuencias de *Aeromonas* spp. depositadas en la base de datos: 1722 (último acceso: octubre de 2015).

Para realizar los análisis filogenéticos se empleó el *software* MEGA[®] (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versión 6.0 desarrollado por Tamura *et al.* (2013).

La historia evolutiva fue inferida en todos los casos mediante el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). El árbol consenso generado en cada caso fue inferido sobre un valor de *bootstrap* de 500 repeticiones y con un nivel de confianza del 95% (Felstein, J.; 1985). Las distancias evolutivas fueron calculadas empleando el método *Maximum Composite Likelihood* (Tamura *et al.*, 2004) y están expresadas como el número de bases sustituidas por sitio. Cada dendograma fue dibujado a escala, empleando las mismas unidades que las de la distancia evolutiva para determinar la longitud de cada rama.

4.4. Caracterización patológica

El efecto de los aislamientos más representativos de las bacterias aeromonadales móviles obtenidas en el presente estudio, sobre la salud de los peces, se determinó mediante el cálculo de dosis letal 50 en 96 horas (DL50₉₆). Para ello se escogieron aislamientos de las especies identificadas con mayor frecuencia y a su vez, dentro de cada una de las especies se escogió un aislamiento con una esperada alta patogenicidad y otro de baja patogenicidad esperada en función de la actividad hemolítica y el número de genes de virulencia.

4.4.1. Modelo *in vivo* para la evaluación de virulencia

Para la evaluación de la virulencia de las cepas de *Aeromonas* spp. se determinó la DL50₉₆ en un modelo de infección de peces *in vivo*. Con este fin se realizaron infecciones experimentales en el pez *Australoheros facetus* (familia Cichlidae) adaptando el protocolo experimental descrito por Jovanovic y colaboradores (2015). A grandes rasgos el cálculo se basa en inocular en los peces distintas concentraciones bacterianas por vía intraperitoneal (i.p.) y a partir del registro de mortandades observadas durante 96 horas, inferir matemáticamente la concentración de inóculo que provocaría la muerte del 50% de la población de animales.

El rango de concentraciones bacterianas que se evaluaron estuvo acorde con el promedio de los valores hallados en la bibliografía para *Aeromonas* móviles.

4.4.1.1. Sujetos experimentales

Australoheros facetus fue escogido como sujeto experimental debido a que es una especie de peces autóctonos a partir de la cual se ha desarrollado una línea de animales para experimentación en el Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP) de la Facultad de Veterinaria (UdelaR). Éste modelo animal ha sido testeado previamente en ensayos de infección experimental con *Aeromonas* spp. y otras bacterias patógenas de organismos acuáticos, corroborándose a partir de los resultados obtenidos la aptitud del mismo para realizar ensayos de ictiopatología (Perretta, 2015).

Desde el punto de vista de los estudios ictiopatológicos este pez posee algunas ventajas sobre otras especies de peces de experimentación, a saber:

- adaptación a la vida de bioterio y laboratorio húmedo.
- tamaño adecuado para la realización de maniobras tales como inyecciones y extracción de sangre periférica.

- expresión de aspectos comportamentales a través del patrón de coloración de la piel.
- existencia de estudios previos de infección experimental con agentes bacterianos.
- existencia de estudios previos de hematología y anatomía patológica para la especie.
- suministro continuo de sujetos experimentales por parte del IIP.

Para este estudio se emplearon peces con una edad de cuatro meses, escogidos al azar de un lote de animales procedentes de un mismo desove, con un peso promedio de $1,5 \pm 0,5$ gramos y talla promedio de $4,2 \pm 1,0$ centímetros.

4.4.1.2. Confección del inóculo y administración a los peces

El protocolo de trabajo empleado en esta parte de la investigación fue adaptado a partir de estudios previos de infección experimental desarrollados por el autor (Perretta *et al.*, 2009a y b) y concuerdan con otras investigaciones llevadas a cabo en condiciones similares (Janda y Abbott, 2010). Se evaluaron siete concentraciones bacterianas diferentes para cada aislamiento, el rango de concentraciones empleado en este estudio estuvo acorde con el empleado por otros autores en varias investigaciones similares (Mittal *et al.*, 1980; Ventura y Grizzle, 1988; Azad *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2008; Sahi *et al.*, 2009; Sarkar y Rashid, 2012). Cada concentración fue inoculada mediante inyección i.p. a un grupo de cinco peces que fue alojado en un acuario de 20 litros, con filtración biológico-mecánica y temperatura promedio de 25°C durante 96 horas. Se inyectaron 10 µL de inóculo bacteriano por gramo de pez, determinado por pesado individual al momento de la inoculación. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones testeadas por aislamiento.

El grupo control se conformó con 10 animales alojados en las mismas condiciones e inoculados por la misma vía con igual volumen de suero fisiológico estéril.

La maniobra de pesado e inoculación de los animales se llevó a cabo bajo sedación. Para ello se empleó una solución alcohólica al 10% (v/v) de Eugenol[®] (Droguería Industrial Uruguaya, código: 41531) a una concentración de 1mL por litro de agua en baño de inmersión según protocolo aprobado por la CHEA de la UdelaR (CHEA, 2006).

La confección del inóculo se llevó a cabo momentos antes de iniciar la experiencia. Para ello, a partir de un cultivo puro con 24 horas de crecimiento en TSA se generó una suspensión en suero fisiológico estéril hasta alcanzar una absorbancia de 0,5 a 600nm. Luego, se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta alcanzar las siete concentraciones bacterianas empleadas en la infección experimental.

La concentración bacteriana de cada inóculo se infirió a partir de conteo total de unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL) del inóculo más diluido de cada aislamiento y posterior extrapolación a las concentraciones más elevadas.

Previo al inicio de la infección experimental se sembró una alícuota de cada inóculo en TSA para asegurar la viabilidad y pureza de las bacterias a inocular.

Los animales inoculados fueron observados cada ocho horas para registrar mortandades, a medida que se hallaron peces muertos fueron retirados de los

acuarios para no alterar la calidad del agua. Durante el tiempo que duró la experiencia se tomó como criterio de punto final la observación de alteraciones en la salud que podrían estar implicando sufrimiento para los animales y/o un claro signo de muerte inminente. Una vez finalizada la experiencia todos los animales fueron sacrificados. El sacrificio en todos los casos se llevó a cabo como se describe en el apartado 6.1.

4.4.2. Hallazgos de histopatología

Con la finalidad de registrar el proceso patológico determinado por cada aislamiento inoculado, se realizó un estudio histopatológico en los ejemplares procedentes de cada grupo experimental.

Para la realización de preparados histológicos se tomaron muestras de un animal de cada grupo inoculado con la concentración bacteriana más elevada. Se seleccionaron animales agonizantes dentro de las 24 horas posinoculación, con claros signos de muerte inminente y fueron considerados como bajas para el cálculo de $DL50_{96}$. Estos individuos se sacrificaron con la técnica descrita en el apartado 6.1 y se fijaron *in toto* en solución de Davidson durante 24 a 48 horas (ver Anexo 2). Del mismo modo se procedió con un pez procedente del grupo control.

Luego del procesamiento histológico de rutina para la tinción con hematoxilina y eosina, los preparados se observaron a 10, 100, 400 y 1000 aumentos en un microscopio óptico Olympus[®] BX50. La interpretación y descripción de lesiones histopatológicas se basó en los criterios propuestos por Ferguson y colaboradores (2006).

4.5. Análisis estadísticos

Tanto el tratamiento estadístico de los datos (Análisis de correlaciones, ANOVA, χ^2 , Kruskal-Wallis) como la confección de gráficos, se llevaron a cabo mediante el empleo del *software* Statgraphic Centurion XVI[®] versión 16.1.18 (StatPoint Technologies Inc.).

5. Resultados

5.1. Origen e identificación de los aislamientos

Se seleccionaron 38 aislamientos sospechosos de pertenecer al grupo *Aeromonas* móviles obtenidos a partir de casos clínicos individuales o poblacionales presumiblemente originados a partir de una infección por *Aeromonas* spp. Treinta de estos aislamientos (81,6%) fueron identificados a nivel bioquímico como miembros del complejo *Aeromonas hydrophila/caviae* y los restantes 8 aislamientos (18,4%) fueron identificados fenotípicamente como *Aeromonas sobria*.

Luego de la identificación basada en la amplificación y secuenciación de los genes que codifican para el ARNr 16S y la enzima *gyrB*, se descartaron de este estudio cuatro aislamientos de los anteriormente mencionados por no pertenecer al grupo de los aeromonadales (se identificaron dos aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* y dos aislamientos de *Morganella morganii*).

En lo que respecta a los aislamientos restantes, fue posible identificar cinco especies diferentes de *Aeromonas* spp.: dos aislamientos de *A. allosaccharophila* (5,9%), dos de *A. bestiarium* (5,9%), un aislamiento de *A. caviae* (2,9%), cinco aislamientos de *A. punctata* (14,7%), 11 aislamientos de *A. veronii* (32,4%) y 12 de *A. hydrophila* (38,2%).

En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos a partir de la identificación fenotípica y genética del total de los aislamientos, al tiempo que se detalla la procedencia de cada uno de ellos y algunas condiciones epizootiológicas de los hospederos. En el Anexo 3, a su vez, se presentan los resultados extendidos de la identificación molecular, mostrándose los taxones más significativos obtenidos al comparar las secuencias problema con las depositadas en la base de datos *Genbank* de NCBI mediante la herramienta BLASTn.

Tabla 7. Principales características de los aislamientos de *Aeromonas* spp. móviles, realizados a partir de peces cultivados en Uruguay.

Ref	Identificación		Hospedero		Datos epizootiológicos		
	Molecular	Bioq	Especie	Órgano	Tipo de caso	Tipo de exp	Estación
A1	<i>A. allosaccharophila</i>	H/C	Sábalo (<i>Prochilodus lineatus</i>)	RA	E	P3	V
A2	<i>A. allosaccharophila</i>	S	Esturión siberiano (<i>Acipenser baerii</i>)	RA	E	P1	V
B1	<i>A. bestiarium</i>	H/C	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	E	P2	O
B2	<i>A. bestiarium</i>	H/C	Carasius ó Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	LA	CU	AC1	O
C	<i>A. caviae</i>	H/C	Esturión ruso (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	RA	E	P2	O
H1	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Cepa tipo ATCC 7966 [®] (aislada de una lata de leche con olor a pescado)				
H2	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	CE	E	P2	O
H3	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Esturión ruso (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	RA	E	P2	V
H4	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Esturión ruso (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	CE	E	P2	V
H5	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Esturión sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>)	UL	CU	B1	O

H6 ^a	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Esturión sterlet (<i>A. ruthenus</i>)	UL	E	P1	I
H7 ^a	<i>A. hydrophila</i>	S	Esturión sterlet (<i>A. ruthenus</i>)	UL	E	P1	I
H8	<i>A. hydrophila</i>	S	Lebistes (<i>Poecilia reticulata</i>)	PI	E	P4	V
H9	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Esturión ruso (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	RA	E	P2	O
H10	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Carasius ó Goldfish (<i>C. auratus</i>)	RA	CU	AC2	O
H11	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Señorita (<i>Gymnoto</i> sp.)	RA	E	B2	O
H12	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Tortuga campanita (<i>Phrynops hylarii</i>)	UL	CU	EO	O
H13	<i>A. hydrophila</i>	H/C	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	CU	B1	P
P1	<i>A. punctata</i>	H/C	Carasius ó Goldfish (<i>C. auratus</i>)	RA	CU	B1	O
P2 ^b	<i>A. punctata</i>	H/C	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	E	P2	O
P3 ^b	<i>A. punctata</i>	H/C	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	E	P2	O
P4 ^c	<i>A. punctata</i>	H/C	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	E	P2	O
P5 ^c	<i>A. punctata</i>	H/C	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	E	P2	O
V1	<i>A. veronii</i>	S	Esturión ruso (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	CE	E	P2	V
V2	<i>A. veronii</i>	H/C	Limpiafondo (<i>Corydoras paleatus</i>)	RA	E	P5	V
V3 ^d	<i>A. veronii</i>	S	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	E	P2	O
V4 ^d	<i>A. veronii</i>	S	Esturión siberiano (<i>A. baerii</i>)	RA	E	P2	O
V5	<i>A. veronii</i>	H/C	Carasius ó Goldfish (<i>C. auratus</i>)	RA	E	P6	O
V6	<i>A. veronii</i>	H/C	Carasius ó Goldfish (<i>C. auratus</i>)	LA	CU	B1	O
V7	<i>A. veronii</i>	H/C	Híbrido: <i>C. auratus</i> + <i>Cyprinus carpio</i>	RA	CU	B1	O
V8	<i>A. veronii</i>	H/C	Carasius ó Goldfish (<i>C. auratus</i>)	UL	CU	B1	O
V9	<i>A. veronii</i>	H/C	Esturión ruso (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	RA	E	P2	O
V10 ^e	<i>A. veronii</i>	S	Esturión ruso (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	RA	E	P2	O
V11 ^e	<i>A. veronii</i>	S	Esturión ruso (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	RA	E	P2	O

^a, ^b, ^c, ^d, ^e: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico

H/C: complejo *Aeromonas hydrophila/caviae* y S: *Aeromonas sobria*

CE: cerebro, LA: líquido ascítico, RA: riñón anterior y PE: piel

CU: caso único y E: epizootia

Tipo de exp (tipo de explotación) AC: acuario comercial, B: bioterio, EO: estanque ornamental y P: piscicultura
I: invierno, O: otoño, P: primavera y V: verano

Se puede observar que en aquellos casos en los que varios aislamientos proceden de un mismo brote epizootico, se aisló una sola especie de *Aeromonas* como agente etiológico asociado al proceso.

El análisis de independencia realizado entre las variables especie bacteriana, especie de hospedero, órgano desde donde se realizó el aislamiento, tipo de caso clínico, tipo de explotación y época del año, presentó una asociación entre: tipo de caso clínico y tipo de explotación por un lado y entre el tipo de explotación y la especie de

hospedero por otro ($p < 0,05$). En la Tabla 8 se presentan los resultados de la prueba de independencia (Chi^2) entre las variables epizootiológicas y las especies de *Aeromonas* móviles que se aíslan de peces cultivados en Uruguay.

Tabla 8. Prueba de independencia entre las variables epizootiológicas y las especies de *Aeromonas* spp. móviles que se aíslan de peces cultivados en Uruguay.

	Estadístico Chi^2	Grados de libertad	Probabilidad
Especie de hospedero	43,279	45	0,5
Órgano	17,656	20	0,6
Tipo de caso	1,989	5	0,8
Tipo de explotación	11,269	15	0,7
Estación	15,709	15	0,4

Se pudo determinar a su vez las relaciones existentes entre las variables "especie del hospedero" y "tipo de explotación" (Chi^2 : 57,157; 27 grados de libertad; $p < 0,01$) y "tipo de explotación" y "tipo de caso clínico" (Chi^2 : 27,76; 3 grados de libertad; $p < 0,01$). De modo tal que, por ejemplo, el cultivo de esturiones es la actividad más representativa de la acuicultura para consumo humano en nuestro país y las epizootias de SAM ocurren con mayor frecuencia en establecimientos de piscicultura intensiva.

5.2. Caracterización bioquímica

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización bioquímica de los aislamientos se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Características bioquímicas de *Aeromonas* spp. aisladas de organismos acuáticos cultivados en Uruguay. Los valores corresponden a resultados positivos expresados como porcentajes del total de aislamientos, el número entre paréntesis corresponde al total de aislamientos evaluados para cada especie.

	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> (2)	<i>Aeromonas bestiarium</i> (2)	<i>Aeromonas caviae</i> (1)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (13)	<i>Aeromonas punctata</i> (5)	<i>Aeromonas veronii</i> (11)
Nitratos a nitritos	100	100	100	100	100	100
Formación de indol	100	100	100	100	100	100
Hidrolisis ácida de la glucosa	50	100	100	77	100	64
Actividad de las enzimas:						
Arginina dihidrolasa	50	100	0	69	60	91
Ureasa	100	0	0	0	20	9,1
β -glucosidasa (esculina)	50	100	100	85	100	55
Proteasas	100	100	100	100	100	91
β -galactosidasa	100	100	100	100	100	91
Asimilación de los carbohidratos:						
Glucosa	100	100	100	100	100	100
Arabinosa	0 ^a	0 ^a	100*	85 ^b	100 ^b	45 ^a
Manosa	100 ^c	100 ^c	100*	100 ^c	60 ^d	100 ^c
Manitol	100	100	100	100	100	100
N-acetil-glucosamida	100	100	100	92	100	100

Maltosa	100	100	100	100	100	100
Gluconato	100	100	100	100	100	100
Caprato	100	100	100	100	100	100
Adipato	0	0	0	15	0	0
Malato	100	100	100	92	100	100
Citrato	50	0	100	69	100	73
Fenil-Acetato	0	0	0	7,7	0	9,1
Actividad hemolítica	0 ^f	100 ^{gh}	0*	100 ^h	0 ^f	55 ^g

Asimilación de Arabinosa: letras diferentes indican diferencias (^a, ^b), estadístico Kuskal-Wallis= 13,47 p<0,01

Asimilación de Manosa: letras diferentes indican diferencias (^d, ^e), estadístico Kuskal-Wallis= 11,16 p<0,05

Actividad hemolítica: letras diferentes indican diferencias (^f, ^g, ^h), estadístico Kuskal-Wallis= 20,6 p<<0,01

*No se tuvo en cuenta *A. caviae* en los análisis debido a que, por su baja representatividad, dificulta la interpretación de los resultados (la presencia/ausencia de *A. caviae* en los análisis no afecta las diferencias halladas entre los demás aislamientos).

A continuación se presentan los coeficientes de variación en el perfil bioquímico, calculados para aquellas especies con dos o más representantes. Este coeficiente, expresado en porcentaje, brinda una idea de la variabilidad interna en los perfiles bioquímicos que presenta cada especie:

- *Aeromonas allosaccharophila*: 56,7%
- *Aeromonas bestiarium*: 0
- *Aeromonas hydrophila*: 40,1%
- *Aeromonas punctata*: 49,2%
- *Aeromonas veronii*: 45,1%

Cabe destacar la identidad en los perfiles bioquímicos presentados por ambos aislamientos de *Aeromonas bestiarium* y a su vez la existencia de varios factores bioquímicos que se mantienen invariables entre especies. Únicamente se encontraron diferencias en los resultados correspondientes a tres de las 21 variables evaluadas (14,3%), a saber: asimilación de arabinosa, asimilación de manosa y actividad hemolítica.

5.3. Antibiograma

En la Tabla 10 se presentan los perfiles de sensibilidad desarrollados por los distintos aislamientos ante los diferentes antibióticos evaluados. Los valores corresponden al diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros. Los aislamientos correspondientes a un mismo brote epizootológico están identificados con letras iguales en superíndice. Se destacaron en negritas, a su vez, aquellos diámetros de halo de inhibición correspondientes a sensibilidad intermedia o resistencia según estándar de CLSI y/o especificaciones del fabricante de los sensidiscos empleados (ver Tabla 3).

Tabla 10. Resultados del antibiograma realizado sobre *Aeromonas* spp. móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. Se empleó la técnica de difusión en placa según protocolo de CLSI (2006). Los valores corresponden al diámetro del halo de inhibición en milímetros.

Especie	Aislamiento	AMC	AMD	AP	ENO	ER	NF	OT	P	TFM	SXT
<i>A. allosaccharophila</i>	A1	20	-	-	37	20	25	32	-	36	36
	A2	21	-	-	34	24	25	33	-	34	32
<i>A. bestiarium</i>	B1	15	-	-	37	20	23	32	-	33	33
	B2	18	-	-	38	19	26	33	-	35	34
<i>A. caviae</i>	C1	12	-	-	30	19	20	24	-	33	26
	H1	15	-	-	36	9	24	23	-	32	23
<i>A. hydrophila</i>	H2	15	-	-	32	15	24	35	-	36	36
	H3	16	-	-	37	15	24	34	-	36	35
	H4	11	-	-	31	18	24	30	-	26	32
	H5	17	-	-	37	20	23	32	-	33	35

	H6 ^a	14	-	-	35	16	23	33	-	33	35
	H7 ^a	12	-	-	39	17	25	35	-	41	32
	H8	14	-	-	33	15	23	9	-	-	-
	H9	13	-	-	32	21	21	-	-	-	-
	H10	13	-	-	33	23	21	29	-	31	30
	H11	15	-	-	21	15	22	30	-	31	29
	H12	15	-	-	34	17	22	33	-	32	33
	H13	10	-	-	32	18	21	27	-	29	29
<i>A. punctata</i>	P1	13	-	-	31	13	20	26	-	33	20
	P2 ^b	13	-	-	32	15	20	20	-	32	20
	P3 ^b	12	-	-	32	18	21	28	-	32	25
	P4 ^c	13	-	-	29	16	19	23	-	29	25
	P5 ^c	15	-	-	32	16	21	23	-	32	24
<i>A. veronii</i>	V1	15	-	-	43	22	25	33	-	35	35
	V2	14	-	-	29	15	21	10	-	32	25
	V3 ^d	13	-	-	36	21	22	13	-	-	25
	V4 ^d	16	-	-	39	24	22	35	-	32	38
	V5	16	-	-	37	21	22	9	-	32	24
	V6	15	-	-	21	24	19	13	-	-	32
	V7	14	-	-	25	18	24	-	-	36	26
	V8	13	-	-	31	12	21	26	-	32	19
	V9	20	-	-	26	16	23	27	-	33	22
	V10 ^e	14	-	-	36	15	21	23	-	32	23
	V11 ^e	16	-	-	34	18	21	24	-	33	25

AMC: amoxicilina ácido clavulánico (2:1, 20µg), AMD: ampicilina dicloxacilina (10:1, 10µg), AP: ampicilina (10µg), ENO: enrofloxacin (30µg), ER: eritromicina (15µg), NF: nitrofurantoína (300µg), OT: oxitetraciclina (30µg), P: penicilina (10U), TFM: tiamfenicol (65µg), SXT: sulfametoxazole trimetopim (19:1, 25µg).

Se destacaron en negrita aquellos halos correspondientes a sensibilidad intermedia o resistencia según estándar de CLSI y/o especificaciones del fabricante de los sensibilizadores empleados. (-) corresponde a aquellos casos donde no se detectó inhibición del crecimiento bacteriano. ^{a, b, c, d, e}: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epidemiológico.

A partir de estos resultados es posible apreciar que todos los aislamientos evaluados son resistentes a las penicilinas, ya sea naturales o sintéticas y que la adición de un inhibidor de las β-lactamasas (ácido clavulánico), permite desarrollar sensibilidad únicamente al 11,8% de los aislamientos analizados (cuatro de 34 aislamientos resultaron sensibles a amoxicilina + ácido clavulánico).

Se destaca a su vez el escaso número de aislamientos sensibles a los macrólidos (11,8%), teniendo en cuenta que también en este caso solo cuatro de 34 aislamientos desarrollaron sensibilidad a la eritromicina.

Observando lo que ocurre con el resto de los antibióticos estudiados, es posible apreciar variabilidad fenotípica únicamente en algunos aislamientos pertenecientes a las especies *A. hydrophila* y *A. veronii*, mientras que el resto de las especies evaluadas poseen perfiles de antibiograma similares entre sí.

En la Tabla 11, se muestran los resultados obtenidos para el cálculo del índice MAR. Teniendo en cuenta que varios autores postulan que *Aeromonas* spp. es por definición resistente a la ampicilina (McInnes *et al.*, 1976; Aoki, 1999) y por ende podría ser naturalmente resistente a otras penicilinas también, se excluyeron los antibióticos β-lactámicos del análisis para aumentar la confiabilidad de los hallazgos.

Tabla 11. Índices de multirresistencia a antibióticos (MAR) calculados para *Aeromonas* spp. aisladas de peces cultivados en Uruguay sobre un total de seis antibióticos evaluados.

<i>A. allosaccharophila</i>	A1	0,14
	A2	0
<i>A. bestiarium</i>	B1	0,28
	B2	0,14
<i>A. caviae</i>	C1	0,28
	H1	0,28
<i>A. hydrophila</i>	H2	0,28
	H3	0,28
	H4	0,28
	H5	0,28
	H6 ^a	0,28
	H7 ^a	0,28
	H8	0,71
	H9	0,71
	H10	0,14
	H11	0,28
	H12	0,28
	H13	0,28
	<i>A. punctata</i>	P1
P2 ^b		0,5
P3 ^b		0,5
P4 ^c		0,5
P5 ^c		0,5
<i>A. veronii</i>	V1	0,5
	V2	0,6
	V3 ^d	0,7
	V4 ^d	0,4
	V5	0,6
	V6	0,6
	V7	0,6
	V8	0,5
	V9	0,4
	V10 ^e	0,5
	V11 ^e	0,5

Valores de $MAR \geq 0,2$ son indicativos de aislamientos con alto riesgo de procedencia de ambientes donde se hace uso habitual de antibióticos.

^a, ^b, ^c, ^d, ^e: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootiológico.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la Tabla 11, es posible apreciar que el 82,3% de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. son multirresistentes. Se destacan, en particular, dos aislamientos de *A. hydrophila* (H8 y H9) que desarrollaron resistencia ante cinco de los siete antibióticos evaluados y los dos aislamientos nacionales de *A. allosaccharophila*, dado que poseen valores de MAR que los situarían como aislamientos que proceden de un ambiente con un uso mínimo o nulo de antibióticos (lo mismo ocurriría con los aislamientos B2 de *A. bestiarium* y H10 de *A. hydrophila*).

5.4. Genes de virulencia

En la Tabla 12 se presentan las frecuencias de hallazgo de cada uno de los genes de virulencia relevados. En aquellos casos en los que se encontraron distintos valores de frecuencia dentro de una especie y con la finalidad de conocer la representatividad de cada uno de los genes para la misma, se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar la significancia de dichas diferencias con un nivel de

confianza del 95%. Se excluyó la cepa tipo de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966®) de estos resultados (control positivo para todos los genes evaluados).

Tabla 12. Frecuencias de detección (en porcentaje) de cinco genes de virulencia relevados en *Aeromonas* spp. móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay.

Aislamientos	Genes de virulencia				
	<i>act</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>ela</i>	<i>lip</i>
<i>A. allosaccharophila</i>	0	0	0	0	0
<i>A. bestiarium</i>	100	100	100	100	100
<i>A. caviae</i>	0	0	0	100	100
<i>A. hydrophila</i>	61,5 ^a	61,5 ^a	100 ^b	100 ^b	92,3 ^b
<i>A. punctata</i>	0	0	0	100	100
<i>A. veronii</i>	81,8 ^c	72,7 ^c	9,1 ^d	54,5 ^c	9,1 ^d

^{a, b, c, d}: letras diferentes indican diferencias (*A. hydrophila*: estadístico Kruskal-Wallis= 14,44 p<0,05; *A. veronii*: estadístico Kruskal-Wallis= 20,88 p<0,01)

Los aislamientos correspondientes a las especies *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium* y *A. punctata* presentaron estabilidad en la distribución de sus genes de virulencia, a diferencia de lo ocurrido con los aislamientos de *A. hydrophila* y *A. veronii*.

Seis de los aislamientos de *Aeromonas hydrophila* presentaron todos los genes de virulencia buscados (53,8%), un único aislamiento presentó cuatro de los cinco genes buscados (ausencia de *lip*) (7,7%) y los restantes cinco presentaron solo tres genes de virulencia (ausencia de *act* y *alt*) (38,5%). Los genes *ast*, *ela* y *lip* fueron los más frecuentemente hallados (92,3 a 100% de los aislamientos) entre los aislamientos de *A. hydrophila*, seguidos por los genes *act* y *alt* (61,5%).

En lo que respecta a *Aeromonas veronii*, el número máximo de genes de virulencia identificados fue de tres, esto corresponde a cinco (54,5%) de los 11 aislamientos evaluados para la especie (ausencia de *ast* y *lip* en cuatro casos y *ela* y *lip* en un caso). Cuatro aislamientos de *A. veronii* (36,3%) presentaron dos genes (ausencia de *ast*, *lip* y *ela* en tres casos y de *act*, *ast* y *alt* en el caso restante) y dos aislamientos (18,2%) presentaron un único gen de virulencia (*act* ó *ela*). Los genes más frecuentes entre los aislamientos nacionales de esta especie fueron *act*, *alt* y *ela* (54,5 a 81,8%), seguidos por *ast* y *lip* con baja representatividad (9,1%).

No se encontraron diferencias en lo que respecta a la frecuencia de identificación de cada uno de los genes de virulencia para el conjunto de los aislamientos de *Aeromonas* spp. evaluados (estadístico Kruskal-Wallis=8,7; p=0,12). El gen *lip* estuvo presente en el 79,4% de los casos, seguido por *ela* 61,8%; *act* 55,9%; *alt* 52,9% y *ast* 47,1%. Nótese que en la Tabla 12, se han identificado, con código de letras diferentes en superíndice, las diferencias en la prevalencia de cada uno de los genes a la interna de cada especie (comparación no válida entre especies).

En función de estos resultados, es posible discriminar diez genotipos diferentes entre los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. (ver Tabla 13). Es de destacar que todos los aislamientos que se agrupan en función de un mismo genotipo de virulencia, comparten, a su vez, las mismas características en lo que respecta a la actividad hemolítica, única relación existente entre estos genotipos y las variables fenotípicas de los aislamientos analizados.

Tabla 13. Genotipos de aeromonadales aislados de peces cultivados en Uruguay, obtenidos a partir de la búsqueda de cinco genes de virulencia con *primers* genéricos, frecuencia de identificación de cada uno y relación con la actividad hemolítica de los aislamientos.

Genotipo de virulencia	Aislamientos	Actividad hemolítica	Frecuencia de identificación (%)
<i>act</i> ⁺ / <i>alt</i> ⁺ / <i>ast</i> ⁺ / <i>ela</i> ⁺ / <i>lip</i> ⁺	B1, B2, H1, H2, H3, H6, H8, H9, H13	+	26,5
<i>act</i> ⁻ / <i>alt</i> ⁻ / <i>ast</i> ⁻ / <i>ela</i> ⁺ / <i>lip</i> ⁺	C1, V8, P1, P2, P3, P4, P5	-	20,6
<i>act</i> ⁻ / <i>alt</i> ⁻ / <i>ast</i> ⁺ / <i>ela</i> ⁺ / <i>lip</i> ⁺	H4, H5, H7, H10, H11	+	14,7
<i>act</i> ⁺ / <i>alt</i> ⁺ / <i>ast</i> ⁻ / <i>ela</i> ⁺ / <i>lip</i> ⁻	V5, V9, V10, V11	-	11,8
<i>act</i> ⁺ / <i>alt</i> ⁺ / <i>ast</i> ⁻ / <i>ela</i> ⁻ / <i>lip</i> ⁻	V1, V4, V7	+	8,8
<i>act</i> ⁻ / <i>alt</i> ⁻ / <i>ast</i> ⁻ / <i>ela</i> ⁻ / <i>lip</i> ⁻	A1, A2	-	5,9
<i>act</i> ⁺ / <i>alt</i> ⁺ / <i>ast</i> ⁺ / <i>ela</i> ⁺ / <i>lip</i> ⁻	H12	+	2,9
<i>act</i> ⁻ / <i>alt</i> ⁻ / <i>ast</i> ⁺ / <i>ela</i> ⁺ / <i>lip</i> ⁻	V2	+	2,9
<i>act</i> ⁻ / <i>alt</i> ⁻ / <i>ast</i> ⁻ / <i>ela</i> ⁻ / <i>lip</i> ⁻	V3	+	2,9
<i>act</i> ⁻ / <i>alt</i> ⁻ / <i>ast</i> ⁻ / <i>ela</i> ⁺ / <i>lip</i> ⁻	V6	-	2,9

A: *Aeromonas allosaccharophila*, B: *A. bestiarium*, C: *A. caviae*, H: *A. hydrophila*, P: *A. punctata*, V: *A. veronii*. + ó -: indican presencia o ausencia de actividad hemolítica respectivamente.

Teniendo en cuenta la frecuencia de identificación de cada genotipo de virulencia, podemos apreciar que se destacan cuatro de ellos por sobre el resto, a pesar de lo cual no se hallaron diferencias entre dichas frecuencias (χ^2 : 21,564, g.l.: 33, p=0,94).

Dichos genotipos son:

- *act*⁺/*alt*⁺/*ast*⁺/*ela*⁺/*lip*⁺ (26,5%), aislamientos hemolíticos.
- *act*⁻/*alt*⁻/*ast*⁻/*ela*⁺/*lip*⁺ (20,6%), aislamientos no hemolíticos.
- *act*⁻/*alt*⁻/*ast*⁺/*ela*⁺/*lip*⁺ (14,7%), aislamientos hemolíticos.
- *act*⁺/*alt*⁺/*ast*⁻/*ela*⁺/*lip*⁻ (11,8%), aislamientos no hemolíticos.

Los resultados del ANOVA multifactorial, tomando a la actividad hemolítica como variable dependiente y las frecuencias de identificación de cada gen de virulencia como factores, indican que los genes analizados no poseen una incidencia directa sobre la actividad hemolítica (*act*: p=0,13; *alt*: p=0,34; *ast*: p=0,07; *ela*: 0,29; *lip*: 0,52) aunque se observa una tendencia del gen *ast* a estar presente en aquellos aislamientos capaces de producir hemólisis (F=6,0; p=0,07), lo que es corroborado, a su vez, por la asociación existente entre dichas variables. En la Tabla 14 se presenta la prueba de independencia (χ^2) entre las variables gen de virulencia y la actividad hemolítica observada en los aislamientos relacionados.

Tabla 14: Prueba de independencia entre las variables gen de virulencia y actividad hemolítica para distintos aislamientos de *Aeromonas* spp. procedentes de peces cultivados en Uruguay.

	Estadístico χ^2	Grados de libertad	Probabilidad
<i>act</i>	2,723	1	0,1
<i>alt</i>	1,102	1	0,3
<i>ast</i>	3,6	1	<0,05
<i>ela</i>	1,102	1	0,3
<i>lip</i>	0,225	1	0,6

Por otra parte, al analizar las relaciones existentes entre variables epizootiológicas y genotipos de virulencia, es posible observar que existe una asociación entre el

"genotipo de virulencia" y la "especie bacteriana" (además de las relaciones ya destacadas en la Tabla 8 para estas variables).

Tabla 15. Prueba de independencia (χ^2) entre la variable genotipos de virulencia y variables epizootiológicas en *Aeromonas* spp. aisladas de peces de Uruguay con algunas variables epizootiológicas.

	χ^2	Grados de libertad	Probabilidad
Especie bacteriana	81,696	36	<<0,01
Órgano	36,49	36	0,4
Tipo de explotación	8,824	9	0,4
Estación	22,954	27	0,7

Teniendo en cuenta esta asociación entre variables puede decirse que los aislamientos nacionales de *Aeromonas hydrophila* presentan dos perfiles de virulencia predominantes, a saber: el 54,5% de los aislamientos posee todos los genes de virulencia evaluados (genotipo $act^+/alt^+/ast^+/ela^+/lip^+$) y el 45,4% presenta el genotipo $act^-/alt^-/ast^+/ela^+/lip^+$. Un único aislamiento de *A. hydrophila* presenta el genotipo $act^+/alt^+/ast^+/ela^+/lip^-$ (no compartido con otras especies), por lo que constituye la única excepción a la predominancia de dos perfiles mencionada.

En lo que respecta a *A. allosaccharophila* y *A. bestiarium*, si bien el número de representantes de cada especie es escaso, en ambos casos se observa uniformidad en los genotipos de virulencia hallados, de modo tal que los representantes de cada una de las especies comparten un genotipo particular. El genotipo predominante para *A. allosaccharophila* carece de los genes de virulencia buscados ($act^-/alt^-/ast^-/ela^-/lip^-$) y en contraposición, ambos aislamientos de *A. bestiarium* poseen todos los genes evaluados ($act^+/alt^+/ast^+/ela^+/lip^+$), genotipo compartido, a su vez, con algunos aislamientos de *A. hydrophila*.

Tomando a *A. caviae* y *A. punctata* como un mismo taxón (teniendo en cuenta lo expresado previamente para estas especies), es posible observar, aquí también, una elevada estabilidad en la distribución de sus genotipos de virulencia. Todos los representantes de este grupo presentaron el genotipo $act^-/alt^-/ast^-/ela^+/lip^+$, junto con un aislamiento de *A. veronii* (V8), única excepción dentro de esta agrupación específica.

Los aislamientos nacionales de *A. veronii*, por su parte, presentaron la mayor diversidad de genotipos de virulencia observada en este trabajo. En esta especie pueden apreciarse seis genotipos diferentes, muchos de los cuales no son compartidos con otras especies. Dos genotipos predominan por sobre el resto, dada su elevada frecuencia de identificación dentro de la especie, estos son: el genotipo $act^+/alt^+/ast^-/ela^+/lip^-$, que está representado por el 36,4% de los aislamientos y el genotipo $act^+/alt^+/ast^-/ela^-/lip^-$, al cual corresponde el 27,3% de los aislamientos evaluados; los restantes aislamientos nacionales de *A. veronii*, a excepción de V8, también poseen genotipos de virulencia no compartidos con otras especies y en este

caso, a su vez, tampoco son compartidos con otros aislamientos conoespecíficos, V2 posee el genotipo: $act^+/alt^+/ast^+/ela^-/lip^-$, V3: $act^+/alt^-/ast^-/ela^-/lip^-$ y V6: $act^-/alt^-/ast^-/ela^+/lip^-$.

5.5. Caracterización genética

Se realizó una caracterización genética de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. desde dos abordajes diferentes.

Por un lado, cada uno de los aislamientos fue sometido a técnicas de tipificación génica global (*rep*-PCR) empleando los *primers*: BOX, ERIC y REP. A partir de la interpretación informática de las imágenes correspondientes a las corridas electroforéticas de cada técnica se llevó a cabo un análisis de conglomerados (*clusters*) para determinar la diversidad de los aislamientos y la similitud existente entre ellos.

Por otro lado, se realizaron análisis filogenéticos empleando las secuencias de los genes ARNr 16S y *gyrB* procedentes de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp., para determinar el grado de similitud existente entre ellos. A su vez se realizó un análisis comparativo entre las secuencias de los aislamientos procedentes de este estudio y las depositadas en bases de datos de acceso público (PubMLST/*Aeromonas* y RDP).

5.5.1. Tipificación con técnicas *rep*-PCR

A excepción de *Aeromonas punctata*, todos los aislamientos de *Aeromonas* spp. empleados en este estudio fueron genéticamente diversos de acuerdo con los resultados de las técnicas de tipificación usadas. Fue posible apreciar, en general, patrones de bandas complejos, caracterizados por un promedio de 22 bandas por carril con diferentes tamaños en pb e intensidades variables.

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los *primers* utilizados.

5.5.1.1. Empleo de *primers* BOX

En la Figura 1 se muestra la corrida electroforética correspondiente a la tipificación con *primers* BOX para las especies *A. hydrophila* (H1 a H13) y *A. punctata* (P1, P2, P4 y P5). Del mismo modo, en la Figura 2 se presentan los resultados de dicha técnica correspondientes a las especies *A. allosaccharophila* (A1 y A2), *A. bestiarium* (B1 y B2) y *A. veronii* (V1 a V11). Mediante esta técnica no fue posible tipificar un aislamiento de *A. punctata* (P3).

Es posible apreciar en la Figura 1 la diversidad en el perfil de bandas que presentan los distintos aislamientos de *A. hydrophila*, en contraposición con la similitud en el patrón presentado por *A. punctata*.

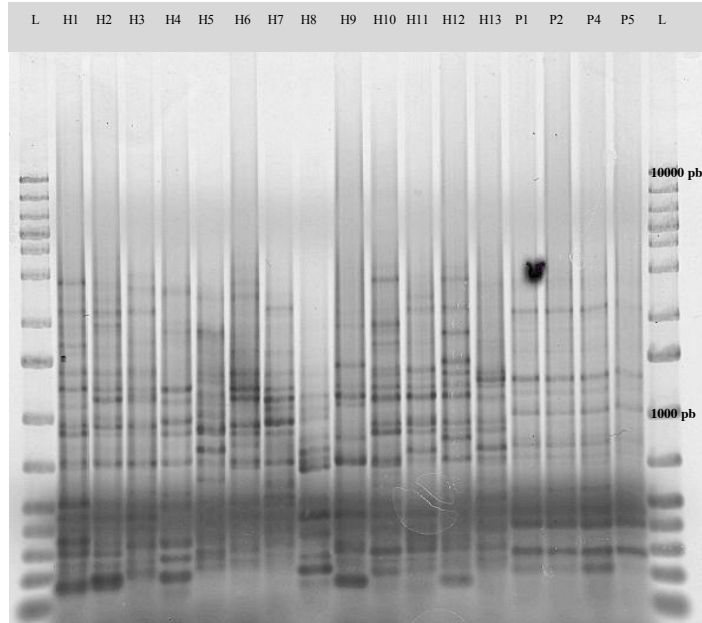


Figura 1. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con primers BOX realizada sobre *Aeromonas hydrophila* (H) y *A. punctata* (P) aisladas de peces cultivados en Uruguay (L: ladder 10000 pb).

A diferencia de lo expresado anteriormente, en la Figura 2 puede observarse que, si bien los aislamientos correspondientes a las especies *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium* y *A. veronii* poseen algunas bandas en común, sus patrones no son coincidentes.

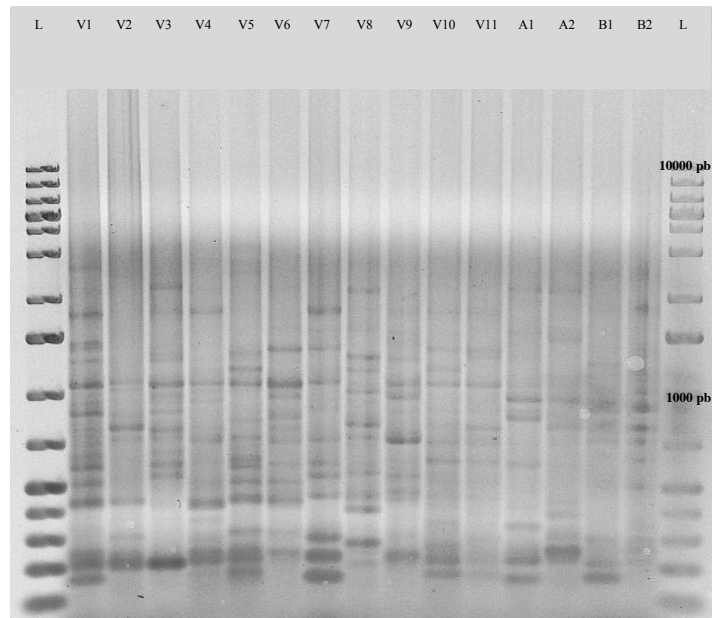


Figura 2. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con primers BOX de *Aeromonas allosaccharophila* (A), *A. bestiarium* (B) y *A. veronii* (V) aisladas de peces cultivados en Uruguay (L: ladder 10000 pb).

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de *clusters* realizado sobre las corridas electroforéticas de tipificación con *primers* BOX de las especies *A. hydrophila* (Figura 3), *A. veronii* (Figura 4) y *A. punctata* (Figura 5). Nótese que los aislamientos emparentados epizootiológicamente no se encuentran asociados genéticamente, a excepción de lo que ocurre con *A. punctata* cuyos cuatro representantes poseen el mismo grado de similitud, a pesar de no estar todos relacionados entre sí.

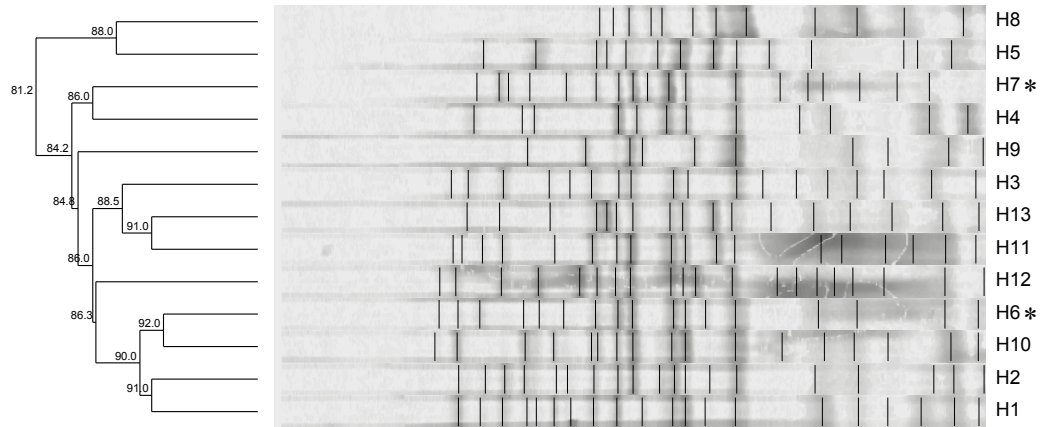


Figura 3. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H1 a H13) con *primers* BOX mediante empleo del *software* Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*: indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

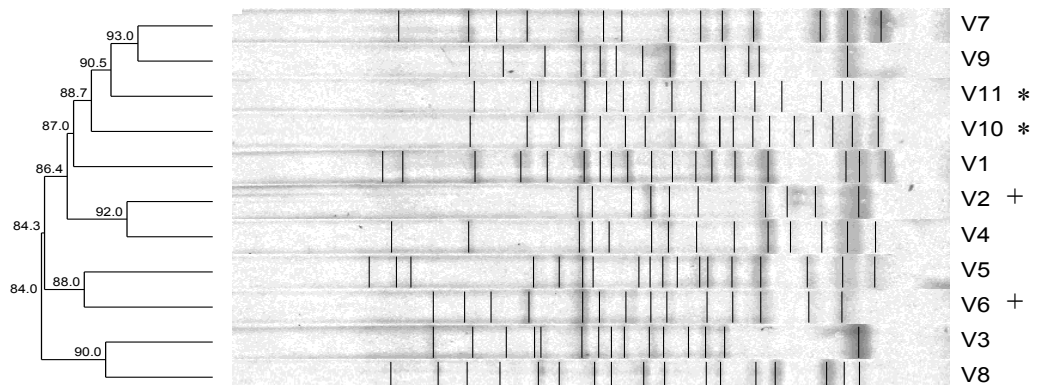


Figura 4. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas veronii* (V1 a V11) con *primers* BOX mediante empleo del *software* Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*, +: símbolos iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

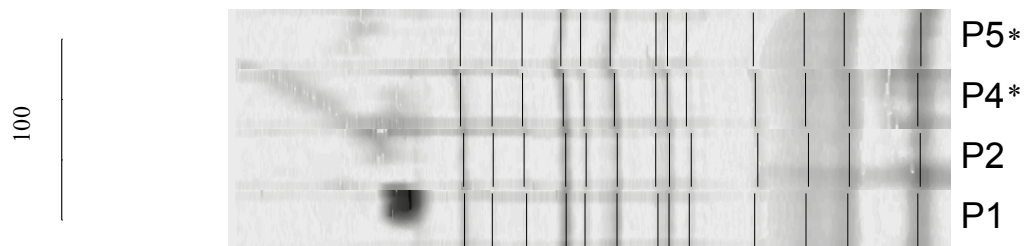


Figura 5. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas punctata* (P1, P2, P4 y P5) con *primers* BOX mediante empleo del software Gelcompar II[®]. El número indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*: aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

5.5.1.2. Empleo de *primers* ERIC

En las Figura 6 se presenta las corrida electroforética correspondiente a la tipificación con *primers* ERIC de las especies *A. allosaccharophila* (A1 y A2), *A. hydrophila* (H1 a H3 y H5 a H13) y *A. punctata* (P1 a P4). En la Figura 7 se presentan los resultados correspondientes a las especies *A. bestiarium* (B1 y B2) y *A. veronii* (V1 a V11). Mediante esta técnica no fue posible tipificar un aislamiento de *A. hydrophila* (H4) y un aislamiento de *A. punctata* (P5).

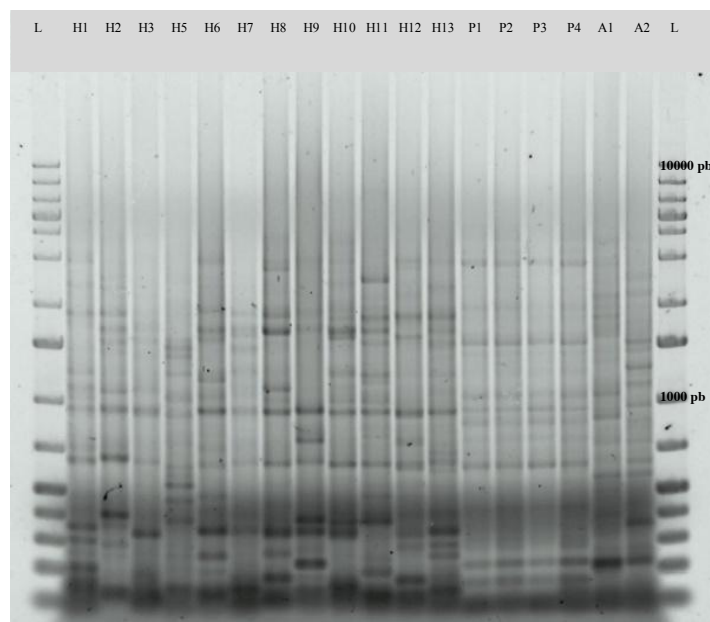


Figura 6. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con *primers* ERIC realizada sobre *Aeromonas allosaccharophila* (A), *A. hydrophila* (H) y *A. punctata* (P) aisladas de peces cultivados en Uruguay (L: *ladder* 10000 pb).

Una vez más se aprecia la similitud en los patrones de bandas que presentan los aislamientos de *A. punctata*. Al ser comparados con los aislamientos de *A. hydrophila* presentes en el mismo gel queda clara la diversidad genética que presenta esta última especie (Figura 6).

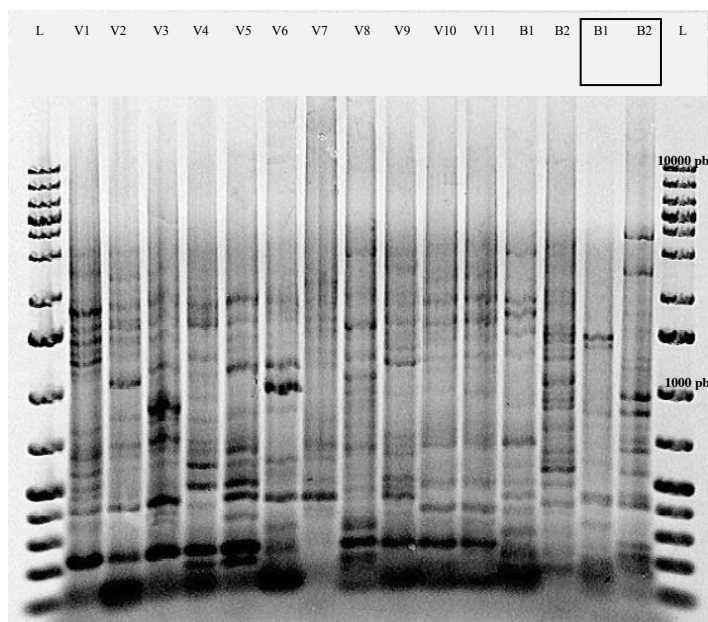


Figura 7. Corrida electroforética correspondiente a la tipificación con *primers* ERIC y REP realizada sobre *Aeromonas bestiarium* (B) y *A. veronii* (V) aisladas de peces cultivados en Uruguay (L: ladder 10000 pb).

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de *clusters* realizado sobre las corridas electroforéticas de tipificación con *primers* ERIC de las especies: *A. hydrophila* (Figura 8), *A. veronii* (Figura 9) y *A. punctata* (Figura 10).

Aquí también puede observarse que, en general, los aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico no están relacionados genéticamente, en función de los resultados obtenidos para la tipificación con estos *primers*. Es destacable, a su vez, que los aislamientos que se encuentran agrupados en un mismo *cluster* poseen orígenes muy distantes, ya sea por la especie de hospedero a partir de la cual fueron obtenidos, por el tipo de sistema de cultivo del cuál provienen o por la época del año en que fueron aislados.

Los aislamientos V10 y V11 son la única excepción a lo expuesto anteriormente, Para estos *primers*, *A. punctata* también presentó un patrón de bandas homogéneo, ya sea entre aislamientos relacionados o no.

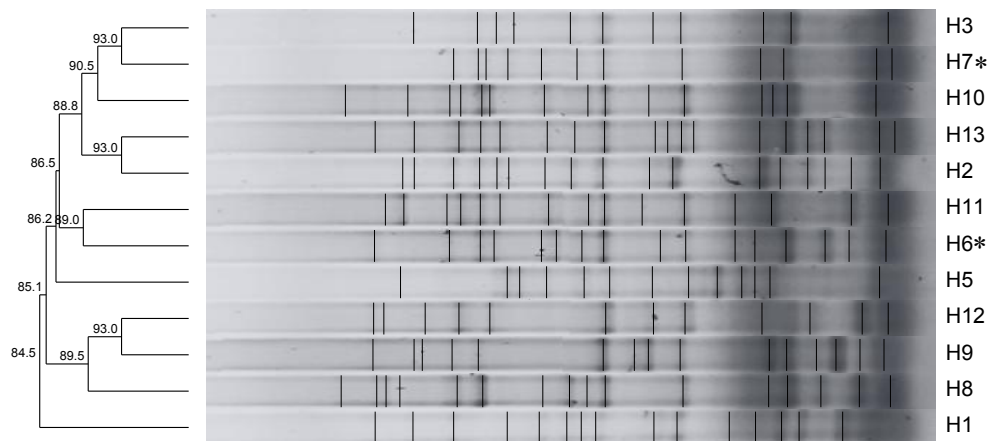


Figura 8. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H1 a H3 y H5 a H13) con *primers* ERIC mediante empleo del *software* Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*: aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

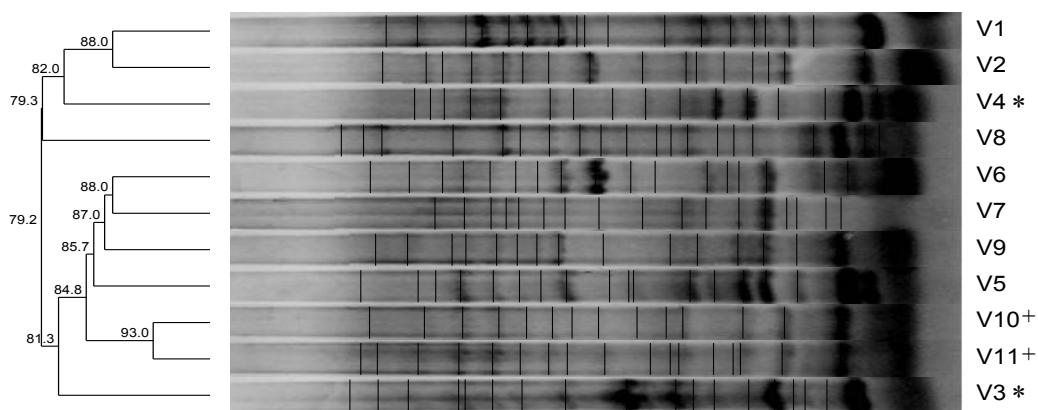


Figura 9. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas veronii* (V1 a V11) con *primers* ERIC mediante empleo del *software* Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*, +: símbolos iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

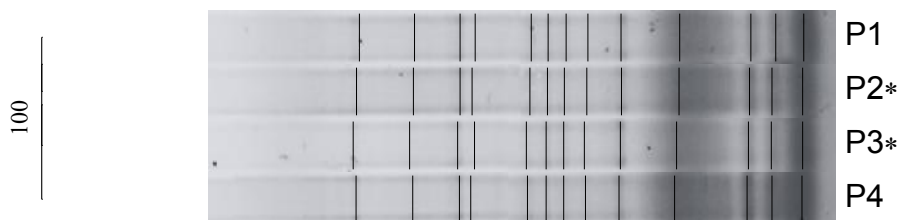


Figura 10. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas punctata* (P1 a P4) con *primers* ERIC mediante empleo del *software* Gelcompar II[®]. El número indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$) (*: aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

5.5.1.3. Empleo de *primers* REP

En la Figura 11 se presenta las corrida electroforética correspondiente a la tipificación con *primers* REP de las especies *A. allosaccharophila* (A1 y A2), *A. hydrophila* (H1, H2, H4, H6 y H8 a H12) y *A. veronii* (V1, V2 y V5 a V8). En la Figura 7 se presentan los resultados de dicha técnica correspondiente a las especies *A. bestiarium* (B1 y B2) y *A. veronii* (V1 a V11). Mediante esta técnica no fue posible tipificar un aislamiento de *A. hydrophila* (H4) y un aislamiento de *A. punctata* (P5). En la Figura 7 se muestran los resultados correspondientes a la tipificación de *A. bestiarium* (B1 y B2) para esta técnica. No fue posible tipificar mediante el empleo de estos *primers* cuatro aislamientos de *A. hydrophila* (H3, H5, H7 y H13), cuatro aislamientos de *A. punctata* (P2 a P5) y cinco aislamientos de *A. veronii* (V3, V4 y V9 a V11).

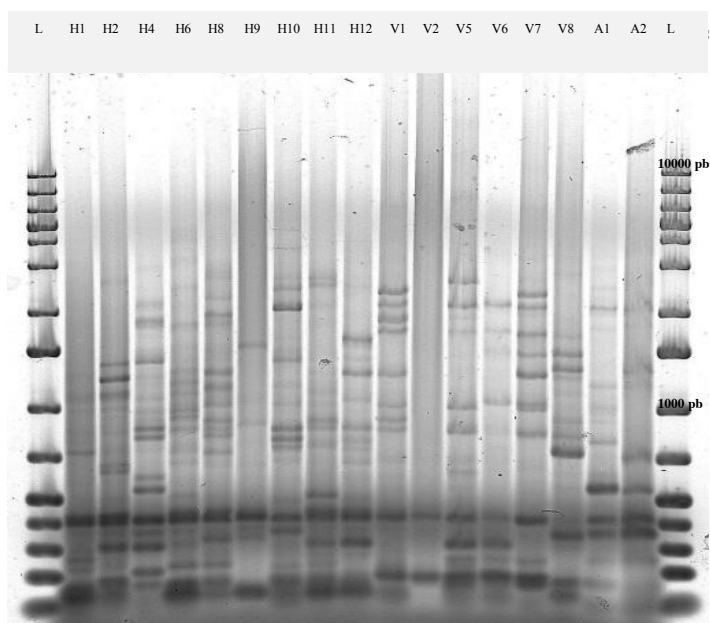


Figura 11. Corrida electroforética en la que se muestran los resultados de la PCR empleando *primers* REP realizada sobre *Aeromonas allosaccharophila* (A), *A. hydrophila* (H) y *A. punctata* (P) aisladas de peces cultivados en Uruguay (L: ladder 10000 pb).

El uso de *primers* REP, fue el método de tipificación menos efectivo, dado que a partir de su empleo no se obtuvieron bandas en 10 de los aislamientos (29,4%), mientras que en caso de ERIC, los aislamientos no tipificables fueron dos (5,9%) y para BOX solo uno (2,9%). En la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética de tipificación con *primers* REP de la especie *A. hydrophila*. Del mismo modo, en la Figura 13 se presentan los resultados correspondientes a *A. veronii*.

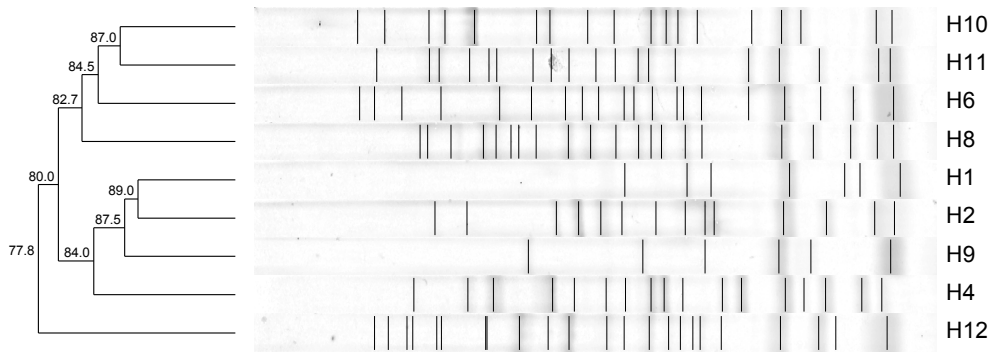


Figura 12. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H1, H2, H4, H6 y H8 a H12) con *primers* REP mediante empleo del *software* Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$).

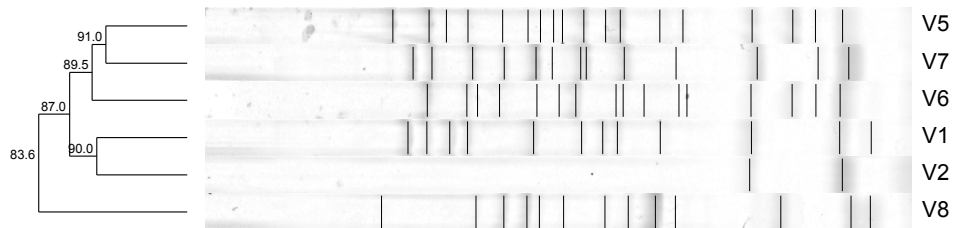


Figura 13. Análisis de *clusters* realizado sobre la corrida electroforética correspondiente a la tipificación de aislamientos de *Aeromonas veronii* (V1, V2 y V5 a V8) con *primers* REP mediante empleo del *software* Gelcompar II[®]. El número en cada nodo indica el valor de *bootstrap* calculado sobre 500 repeticiones ($p < 0,05$).

5.5.2. Análisis filogenético a partir de las secuencias del ARNr 16S

A continuación se presentan los resultados del análisis filogenético realizado tanto dentro y entre las especies identificadas en este trabajo, como también, entre dichos aislamientos y los depositados en la base de datos RDP.

5.5.2.1. Análisis intraespecífico para las especies nacionales

Los dendogramas que se muestran a continuación, fueron generados a partir de la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S de aquellos aislamientos de *Aeromonas* spp. identificados en el marco de esta investigación con más de dos representantes.

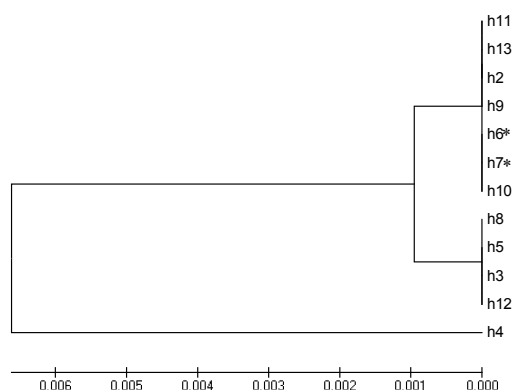


Figura 14. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del ARNr 16S de *Aeromonas hydrophila* aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (*software* MEGA6[®]) (*: indica aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

Figura 15. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del ARNr 16S de *Aeromonas punctata* aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®) (*,+ : signos iguales indica aislamientos procedentes de un mismo brote).

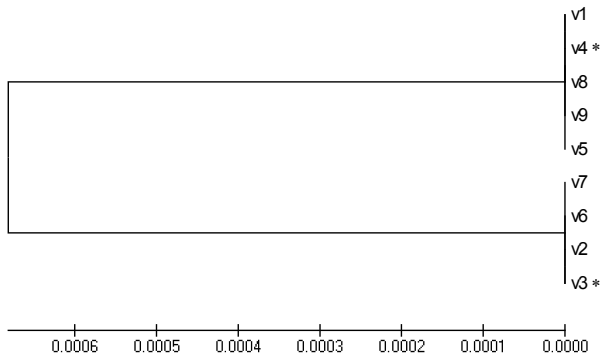
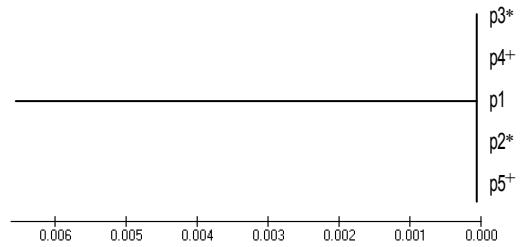


Figura 16. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del ARNr 16S de *Aeromonas veronii* aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®) (*: indica aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

En las Figuras precedentes (14 a 16) puede observarse la elevada similitud intraespecífica en las secuencias que codifican para el ARNr 16S que presentan los distintos aislamientos analizados.

5.5.2.2. Análisis interespecífico de los aislamientos nacionales

El siguiente árbol representa las relaciones filogenéticas existentes entre las secuencias del gen ARNr 16S de todas las especies de *Aeromonas* spp. procedentes de este trabajo.

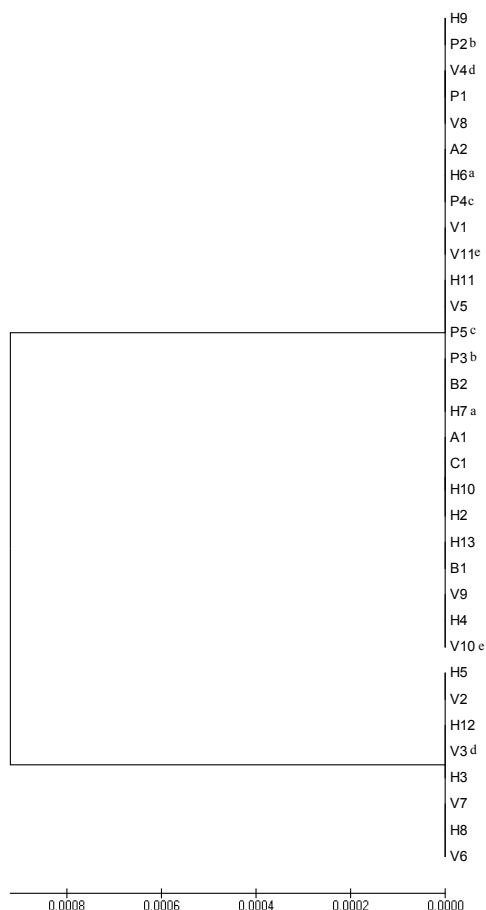


Figura 17. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre todas las secuencias del ARNr 16S de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®) (a, b, c, d, e: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

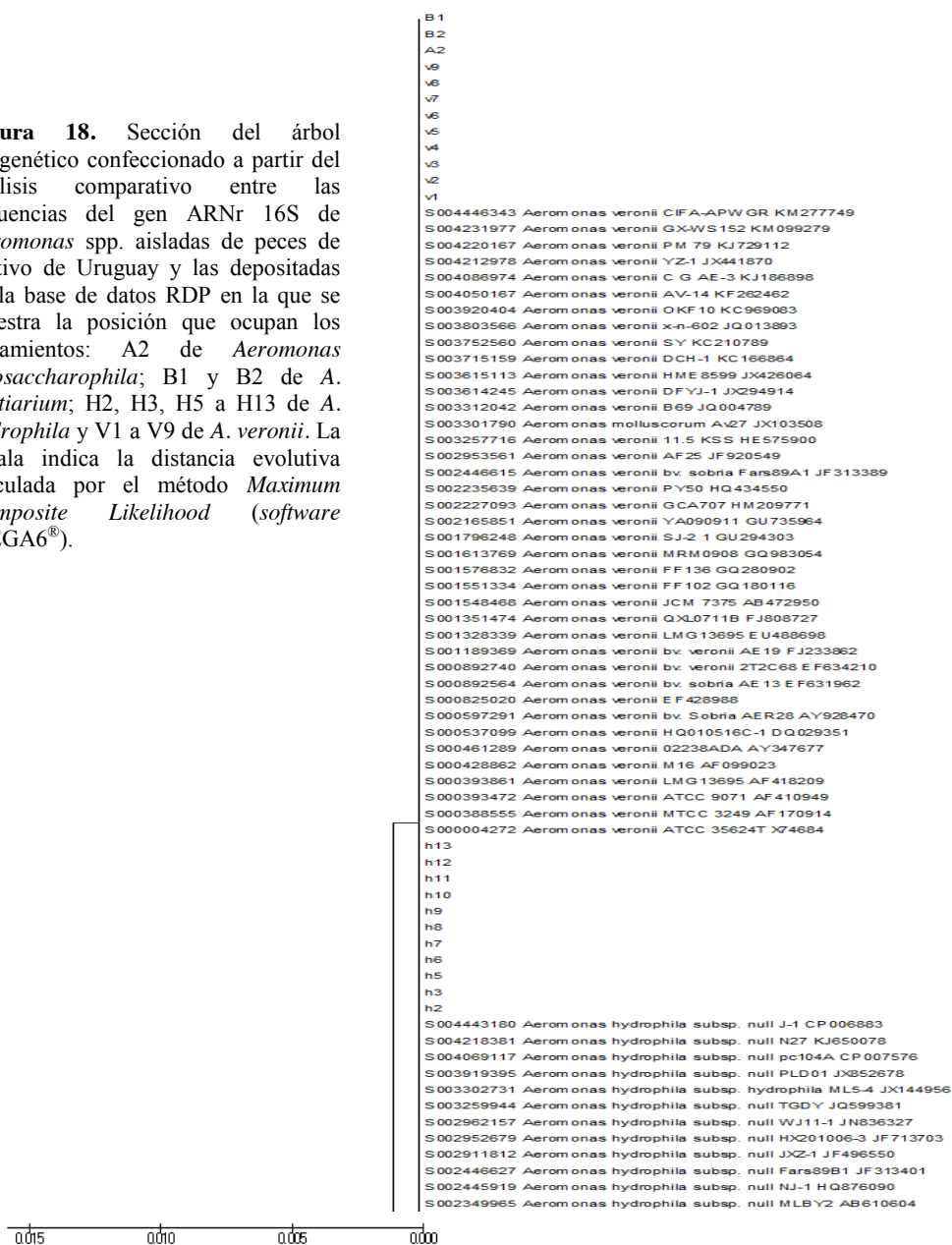
A partir del agrupamiento general de aislamientos en función de la similitud de secuencias ARNr 16S presentado en la Figura 17, es posible apreciar el solapamiento de especies diferentes que se produce dentro de un mismo *cluster*.

5.5.2.3. Análisis filogenético realizado entre los aislamientos nacionales y las secuencias depositadas en RDP

Los árboles filogenéticos que se presentan a continuación (Figuras 18 a 21), son secciones del dendograma consenso confeccionado para el análisis comparativo realizado entre las secuencias del gen ARNr 16S de los aislamientos nacionales y las secuencias correspondientes depositadas en la base de datos RDP (el árbol filogenético completo se puede observar en el Anexo 4).

Se emplearon un total de 183 secuencias para el análisis. Treinta y un secuencias correspondientes a los aislamientos de este estudio (dos secuencias de *A. allosaccharophila*, dos secuencias de *A. bestiarium*, una de *A. caviae*, 12 secuencias de *A. hydrophila*, cinco secuencias de *A. punctata* y 9 de *A. veronii*) y 152 secuencias procedentes de la citada base de datos (29 secuencias de *A. caviae*, 70 secuencias de *A. hydrophila*, dos de *A. punctata* y 51 secuencias de *A. veronii*). La base de datos no posee secuencias depositadas de las especies *A. allosaccharophila* y *A. bestiarium*.

Figura 18. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen ARNr 16S de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de Uruguay y las depositadas en la base de datos RDP en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos: A2 de *Aeromonas allosaccharophila*; B1 y B2 de *A. bestiarium*; H2, H3, H5 a H13 de *A. hydrophila* y V1 a V9 de *A. veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA®).



La introducción de aislamientos externos en el análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S permite corroborar el escaso poder discriminatorio que posee ésta técnica para los aeromonadales, aunque, en comparación con los resultados obtenidos para el análisis de aislamientos nacionales por separado, es posible apreciar aquí la tendencia de las especies *A. hydrophila* y *A. veronii* a agruparse en un mismo clado, junto con otros conespecíficos procedentes de la base de datos y también con la mayoría de los aislamientos de *A. allosaccharophila* y *A. bestiarium* (Figura 18). En la Figura 20 se verá como los aislamientos nacionales pertenecientes al complejo *A. caviae/punctata* se agrupan en un clado diferente junto con otros conespecíficos depositados en RDP y algunas cepas externas de *A. hydrophila*, incluida H4.

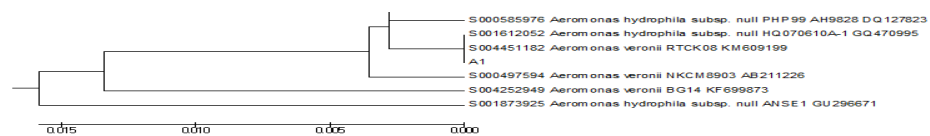


Figura 19. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen ARNr 16S de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos RDP en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento A1 de *Aeromonas allosaccharophila*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

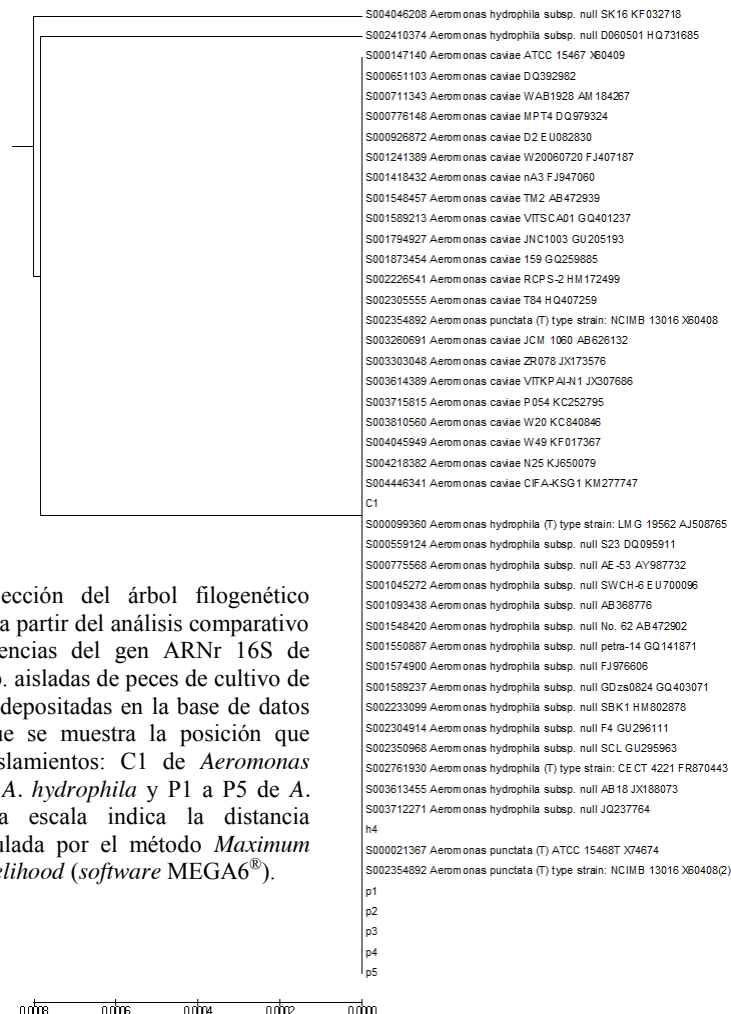


Figura 20. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen ARNr 16S de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos RDP en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos: C1 de *Aeromonas caviae*, H4 de *A. hydrophila* y P1 a P5 de *A. punctata*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

5.5.3. Análisis filogenético a partir de las secuencias del gen *gyrB*

A continuación se presentan los resultados del análisis filogenético realizado tanto dentro y entre las especies identificadas en este trabajo, como también, entre dichos aislamientos y los depositados en la base de datos *Aeromonas* MLST *Databases*.

5.5.3.1. Análisis intraespecífico para las especies nacionales

Los árboles filogenéticos que se muestran a continuación (Figuras 21 a 23), fueron generados a partir de la comparación de las secuencias del gen *gyrB* de cada una de las especies de *Aeromonas* spp. identificadas en el marco de esta investigación.

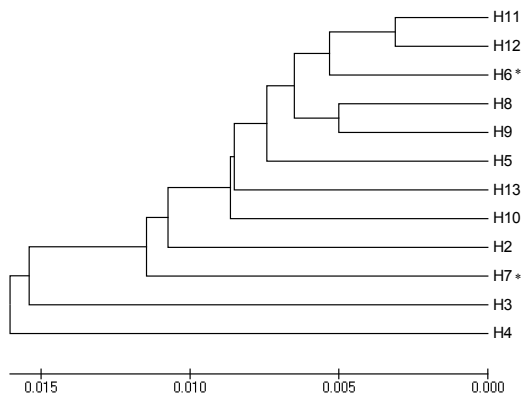


Figura 21. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas hydrophila* (H2 a H13) aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®) (*: indica aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).

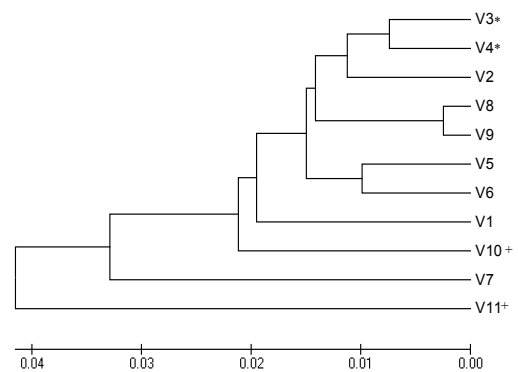


Figura 22. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas veronii* (V1 a V11) aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®) (*,+: signos iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).

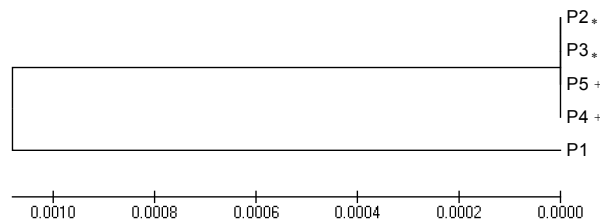


Figura 23. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo de las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas punctata* (P1 a P5) aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®) (*,+: signos iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizoótico).

5.5.3.2. Análisis interespecífico de los aislamientos nacionales

El siguiente dendograma (Figura 24) representa las relaciones filogenéticas existentes entre las secuencias del *gyrB* de todas las especies de *Aeromonas* spp. aisladas de peces cultivados en nuestro país en el marco de esta investigación.

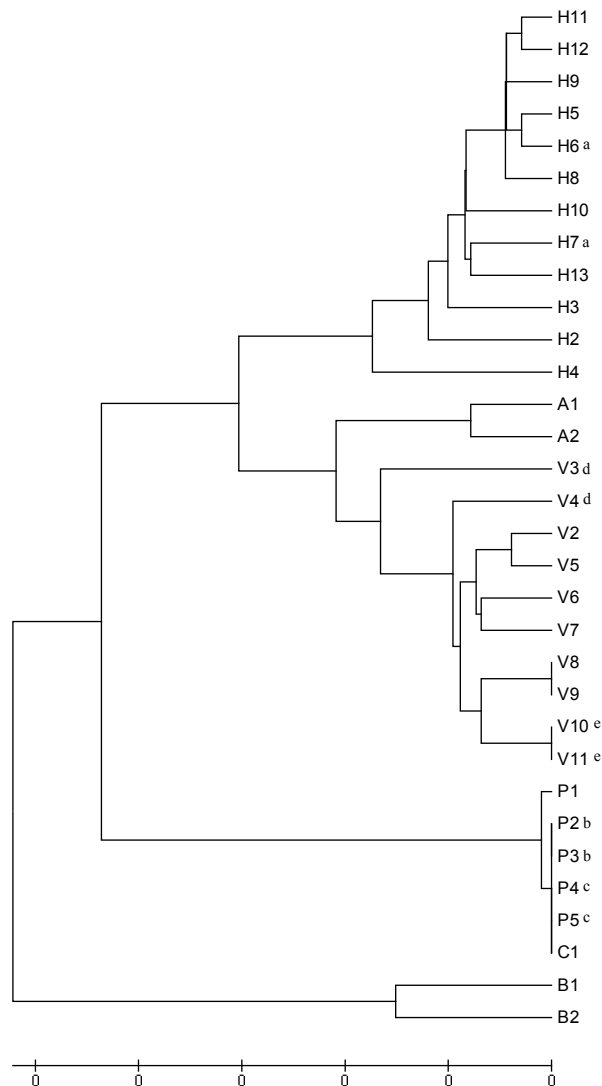


Figura 24. Árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre todas las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®) (a, b, c, d, e: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico).

Las relaciones filogenéticas interespecíficas establecidas a partir de la comparación de las secuencias *gyrB* de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp., permiten crear conglomerados monoespecíficos, a diferencia de lo que ocurre cuando se emplean las secuencias de ARNr 16S con el mismo fin. Es posible apreciar en la Figura 24, a su vez, asociaciones entre aislamientos procedentes de un mismo brote.

5.5.3.3. Análisis filogenético entre los aislamientos nacionales y las secuencias depositadas en *Aeromonas* MLST Databases

A continuación se presentan los resultados correspondientes al análisis filogenético realizado entre las secuencias del gen *gyrB* depositadas en *Aeromonas* MLST Databases y las correspondientes a los aislamientos de *Aeromonas* spp. procedentes de peces cultivados en nuestro país.

Se emplearon 451 secuencias para este análisis. Veintinueve secuencias de *Aeromonas* spp. procedentes de este estudio (una secuencia de *A. allosaccharophila*,

una de *A. bestiarium*, una de *A. caviae*, 12 secuencias de *A. hydrophila*, 5 de *A. punctata* y 9 secuencias de *A. veronii*) y 422 secuencias procedentes de la base de datos mencionada (seis secuencias de *A. allosaccharophila*, 39 secuencias de *A. aquariorum*, dos de *A. bestiarium*, 9 de *A. caviae*, una secuencia de *A. encheleia*, cuatro de *A. enteropelogenes*, una de *A. eucrenophila*, 76 secuencias de *A. hydrophila*, tres secuencias de *A. jandanei*, cinco de *A. media*, una secuencia de *A. molluscorum*, una de *A. popoffii*, una de *A. schubertii*, 7 secuencias de *A. salmonicida*, 165 secuencias de *Aeromonas* spp., 14 de *A. sobria*, una secuencia de *A. tecta* y 86 secuencias de *A. veronii*)

En las Figuras 25 a 39 se presentan secciones del árbol filogenético óptimo obtenido mediante el análisis comparativo de todas las secuencias. El árbol completo se presenta en el Anexo 4.

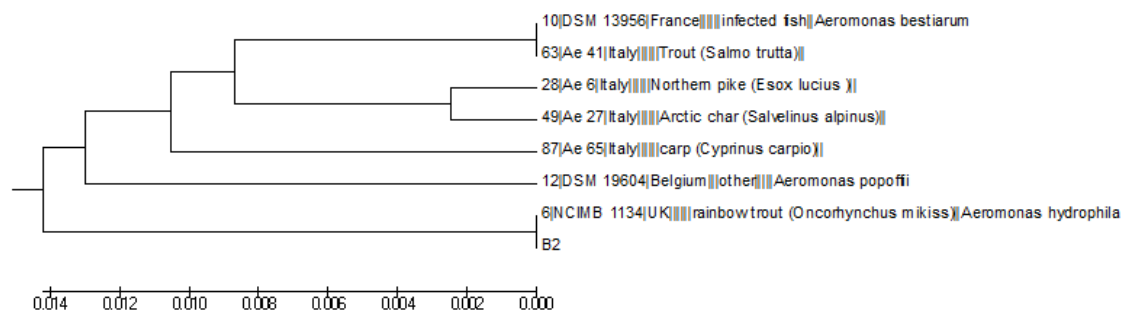


Figura 25. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento B2 de *Aeromonas bestiarium*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

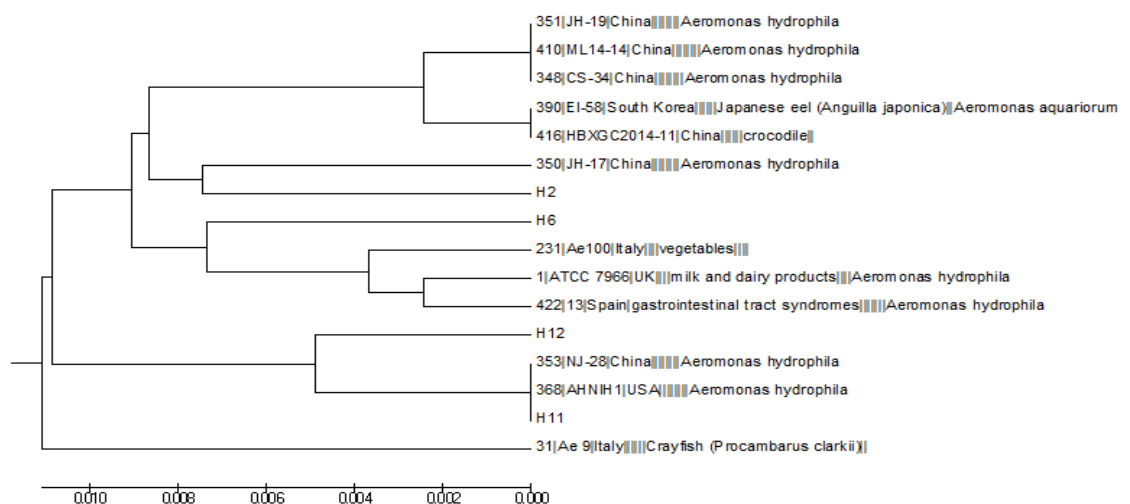


Figura 26. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H2, H6, H11 y H12 de *Aeromonas hydrophila*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

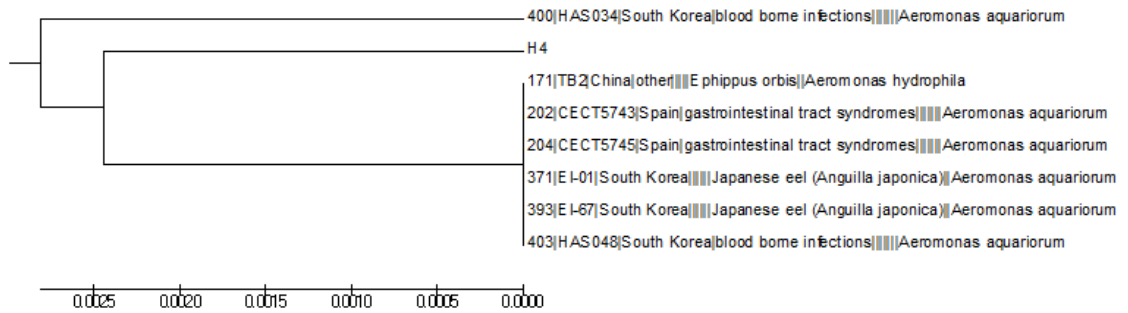


Figura 27. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento H4 de *Aeromonas hydrophila*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA⁶®).

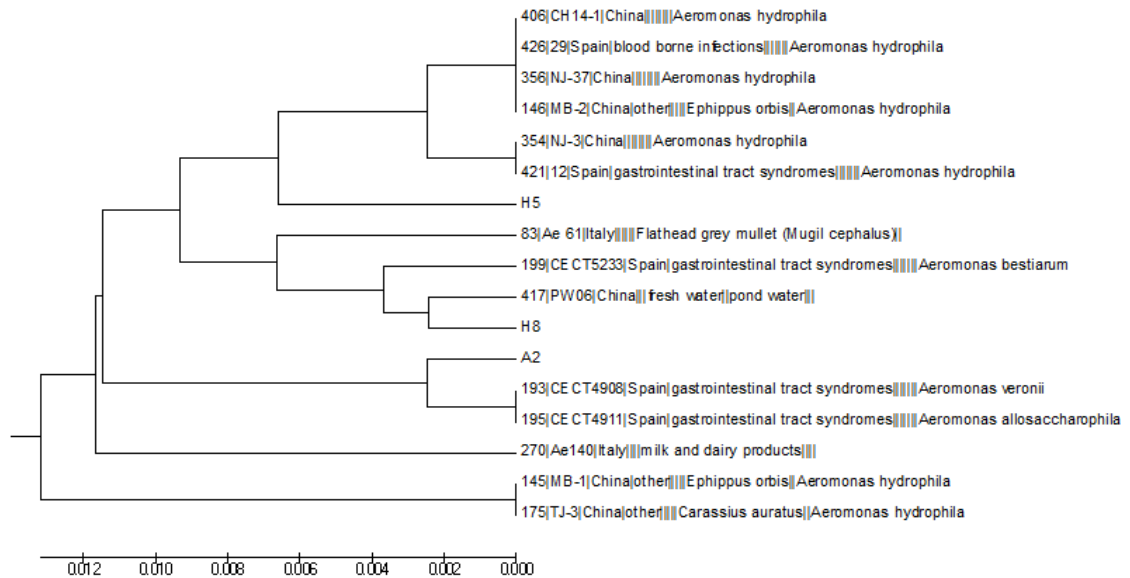


Figura 28. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H5 y H8 de *Aeromonas hydrophila* y el aislamiento A2 de *Aeromonas allosaccharophila*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA⁶®).

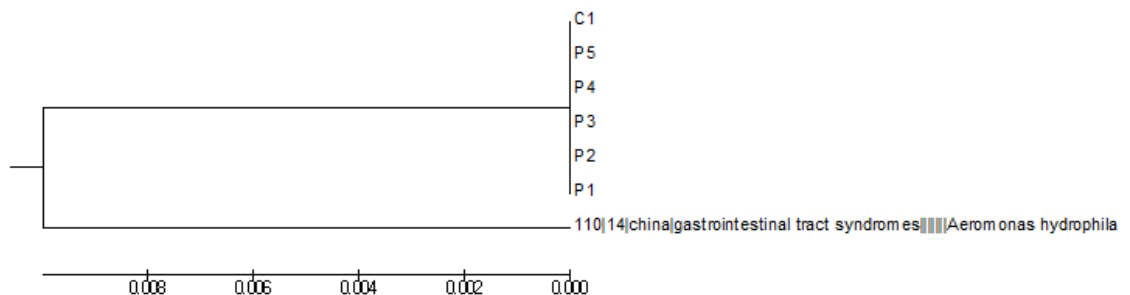


Figura 29. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos P1 a P5 de *Aeromonas punctata* y el aislamiento C1 de *Aeromonas caviae*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA⁶®).

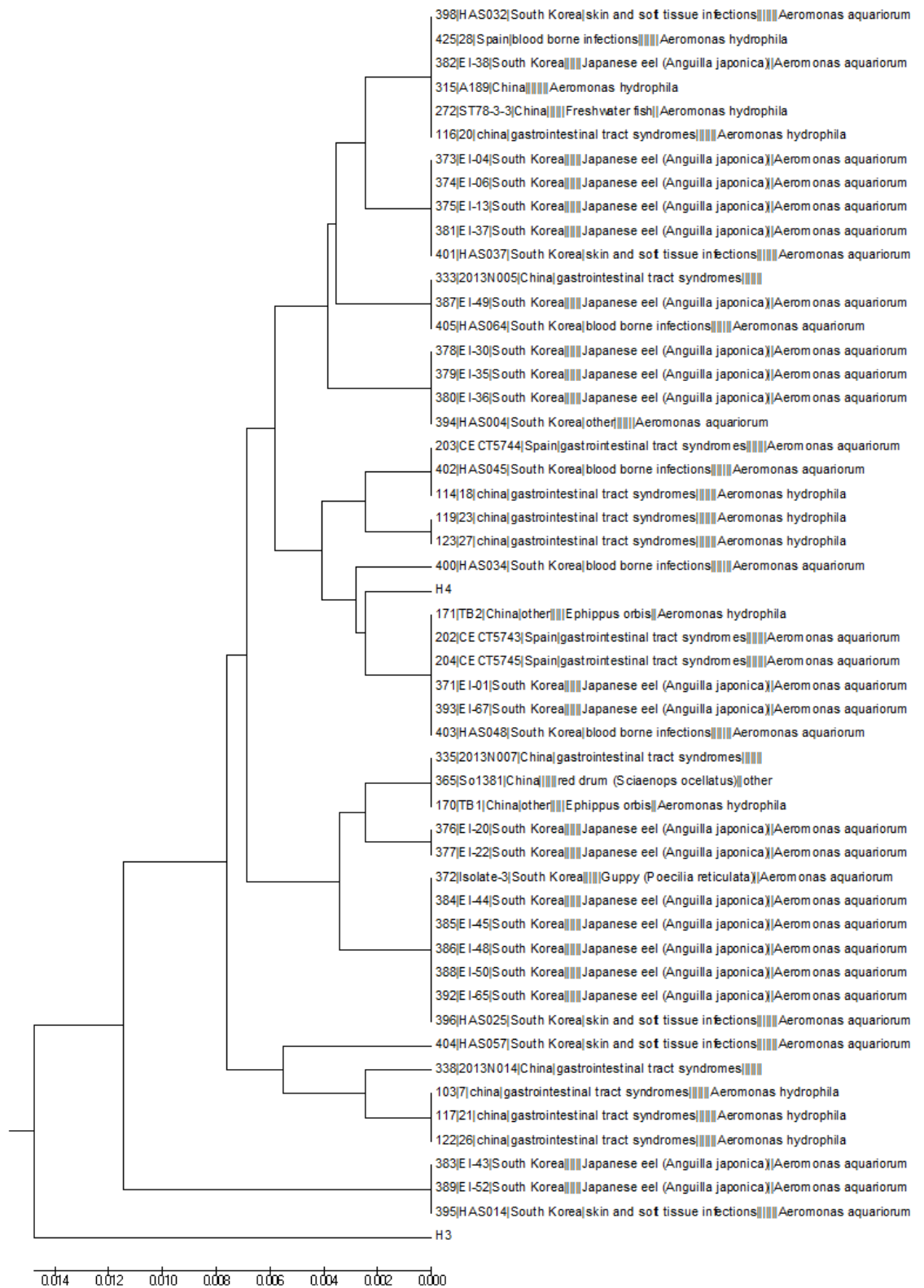


Figura 30. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H3 y H4 de *Aeromonas hydrophila*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

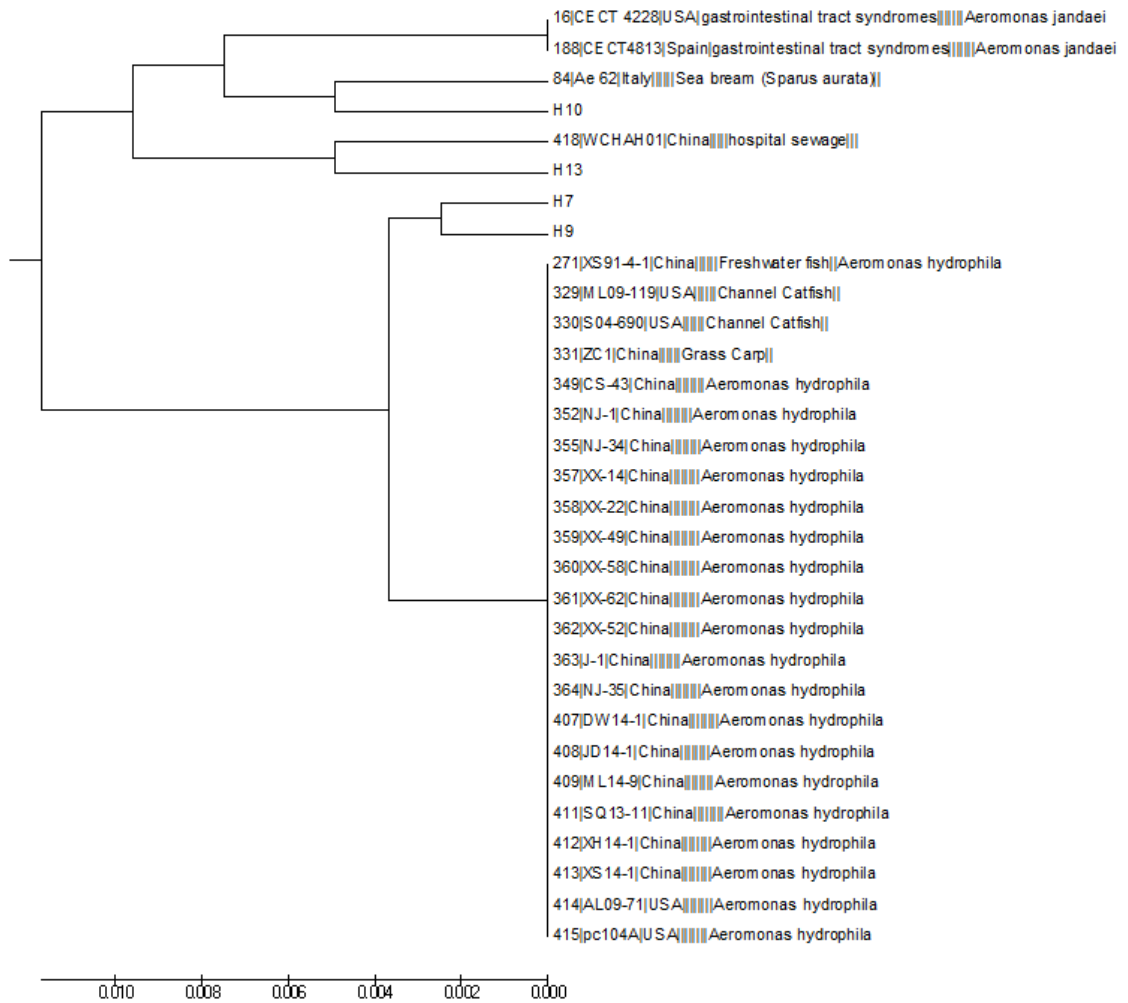


Figura 31. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos H7, H9, H10 y H13 de *Aeromonas hydrophila*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

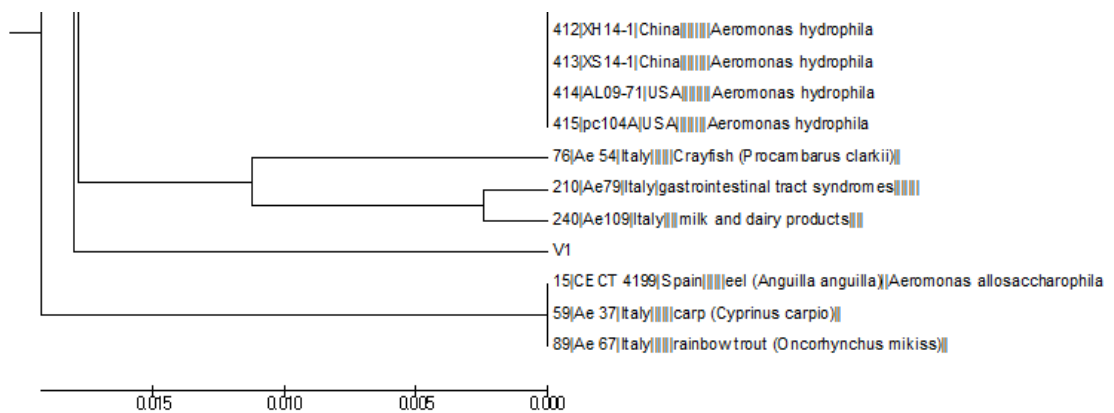


Figura 32. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V1 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

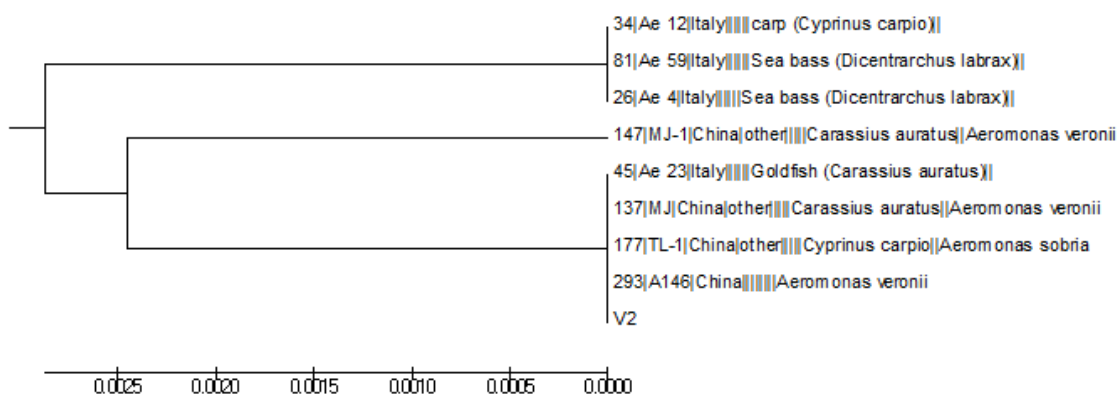


Figura 33. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V2 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6[®]).

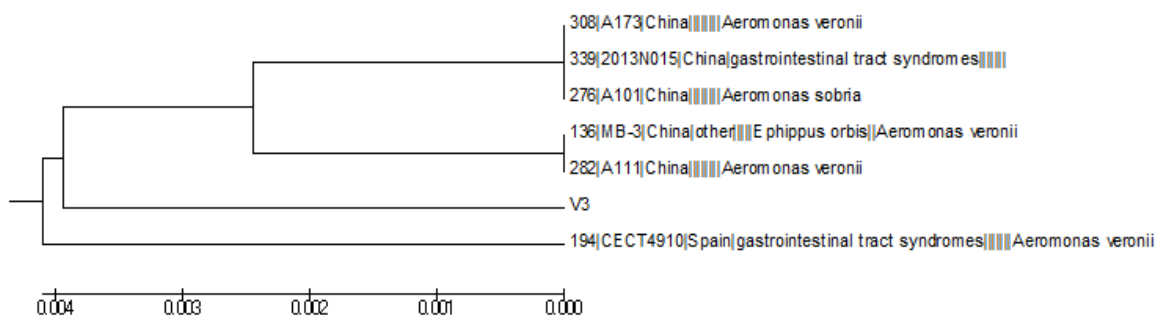


Figura 34. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V3 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6[®]).

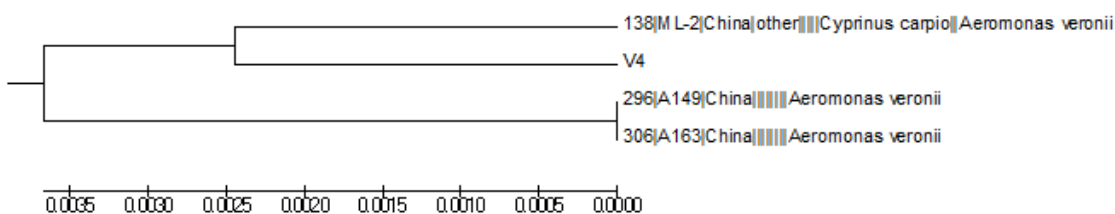


Figura 35. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V4 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6[®]).

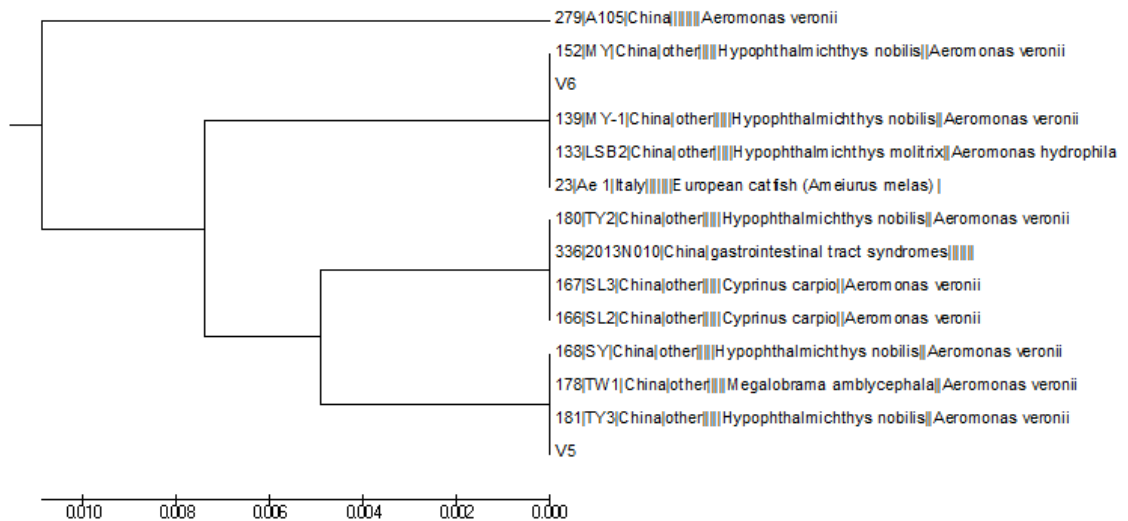


Figura 36. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos V5 y V6 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

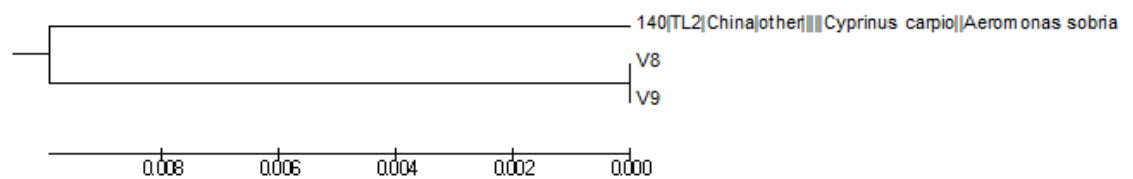


Figura 37. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos V8 y V9 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

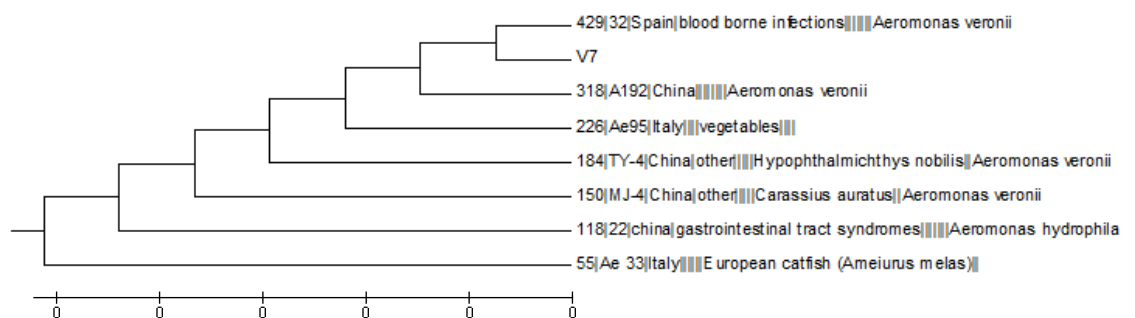


Figura 38. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupa el aislamiento V7 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

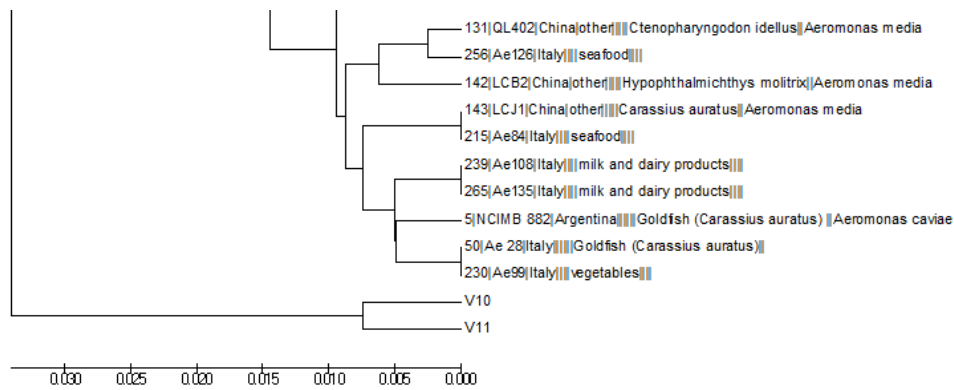


Figura 39. Sección del árbol filogenético confeccionado a partir del análisis comparativo entre las secuencias del gen *gyrB* de *Aeromonas* spp. aisladas de peces de cultivo de Uruguay y las depositadas en la base de datos PubMLST/*Aeromonas* en la que se muestra la posición que ocupan los aislamientos V10 y V11 de *Aeromonas veronii*. La escala indica la distancia evolutiva calculada por el método *Maximum Composite Likelihood* (software MEGA6®).

Observando las figuras anteriores (25 a 39) se puede apreciar, a grandes rasgos, que las secuencias *gyrB* de los aislamientos nacionales de *A. hydrophila* están más relacionadas entre sí, de lo que lo están las secuencias correspondientes a los aislamientos nacionales de *A. veronii*, teniendo en cuenta el número de aislamientos vecinos procedentes de Uruguay. A pesar de esto, el aislamiento H4 se aloja en un *cluster* completamente aislado del resto de los aislamientos nacionales, al igual de lo que ocurría al comparar las secuencias ARNr 16S.

Otro caso de particular interés lo constituyen los aislamientos V10 y V11, dado que además de haberse agrupado juntos al ser enfrentados con 422 secuencias externas, comparten un origen epizootiológico común.

También para la secuencia de este gen, los aislamientos de *A. caviae* y *A. punctata* nacionales se encuentran altamente emparentados entre sí.

5.6. Caracterización patológica

Se determinó el efecto sobre la salud de los peces, de los aislamientos más representativos de las bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay, mediante el cálculo DL50%. Para ello se escogieron aislamientos representativos de las especies identificadas con mayor frecuencia, a saber: *A. hydrophila* (38,2% de los aislamientos) y *A. veronii* (32,4%). A su vez dentro de cada una de las especies se escogió un aislamiento con esperada alta patogenicidad y otro de baja patogenicidad esperada en función de los criterios que se resumen a continuación.

5.6.1. Elección de aislamientos candidatos

La elección de los aislamientos se basó en la presencia o ausencia de aquellas variables evaluadas que podrían indicar mayor o menor virulencia. Teniendo en cuenta esto, se establecieron grupos de alta y baja patogenicidad esperada, conformados por un representante de cada especie, en función del número de genes de virulencia identificados y la presencia/ausencia de actividad hemolítica.

De este modo, se escogieron como aislamientos de alta patogenicidad esperada (APE):

- H2: aislamiento que posee todos los genes de virulencia relevados y presenta actividad hemolítica.

- V2: aislamiento que posee tres de los cinco genes de virulencia relevados (*act*, *alt* y *ast*) (número máximo de genes de virulencia para la especie) y posee a su vez actividad hemolítica.

Se escogieron como aislamientos de baja patogenicidad esperada (BPE):

- H11: aislamiento que posee tres de los cinco genes de virulencia relevados (*ast*, *ela* y *lip*) (número mínimo de genes de virulencia para la especie) y presenta actividad hemolítica.
- V6: aislamiento que posee un único gen de virulencia de los cinco evaluados (*ela*) (número mínimo de genes de virulencia para la especie) y no posee actividad hemolítica.

En la Tabla 16 se presentan los porcentajes de mortalidad acumulados a las 96 horas posinfección para las cuatro bacterias seleccionadas.

Tabla 16. Índices de mortalidad (%) observados en *Australoheros facetus* infectados experimentalmente con distintos aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H2 y H11) y *Aeromonas veronii* (V2 y V6).

Aislamiento (concentración inicial en ufc/mL)	Diluciones del inóculo (1=concentración inicial)						
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
H2 ($6,9 \times 10^9$)	100	80	60	0	10	0	0
H11 ($4,4 \times 10^9$)	80	80	60	0	10	0	0
V2 ($3,4 \times 10^9$)	100	20	0	0	0	0	0
V6 ($1,6 \times 10^9$)	0	0	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0	0

5.6.2. Cálculo de DL_{50}_{96} para cada aislamiento seleccionado

A continuación se presentan los resultados del cálculo de dosis letal para cada aislamiento. En cada caso se muestran los distintos modelos de regresión simple evaluados y el cálculo de la DL_{50}_{96} a partir del modelo más adecuado. No se observaron mortandades en los animales procedentes del grupo control.

5.6.2.1. Aislamiento H2

En la Tabla 17 se presentan los porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones de H2 inoculadas en los animales experimentales (valores promediados a partir de tres repeticiones)

Tabla 17. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento H2 de *Aeromonas hydrophila*, inoculado en *Australoheros facetus*.

Concentración del inóculo (ufc/mL)	Índice de mortalidad (%)
$6,96 \times 10^9$	100
$3,48 \times 10^9$	80
$1,74 \times 10^9$	80
$8,7 \times 10^8$	40
$4,35 \times 10^8$	10
$2,18 \times 10^8$	0
$1,09 \times 10^8$	0

El índice de mortalidad inducido por H2 está relacionado con su concentración en el inóculo según los resultados obtenidos del ANOVA realizado sobre las variables normalizadas ($F_{1,6}=64,5$; $p=0,0005$).

A partir de los datos presentados anteriormente se realizaron regresiones simples testeando diferentes modelos, con la finalidad de hallar la ecuación que describa la variabilidad en el índice de mortalidad con el mejor ajuste. En la Tabla 18 se presentan los modelos de regresión simple evaluados para los resultados de $DL50_{96}$ obtenidos para el aislamiento H2, a su vez se muestra el índice de correlación de Pearson y el valor de R^2 presentado por cada uno de los modelos.

Tabla 18. Características de los distintos modelos regresión simple evaluados para el cálculo de $DL50_{96}$ del aislamiento H2 de *Aeromonas hydrophila*.

Modelo de regresión simple	Correlación de Pearson	R^2
Cuadrado de Y Raíz Cuadrada de X	0,9634	92,81%
Raíz Cuadrada de Y Log de X	0,9612	92,40%
Logaritmo de X	0,9582	91,81%
Raíz Cuadrada de X	0,9336	87,17%
Cuadrado de Y Log de X	0,9329	87,03%
Cuadrado de Y	0,9235	85,29%
Raíz Cuadrada Doble	0,8879	78,83%

Teniendo en cuenta lo expresado en la Tabla 18, se escogió el modelo: "Cuadrado de Y, Raíz cuadrada de X" como el más adecuado para nuestro análisis.

En la figura 40 se muestra el gráfico que describe el modelo ajustado a los datos de H2.

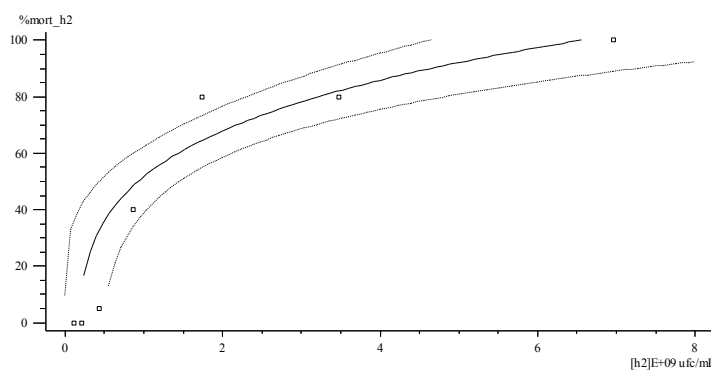


Figura 40. Gráfico en el que se representa la ecuación de regresión simple correspondientes al modelo: $\%mort_{H2} = \sqrt{-2019,28 + 0,148485\sqrt{[H2]}}$, utilizado para el cálculo de $DL50_{96}$ del aislamiento H2 de *Aeromonas hydrophila* (trazo continuo: representación gráfica de la función, trazo punteado: límites de confianza del modelo).

La ecuación de la curva correspondientes es:

$$\%mort_{H2} = \sqrt{-2019,28 + 0,148485\sqrt{[H2]}}$$

Tomando 50 como el valor correspondiente a "%m_{ort}H₂" en la ecuación obtenemos el siguiente valor de DL50₉₆ para el aislamiento H2 (DL50₉₆_H2):

$$DL50_{96_H2} = 9,3 \times 10^8 \text{ ufc/mL}$$

5.6.2.2. Aislamiento H11

Del mismo modo que en el caso anterior, en la Tabla 19 se presentan los porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones de H11 inoculadas en los animales experimentales (promedio de tres repeticiones).

Tabla 19. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento H11 de *Aeromonas hydrophila*, inoculado en *Australoheros facetus*.

Concentración del inóculo (ufc/mL)	Índice de mortalidad (%)
4,4x10 ⁹	90
2,2 x10 ⁹	90
1,1 x10 ⁹	0
5,5 x10 ⁸	45
2,75 x10 ⁸	10
1,38 x10 ⁸	0
6,88 x10 ⁷	0

En este caso, el índice de mortalidad inducido por H11, también estuvo relacionado con su concentración en el inóculo ($F_{1,6}=18,84$; $p=0,0074$).

En la Tabla 20 se presentan los modelos de regresión simple evaluados para los resultados de DL50₉₆ obtenidos para el aislamiento H11, a su vez se muestra el índice de correlación de Pearson y el valor de R² presentado por cada uno de los modelos.

Tabla 20. Características de los distintos modelos de regresión simple evaluados para el cálculo de DL50₉₆ del aislamiento H11 de *Aeromonas hydrophila*.

Modelo de regresión simple	Correlación de Pearson	R ²
Cuadrado de Y	0,8890	79,03%
Cuadrado de Y Raíz Cuadrada de X	0,8887	78,97%
Raíz Cuadrada de X	0,8794	77,34%
Lineal	0,8674	75,25%
Raíz Cuadrada Doble	0,8275	68,48%
Logaritmo de X	0,8199	67,23%
Cuadrado de Y Log de X	0,8058	64,92%

Teniendo en cuenta la información contenida en la tabla anterior (Tabla 20), se escogió el modelo: "Cuadrado de Y" como el más adecuado para nuestro análisis. En la Figura 41 se muestra el gráfico que describe el modelo ajustado a los datos de H11.

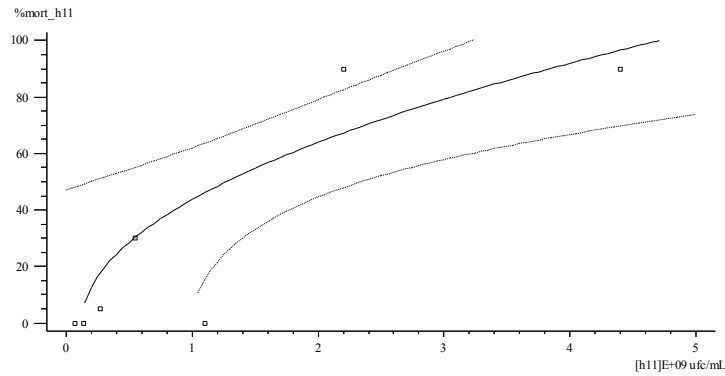


Figura 41. Gráfico en el que se representa la ecuación de regresión simple correspondientes al modelo: $\%mort_{H11} = \sqrt{-279,163 + 0,00000218502 * [H11]}$, utilizado para el cálculo de DL50₉₆ del aislamiento H11 de *Aeromonas hydrophila* (trazo continuo: representación gráfica de la función, trazo punteado: límites de confianza del modelo).

La ecuación de la curva correspondiente es:

$$\%mort_{H11} = \sqrt{-279,163 + 0,00000218502 * [H11]}$$

Tomando 50 como el valor correspondiente a " $\%mort_{H11}$ " en la ecuación obtenemos el siguiente valor de DL50₉₆ para el aislamiento H11 (DL50₉₆_H11):

$$DL50_{96_H11} = 1,3 \times 10^9 \text{ ufc/mL}$$

5.6.2.3. Aislamiento V2

En la Tabla 21 se presentan los porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones de V2 inoculadas en los animales experimentales (valores promediados a partir de tres repeticiones)

Tabla21. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento V2 de *Aeromonas veronii*, inoculado en *Australoheros facetus*.

Concentración del inocular (ufc/mL)	Índice de mortalidad (%)
$3,4 \times 10^9$	90
$1,7 \times 10^9$	60
$8,4 \times 10^8$	15
$4,2 \times 10^8$	0
$2,1 \times 10^8$	0
$1,05 \times 10^8$	0
$5,25 \times 10^7$	0

El índice de mortalidad inducido por V2 está relacionado con su concentración en el inocular según los resultados obtenidos del ANOVA realizado sobre las variables normalizadas ($F_{1,6}=113,24$; $p=0,0001$).

En la Tabla 22 se presentan los modelos de regresión simple evaluados para los resultados de DL50₉₆ obtenidos para el aislamiento V2, a su vez se muestra el índice de correlación de Pearson y el valor de R² presentado por cada uno de los modelos.

Tabla 22. Características de los distintos modelos regresión simple evaluados para el cálculo de DL50₉₆ del aislamiento V2 de *Aeromonas veronii*.

Modelo de regresión simple	Correlación de Pearson	R ²
Cuadrado Doble	0,9786	95,77%
Cuadrado de Y	0,9784	95,72%
Lineal	0,9738	94,82%
Raíz Cuadrada Doble	0,9621	92,56%
Raíz Cuadrada de Y	0,9505	90,35%
Raíz Cuadrada de X	0,9479	89,86%
Cuadrado de X	0,9238	85,34%

Si bien el modelo que mejor se ajusta a los datos en este caso es "Cuadrado doble", no fue posible emplearlo para el cálculo de dosis letal de V2 debido a que no posee aplicabilidad biológica. Del tratamiento matemático de los datos surge que el índice de mortalidad de V2 no depende de la dosis bacteriana a inocular, lo que no se condice con el ANOVA realizado para el conjunto de datos normalizados, análisis éste que indica una relación significativa entre las variables: índice de mortalidad de V2 y concentración de V2 ($F_{1,6}=113,24$; $p<0,01$). A continuación se muestra la ecuación correspondiente al modelo "Doble cuadrado": $\%mort_{V2} = \sqrt{(101,785 + 0,0 * [V2])}$, como puede apreciarse, el término $[V2]$ es nulo en todos los casos. Teniendo en cuenta esto, se empleó el modelo "Cuadrado de Y" para el cálculo de dosis letal. En la Figura 42 se muestra el gráfico que describe el modelo ajustado a los datos de V2.

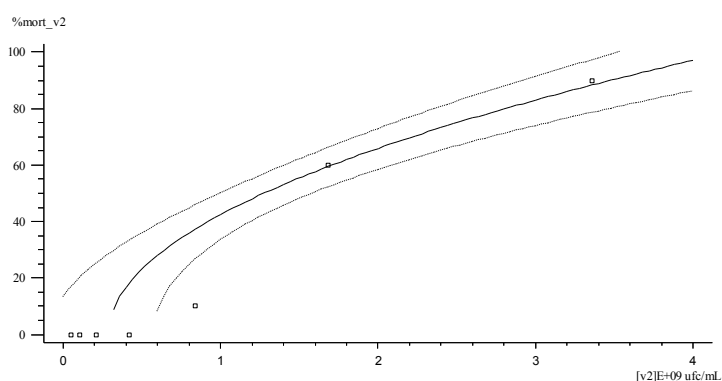


Figura 42. Gráfico en el que se representa la ecuación de regresión simple correspondientes al modelo: $\%mort_{V2} = \sqrt{(-734,483 + 0,00000254089 * [V2])}$, utilizado para el cálculo de DL50₉₆ del aislamiento V2 de *Aeromonas veronii* (trazo continuo: representación gráfica de la función, trazo punteado: límites de confianza del modelo).

La ecuación de la curva correspondiente es:

$$\%mort_{V2} = \sqrt{(-734,483 + 0,00000254089 * [V2])}$$

Tomando 50 como el valor correspondiente a "% $mort_{V2}$ " en la ecuación obtenemos el siguiente valor de DL50₉₆ para el aislamiento V2 (DL50_{96_V2}):

$$DL50_{96_V2} = 2,3 \times 10^{11} \text{ ufc/mL}$$

5.6.2.4. Aislamiento V6

Como puede observarse en la Tabla 23, no ocurrieron mortandades para ninguna de las concentraciones del aislamiento V6 de *Aeromonas veronii* inoculado en *Australoheros facetus*.

Tabla 23. Porcentajes de mortalidad observados para las distintas concentraciones del aislamiento V6 de *Aeromonas veronii*, inoculado en *Australoheros facetus*.

Concentración del inoculo (ufc/mL)	Índice de mortalidad (%)
1,6x10 ⁹	0
8,0x10 ⁸	0
4,0x10 ⁸	0
2,0x10 ⁸	0
1,0x10 ⁸	0
5,0x10 ⁷	0
2,5x10 ⁷	0

5.6.3. Comparación entre aislamientos

En la Tabla 24 se resumen los resultados del cálculo de DL50₉₆ para los aislamientos seleccionados.

Tabla 24. Dosis letal 50 en 96 horas (DL50₉₆) para distintos aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H2 y H11) y *Aeromonas veronii* (V2 y V6) obtenidas a partir de infección experimental del pez *Australoheros facetus*.

Aislamiento	DL50 ₉₆ (ufc/mL)
H2	9,3x10 ⁸ ^a
H11	1,3x10 ⁹ ^{ab}
V2	2,3x10 ¹¹ ^b
V6	sin mortandades ^c
Control negativo	sin mortandades ^c

^a, ^b, ^c: letras diferentes indican diferencias (Estadístico Kruskal-Wallis=20,46; p<<0,01)

Empleando los datos de mortandades generados para cada aislamiento, se llevó a cabo un análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis) para evaluar la significancia de las diferencias observadas entre grupos, con un nivel de confianza del 95%. De este modo se encontró que no existen diferencias entre las mortandades de peces inducidas por la infección experimental con ambas especies de *A. hydrophila* (aislamientos H2 y H11), siendo diferentes entre sí las mortandades provocadas por el aislamiento H2 de *A. hydrophila* y el aislamiento V2 de *A. veronii*. También se encontraron diferencias entre todos los aislamientos que provocaron algún grado de mortandad (H2, H11 y V2) y el conjunto formado por el aislamiento V6 de *A. veronii* y el grupo control (estadístico Kruskal-Wallis=20,4604; p=0,00013625).

A partir de los resultados presentados anteriormente, es posible observar que los aislamientos nacionales de *A. hydrophila* poseen una DL50₉₆ inferior a la

desarrollada por los aislamientos de *A. veronii*, existiendo incluso un aislamiento de *A. veronii* que no fue capaz de desarrollar mortandades observables durante el período de estudio. Se aprecia, a su vez, que la patogenicidad desarrollada por los aislamientos evaluados estuvo acorde a lo esperado de acuerdo a la cantidad de genes de virulencia identificados, dado que H2 resultó más patógeno que H11 (representantes de *A. hydrophila* con alta y baja patogenicidad esperada respectivamente) y V2 lo fue más que V6 (representantes de *A. veronii* alta y baja patogenicidad esperada respectivamente).

5.6.4. Hallazgos histopatológicos en los peces infectados

En las imágenes siguientes se presentan los hallazgos de histopatología más significativos observados en branquias (Imagen 1), hígado (Imagen 2) y riñón posterior (Imagen 3) de los peces infectados experimentalmente con los aislamientos de *A. hydrophila* y *A. veronii* empleados en los cálculos de DL50₉₆.

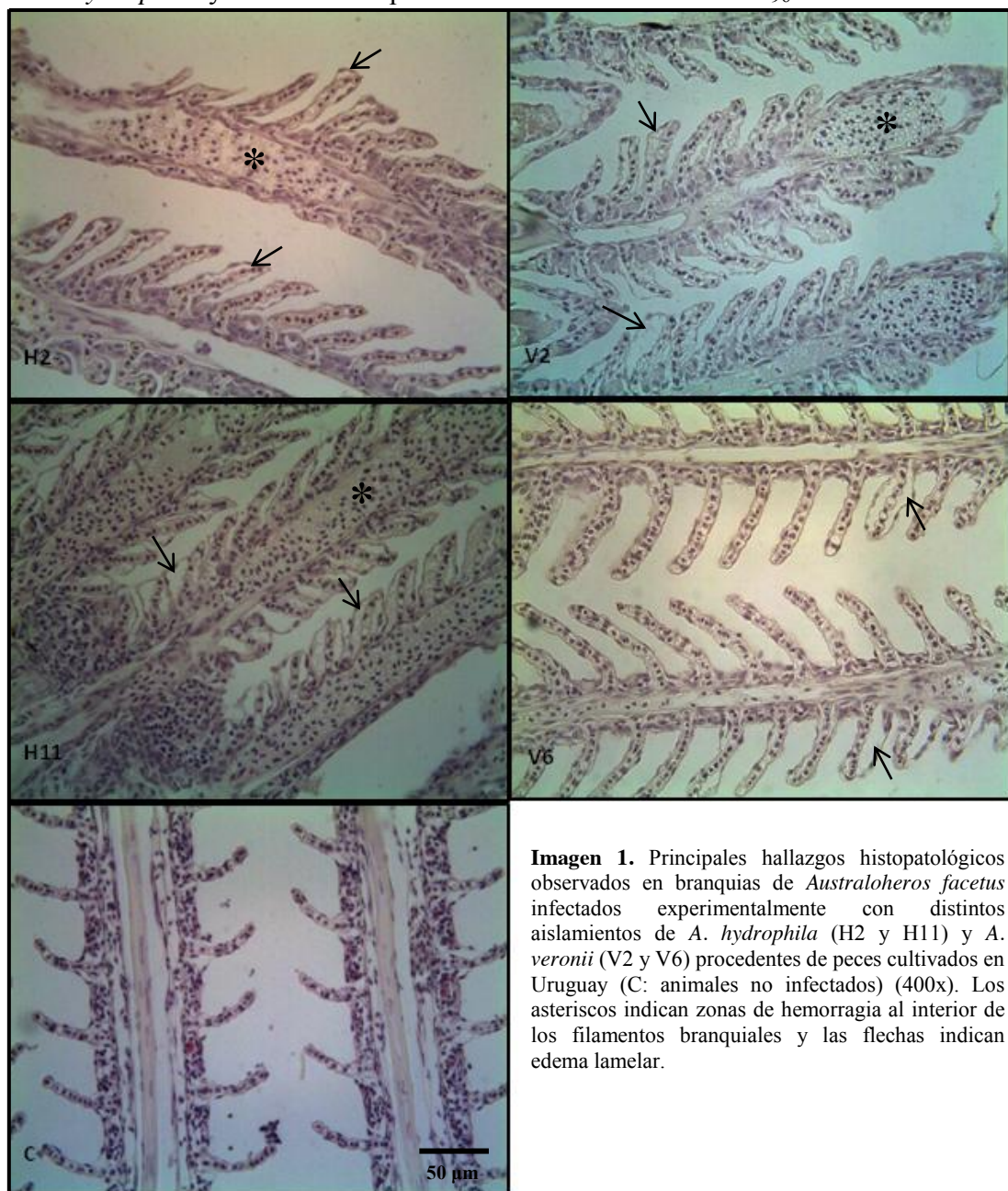
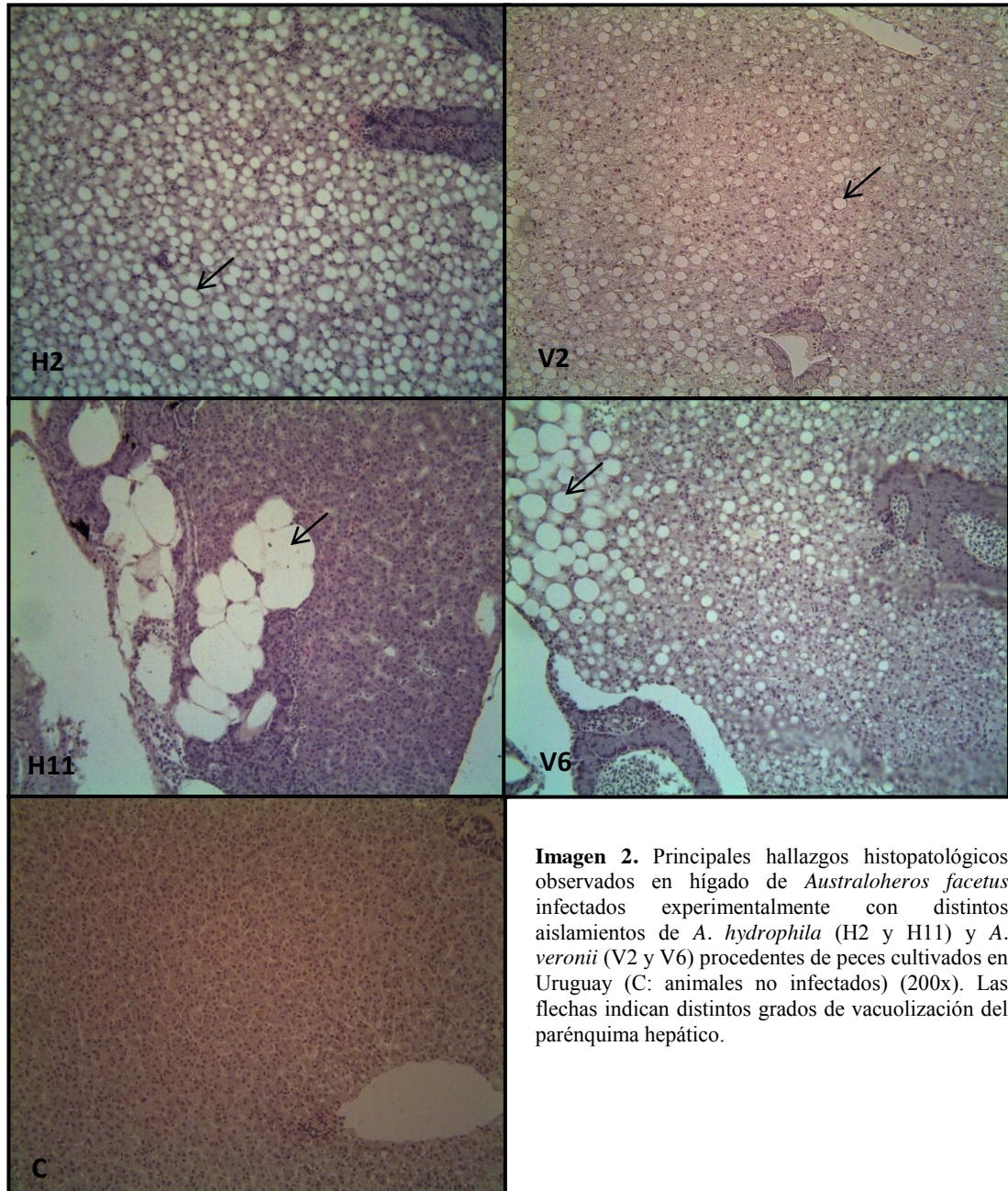


Imagen 1. Principales hallazgos histopatológicos observados en branquias de *Australoheros facetus* infectados experimentalmente con distintos aislamientos de *A. hydrophila* (H2 y H11) y *A. veronii* (V2 y V6) procedentes de peces cultivados en Uruguay (C: animales no infectados) (400x). Los asteriscos indican zonas de hemorragia al interior de los filamentos branquiales y las flechas indican edema lamelar.

Las lesiones más significativas observadas en el tejido branquial, se caracterizan por la presencia de edema de laminillas secundarias y hemorragias al interior de los filamentos branquiales. Si bien no es posible realizar una comparación objetiva entre los hallazgos realizados para cada aislamiento, se aprecia la notoria diferencia entre los tejidos de los animales infectados y los correspondientes al grupo control.



En el tejido hepático de los animales infectados es posible observar distintos grados de alteración, que van desde la degeneración hidrópica de algunos hepatocitos, hasta la vacuolización de amplias zonas del hígado. Se aprecia a su vez hemorragia y edema en el parénquima hepático de todos los animales infectados y necrosis difusa del tejido hepático.

Las alteraciones observadas en riñón posterior de los animales infectados se caracterizan, a grandes rasgos, por hemorragia y edema intersticial. En H2 en

particular se aprecian masas de células necróticas (flechas de trazo fino), en V2 es posible apreciar depósitos de material hialino en el epitelio de algunos túbulos renales (flechas de trazo grueso). En H11 se aprecia el aumento del espacio de Bowman provocado por el edema y la consiguiente compresión glomerular (representado con *). Es también notorio el edema desarrollado en V6 y la consiguiente compresión de los túbulos asociados al proceso.

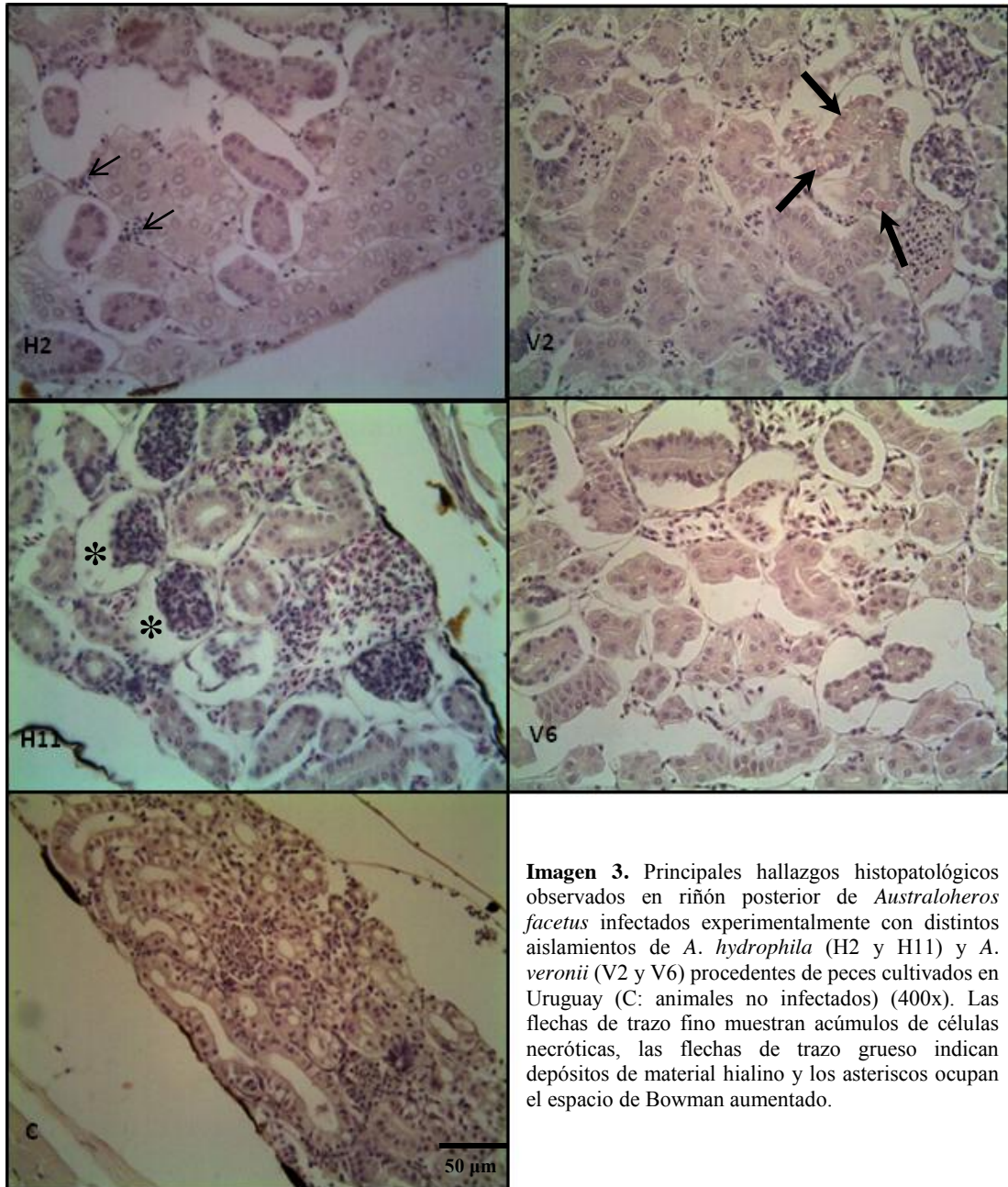


Imagen 3. Principales hallazgos histopatológicos observados en riñón posterior de *Australoheros facetus* infectados experimentalmente con distintos aislamientos de *A. hydrophila* (H2 y H11) y *A. veronii* (V2 y V6) procedentes de peces cultivados en Uruguay (C: animales no infectados) (400x). Las flechas de trazo fino muestran acúmulos de células necróticas, las flechas de trazo grueso indican depósitos de material hialino y los asteriscos ocupan el espacio de Bowman aumentado.

6. DISCUSIÓN

Los trabajos de caracterización de bacterias aeromonadales móviles existentes hasta el momento se centran en la evaluación de caracteres relacionados con la diversidad y patogenicidad de los aislamientos, empleando técnicas que han ido variando y haciéndose más específicas y sensibles con el paso del tiempo (Aguilera-Arreola *et al.*, 2005).

Es de destacar a su vez la escasa información existente en relación a este tema en lo que refiere a los aislamientos de aeromonadales procedentes de la acuicultura fundamentalmente, a pesar de que se trata de uno de los grupos de patógenos más relevantes para la actividad.

Esta tesis constituye la primera investigación en la que se realiza una caracterización, desde el punto de vista bioquímico, genético y patológico, de un número representativo de aeromonadales móviles aislados de peces de cultivo con afecciones clínicas.

6.1. Origen e identificación de los aislamientos

Comparando los resultados de identificación fenotípica y genotípica obtenidos para un mismo aislamiento en esta investigación, observamos que los taxones coinciden únicamente en el 35,3% de los casos. Mediante el empleo del *kit* API 20 NE[®] fue posible identificar con seguridad a diez de los 13 aislamientos de *Aeromonas hydrophila* evaluados (76,9%) y el único aislamiento de *A. caviae*, todos ellos como miembros del complejo "*Aeromonas hydrophila* - *caviae*" según la base de datos del fabricante. A su vez, con el empleo del *kit* se identificó en varias oportunidades y de manera errónea, a la especie *A. sobria*, lo que no pudo ser corroborado con la información genotípica.

Kozinzka *et al.* (2002), comparando los resultados obtenidos a partir de la identificación fenotípica con API 20E[®] y la genotípica a partir de RFLP del gen que codifica para el ARNr 16S, de 34 aislamientos de *Aeromonas* procedentes de carpas (*Cyprinus carpio*), encuentran también dos únicas fenoespecies identificadas como los complejos *A. hydrophila* y *A. sobria* a pesar de corresponderse con seis especies diferentes luego de la identificación molecular. A diferencia de lo ocurrido con nuestros resultados, estos autores lograron identificar con seguridad únicamente el 35,1% de los aislamientos de *A. sobria*, siendo erróneas todas las identificaciones fenotípicas de *A. hydrophila*.

Los trabajos publicados sobre microorganismos aeromonadales aislados en nuestro país hasta el momento, emplean en todos los casos métodos fenotípicos de identificación y hacen referencia, mayoritariamente, a casos clínicos procedentes de algún tipo de piscicultura. En dichos artículos se mencionan las especies: *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. veronii* (Carnevia *et al.*, 2001 y 2003; Chávez *et al.*, 2003; Carnevia *et al.*, 2005; Letamendia *et al.*, 2007; Perretta *et al.*, 2007 y Carnevia *et al.*, 2009a,b), como agentes primarios o secundarios aislados de procesos patológicos observados en distintas especies de peces de acuario y para consumo humano. Existen a su vez otras dos publicaciones de origen nacional, referentes a *Aeromonas* spp., no relacionadas con la piscicultura. En una de ellas los aislamientos provienen de casos clínicos en medicina humana (niños con diarrea sanguinolenta) (Mota *et al.*, 2010) y en la otra, *Aeromonas* sp. fue aislada de *Chelonya midas* (tortuga verde) con dermatitis necrótica (Ferrando *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior y debido a que la identificación de especies del género *Aeromonas* en nuestro país se ha basado únicamente en el empleo de *kits* comerciales (Microbact[®] de Oxoid[®] y API20NE[®] de Biomerieux[®]), el número y la identidad de las especies diagnosticadas hasta el momento puede estar siendo subestimada. En este sentido, varios autores coinciden en que los métodos miniaturizados comerciales de identificación, empleados rutinariamente en los laboratorios de ictiopatología (Vitek[®], API 20E[®] y 20NE[®], Biolog GN[®], *Microplates*[®], BBL *Crystal*[®] o *Microscan Walk/Away*[®]) no son capaces de identificar de modo preciso las especies de *Aeromonas*. Estos *kits* tienden a identificar todos los aislamientos de *Aeromonas* como pertenecientes al complejo *A. hydrophila* (Joseph y Carnahan, 1994; Kozinska *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2003).

En lo que respecta a los países de la región y teniendo en cuenta aquellos con los que compartimos cuencas hidrográficas y entre los cuales a su vez se comercializan y distribuyen peces vivos sin certificación sanitaria, podemos destacar que en Argentina se han hallado las especies *A. hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* y *A. sobria* (Parodi y Preso, 1983; Fracchia de Salvay, 1986; Fernández *et al.*, 2000 y Pavan *et al.*, 2000) mientras que las especies identificadas en Brasil hasta el momento son *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. jandanei*, *A. media*, *A. trota*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. schubertii* y *A. sobria* (Moro *et al.*, 1997; Mores *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2004; Evangelista-Barretto *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2007, Scoaris *et al.*, 2008; Evangelista-Barretto *et al.*, 2010 y Razzolini *et al.*, 2010).

Únicamente una publicación reciente emplea métodos moleculares para identificar a nivel específico bacterias aeromonadales aisladas de un brote de diarrea en humanos en Brasil (Mendez-Marquez *et al.*, 2012).

Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre en nuestro país donde la investigación sobre aeromonadales ha estado enfocada principalmente en la ictiopatología, en los países de la región el aislamiento e identificación de aeromonadales se ha llevado a cabo, fundamentalmente, en el marco de investigaciones relacionadas con medicina humana y salud pública.

A partir del presente estudio y con base en la identificación genotípica, se suman las especies *Aeromonas allosaccharophila*, *A. bestiarium* y *A. punctata* a las ya diagnosticadas para Uruguay. Vale la pena advertir, en este sentido, acerca de la posible identificación errónea de las especies de *Aeromonas* anteriormente diagnosticadas para nuestro país, teniendo en cuenta las dificultades de identificación fenotípica descritas ampliamente. En particular, la identificación fenotípica de *A. sobria* podría ser debida al solapamiento de perfiles bioquímicos entre especies del género y no a la presencia real de la geno especie mencionada.

En referencia a las especies de *Aeromonas* aisladas en la región, se destaca el primer registro de *A. punctata* para los países mencionados, aunque, en este sentido debe advertirse que, como se mencionó anteriormente, para Schubert y Hegazi (1988), *A. caviae* (especie ya citada en Brasil y Uruguay) es un sinónimo posterior e ilegítimo de *A. punctata*, por lo que podrían existir discrepancias en la identificación de estos taxones.

6.1.1 Hallazgos epizootiológicos

Las especies más representativas de los aislamientos nacionales de aeromonadales fueron *Aeromonas hydrophila* (38,2%) y *A. veronii* (32,4%), seguidas por *A. punctata* (*A. punctata*: 14,7%; *A. punctata* + *A. caviae*: 17,6%). Coincidentemente, estas tres especies son las que se reportan con mayor frecuencia en el mundo como agentes etiológicos aislados de organismos acuáticos de cultivo, casos clínicos en humanos y distintos cuerpos de agua (Radu *et al.*, 2003; Hatha *et al.*, 2005; Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Figueiras *et al.*, 2011, Carvalho *et al.*, 2012). *Aeromonas hydrophila*, a su vez, ha sido diagnosticada como la bacteria más prevalente en epizootias por Gram negativos en la acuicultura nacional (Carnevia *et al.*, 2013).

A pesar de que *A. hydrophila* es clásicamente la especie de aeromonadales móviles más citada como agente causal de SAM en peces de agua dulce (Aoki, 1999), es de destacar que la prevalencia de aislamientos de *A. veronii* recuperados de peces con SAM cultivados en nuestro país es similar a la alcanzada por *A. hydrophila*. Jagoda *et al.* (2014), analizando aislamientos de aeromonadales móviles obtenidos de peces ornamentales con SAM en Sri Lanka, encuentran una prevalencia de *A. veronii* cercana al 80%, argumentando que estas diferencias en la prevalencia histórica con respecto a *A. hydrophila* en peces de cultivo es una tendencia en los artículos más recientes y puede ser debida a los avances en la identificación molecular de aeromonadales.

La asociación existente entre el tipo de explotación piscícola y la especie de pez que se cultiva puede explicarse teniendo en cuenta que los cultivos llevados a cabo en cada establecimiento son, en su mayoría, monoespecíficos y a su vez el número de especies de peces cultivadas en nuestro país es escasa. En consecuencia, es frecuente encontrar una asociación entre estas variables, siendo el cultivo de esturiones la actividad predominante en los establecimientos de piscicultura para consumo humano en Uruguay y la cría de carasius y peces tropicales el rubro más representativo del acuarismo.

La asociación hallada entre el tipo de explotación y el tipo de caso clínico puede deberse fundamentalmente a las condiciones de vida de los animales en cada establecimiento. Para asegurar la rentabilidad de la piscicultura intensiva, ya sea para consumo humano o de peces ornamentales, los animales deben ser mantenidos a la mayor densidad posible soportada por el sistema de cultivo. En estas condiciones de vida, se disparan una serie de factores predisponentes a la aparición de SAM u otras epizootias, tales como hipoxia, elevada carga de materia orgánica, excesiva competencia por el alimento. A su vez la probabilidad de contacto entre animales se incrementa y la contaminación del agua con excrementos de los peces en cultivo aumenta, lo que favorece el ingreso de los patógenos al sistema y la dispersión de los mismos, así como también la posibilidad de contacto con eventuales puertas de entrada (Noga, 1996; Aoki, 1999; Austin y Austin, 2007).

A diferencia de lo anterior, los peces mantenidos en acuarios y bioterios se encuentran, generalmente, en mejores condiciones de vida desde el punto de epizootiológico. Las densidades de animales por volumen de agua que se manejan son más bajas que en la piscicultura intensiva, la alimentación en general es *ad libitum* y se mantienen las condiciones de temperatura, oxigenación y calidad del agua de modo constante y adecuado para cada especie. Todo esto conlleva a una disminución considerable de los factores predisponentes para el desencadenamiento

de epizootias, por lo que la mayoría de los casos clínicos observados en este tipo de explotaciones piscícolas son individuales.

El caso particular de los acuarios comerciales que se ubican en tiendas de mascotas y clínicas veterinarias, podría ser una excepción a lo anterior. En aquellos casos en los que se hace un mal manejo (caracterizado por elevadas densidades de animales, exceso de alimento, temperatura inadecuada para la especie, cohabitación de especies no compatibles, escaso recambio de agua) se observan casos de epizootias con elevadas mortandades, al igual que en la piscicultura intensiva.

6.2. Caracterización bioquímica

Tal como se había mencionado previamente, a partir de la caracterización bioquímica realizada por medio del *kit* API 20NE[®] no fue posible discernir adecuadamente entre especies de *Aeromonas*, debido al solapamiento de perfiles bioquímicos observado entre los distintos aislamientos. Esta heterogeneidad fenotípica impide a su vez, extraer del análisis caracteres que permitan relacionar a los distintos aislamientos con algunas de las variables epizootiológicas relevadas.

A pesar de la diversidad fenotípica que presenta el grupo de los aeromonadales, varios autores coinciden en que existen algunos rasgos que se mantienen constantes para todas las especies de *Aeromonas* móviles (Chong *et al.*, 1980, Carnahan *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 2003). Si comparamos esta información con los resultados obtenidos para los aislamientos locales de *Aeromonas*, se pueden establecer las discrepancias que se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los rasgos fenotípicos de *Aeromonas* spp. móviles en los que se halló discrepancia entre los perfiles obtenidos de aislamientos de peces de Uruguay y la información publicada (Chong *et al.*, 1980, Carnahan *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 2003).

Información aportada por la bibliografía	Hallazgos en aislamientos nacionales
La producción de indol es variable entre especies de <i>Aeromonas</i> móviles.	Todos los aislamientos nacionales evaluados produjeron indol
Todas las <i>Aeromonas</i> spp. son capaces de realizar hidrólisis ácida de la glucosa.	Únicamente las especies <i>Aeromonas bestiarium</i> , <i>A. caviae</i> y <i>A. punctata</i> realizaron hidrólisis ácida de la glucosa. Uno de los dos aislamientos de <i>A. allosaccharophila</i> presentó resultados negativos para esta reacción, al igual que el 33% de los aislamientos de <i>A. hydrophila</i> y el 36% de <i>A. veronii</i> .
Las especies de <i>Aeromonas</i> móviles no hacen uso de la enzima ureasa.	Ambos aislamientos de <i>A. allosaccharophila</i> emplearon la enzima ureasa, al igual que uno de los aislamientos de <i>A. punctata</i> y uno de <i>A. veronii</i> .
Todas las especies de <i>Aeromonas</i> móviles hacen uso de la enzima β -galactosidasa.	Un aislamiento de <i>Aeromonas veronii</i> no hizo uso de esta enzima

Un aspecto a destacar de la caracterización bioquímica de los aeromonadales nacionales, es el comportamiento de los aislamientos V1, V3, V4, V10 y V11, ante las variables hidrólisis de arginina y esculina. Las pruebas bioquímicas mínimas para diferenciar las biovariedades de *Aeromonas veronii* son descarboxilación de ornitina (-: biovar. *sobria*), actividad arginino dihidrolasa (+: biovar. *sobria*) y arbutino dihidrolasa (-: biovar. *sobria*) e hidrólisis de esculina (-: biovar. *sobria*); basándonos en las únicas dos variables de estas que permite evaluar el *kit* API 20 NE[®] (hidrólisis de arginina y esculina), los aislamientos mencionados se corresponden con la subespecie *sobria* (*Aeromonas veronii* biovar. *sobria*). El resto de los aislamientos nacionales de *Aeromonas veronii* no pueden ser asignados a ninguna biovariedad en

función del esquema de diferenciación que planteamos con este *kit*.

Es interesante resaltar a su vez, que los aislamientos identificados como *Aeromonas veronii* biovar. *sobria*, según el esquema citado, fueron los únicos identificados por el *kit* API 20NE[®] como *Aeromonas sobria*, el resto de los aislamientos nacionales identificados a nivel molecular como *Aeromonas veronii* y a los que no se les pudo asignar una biovariedad, fueron identificados como *Aeromonas hydrophila/caviae* según el *kit*. API 20NE[®] identificó a su vez como *A. sobria* a aislamientos de otras dos especies no *A. veronii* según la identificación molecular, a saber: A2, H7 y H8.

Si bien la investigación en variantes bioquímicas en aeromonadales se ha dejado de lado en las últimas décadas, debido fundamentalmente al advenimiento de las técnicas moleculares de identificación y tipificación, una investigación reciente pone de manifiesto el rol de las vías metabólicas diferenciales en la patogenicidad de *Aeromonas hydrophila* (Pang *et al.*, 2015). Estos autores demostraron, a partir de secuenciado masivo y análisis de secuencias funcionales COG, que los genomas de aislamientos epizoóticos y altamente virulentos detectados en China y EEUU, difieren de otros aislamientos ambientales o no virulentos, únicamente en que poseen genes adicionales involucrados en funciones tales como el metabolismo y transporte de carbohidratos. En particular, estos autores hallan tres vías metabólicas diferenciales en estas cepas epizoóticas que involucran la utilización de *myo*-inositol, ácido siálico y L-fucosa. Esta diversidad de vías metabólicas le aportarían a estas cepas una ventaja nutricional sobre el resto que favorecería su diseminación clonal. Más adelante veremos cómo estos aislamientos epizoóticos procedentes de China y EEUU poseen estrechas relaciones filogenéticas que hacen suponer la transmisión de clones de un continente a otro.

6.3. Antibiograma

Todos los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. fueron resistentes a por lo menos tres de los diez antibióticos evaluados en esta investigación. La elevada resistencia que se observa en las bacterias aeromonadales es un hecho destacado por varios autores.

Sin importar el origen de los aislamientos, es posible encontrar cepas de *Aeromonas* spp. resistentes a uno o más antibióticos, ya sea que provengan de pacientes humanos, cuerpos de agua naturales o contaminados, alimentos crudos o procesados, animales sanos o enfermos. Existe consenso en afirmar, a su vez, que la resistencia a antibióticos desarrollada por estos microorganismos se ha visto incrementada en los últimos años, por un lado debido al desarrollo de cepas multirresistentes procedentes de las aguas residuales de hospitales y plantas de tratamiento urbanas y por otro lado debido al uso indiscriminado de antibióticos que ha hecho históricamente la acuicultura (Schmidt, 2000; Janda y Abbott, 2010; Kaskhedikar y Chhabra, 2010; Saavedra, 2012).

Varios estudios sugieren que existe un flujo bidireccional de genes de resistencia a antibióticos, entre el medio acuático natural y las fuentes antropogénicas, siendo la acuicultura y sus actividades derivadas (tales como el movimiento internacional de peces y agua de cultivo y el mal uso de antibióticos hecho por acuicultores y acuaristas) un factor que incide de manera considerable en la aparición de resistencia. Se han hallado numerosos elementos móviles del genoma presentes en bacterias del medio acuático que poseen una elevada homología con las secuencias de plásmidos e integrones de importancia clínica (Rhodes *et al.*, 2000; Verner-Jefferys *et al.*, 2009).

Martin-Carnahan y Joseph (2005), revisando una extensa bibliografía, consideran que la mayoría de las especies de *Aeromonas* móviles son generalmente resistentes a la penicilina, ampicilina, carbenicilina y tricarsilina, pero continúan siendo susceptibles a las cefalosporinas de segunda y tercera generación, aminoglucósidos, carbapenems, cloramfenicol, tetraciclinas, sulfametoxazole-trimetoprim y quinolonas. La única excepción conocida hasta el momento lo constituye *Aeromonas trota*, debido a que es sensible a la ampicilina, al igual que algunas cepas de *Aeromonas caviae* (Carnahan *et al.*, 1991).

Si bien existen pocas investigaciones que comparen la susceptibilidad entre especies, algunos autores destacan que *A. hydrophila* es más resistente a los antibióticos que *A. caviae* y *A. sobria*, especialmente a las penicilinas y cefalosporinas (Motyl *et al.*, 1985; Chang y Bolton, 1987). En nuestro caso, no se encontraron diferencias entre especies en lo que respecta a la susceptibilidad promedio, desarrollada para el conjunto de los antibióticos analizados ($\chi^2=104,627$; g.l.: 306; $p=1,0$).

Para Yi *et al.* (2014), las discrepancias que se observan en la prevalencia de resistencia a distintos antibióticos en aeromonadales aislados de diferentes unidades de cultivo (ya sea peces o agua), además de responder a factores globales, puede ser debida a la expresión de distintos mecanismos de resistencia en aislamientos que se hayan expuestos a presión de selección inducida por el uso de diferentes antibióticos según cada acuicultura.

Se han descrito diversos mecanismos de resistencia a antibióticos en *Aeromonas* spp., algunos de ellos derivan de la expresión de genes cromosomales y otros pueden

ser adquiridos y transferidos horizontalmente a través de elementos móviles del genoma (Janda y Abbott, 2010).

6.3.1. Índice de Multirresistencia a Antibióticos (MAR)

Varios autores han empleado este índice en aeromonadales como una herramienta para inferir el posible origen de los aislamientos, en relación con la presión de selección por antibióticos a la que habrían sido sometidos (Pettibone *et al.*, 1996; Vivekanandhan *et al.*, 2002; Igbinosa *et al.*, 2013; Johny y Subashkumar, 2014; Yi *et al.*, 2014).

Nuestros hallazgos muestran que la mayoría de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. (82,3%) presentan multirresistencia y son originarios de ambientes con alta presión de selección por antibióticos (MAR: 0,28 a 0,71). La historia epizootiológica de los aislamientos nacionales apoya esta idea, dado que los aislamientos que poseen índices MAR superiores a 0,2 provienen de sistemas de cultivo en los que se hace uso de antibióticos y los aislamientos con índices inferiores a esta cifra fueron obtenidos de ambientes con escaso o nulo uso de estas drogas.

Los aislamientos H8 y H9 de *A. hydrophila* se destacan con respecto al resto, debido que son resistentes a siete de los diez antibióticos evaluados (MAR: 0,71). Estos aislamientos proceden de una epizootia de bacteriosis cutánea en Lebistes (*Poecilia reticulata*) diagnosticada en un criadero de peces ornamentales de Montevideo (H8) y una epizootia de SAM diagnosticada en un criadero de esturiones en el departamento de Durazno (H9), ambientes ambos, en los que se emplean antibióticos rutinariamente, ya sea en el alimento, como en el agua de cultivo o inyectable. Además de ser resistentes a los β -lactámicos (AMD, AP y P), H8 y H9 desarrollaron también resistencia hacia los macrólidos (ER), tetraciclinas (OT), fenicoles (TFM) y antifolatos (SXT).

El aislamiento V3 de *Aeromonas veronii* también posee un índice MAR (0,7) similar al de H8 y H9. Este aislamiento, procedente de una epizootia de SAM registrada en el mismo criadero de esturiones de donde se aisló H9, desarrolló resistencia a los mismos antibióticos que estas bacterias (H8 y H9) salvo hacia los antifolatos (SXT).

En contraposición con lo anterior, los aislamientos A1 y A2 (*Aeromonas allosaccharophila*), B2 (*A. bestiarium*) y H10 (*A. hydrophila*) poseen índices MAR que indican que proceden de ambientes con escaso o nulo uso de antibióticos. Todos estos aislamientos presentan resistencia a los β -lactámicos y dos de ellos además, fueron resistentes a la eritromicina (A2 y H10). El aislamiento A1 procede de una epizootia de SAM, con elevadas mortandades, que se registró en un cultivo de sábalo ubicado en una zona rural del límite entre los departamentos de Artigas y Salto, a los pocos meses de comenzar a funcionar; A2, por su parte también fue aislada de un criadero con poco tiempo de funcionamiento, el mismo se dedica al cultivo de esturiones y se sitúa sobre el Río Negro (Tacuarembó), aguas arriba del establecimiento de cría de esturiones mencionado anteriormente. Los aislamientos B2 y H10 provienen de casos clínicos individuales (B2: ascitis infecciosa en carasius y H10: carasius subclínico) observados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Pesqueras de Facultad de Veterinaria. Es de nuestro conocimiento que en todos los sistemas de cultivo mencionados, no se hace uso de antibióticos o por lo menos no se había hecho uso hasta el momento de realizar los aislamientos, por lo que la procedencia de estas bacterias estaría acorde con lo esperado según el valor de índice

MAR que poseen.

Los aislamientos H1 a H7 y H11 a H13, por su parte, poseen valores de dicho índice que apenas los sitúan dentro de la categoría multirresistentes (todos poseen índices MAR=0,28), cabe destacar que estos aislamientos son originarios a su vez de ambientes con escaso o nulo uso de antibióticos (H1, H5, H6, H7, H11, H12 y H13), o fueron aislados de pisciculturas en momentos donde el uso regular de antimicrobianos aún no se había instalado (H2, H3 y H4).

6.4. Caracterización genética

6.4.1. Genes de virulencia

Teniendo en cuenta que la expresión de algunos factores asociados a virulencia en aeromonadales podría estar afectada por las condiciones medioambientales (Jagoda *et al.*, 2014), los métodos *in vitro* (empleando cultivos celulares) e *in vivo* (modelo animal) de evaluación de la patogenicidad, si bien aportan información de utilidad, pueden brindar resultados confusos al enmascarar el potencial genético de una cepa enfrentada a un ambiente en particular. En este sentido, los métodos de evaluación basados en la información contenida en el genoma permiten conocer la patogenicidad potencial de los aislamientos, más allá de la expresión génica en un momento determinado (Ottavini *et al.*, 2011).

La búsqueda de genes de virulencia en *Aeromonas* spp. ha sido empleada por varios autores como una herramienta para evaluar la patogenicidad en función del número y tipo de genes y su relación con la procedencia de los aislamientos (ambientes acuáticos naturales o contaminados, peces sanos o enfermos, alimentos, pacientes humanos, entre otros). De este modo, se ha encontrado en varias investigaciones, una elevada incidencia de los genes *act*, *alt* y *ast*, en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de pacientes hospitalizados por afecciones intestinales, a diferencia de lo que ocurre en aislamientos obtenidos de pacientes con síndromes extraintestinales, en cuyo repertorio de genes de virulencia predominan aquellos que codifican para proteasas, sideróforos, lipasas, pilis y sistemas de secreción. Los aislamientos medioambientales de *Aeromonas* spp., por su parte, poseen por lo general, genes de virulencia que codifican para proteínas implicadas en síndromes tanto intestinales como extraintestinales, hecho que posiciona a esta fuente de aislamientos como un reservorio de genes de virulencia (Kingdome *et al.*, 1999; Aguilera-Arreola *et al.*, 2005; Chacón *et al.*, 2005; Janda y Abbott, 2010).

Teniendo en cuenta lo anterior, algunos autores han propuesto la existencia de ecotipos o patotipos de *Aeromonas* spp. en función de la existencia de una marcada correlación entre la presencia de determinados genes de virulencia y el ambiente de origen de cada aislamiento. Estudios de tipificación global del genoma, han demostrado a su vez, la tendencia de los aislamientos de aeromonadales móviles a agruparse en *clusters* en función de la región geográfica de donde proceden (Aguilera-Arreola *et al.*, 2005; Metz, 2015).

Debido a que los aislamientos empleados en este estudio provienen únicamente de peces de cultivo infectados, no fue posible inferir a partir de nuestros resultados la relación existente entre el número y tipo de genes virulencia y otras fuentes de aislamientos, tales como fuentes de agua, alimentos, peces sanos, etc. A pesar de ello, los análisis realizados en función de las variables epizootiológicas permitieron advertir que existe una asociación entre los genotipos de virulencia identificados y

las especies de *Aeromonas* investigadas, hecho que puede apreciarse al observar la Tabla 13, donde, a excepción de lo ocurrido con tres aislamientos (B1, B2 y V8), los distintos genotipos de virulencia no son compartidos entre especies. Existe poca evidencia relacionada con este hallazgo. Según la información publicada, la distribución de genotipos de virulencia en aeromonadales, en caso de poseer algún patrón característico, responde al tipo de ambiente de origen del aislamiento y no a la especie de *Aeromonas* en particular, como se mencionó anteriormente. Entre los escasos estudios que abordan este aspecto, se destaca el trabajo realizado por Castilho *et al.* (2009), donde se observa una mayor frecuencia del genotipo *alt⁺/ast⁺* únicamente en los aislamientos de *A. hydrophila* recuperados de alimentos, no ocurriendo lo mismo con otras especies (*A. caviae* y *A. veronii*) y otras fuentes de aislamientos (heces de pacientes con diarrea y agua, del estado de Río de Janeiro, Brasil). Heuzenroeder *et al.* (1999), por su parte, encuentran diferencias en la frecuencia de identificación del genotipo *aerA⁺/hlyA⁺* entre las especies *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* biovar *sobria*. Cabe destacar que en ambas investigaciones citadas, si bien se hallaron diferencias en la prevalencia de cada genotipo según la especie, dichos genotipos son compartidos entre ellas, a diferencia de lo ocurrido en nuestro caso.

En contraposición con lo observado por otros autores, entre los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. no se hallaron diferencias en la prevalencia de los genes de virulencia evaluados, ya sea en función de la especie de hospedero, de la especie bacteriana o del tipo de explotación piscícola, entre otras variables epizootiológicas. Tomando en cuenta el total de las especies identificadas en nuestro país, puede decirse que la representatividad de cada uno de los genes relevados fue similar entre sí. Esto podría deberse a que la fuente de aislamientos en todos los casos fue la misma (peces enfermos) e indicaría que el repertorio de genes implicados en el desarrollo de un proceso infeccioso en peces no posee un patrón de distribución definido. A pesar de esto, más adelante se discutirá la posible relación existente entre el genotipo de virulencia *act⁺/alt⁺/ast⁺/ela⁺/lip⁺* y el cuadro clínico desarrollado por los peces afectados por los aislamientos nacionales que lo poseen.

Otro aspecto a destacar es la relativa homogeneidad en la distribución de genotipos de virulencia que presentan en general los aislamientos nacionales de aeromonadales móviles, hecho que contrasta con la mayoría de las investigaciones publicadas que abordan la temática. Por ejemplo, en un reciente estudio Jagoda *et al.* (2014), analizando siete genes de virulencia en aislamientos de aeromonadales móviles obtenidos de peces ornamentales con signos de SAM, encuentran 18 genotipos diferentes y destacan la elevada heterogeneidad que presenta la distribución de genes de virulencia, congruente con lo hallado por otros autores.

Como se mencionó anteriormente, los aislamientos de *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium*, *A. caviae* y *A. punctata* presentan una elevada estabilidad en la distribución de sus genes de virulencia, a lo que se suma la existencia de dos únicos genotipos predominando entre los aislamientos nacionales de *A. hydrophila*.

A. veronii, por su parte, es la especie que presenta la mayor diversidad de genotipos de virulencia para el país, estos genotipos presentan la particularidad de no ser compartidos con otras especies (salvo un aislamiento) y de ser aislamiento-específico en varias ocasiones (4 de 7 genotipos representados por un solo aislamiento de *A. veronii*).

Aguilera-Arreola *et al.* (2005) encontraron una elevada estabilidad en la distribución de genotipos de virulencia en *Aeromonas* spp. aisladas de muestras clínicas y medioambientales en México. Para estos autores la distribución de genotipos depende de la locación geográfica y es una evidencia de la existencia de subpoblaciones de *Aeromonas* capaces de emplear diferentes mecanismos para colonizar y desarrollar un proceso infeccioso en su hospedero.

6.4.1.1. *Aeromonas allosaccharophila*

Si bien la carencia de genes de virulencia en aeromonadales es rara, varios autores destacan una menor frecuencia de identificación de estos genes en aquellos aislamientos provenientes de individuos sanos, en contraposición de lo que ocurre con los aislamientos de *Aeromonas* spp. realizados a partir de personas o animales enfermos, aislamientos medioambientales y de alimentos (Kühn *et al.*, 1997). A pesar de no poseer los genes de virulencia buscados, los aislamientos nacionales de *A. allosaccharophila* provienen de casos clínicos poblacionales en los que se registraron mortandades superiores a las esperadas, con sintomatología compatible con SAM, lo que implicaría que estos aislamientos son capaces de desarrollar un cuadro patológico en peces.

La ausencia de estos genes en aislamientos con capacidad patogénica, podría indicar una elevada susceptibilidad de los hospederos y/o la existencia, en estos aislamientos, de otros determinantes de patogenicidad más allá de los evaluados en este estudio. De hecho han sido descritos varios factores de virulencia en *Aeromonas* spp. que no se han relevado en esta investigación, entre los que se destacan sistema de secreción de tipo III, adhesinas, pilis, capa-S y nucleasas (Sen y Rodgers, 2004; Senderovich *et al.*, 2012). La realización de ensayos de infección experimental con estos aislamientos podría brindar información acerca de la virulencia de los mismos.

Cabe recordar, a su vez, que A1 y A2 provienen de establecimientos de piscicultura ubicados en zonas del país con bajo impacto antrópico (embalse para riego en zona rural del límite Artigas - Salto y embalse del río Negro en San Gregorio del Polanco respectivamente) y que, al momento de realizar los aislamientos eran pisciculturas de reciente instalación, lo que podría haber determinado, al igual de lo que ocurre con la resistencia a antibióticos en estos mismos aislamientos, una baja presión de selección hacia los genotipos patogénicos.

6.4.1.2. *Aeromonas bestiarium*

Ambos aislamientos de *A. bestiarium* comparten uno de los genotipos de virulencia más frecuentemente identificados entre los aeromonadales aislados de peces en nuestro país (26,5%), el cual posee todos los genes relevados y es compartido, a su vez, con otros siete aislamientos de *A. hydrophila*, todos ellos con capacidad hemolítica. Esta baja diversidad de genotipos expresada por *A. bestiarium* concuerda con los hallazgos realizados por Sen y Rodgers (2004), quienes encuentran un único genotipo (*act*⁺/*alt*⁻/*ast*⁻/*ela*⁺/*fla*⁺/*lip*⁺) al analizar 17 aislamientos de *A. bestiarium* procedentes de distintas fuentes naturales de agua en Estados Unidos.

6.4.1.3. *Aeromonas caviae/punctata*

Todos los aislamientos pertenecientes al complejo *A. caviae/punctata* (al igual que V8) presentan un genotipo de virulencia caracterizado por la carencia de genes que codifican la producción de enterotoxinas (*act*, *alt* y *ast*) y la presencia de genes que codifican exotoxinas (*ela* y *lip*), siendo a su vez, aislamientos no hemolíticos en todos los casos. Estos hallazgos concuerdan con los realizados por otros autores,

quienes destacan el escaso número de genes de virulencia que presentan los aislamientos de *Aeromonas caviae* en comparación con lo ocurrido con otras especies, independientemente del origen de los mismos (Heuzenroeder *et al.*, 1999; Castilho *et al.*, 2009; Aravena-Román *et al.*, 2014; Khor *et al.*, 2016).

Si bien, como se mencionó anteriormente, es difícil determinar el rol específico que desempeña cada gen de virulencia en la patogenia de SAM, cabe destacar que todos los aislamientos que presentaron el genotipo de virulencia *act⁻/alt⁻/ast⁻/ela⁺/lip⁺* fueron obtenidos de presentaciones atípicas de la enfermedad.

Teniendo en cuenta lo anterior, podría especularse que los aislamientos que poseen el genotipo *act⁻/alt⁻/ast⁻/ela⁺/lip⁺*, además de ser no hemolíticos, son incapaces de desarrollar un cuadro agudo de SAM; pudiendo inducir, en su lugar una enfermedad de tipo crónico, con características variables según la especie de hospedero.

Las investigaciones llevadas a cabo para poner de manifiesto el rol de estos genes en la virulencia de los aeromonadales arrojan resultados controvertidos. A pesar de que la producción de lipasas es bien conocida en varias bacterias patógenas, no está claro el papel que juegan las mismas en la patogenia de las aeromoniasis. En un estudio llevado a cabo por Vipond *et al.* (1998), no fue posible demostrar la disminución en la virulencia de cepas mutantes de *Aeromonas salmonicida* en el gen *satA*, el cual codifica para la producción de la enzima GCAT (glicerofosfolidil-colesterol aciltransferasa), considerada la toxina más letal que posee la especie. Sin embargo, ensayos de virulencia llevados a cabo en peces y ratones con mutantes de *A. hydrophila* con deleciones en los genes que codifican para las fosfolipasas A1 (*pla*) y C (*plc*), han demostrado que el fenotipo *plc⁻* induce aumentos en la dosis letal cincuenta de uno a dos órdenes logarítmicos, lo que indicaría que esta fosfolipasa tiene efecto sobre la virulencia (Merino *et al.*, 1999).

En lo que respecta a la producción de elastasa, un estudio llevado a cabo por Cascón *et al.* (2000), demostró que la disrupción del gen *aphB*, que codifica la producción de AphB (la Zn metaloproteasa extracelular de *Aeromonas* spp. con actividad elastolítica evaluada en nuestra investigación), induce aumentos muy significativos en la dosis letal cincuenta desarrollada por las cepas mutantes tras la infección experimental en truchas, por lo que ha sido considerada como un factor de virulencia importante para los aeromonadales. En un trabajo posterior, realizado por Song *et al.* (2004), se comprobó que una Zn metaloproteasa de 34 kDa, denominada Avp, es necesaria para la activación de la proaerolisina en aerolisina de *A. veronii* biovar. *sobria*; las cepas mutantes que carecen del gen *avp* poseen escasa actividad hemolítica y proteolítica.

6.4.1.4. *Aeromonas hydrophila*

La predominancia de dos únicos genotipos de virulencia que presentan los aislamientos nacionales de *Aeromonas hydrophila* contrasta con la elevada diversidad observada por otros autores para la especie. Entre otros se destacan los estudios realizados por Li *et al.* (2011), quienes evaluando la frecuencia de ocurrencia de tres genes de virulencia (*aerA*, *ahp* y *alt*) en aislamientos de *A. hydrophila* provenientes de peces (sanos y enfermos) y cuerpos de agua, encuentran siete genotipos diferentes, hallando una predominancia del genotipo *aerA⁺/ahp⁺/alt⁺* en aquellos aislamientos obtenidos a partir de peces enfermos. Oliveira *et al.* (2012), a su vez, encuentran 13 genotipos diferentes al evaluar la ocurrencia de los genes

aer, *ahyB*, *pla/lip* y *Lip* en 114 aislamientos de *A. hydrophila* obtenidos de peces enfermos cultivados en Brasil, estos autores destacan además la elevada prevalencia (42,9%) de aislamientos con un mínimo de tres de los cuatro genes buscado por los autores. En una reciente investigación, Metz (2015) encuentra 10 genotipos diferentes, al evaluar la presencia/ausencia de 11 genes de virulencia (*act*, *aerA*, *ahh1*, *ahsA*, *ahyB*, *aopB*, *ascV*, *eno*, *lip*, *sery* *tapA*) en 20 aislamientos de *A. hydrophila* procedentes de casos clínicos humanos, peces, reptiles y medioambiente.

Los dos genotipos encontrados se hallan distribuidos uniformemente en la población de aislamientos nacionales de *A. hydrophila*, de modo tal que, es posible encontrar representantes de la especie con uno u otro genotipo en casos clínicos provenientes de todos los tipos de explotación evaluados. Es interesante destacar a su vez, que los aislamientos H6 y H7 poseen distintos genotipos de virulencia a pesar de haber sido aislados del mismo brote epizootiológico (enfermedad ulcerativa observada en un número significativo de esturiones en cultivo), lo que podría estar indicando la presencia de más de un clon de *Aeromonas hydrophila* actuando en una epizootia.

Otro aspecto a destacar es el genotipo de virulencia presentado por el aislamiento H12, el mismo no es compartido con otros aislamientos, a pesar de la preponderancia de dos únicos genotipos que poseen los aislamientos nacionales de *A. hydrophila*. Teniendo en cuenta que H12 fue aislada de una tortuga acuática (proceso ulcerativo observado en piel y carapacho) y no de peces como el resto de los aislamientos, podría especularse que la existencia de este genotipo en particular (*act*⁺/*alt*⁺/*ast*⁺/*ela*⁺/*lip*⁻) es debida a las necesidades de adaptación de este aislamiento a una especie no íctica. Algunos aspectos de la caracterización genética que veremos más adelante brindan información en favor de esta especulación.

En referencia a la prevalencia de los genes de virulencia identificados para la especie, varios autores destacan la elevada frecuencia de identificación de genes relacionados con la hemolisina aerolisina (*act/hylA/aerA*) por sobre el resto de los evaluados, ya sea en aislamientos clínicos o medioambientales y destacan a su vez la relación del mismo con la virulencia y capacidad hemolítica de las cepas (Sen y Rodgers, 2004; Janda y Abbott, 2010); en nuestro trabajo, el gen *act*, filogenéticamente relacionado con la hemolisina aerolisina, fue junto con *alt*, el menos representado; a diferencia de lo ocurrido con los genes *ast*, *ela* y *lip*.

6.4.1.5. *Aeromonas veronii*

Aeromonas veronii es la especie que posee la mayor diversidad de genotipos de virulencia de entre las analizadas en este estudio. En coincidencia con nuestros hallazgos, Gashgari y Selim (2015) encontraron 12 genotipos de virulencia diferentes al relevar la ocurrencia de seis genes (*aero*, *ahyB*, *lip*, *fla*, *act* y *exu*) en 45 aislamientos de *A. veronii* biovar. *sobria* obtenidos de filetes de pescado a la venta.

En contraste con lo que ocurre en *A. hydrophila*, los genes de virulencia más prevalentes entre los aislamientos nacionales de *A. veronii* son los que codifican para las enterotoxinas *act* y *alt* y para la elastasa. Si tenemos en cuenta la asociación detectada entre los genes que codifican para estas enterotoxinas y su estrecha relación con los genotipos de virulencia de los aislamientos nacionales de *A. veronii* (4 de 5 genotipos de virulencia exclusivos de *A. veronii* poseen ambos genes), podría especularse que se trata de patotipos con capacidad enteropatogénica.

La enterotoxina citotóxica Act se secreta a través del sistema de secreción tipo II, está relacionada con la hemolisina aerolisina y posee múltiples actividades biológicas, entre las que se incluyen: la capacidad de lisar eritrocitos, destruir células en cultivo, desarrollar una respuesta secretoria en el modelo asa intestinal ligada e inducir mortandad en ratones. Alt y Ast poseen actividad citotónica más que citotóxica, causando desregulación en la absorción de agua en el intestino como resultado del incremento en los niveles de cAMP en los enterocitos, similar a la acción de la toxina colérica. Las tres enterotoxinas han sido relacionadas con el desarrollo de diarrea en modelo murino, siendo Act la enzima más influyente (Metz, 2015).

6.4.2. Tipificación mediante técnicas de rep-PCR

Existen muy pocas investigaciones que evalúen la diversidad de los aislamientos de aeromonadales mediante el empleo de técnicas de tipificación genómica. En este sentido, Korzekwa *et al.* (2012) afirman, en referencia a *Aeromonas hydrophila*, que el esfuerzo de los investigadores en el estudio del genoma se ha centrado en aspectos taxonómicos, análisis de mutaciones en genes de resistencia a antibióticos, secuencias relacionadas con virulencia y elementos transponibles, pero hay una escasez general de información acerca de la diversidad del genoma de esta bacteria.

Los primeros estudios de tipificación de aeromonadales datan de principios de la década de 1990 y emplean técnicas tales como la electroforesis de campo pulsado (PFGE), RAPD-pcr (por *Random Amplified Polymorphism of the DNA PCR*) y RFLP de la región espaciadora intergénica 16S-23S (ISR 16S-23S), entre otras. Es de destacar que en ésta década, Miyata *et al.* (1995) demuestran la estructura clonal de *Aeromonas salmonicida* spp., al obtener idénticos patrones de tipificación mediante RAPD en varios aislamientos de esta bacteria procedentes de distintos países del mundo; hecho que contrasta con la heterogeneidad genética hallada por estos autores para *Aeromonas hydrophila* empleando la misma técnica. Estudios posteriores confirmarían la homogeneidad genética de *A. salmonicida* ampliando el número y la procedencia de los aislamientos investigados (O'hlci *et al.*, 2000).

El uso de las técnicas de rep-PCR empleadas en nuestra investigación es limitado entre los aeromonadales y de relativa reciente aplicación. La mayor parte de las investigaciones se centran en la tipificación de aislamientos ambientales o de casos clínicos humanos y su uso como herramienta epidemiológica en medicina de organismos acuáticos es aún incipiente.

Los primeros estudios que emplearon estas técnicas de tipificación en *Aeromonas* spp. desestimaron su utilidad, debido principalmente a las incongruencias halladas en los resultados, tales como formación de *clusters* entre aislamientos completamente independientes o la no asociación entre otras variables (antibiorresistencia y genotipo de virulencia por ejemplo) y la agrupación de aislamientos derivada de la tipificación.

Para Aguilera *et al.* (2005), las dificultades en la interpretación de los hallazgos obtenidos a partir de este tipo de tipificación en *Aeromonas hydrophila* observados en la literatura, son debidos al empleo de un bajo número de aislamientos y a la incorrecta identificación de los mismos, mediante métodos fenotípicos. A pesar de esto, existen algunas investigaciones que, a partir de un diseño adecuado, ponen de manifiesto algunas asociaciones existentes entre *clusters* de aislamientos y ciertas variables epidemiológicas en aeromonadales móviles. Soler *et al.* (2003b) por

ejemplo, empleando las técnicas de ISR-RFLP, *rep*-PCR (*primers* ERIC y BOX), tipifican 26 aislamientos de *Aeromonas popoffii* procedentes de distintas partes del mundo y encuentran una estructura clonal en función del origen geográfico de los mismos, advirtiendo a su vez el poder discriminatorio de dichas técnicas, dado que las especies empleadas como control externo (cepas tipo de *A. bestiarium*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida*) se asocian en *clusters* independientes.

Szczuka y Kaznowski (2004), realizaron un completo estudio de tipificación en un elevado número de aislamientos de *Aeromonas* spp., procedentes de fuentes clínicas (humanos y animales, incluidos peces) y ambientales de varias partes del mundo, mediante RAPD y *rep*-PCR. En este trabajo se destaca la elevada diversidad genética que presenta el grupo y la coexistencia de varios genotipos de una misma especie en las muestras analizadas. Sin embargo, los autores también destacan la estructura clonal observada para algunos aislamientos de las especies *A. bestiarium*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. salmonicida* y *A. veronii* procedentes de un mismo ambiente, no ocurriendo lo mismo en relación con otro tipo de variables (tipo de patología desarrollada por el aislamiento, origen geográfico de los mismos). En función de sus hallazgos, estos autores plantean la existencia de distintos patotipos de *Aeromonas* spp. procedentes de varias líneas evolutivas y no de un grupo monofilético, similar a lo ocurrido con otras especies bacterianas. Un ejemplo de esto lo constituye *E. coli*, dado que la mayoría de las cepas patógenas de esta bacteria son capaces de desarrollar una enfermedad similar a pesar de no poseer un origen evolutivo en común (Pupo *et al.*, 1997).

En relación con la utilidad de esta técnica para la tipificación de los aeromonadales móviles nacionales, podría decirse que el empleo de los *primers* BOX y ERIC arrojó mejores resultados que la utilización de *primers* REP. Mediante el uso de *primers* BOX fue posible tipificar todos los aislamientos de cada una de las especies evaluadas, no ocurriendo lo mismo al emplear los *primers* ERIC, dado que no se obtuvo patrón de bandas en uno de los aislamientos (H4). La tipificación con *primers* REP fue la menos efectiva, ya que solo fue posible tipificar a nueve de los 13 aislamientos de *A. hydrophila*, seis de los 11 aislamientos de *A. veronii* y ningún aislamiento de *A. punctata*.

Estos hallazgos son coincidentes con los realizados por otros autores. Tacao *et al.* (2005) a partir de la tipificación de varios aislamientos de *Aeromonas* spp. con *primers* BOX, concluyen en que esta es una excelente herramienta para la caracterización genética de estas bacterias y puede ser empleada como un complemento epidemiológico de utilidad para este género. En relación con el empleo de *primers* REP, Szczuka y Kaznowski (2004) desaconsejan su empleo en aeromonadales dado que obtienen escasos patrones de bandas al tipificar varios aislamientos, concluyendo que las secuencias extragénicas palindrómicas repetitivas deben estar poco distribuidas en el genoma de *Aeromonas* spp.

6.4.2.1. Tipificación de *Aeromonas hydrophila*

Teniendo en cuenta la baja diversidad de genotipos de virulencia que se identificaron para esta especie en nuestro país, era de esperar una cierta homogeneidad en la distribución de los patrones de tipificación del genoma, derivados de la preponderancia de algunos clones entre los peces afectados por SAM. A pesar de esto, del análisis de *clusters* realizado sobre las corridas de tipificación de estas bacterias surge que los aislamientos nacionales de *A. hydrophila* son genéticamente

heterogéneos y no presentan un patrón de asociación característico (ver Figuras 3, 8 y 12). La elevada diversidad genética que presenta *A. hydrophila* frente a este tipo de técnicas de tipificación ha sido señalada en numerosas investigaciones y en aquellos casos en los que se encuentra una asociación entre aislamientos, la misma responde al origen geográfico común de los mismos y no a otras características epidemiológicas.

Aguilera-Arreola *et al.* (2007), en un extenso estudio en el que comparan los perfiles de tipificación empleando *primers* ERIC en varios aislamientos de *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. veronii* procedentes de casos clínicos observados en humanos de España y México, no encuentran un patrón de tipificación claro que permita agrupar a los aislamientos, a pesar de que hallan una correlación entre ciertos genotipos de virulencia y el origen geográfico de los aislamientos.

En un estudio reciente realizado por Shao-wu *et al.* (2013) se tipificaron 59 aislamientos de *A. hydrophila* procedentes de pisciculturas del norte de China mediante *rep*-PCR (*primers* ERIC), si bien fue posible agrupar a estos aislamientos en tres *clusters* principales según sus perfiles de tipificación, no fue posible establecer una correlación entre dichos *clusters* y los perfiles de resistencia a antibióticos obtenidos para cada aislamiento o con la piscigranja de procedencia, a pesar de que la prevalencia de cada uno de los *clusters* hallados fue diferente entre provincias.

Como se mencionó anteriormente, es probable que en nuestro caso, al haber trabajado únicamente con aislamientos obtenidos de peces enfermos, que a su vez proceden de una región geográfica acotada, se enmascare la posible asociación entre ellos, suponiendo que la misma ocurriese a una escala geográfica más amplia o entre distintas formas de presentación de la aeromoniasis (distintas clases de hospederos por ejemplo). En relación con esto, es interesante resaltar un estudio realizado por Singh *et al.* (2010), en el que se tipifican mediante el empleo de *primers* BOX varios aislamientos de distintas especies de *Aeromonas*, hallándose por un lado estructura clonal intraespecífica para *A. bestiarium*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. salmonicida* y *A. veronii*; además de advertir la formación de *clusters* según los patrones de tipificación de *A. hydrophila* en los que se agrupan, por un lado los aislamientos procedentes de peces enfermos y por otro lado los aislamientos procedentes de peces sanos, casos clínicos humanos y cuerpos de agua.

Ampliar las fuentes de aislamientos, así como la zona de procedencia de los mismos, aportaría información de relevancia para el establecimiento de asociaciones a mayor escala entre los aeromonadales nacionales.

Recientemente Hossain *et al.* (2013), mediante secuenciado masivo, demostraron la estrecha relación filogenética existente entre los aislamientos de *Aeromonas hydrophila* responsables de graves epizootias de SAM ocurridas en el cultivo de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) del sudeste de EEUU en los últimos años. Por un lado hallaron una elevada relación clonal entre los aislamientos implicados en los brotes, tanto en años sucesivos, como entre los distintos estados afectados; siendo a su vez estos clones genómicamente diferentes a los aislados en años previos a que comenzaran a ocurrir los brotes de mortandad masiva de animales en el primero de los estados afectados hasta el momento (Alabama - 2009). Posteriormente, mediante estudios filogenéticos empleando la secuencia del gen *gyrB* y secuenciado del genoma completo, se demuestra que las cepas de *A. hydrophila* altamente virulentas

que afectan la piscicultura del sudeste estadounidense (AL09-71, AL09-72 y AL09-73) proceden de aislamientos relacionados con episodios de mortandad masiva por SAM ocurridos en China entre las décadas de 1980 y 1990, con características epizootiológicas similares a las observadas en EEUU. Los autores responsabilizan de la diseminación de esta bacteria desde Asia hasta América del norte, tanto al comercio de organismos acuáticos vivos y sus derivados, como a los organismos invasores (Hossain *et al.*, 2014).

Las asociaciones que se aprecian en los análisis de *clusters* realizados con los aislamientos nacionales de *Aeromonas hydrophila* no poseen una explicación aparente. Si bien se observan aislamientos procedentes de la misma explotación piscícola que se hallan relacionados entre sí, tal es el caso de la tipificación con *primers* BOX de H11 y H13 (Figura 3), también pueden verse asociaciones entre aislamientos no relacionados, como ser H1 (cepa tipo de *A. hydrophila* ATCC 7966) y H2 (aislamiento procedente de un esturión de cultivo). Puede apreciarse también, que los *clusters* creados en función de una de las técnicas de tipificación no se corresponden con los creados para otras.

Una excepción a lo anterior lo constituye el aislamiento H12, recordemos que, a diferencia de lo ocurrido con el resto de los aislamientos, éste fue obtenido de un proceso ulceroso ocurrido en una tortuga acuática y no de un pez de cultivo, lo que podría explicar estos hallazgos. En dos de los tres patrones de tipificación obtenidos para la especie (tipificación con *primers* BOX y REP, Figuras 3 y 12 respectivamente), H12 tiende a ubicarse en una rama independiente del resto de los aislamientos (más notorio para REP), lo que indicaría que el genoma de este aislamiento diverge del resto, probablemente como respuesta adaptativa a un hospedero distinto del pez. La posesión de un genotipo de virulencia exclusivo en este aislamiento ($act^+/alt^+/ast^+/ela^+/lip^-$) apoya la idea antes mencionada.

6.4.2.2. Tipificación de *Aeromonas caviae/punctata*

Los aislamientos pertenecientes al complejo *Aeromonas caviae/punctata* presentan un patrón de tipificación que corresponde claramente con el desarrollo de una población clonal altamente emparentada (ver Figuras 5 y 10). No solo el grado de similitud entre aislamientos es del 100% para todas las técnicas empleadas, sino que también, el genotipo de virulencia identificado para todos los aislamientos de esta especie es idéntico entre sí ($act^+/alt^+/ast^+/ela^+/lip^+$) y compartido únicamente con otro aislamiento de *Aeromonas veronii* (V8). La mayoría de estos aislamientos (C1 y P2 a P5) proceden, como se mencionó anteriormente, de episodios de mortandad en esturiones relacionados epidemiológicamente (en tiempo y espacio), lo que podría indicar el reclutamiento de este clon en particular durante dicha epizootia. El aislamiento P1, de idéntico patrón de tipificación y genotipo de virulencia, no posee relación epidemiológica aparente con el resto de los aislamientos, ya que procede de un caso clínico individual observado en un bioterio de Montevideo. Más adelante se verá, a su vez, que P1 posee algunas diferencias en la secuencia del gen *gyrB* que lo posicionan a cierta distancia evolutiva del *cluster* que agrupa al resto de los aislamientos de *A. caviae/punctata*.

Pablos *et al.* (2010) también encuentran relaciones clonales entre aislamientos de *A. caviae* procedentes de pacientes con diarrea y entre muestras ambientales. Dichos aislamientos poseen a su vez una baja carga de genes de virulencia y fueron obtenidos a lo largo de un período prolongado de tiempo en varias ocasiones. La

persistencia de estos clones en el ambiente sería debida fundamentalmente a la formación de *biofilm* según estos autores.

6.4.2.3. Tipificación de *Aeromonas veronii*

Al igual de lo ocurrido con *A. hydrophila*, la tipificación de los aislamientos nacionales de *A. veronii* no arroja un patrón particular de agrupamiento (ver Figuras 4, 9 y 13). Si observamos los aislamientos relacionados epizootiológicamente (V3-V4 y V10-V11) podemos apreciar que no tienden a agruparse en conjunto, salvo en una ocasión (V10-V11 para *primers* ERIC), lo que pone de manifiesto la existencia de diversos clones de *A. veronii* actuando en un mismo brote epizootico. Lo que estaría en concordancia con la diversidad de genotipos de virulencia identificados para la especie.

A pesar de esto, Martínez-Murcia *et al.* (2000), analizando patrones de tipificación (ISR-RFLP) de distintos aislamientos clínicos y medioambientales, concluyen que *A. veronii* procede de una línea filogenética relativamente homogénea, teniendo en cuenta que varios aislamientos de *A. veronii* de diversos orígenes comparten idénticos perfiles de tipificación.

Es interesante resaltar, aquí también, la existencia de un aislamiento que tiende a la no agrupación con sus conespecíficos en dos de las tres técnicas empleadas. Dicho aislamiento es V8 y posee la particularidad de que su genotipo de virulencia es único entre los aislamientos nacionales de *A. veronii* y es compartido, a su vez, con todos los aislamientos nacionales de *A. caviae/punctata*. Cabe destacar que la patología desarrollada por V8 posee algunas características epizootiológicas que se asemejan a las observadas en los animales infectados por miembros del complejo *A. caviae/punctata*, a saber: este aislamiento fue realizado también en épocas del año con baja temperatura ambiente y el único signo que presentaba el caracius desde donde se aisló V8 era letargia, forma de presentación atípica o subclínica de una aeromoniasis.

6.4.3. Análisis filogenéticos

Los estudios filogenéticos en aeromonadales han tenido como objetivo principal el esclarecimiento de sus relaciones taxonómicas, tanto al interior del género, como también con otros taxones allegados. Una vez reconocidas las dificultades de identificación impuestas por la heterogeneidad fenotípica de los aislamientos, el esfuerzo de la comunidad científica se enfocó en la búsqueda de marcadores genéticos que permitieran establecer relaciones filogenéticas acordes con los resultados obtenidos de la hibridación ADN-ADN. En uno de los trabajos pioneros en el tema, Martínez-Murcia *et al.* (1992) advierten las incongruencias existentes entre los árboles filogenéticos creados en función de la secuencias del ARNr 16S de los representantes del género *Aeromonas* y las genopecies determinadas hasta el momento con base en los estudios de reasociación de ADN. Estos autores encontraron, por ejemplo, que la diferencia en las secuencias del ARNr 16S entre *A. caviae* y *A. trota* es de apenas 3 nucleótidos, a pesar de que ambas especies se ubican en GH diferentes y poseen un valor de hibridación ADN-ADN bajo (30%); en contraposición, las secuencias que codifican para la subunidad ribosomal 16S de *A. sobria* y *A. veronii*, a pesar de diferir en 12 nucleótidos, poseen un valor de hibridación de 60 a 65%, indicando que ambas especies están muy emparentadas.

Estas discrepancias en la agrupación filogenética de los aeromonadales móviles en función de la secuencia del gen ARNr 16S, son debidas al mosaico evolutivo de los operones de ARN ribosomal de *Aeromonas* spp. La heterogeneidad intragenómica manifestada por el polimorfismo nucleotídico del ARN ribosomal detectado en la mayoría de las especies va desde 0,06% (en *A. veronii*) hasta 1,5% (microheterogeneidades); esta amplia divergencia en las secuencias impide, además, su uso como método definitivo para la identificación de especies de estas bacterias (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

6.4.3.1. Empleo de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S

Mediante el análisis de esta secuencia génica no fue posible obtener un patrón de agrupamiento de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. que tuviese relación con los hallazgos realizados en las otras etapas de la caracterización. Si observamos los análisis intraespecíficos de aislamientos nacionales (Figuras 14 a 16) podemos advertir, en el caso de *A. hydrophila*, que si bien dos aislamientos de un mismo brote se ubican en un mismo clado (H6 - H7), a su vez ocupan el mismo nivel otros aislamientos sin relación epidemiológica conocida; por otra parte, la mayoría de los aislamientos que comparten un mismo genotipo de virulencia se ubican en grupos diferentes. Las diferencias para el caso de *A. veronii* son aún mayores, dado que, incluso los aislamientos epizootiologicamente relacionados (V3 - V4) se ubican en clados diferentes.

Estos hallazgos, al igual que los realizados mediante las técnicas de *rep*-PCR, dan cuenta de la elevada diversidad genética que poseen la mayoría de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. Teniendo en cuenta que hemos detectado la coexistencia de distintos clones de una misma especie en un mismo brote en nuestro país y que a su vez se ha demostrado la capacidad de dispersión a gran escala que poseen estos agentes, es de destacar la potencialidad de estos microorganismos para el desarrollo de epizootias, ya sea en peces u otros organismos susceptibles.

Las relaciones filogenéticas de *Aeromonas punctata* en función de la secuencia de este gen, mantienen el patrón de similitud que se observó en otros aspectos de la caracterización. Todos los aislamientos se ubican en un mismo *cluster* y poseen una similitud del 100% en sus secuencias ARNr 16S. La baja diversidad observada en este caso, es coincidente a su vez, con los hallazgos realizados para otras técnicas ya sea genotípicas como fenotípicas y refuerza la hipótesis de existencia de un bajo número de clones de *A. caviae/punctata* circulando entre los peces de cultivo de nuestro país.

6.4.3.2. Empleo de la secuencia del gen *gyrB*

Es notorio el poder discriminatorio que posee la secuenciación y análisis filogenético del gen *gyrB* en aeromonadales en comparación con el gen ARNr 16S. Mientras que la similitud interespecífica en las secuencias del ARNr 16S va del 98,7 al 100% para *Aeromonas* spp., en el caso de la secuencia del gen *gyrB* estos valores alcanzan apenas el 89 a 92%. La mayor diversidad en la secuencia de este y otros genes *housekeeping*, en contraposición con la estabilidad que presenta el ARNr 16S, le aporta a ésta técnica mayor poder de discernimiento entre especies de *Aeromonas* altamente emparentadas e incluso entre cepas de una misma especie (Janda y Abbott, 2010). A modo de ejemplo, *A. caviae* y *A. trota* son distinguibles solo por un nucleótido cuando se emplea el ARNr 16S como cronómetro molecular, mientras el

análisis de la secuencia del gen *gyrB* revela diferencias que van de las 57 a 69 pb, dependiendo de la cepa particular que se secuencie (Yáñez *et al.*, 2003).

Con respecto a las relaciones intraespecíficas establecidas entre los aislamientos identificados en nuestro país, una vez más queda de manifiesto la diversidad genética que presentan los aislamientos de *Aeromonas hydrophila* y *A. veronii*., en contraposición con la elevada similaridad en las secuencias del gen *gyrB* que presentan los aislamientos de la especie *A. punctata*. En la Figura 23, por ejemplo, puede observarse que, incluso en el único caso en el que dos aislamientos procedentes de un mismo brote se ubican en un mismo *cluster* (V3 - V4), la distancia evolutiva que los separa es aún mayor a la existente entre aislamientos no relacionados (V8 - V9 por ejemplo), lo que estaría poniendo de manifiesto, aquí también, la existencia de distintas variantes genéticas de una misma especie actuando en conjunto en un mismo brote epizootico.

Es interesante resaltar a su vez, que el aislamiento P1 de *A. punctata* no tiende a agruparse en el mismo *cluster* que el resto de los aislamientos nacionales de la especie. Teniendo en cuenta que este es el único aislamiento de *A. punctata* no relacionado epizootiológicamente con el resto, podría considerarse esta leve discrepancia en la secuencia *gyrB* como un marcador entre aislamientos altamente emparentados.

En lo que respecta a las relaciones interespecíficas establecidas entre los aislamientos nacionales mediante el empleo de la secuencia de este gen, en la Figura 25 puede observarse que la capacidad de discernimiento entre especies es superior a la observada para la secuencia del gen ARNr 16S, presentada previamente en la Figura 17.

Yáñez *et al.* (2003), resaltando su extremada utilidad, reconstruyeron la filogenia del género *Aeromonas* mediante el empleo de la secuencias del gen *gyrB* de las cepas tipo representantes de los 17 GH conocidos hasta el momento, obteniendo un arreglo de especies coincidente con los esperado en función de la reasociación de ADN. Dichos autores estiman que la exactitud de este gen como cronómetro evolutivo es debida a que su tasa media de sustitución en *Aeromonas* spp. es seis veces superior a la esperada para el ARNr 16S, además de la probable existencia de una única copia del gen *gyrB* en cada aislamiento, lo que aportaría menos variabilidad intraespecífica que las cinco copias del operón ribosomal que posee *Aeromonas veronii*, con una heterogeneidad interna del 1,5% o las seis copias de *A. media*, con 1,4% de microheterogenicidades (Alperi *et al.*, 2008).

Del análisis de las relaciones filogenéticas interespecíficas establecidas con las secuencias *gyrB* depositadas en PubMLST/*Aeromonas* puede inferirse que los aislamientos nacionales de *A. hydrophila* están más emparentados entre sí que los aislamientos de *A. veronii*. Téngase presente que fue necesaria la confección de ocho arboles diferentes (derivados del dendograma original presentado en el Anexo 4) para establecer las relaciones filogenéticas que incluyeran a todos los aislamientos nacionales de *A. veronii* (Figuras 32 a 39), mientras que para el caso de *A. hydrophila* bastó con la confección de cuatro árboles para ver incluidos a todos los aislamientos nacionales (Figuras 26, 28, 30 y 31). Este hallazgo está en concordancia con la diversidad de genotipos de virulencia encontrados para estos aislamientos; en este sentido, era de esperar una menor diversidad genética en *A. hydrophila* en función de que fueron identificados dos únicos genotipos de virulencia con clara

predominancia entre estos aislamientos; a su vez, y teniendo en cuenta que *A. veronii* fue la especie que presentó la mayor diversidad de genotipos de virulencia, era esperable que fuese una especie diversa desde otros abordajes de la caracterización génica.

El comportamiento del aislamiento H4 de *Aeromonas hydrophila* en el análisis filogenético empleando ambos genes, es de remarcar. Nótese que en todos los casos (Figuras 20, 21, 24, 27 y 30) H4 tiende a ubicarse por separado del resto de sus conespecíficos, ya sea en un mismo *cluster* o incluso en agrupaciones con otras especies, tal es el caso del *cluster* formado con aislamientos de *Aeromonas aquariorum*. Estas discrepancias en la asignación taxonómica de H4 podrían deberse a que se trate de una especie distinta de *A. hydrophila* pero que no puede ser discriminada mediante las técnicas de identificación empleadas en ésta investigación. Cabe destacar, que *A. aquariorum* es una especie de reciente descripción y de la cual existen muy pocas secuencias depositadas en las bases de datos públicas, por lo que su representatividad puede verse subestimada.

6.5. Caracterización patológica

Existe amplio consenso en afirmar que la patogenia de las diferentes presentaciones clínicas de la infección por *Aeromonas* spp. es multifactorial y no puede ser explicada en función de la evaluación de algunos determinantes de virulencia (Janda y Abbott, 2010). A pesar de esto, se ha demostrado la existencia de algunos factores fundamentales para la instalación y el desarrollo de un proceso patológico. En el caso de *Aeromonas salmonicida*, por ejemplo, se ha demostrado que la capa-S y el sistema de secreción del tipo III son indispensables en la patogenia de la forunculosis en salmónidos (Tanaka *et al.*, 2013). Sin embargo, para los aeromonadales móviles no se han hallado, hasta el momento, determinantes de patogenicidad *per se*, aunque, el grupo de toxinas conocido como aerolisina/hemolisina podría ser el factor más importante en la patogenicidad de estas bacterias (Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Un estudio realizado por Li *et al.* (2011) apoya esta teoría, dado que los aislamientos de *A. hydrophila* cuyos genotipos incluyen genes de este grupo de toxinas, son más letales para *zebrafish* (*Danio rerio*) infectados experimentalmente.

Como se mencionó anteriormente, en distintas investigaciones se ha determinado la actividad biológica de los productos de transcripción de los genes de virulencia relevados en este estudio, ya sea mediante la infección experimental con cepas mutantes de *Aeromonas* spp. (*knock-out* para el gen de interés) o mediante el empleo de la proteína purificada (ya sea en cultivo celular o modelo animal). En todos los casos se ha demostrado que los factores de virulencia producidos provocan mortandades y/o efectos citotóxicos en distintas especies de animales (peces, ratones, nematodos) y líneas celulares (Metz, 2015).

La inducción experimental de SAM es una herramienta útil para relevar la virulencia de distintos aislamientos, evaluar factores predisponentes y desarrollar métodos de prevención de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2016). En la actualidad, la inyección intraperitoneal de bacterias vivas es el método más comúnmente empleado en el laboratorio para comparar la virulencia relativa de distintos aislamientos y la eficacia de los métodos profilácticos. Varios autores mencionan la efectividad y reproducibilidad de este método, aunque destacan a su vez, que es incongruente con el proceso natural de infección, el cual se da, por lo general por vía acuática (Hossain *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014)

Tres de los cuatro aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. empleados en la evaluación de virulencia fueron capaces de desarrollar un proceso patológico en los peces (H2, H11 y V2), apreciable no solo desde el punto de vista clínico e histopatológico, sino también en función de las mortandades registradas en comparación con el grupo control. En contraposición, un aislamiento de *Aeromonas veronii* (V6) no fue capaz de inducir mortandades, a pesar de que al análisis histopatológico de los peces infectados experimentalmente es posible apreciar algunas lesiones, a diferencia de lo observado en los animales no infectados.

En función de los valores de DL50 podríamos especular que los aislamientos de *Aeromonas hydrophila* fueron más virulentos que los de *A. veronii*, aunque debemos recordar que no se hallaron diferencias entre las DL50₉₆ calculadas para H11 y V2 (ver Tabla 24), por lo que cabe esperar que la dosis letal desarrollada por los aeromonadales esté en relación con el número de genes de virulencia que poseen y no con la especie de la que se trate.

En coincidencia con lo expresado anteriormente, Li *et al.* (2011), a partir de la caracterización patológica de 26 cepas de *Aeromonas hydrophila* con siete genotipos de virulencia diferentes, concluyen que la actividad citotóxica, proteolítica y patogenicidad animal (modelo *zebrafish*) está correlacionada con el número de genes de virulencia que poseen los aislamientos y no con el tipo de gen de que se trate, debido al efecto sinérgico sobre la virulencia que poseen las proteínas expresadas.

La comparación de DL50 entre distintas investigaciones puede arrojar resultados controvertidos, debido a que las diferencias en el diseño experimental (temperatura, especie de hospedero y vía de administración, entre otros) pueden alterar de manera considerable los resultados. A pesar de esto, Pridgeon y Klesius (2011) por ejemplo, catalogan a los aislamientos Alabama 2009 de *Aeromonas hydrophila* mencionados previamente (AL09-71, AL09-72 y AL09-73) como extremadamente virulentos, teniendo en cuenta que la DL50 calculada para los mismos ronda las $2,1 \times 10^5$ ufc/mL por vía IP en bagre de canal y es varias veces menor a las dosis letales obtenidas por otro autor en tilapia nilótica.

Li *et al.* (2011) por su parte, emplea el esquema presentado por Pu y colaboradores (2007), para establecer los rangos de virulencia expresados por los 26 aislamientos de *A. hydrophila* mencionados en párrafos anteriores. Según esta clasificación, se consideran virulentos aquellos aislamientos que poseen una DL50 entre las 10^3 y 10^5 ufc/mL y avirulentos aquellos aislamientos con dosis superiores a 10^6 ufc/mL.

Basados en los esquemas descritos anteriormente, los aislamientos nacionales deberían considerarse como no virulentos, aunque deben tenerse en cuenta las salvedades de interpretación hechas previamente.

Los hallazgos de histopatología que se observan en los animales infectados experimentalmente, dan cuenta de la extensión de un proceso infeccioso sistémico con características generales compatibles con SAM, lo que permite corroborar la efectividad de la técnica de infección experimental empleada.

Entre las lesiones más significativas del tejido branquial se destaca la separación del epitelio de las laminillas de las células pilares debido al edema, hallazgo que concuerda con el realizado por Ventura y Grizzle (1988) en bagres de canal infectados experimentalmente con *A. hydrophila*. La congestión observada al interior del filamento branquial responde al proceso hemodinámico generalizado descrito por varios autores en peces con SAM (Aoki, 1999; Austin y Austin, 2007; Rey *et al.*, 2009) y fue hallada a su vez por Grizzle y Kiryu (1993) en bagre de canal infectado experimentalmente.

La necrosis difusa observada en el tejido hepático, así como la congestión y dilatación de espacios portales, junto con la pérdida de arquitectura general ha sido observada en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas naturalmente con *Aeromonas hydrophila* (Noor El Deen *et al.*, 2014). La vacuolización de hepatocitos que presentan los peces infectados no ha sido descrita previamente en relación con la infección por *Aeromonas* spp. en peces, dicho hallazgo corresponde con una degeneración grasa, en este caso de tipo aguda y entre sus posibles causas se citan los procesos inflamatorios agudos, trastornos alimentarios, enfermedades carenciales e intoxicaciones (Roberts, R.; 2012).

Las alteraciones observadas en el tejido renal también son coincidentes con los hallazgos realizados por otros autores; hemorragia, edema y necrosis intersticial han sido descritas como hallazgos frecuentes en peces infectados experimentalmente con *A. hydrophila* (Miyazaki y Kaige, 1985; Azad *et al.*, 2001). Los depósitos hialinos en el citoplasma de las células tubulares pueden presentarse como consecuencia del proceso inflamatorio derivado de la infección (Roberts, R.; 2012) y fueron observados por Miyazaki y Kaige (1985) en caracisus como consecuencia de la infección experimental con *Aeromonas* móviles.

A pesar de que el diseño experimental empleado en la caracterización patológica no permite cuantificar las lesiones histopatológicas observadas tras la infección experimental con cada uno de los aislamientos, es posible apreciar en las imágenes que la extensión y severidad de las lesiones inducidas por el aislamiento V6 (*A. veronii*), son de menor gravedad que las desarrolladas por el resto de los aislamientos. De hecho, la patología desarrollada en *Australoheros facetus* por el aislamiento V6 fue compatible con la vida de los sujetos experimentales más allá del tiempo que duró la experiencia. En el tejido branquial se aprecia un número reducido de laminillas edematizadas y un flujo sanguíneo normal al interior del filamento branquial, en contraposición con lo observado para los otros aislamientos; el tejido renal, por su parte, si bien presenta notorias zonas edematizadas, no posee signos de lesión que permitan deducir compromiso futuro del órgano (necrosis, alteraciones del glomérulo, depósitos en túbulos) lo que hace sospechar la instalación de un proceso reversible. El hígado aparenta ser el órgano más afectado por este aislamiento, presentando lesiones similares a las observadas en el resto de los animales infectados experimentalmente, lo que podría deberse al efecto directo del inóculo sobre los órganos ubicados en la cavidad abdominal, más que a la alteración desarrollada por la bacteria o sus productos por vía sistémica.

7. CONCLUSIONES

- El empleo del *kit* API 20NE[®] para la identificación específica de aeromonadales móviles conduce a resultados erróneos al ser comparados con los obtenidos de la identificación molecular mediante secuenciación de los genes ARNr 16S y *gyrB*.

- Se han identificado tres nuevas especies de *Aeromonas* para nuestro país, a saber: *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas bestiarium* y *Aeromonas punctata*.

- La prevalencia por especie de los aeromonadales aislados de peces cultivados en nuestro país es:

- . *Aeromonas allosaccharophila*: 5,9%
- . *Aeromonas bestiarium*: 5,9%
- . *Aeromonas caviae/punctata*: 17,6%
- . *Aeromonas hydrophila*: 38,2%
- . *Aeromonas veronii*: 32,4%

- Todos los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. presentan resistencia a por lo menos tres de los diez antibióticos evaluados. Ampicilina (con y sin Dicloxacilina) y Penicilina son los antibióticos ante los cuales se identifican la mayor cantidad de aislamientos resistentes; mientras que no se encontraron aislamientos resistentes a los antibióticos Enrofloxacina y Nitrofurantoína.

- El 82,3% de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. poseen algún grado de multiresistencia y son originarios de ambientes con alta presión de selección por antibióticos (índice MAR: 0,28 a 0,71).

- Se identificaron diez genotipos de virulencia diferentes entre los aeromonadales nacionales. Dichos genotipos están correlacionados, por un lado con la especie de *Aeromonas* que lo posee y por otro lado con la actividad hemolítica que presentan los aislamientos relacionados.

- Los genotipos de virulencia más frecuentemente hallados entre los aeromonadales aislados de peces de cultivo en nuestro país son:

- . *act*⁺/*alt*⁺/*ast*⁺/*ela*⁺/*lip*⁺ (26,5%), aislamientos hemolíticos.
- . *act*⁻/*alt*⁻/*ast*⁻/*ela*⁺/*lip*⁺ (20,6%), aislamientos no hemolíticos.
- . *act*⁻/*alt*⁻/*ast*⁺/*ela*⁺/*lip*⁺ (14,7%), aislamientos hemolíticos.
- . *act*⁺/*alt*⁺/*ast*⁻/*ela*⁺/*lip*⁻ (11,8%), aislamientos no hemolíticos.

- Las técnicas de tipificación *rep*-PCR son una herramienta útil para conocer la diversidad global del genoma de los aeromonadales móviles, permitiendo determinar la existencia de aislamientos con alta y baja diversidad genética. El empleo de *primers* BOX fue el método de tipificación más efectivo, mientras que el mayor número de especies no tipificables se obtuvo a partir del empleo de *primers* REP.

- Los aislamientos de *Aeromonas caviae/punctata* poseen relaciones clonales entre sí, a diferencia de la elevada diversidad genética observada para el resto de los aislamientos para las técnicas de *rep*-PCR.

- *Australoheros facetus* es un modelo animal adecuado para la realización de ensayos de dosis letal con aeromonadales móviles, desarrollando una respuesta ante la infección experimental detectable mediante técnicas histológicas convencionales.

- La virulencia de los aislamientos de aeromonadales móviles es proporcional a la cantidad de genes de virulencia que poseen.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S.; Cheung, W.; Kroske-Bristom, S.; Malekzadeh, T. y Janda, M. 1992. Identification of *A. Strains* to the Genospecies Level in the Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(5):1262-1266.
- Abbott, S.; Cheung, W. & Janda, M. 2003. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(6):2348-2357.
- Aboubakr, M.; Abdelazem, A. y Abdellatif, A. 2014. Influence of *Aeromonas hydrophila* infection on the disposition kinetic of norfloxacin in *Goldfish (Carassius auratus auratus)*. *Journal of Forensic Toxicology & Pharmacology*. 3:1.
- Abulhamd, A. 2009. Characterization of *A. hydrophila* isolated from aquatic environments using phenotypic and genotyping methods. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 5(6): 923-931.
- Abulhamd, A. 2010. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic aeromonads. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 1(1):90-95.
- Agerso, Y.; Sichlau, M.; Dalsgaard, I y Laurits, J. 2007. The tetracycline resistance gene tet(E) is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms. *Aquaculture*. 266:47-52.
- Aguilera-Arreola, M.; Hernández-Rodríguez, C.; Zuñiga, G.; Figueras, M.; Castro-Escarpulli, G. 2005. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiology*. 242:231-240.
- Aguilera-Arreola, M.; Hernández-Rodríguez, C.; Zúñiga, G.; Figueras, M.; Garduño, R. y Castro-Escarpulli, G. 2007. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *A. veronii* and *A. hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: A comparative study. *Canadian Journal of Microbiology*. 53:877-887.
- Alcalde, E.; Blasco, M. y Esteve, C. 2010. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*. 161:40-45.
- Alperi, A.; Figueras, M.; Inza, I. y Martínez-Murcia, A. 2008. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *International Microbiology*. 11:185-194.
- Alperi, A.; Martínez-Murcia, A.; Monera, A.; Saavedra, M y Figueras, M. 2010a. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60:72-77.

- Alperi, A.; Martínez-Murcia, A.; Wen-Chien, K.; Monera, A.; Saavedra, M.; y Figueras, M. 2010b. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60:2048-2055.
- Altschul, S.; Madden, T.; Schäfer, A.; Zhang, J.; Miller, W. y Lipman, D. 1997. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Altwegg, M.; Steigerwalt, A.; Altwegg-Bissig, R.; Luthy-Hottenstein, J. y Brenner, D. 1990. Biochemical identification of *A. genospecies* isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(2):258-264.
- Amlacher, E. 1964. *Manual de enfermedades de los peces*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp:319.
- Ansari, M.; Rahimi, E. y Raissi, M. 2011. Antibiotic susceptibility and resistance of *Aeromonas* spp. isolated from fish. *African Journal of Microbiology Research*. 5(31):5772-5775.
- Aoki, T.; Egusa, S.; Yasuko, O. y Watanabe, T. 1971. Detection of resistance factors in fish pathogen *A. liquefaciens*. *Journal of General Microbiology*. 65:343-349.
- Aoki, T. 1999. Motile *Aeromonads* (*A. hydrophila*). In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by: Woo, P. y Bruno, D. CABI Publishing, New York, USA. pp:874.
- Austin, B. y Austin, D. 2007. *Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish*. Springerlink and Praxis Publishing eds., Chinchester, UK. pp:552.
- Azad, I.; Rajendran, K.; Rajan, J.; Kijayan, K. y Santiago, C. 2001. Virulence and histopathology of *Aeromonas hydrophila* (SAH 93) in experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (L.). *Journal of Aquaculture in the Tropics*. 16(3):265-275.
- Baez-Hidalgo, R.; Alperi, A.; Figueras, M y Romalde, J. 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*. 32:471-479.
- Baez-Hidalgo, R. y Figueras, M. 2012. Chapter 4: Molecular Detection and Characterization of Furunculosis and Other *A. Fish* Infections. In: *Health and Environment in Aquaculture*. Eds. Carvalho, E.; david, G. y Silva, R. Intech. pp:98-132.
- Baez-Hidalgo, R.; Martínez-Murcia, A. y Figueras, M. 2013. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Systematic and Applied Microbiology*. 36:171-176.

- Baez-Hidalgo, R.; Latif-Eugenín, F.; Hossain, M.; Berg, K.; Niemi, R.; Rapala, J.; Lyra, C.; Liles, M. y Figueras M. 2015. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. Systematic and Applied Microbiology. En prensa.
- Barcellos, L.; Kreutz, L.; Rodríguez, L.; dos Santos, L.; Motta, A.; Ritter, F.; Calliari, A. y da Silva, L. 2008. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscopicos das lesões e perfil de resistencia a antimicrobianos. Boletín del Instituto de Pesca de San Pablo. 34(3):355-363.
- Bauer, A.; Kirby, W. y Sherris, J. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45:493-496.
- Boijink, C. y Brandao, D. 2004. Avaliação da inoculação de suspensões bacterianas de *A. hydrophila*, em juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). Biodiversidade Pampeana, PUCRS, Uruguaiana. 2:3-8.
- Borrel, N.; Acinas, S.; Figueras, M. y Martínez-Murcia, A. 1997. Identification of *A. Clinical* Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. Journal of Clinical Microbiology. 35(7):1671-1674.
- Boulanger, Y.; Lallier, R. y Cousineau, G. 1977. Isolation of enterotoxigenic *A.* from fish. Canadian Journal of Microbiology. 23(9):1161-1164.
- Carnahan, Behram, S. y Joseph, S. 1991. Aerokey II: a flexible key for indentifying clinical *A.* species. Journal of Clinical Microbiology. 29(12):2843-2849.
- Carnevia, D.; Mazzoni, R.; Apolo, A.; Bellizi, M. ; Pesce, C. y Chavez, L. 2001. Bacteriosis por *Aeromonas* sp. en renacuajos de rana toro de dos criaderos comerciales. Actas del VII Congreso Nacional de Veterinaria , Montevideo.
- Carnevia, D.; Chaves, L. y Friss de Kereki, C. 2003. Caracterización de siete cepas de *A. hydrophila* (Bacteria, Aeromonadaceae) aisladas de peces tropicales ornamentales de Uruguay. Actas del III Congreso Virtual de Acuicultura:966-970.
- Carnevia, D. y Chavez, L. 2005. Resultados preliminares sobre bacterias aisladas de *Corydoras paleatus* (Pisces, Callichthyidae) comercializados como peces ornamentales en Uruguay. Actas de las VIII Jornadas Zoología Uruguay . pp:48.
- Carnevia, D.; Letamendia, M. y Perretta, A. 2009a. "Bacteriosis cutánea" en peces ornamentales asociada a mortalidad en criaderos de Montevideo. 1. Aspectos semiológicos y microbiológicos. Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras. 27:38-41.
- Carnevia, D.; Letamendia, M. y Perretta, A. 2009b. Podredumbre bacteriana de las aletas por *Aeromonas hydrophila/caviae*, en brótola, *Urophycis brasiliensis*

(PISCES: GADIFORMES: PHYCIDAE). Primer diagnóstico en Uruguay. Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras. 27:43-45.

- Carnevia, D.; Perretta, A.; Letamendia, M. y Delgado, G. 2009b. Manual de prevención de enfermedades en organismos acuáticos de cultivo. Montevideo, Ed. Oficina de Publicaciones de Facultad de Veterinaria. pp:62.

- Carnevia, D.; Letamendia, M.; Perretta, A. y Delgado, E. 2010. Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticada en peces ornamentales de Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 46(177-180):27-32.

- Carnevia, D.; Letamendia, M. y Perretta, A. 2013. Pathogenic Gram-negative bacteria isolated from ornamental fish in Uruguay: characterization and antibiotic resistance. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 33(6):181-186.

- Carvalho, M.; Martínez-Murcia, A.; Esteves, A.; Correia, A. y Saavedra, M. 2012. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. International Journal of Food and Microbiology. 159:230-239.

- Cascón, A.; Yugueros, J.; Temprano, A.; Sánchez, M.; Hernanz, C.; Luengo, M.J. y Naharro, G. 2000. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. Infection and Immunity. 6(6):3233-3241.

- Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Fernández-Rendón, N.; Aparicio, G.; Guarro, J. Y Chacón, M. 2003. Characterization of *A.* spp. Isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. International Journal of Food Microbiology. 84:41-49.

- Castilho, M.; Castro, T.; Araújo, V.; Trajano, R.; Santos, P.; Pimenta, P.; Lucheze, K.; Melo, J.; Gonçalves, A.; Nogueira, R.; Gracias de Luna, M. y Freitas-Almeida, A. 2009. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. Antonie van Leeuwenhoek. 96:53-61.

- Cattoir, V.; Poirel, L.; Aubert, C.; Soussy, C. y Nordman, P. 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. Emerging Infectious Diseases. 14(2):231-237.

- Chacón, M.; Soler, L.; Groisman, E.; Guarro, J. y Figueras, M. 2005. Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. Journal of Clinical Microbiology. 42(3):1285-1287.

- Chang, B y Bolton, S. 1987. Plasmids and Resistance to Antimicrobial Agents in *S* and *A. hydrophila* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 31(8):1281-1282.

- Chavez, L.; Carnevia, D. y Friss de Kereki, C. 2003. Identificación de bacterias que afectan peces ornamentales tropicales en Uruguay. Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras. 24:32.

- CHEA. 2006. Manejo de Animales de Experimentación Tradicionales y No Tradicionales. Publicaciones de la Oficina del Libro FEFMUR. pp:101.
- Chong, Y.; Nyung, K. y Lee, S. 1980. Cultural and biochemical characteristics of clinical isolates of *A. hydrophila*. *Jonsei Medical Journal*. 21(1):52-57.
- Cipriano, R.; Bullock, G. y Pyle, S. 1984. *A. hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. US Fish and Wildlife Publications. Fish Disease Leaflet 68. pp:23.
- Cipriano, R. 2001. *A. hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. US Fish and Wildlife Publications. Revisión of Fish Disease Leaflet 68. pp: 25.
- Clauss, T.; Dove, A. y Arnold, J. 2008. Hematological disorders of fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animals Practice*. 11:445-462.
- Cole, J.; Q. Wang, Q.; Fish, J.; Chai, B.; McGarrell, D.; Sun, Y.; Brown, C.; Porrás-Alfaro, A.; Kuske, C. y Tiedje, M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res*. 42:D633-D642.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2006. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated and Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. Document:M45-P. pp.53.
- Davin-Regli, A.; Bollet, C.; Chamorey, E.; Colonna D'Istria, V. y Cremieux, A. 1998.
- de Figueredo, J. y Plumb, J. 1977. Virulence of different isolates of *A. hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*. 11:349–354.
- del Río-Rodríguez, R. y Turnbull, J. 2002. Aerobic microflora of imported ornamental fish from Singapore and South America. Part 2: Antimicrobial Resistant Profiles of motile Aeromonads. *Fish Veterinary Journal*. 6:1-21.
- Dias, C.; Mota, V.; Martínez-Murcia, A. y Saavedra, M. 2012. Antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish. *Aquaculture Research & Development*. 3(3):1000131.
- Djoka, M; Harris, K. y Pace, N. 2000. Expanding the know diversity and environmental distribution of an uncultured division of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4):1617-1621.
- Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. 1988. Patología en Acuicultura. Manual del Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. Industrias Gráficas Espana S.L. Madrid, España. pp:550.
- Evangelista-Barretto, S.; Vieira, R.; Carvalho, T.; Torres, R.; Sant'anna, E.; Rodrigues, D. y Reis, C. 2006. *Aeromonas* spp. isolated from oysters from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 48(3):129-133.

- Evangelista-Barreto, S.; Carvalho, T.; Vieira, R.; Moura, C.; Macrae, A. y Rodrigues, D. 2010. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:452-460.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*.39:783-791.
- Fernandez, M.; Giampaolo, B.; Ibañez, S.; Guagliardo, M.; Esnaola, M.; Conca, L.; Valdivia, P.; Stagnaro, S.; Chiale, C. y Frade, H. 2000. *Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentine. *Genetica*. 108:35-40.
- Ferrando, V.; Pereira, C. y Bentancur, V. 2011. Caso clínico: infección causada por *Aeromonas* spp. Actas de la "V Jornada sobre Tartarugas Marinhas do Atlantico Sul Ocidental". 27 y 28 de noviembre de 2011. Florianópolis, Brasil. pp:95.
- Figueras, M. 2005. Clinical relevance of A.. *Rev Med Microbiol*. 16:145–153.
- Figueras, M.; Alperi, A.; Beaz-Hidalgo, R.; Stackebrandt, E.; Brambilla, E.; Monera, A. y Martínez-Murcia, A. 2011. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61:242-248.
- Figueira, V.; Vaz-Moreira, I.; Silva, M. y Manaia, C. 2011. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Research*. 45:5599-5611.
- Fosse, T.; Giraud-Morin, C. y Madinier, I. 2003. Phénotypes de résistance aux - lactamines dans le genre *Aeromonas*. *Pathologie Biologie (Paris)*. 51:290–296.
- Fracchia de Salvay, Y. 1986. *Aeromonas hydrophila* in waters of Lake San Roque and its tributaries. *Revista Argentina de Microbiología*. 18(3-4):121-126.
- Gashgari, R. y Selim, S. 2015. Detection and characterization of antimicrobial resistance and putative virulence genes in *Aeromonas veronii* biovarsobriaisolated from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Foodborne Pathogens and Disease*. DOI: 10.1089/fpd.2015.1976.
- Gonzalez-Kanter, E. 2002. Descripción de la furunculosis producida por *A. salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie *salmonicida* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Patología Animal. pp:44.
- Grave, K.; Engelstad, M.; Soli, N. y Hastein, T. 1990. Utilization of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during 1980-1988. *Aquaculture*. 86:347-358.
- Grizzle, J. y Kiryu, Y. 1993. Histopathology of gill, liver, and pancreas, and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex.

Journal of Aquatic Animal Health. 5(1):36-50.

- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

- Harf-Monteil, C; Le Fleche, A.; Riegel, P.; Prévost, G.; Bermond, D.; Grimont, P. y Monteil, H. 2004. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54:481-485.

- Hatha, M.; Vivekanandhan, A.; Joice, J y Christol. 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. International Journal of Food Microbiology. 98:131-134.

- Heuzenroeder, M; Wong, C. y Flower, R. 1999. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. FEMS Microbiology Letters. 174:131-136.

- Hossain, M.; Waldbieser, G.; Sun, D.; Capps, N.; Hemstreet, W.; Carlisle, K.; Griffin, M.; Khoo, L.; Goodwin, A.; Sonstegard, T.; Schroeder, S.; Hayden, K.; Newton, J.; Terhune, J. y Liles, M. 2013. Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. PLOSone. 8(11):e80943. doi:10.1371/journal.pone.0080943.

- Hossain, M.; Sun, D.; McGarey, D.; Wrenn, S.; Alexander, L.; Martino, M.; Xing, Y.; Terhune, J. y Liles, M. 2014. An asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish. mBio. 5(3):e00848-14. doi:10.1128/mBio.00848-14.

- Igbinosa, I.; Chigor, H.; Igbinosa, V.; Obi, E. y Okoh, A. 2013. Antibiogram, adhesive characteristics, and incidence of class 1 integron in *Aeromonas* species isolated from two South African rivers. BioMed research international. ID 127570.

- Jagoda, S; Wijewardana, T.; Arulkanthan, A.; Igarashi, I.; Tan, E.; Kinoshita, S.; Watabe, S. y Asakawa, S. 2014. Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicemia. Diseases of Aquatic Organisms. 109:127-137.

- Janda, M.; Bottone, E.; Skinner, C. y Calcaterra, D. 1983. Phenotypic Markers Associated with Gastrointestinal *A. hydrophila* Isolates from Symptomatic Children. Journal of Microbiology. 17(4):588-591.

- Janda, M.; Reitano, M. y Bottone, E. 1984. Biotyping of *A.* Isolates as a Correlate to Delineating a Species-Associated Disease Spectrum. Journal of Clinical Microbiology. 19(1):44-47.

- Janda, M. y Duffey, P. 1988. Mesophilic aeromonads in human disease; current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. Rev. Infect. Dis. 10:980-997.

- Janda, M.; Abbott, S.; Khashe, S.; Kellog, G. y Shimada, T. 1996. Further Studies

on Biochemical Characteristics and Serologic Properties of the Genus *A.* Journal of Clinical Microbiology. 34(8):1930-1933.

- Janda, M. y Abbott, S. 1998. Evolving concepts regarding the genus *A.*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clinical Infectious Diseases. 27:332-344.

- Janda, M. y Abbott, S. 2010. The Genus *A.*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clinical Microbiology Reviews. 23(1):35-73.

- Johny, M y Subashkumar, R. 2014. Phenotypic and genotypic discrimination of multifactorial virulent *Aeromonas hydrophila* in clinical and environmental samples. European Journal of Academic Essays. 1(8):10-14.

- Jolley, K. y Maiden, M. 2010. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics. 11:595 (3-11).

- Joseph, S. y Carnahan, A. 1994. The isolation, identification and systematics of the motile *A.* species. Annual Review of Fish Diseases. 4:315-343.

- Jovanovic, B; Whitley, E.; Kimura, K.; Crumpton, A. y Palic, D. 2015. Titanium dioxide nanoparticles enhance mortality of fish exposed to bacterial pathogens. Environmental Pollution. 203:153-164.

- Kane, A.; Baya, A.; Reimschuessel, R.; St Pé, K.; Poukish, C. y Driscoll, C. 1999. Field Sampling and necropsy examination of fish. Virginia Journal Of Science. 50(4):345-364.

- Kaskhedikar, M y Chhabra, D. 2010. Multidrug resistance in *A. hydrophila* isolates of fish. Veterinary World. 3(2):76-77.

- Keim, A. 1982. Manual de métodos parasitológicos e histopatológicos en piscicultura. Instituto Nacional de Pesca, Informe técnico N° 31. pp. 49.

- Khor, W.; Puah, S.; Tan, J.; Puthuchery, S. y Chua, K. 2016. Phenotypic and genetic diversity of *Aeromonas* species isolated from fresh water lakes in Malaysia. PLOSone. DOI:10.1371/journal.pone.0145933.

- Kingdome, C.; Huys, G.; Tonolla, M.; Albert, M.; Swings, J.; Peduzzi, R. y Jemmi, T. 1999. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. Applied and Environmental Microbiology. 65(12):5293-5302.

- Korbsrisate, S.; Dumnin, S.; Chawengkirtikul, R.; Gherunpong, V.; Eampokalap, B.; Gongviseisong, C.; Janyapoon, K.; Lertpocasombat, K. y Shimada, T. 2002. Distribution of *A. hydrophila* serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination. Microbiology and Immunology. 46:875-879.

- Korzekwa, K.; Golas, I. y Harnisz, M. 2012. Evaluation of antropogenic pollution in river water based on the genetic diversity of *Aeromonas hydrophila*. Archives of Environmental Pollution. 28(3):41-50.

- Kozinska, A.; Figueras, M.; Chacon, M y Soler, L. 2002. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*. 93:1034-1041.
- Khün, I.; Albert, M.; Ansaruzzaman, M.; Bhuiyan, N.; Alabi, S.; Sirajul, M.; Neogi, P.; Huys, G.; Janssen, P.; Kersters, K. y Möllby, R. 1997. Characterization of *Aeromonas* spp. Isolated from Humans with Diarrhea, from Healthy Controls, and from Surface Water in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(2):369-373.
- Kuifper, E.; Steigerwalt, A.; Schoenmakers, B.; Peeters, M.; Zanen, H. y Brennen, D. 1986. Phenotypic Characterization and DNA Relatedness in Human Fecal Isolates of *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 27(1):132-138.
- Krumperman, P. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(1):165-170.
- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Eds. Stackebrandt & M. Goodfellow: New York: Wiley p. 115-175.
- Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.; Gibson, T. y Higgins, D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Leblanc, D.; Mittal, K.; Olivier, G. y Lallier, R. 1981. Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated of moribund and healthy fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 42(1):56-60.
- Letamendía, M. y Carnevia, D. 2007. Bacterias gram negativas halladas en peces ornamentales de la familia Poeciliidae en Montevideo y Costa de Oro, Uruguay. *Actas de las V Jornadas Técnicas Veterinaria*.
- Letamendia, M, Perretta, A. y Carnevia, D. 2009. Análisis de casos de “podredumbre bacteriana de las aletas” (*fin rot*) en peces ornamentales de Uruguay. *Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras*. 27:57-60.
- Letamendía, M.; Carnevia, D.; Perretta, A. y Delgado, E. 2009. Detección del género *Aeromonas* (Bacteria, Aeromonadaceae) en organismos acuáticos de interés comercial en Uruguay. *Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras*. 27:42.
- Li, J.; Ni, X.; Liu, Y. y Lu, C. 2011. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerAin* *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*. 110:823-830.
- Marti, E. y Balcazar, J. 2015. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. *Journal of Basic Microbiology*. 55:1-5.
- Martin-Carnahan, A. y Joseph, S. 2005. Order XII. Aeromonadales ord. nov. In

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, p. 556. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York:Springer.

- Martínez-Murcia, A.; Benlloch, S. & Collins, M. 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *A.* and *Plesiomonas* as determined by 16s ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42(3):412-421.
- Martínez-Murcia, A.; Borrell, N. y Figueras, M. 2000. Typing of clinical and environmental *Aeromonas veronii* strains based on the 16S-23S rDNA spacers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 28:225-232.
- Martínez-Murcia, A.; Figueras, M.; Saavedra, M. y Stackebrandt, E. 2007. The recently proposed species *A. sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *A.*. *Int Microbiol*. 10:61–64.
- Martínez-Murcia, A.; Saavedra, M.; Mota, V.; Maier, T.; Stackebrandt, E. y Cousin, S. 2008. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(5):1169–1175.
- Martínez-Murcia, A.; Beaz-Hidalgo, R.; Svec, P.; Saavedra, M.; Figueras, M. y Sedlacek, I. 2010. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr Microbiol*. 66:197-204.
- Martínez-Murcia, A.; Morena, A.; Saavedra, M.; Ocina, R.; López-Álvarez, M.; Lara, E. y Figueras, M. 2011. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and Applied Microbiology*. 34:189-199.
- Mendes-Marques, C.; de Nascimento, L.; Theophilo, N.; Hofer, E.; de Melo Neto, O. y Leal, N. 2012. Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during a diarrhea outbreak. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 54(6):299-304.
- Merino, S.; Aguilar, A.; Nogueras, M.M.; Regué, M.; Swift, S. y Tomás, J.M. 1999. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infection and Immunity*. 67(8):4008–4013.
- Messner P. y Sleytr U. 1992. Crystalline bacterial cell-surface layers. *Advances in Microbial Physiology*. 33:213-275.
- Metz, J. 2015. Delineation of *Aeromonas hydrophila* pathotypes by detection of putative virulence factors using polymerase chain reaction and nematode challenge assay. Master of Science in Integrative Biology Theses. Paper 7.
- Miñana-Galbis, D.; Farfán, M.; Fusté, C. y Lorén, G. 2004. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:2073-2078.

- Miñana-Galbis, D.; Farfán, M.; Fusté, C. y Lorén, G. 2007. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57:582-587.
- Miñana-Galbis, D.; Farfán, M.; Lorén, G. y Fusté, C. 2007. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Systematic and Applied Microbiology*. 33:15-19.
- Miranda, C.; Kehrenberg, D.; Ulep, C.; Schwarz, C. y Roberts, M. (2003). Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47:883-888.
- Miranda, C.; Tello, A. y Keen, P. 2013. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. *Frontiers in Microbiology*. 4:1-6.
- Mittal, K.; Lalonde, G.; Leblanc, D.; Olivier, G. y Lallier, R. 1980. *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface characteristics. *Canadian Journal of Microbiology*. 26:1501-1503.
- Miyata, M.; Aoki, T.; Inglis, V.; Yoshida, T. y Endo, M. 1995. RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Bacteriology*. 79:181-185.
- Miyazaki, T. y Kaige, N. 1985. A histopathological study on motile aeromonad disease in crucian carp. *Fish Pathology*. 21(3):181-185.
- Miyazaki, T. y Yasuhiko, J. 1985. A histopathological study on motile aeromonad disease in Ayu. *Fish Pathology*. 20(1):55-59.
- Mores, V.; Timo, S.; Heidtmann, S.; Pimenta, F.; Carvalho, R.; Midori, D. y Pedroso, M. 1998. *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp.): virulence factors and drug susceptibility. *Rev. Microbiol.* 29(3):
- Moro, R.; Niederauer, R.; Salet, R. y Paiva, M. Bacteriocin-like substance of *Aeromonas hydrophila*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 92(1):115-116.
- Mota, M.; Gadea, M.; González, S.; González, G.; Pardo, L.; Rivas, M.; Algorta, G.; Schelotto, F. y Varela, G. 2010. Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. *Revista Argentina de Microbiología*. 42:114-117.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1997. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests: Approved Standards NCCLS Document M2-A6. Villanova, PA, USA. pp:131.
- Negrete, P.; Jarero, J. y Fiegueroa, J. 2004. Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en: *A. hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*. *Veterinaria México*. 35(1):1-10.
- Nielsen, M.; Hoi, L.; Schmidt, A.; Qian, D.; Shimada, T.; Shen, J. y Larsen, J. 2001. Is *A. hydrophila* the dominant motile *A.* species that causes disease outbreaks

in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? Diseases of Aquatic Organisms. 46:23-29.

- Noga, E. 1996. Fish Diseases, diagnosis and treatment. Iowa, Ed. Mosby-Year Book, Inc. USA. pp.367.

- Noor El Deen, A.; Dorgham, S.; Hassan, A. y Hakim, A. 2014. Studies on *Aeromonas hydrophila* in cultured *Oreochromis niloticus* at Kafr El Sheikh Governorate, Egypt with reference to histopathological alterations in some vital organs. World Journal of Fish and Marine Sciences. 6(3):233-240.

- O'hlcı, B.; Olivier, G. y Powell, R. 2000. Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gelelectrophoresis analyses. Diseases of Aquatic Organisms. 39:109-119.

- Oliveira, S.; Veneroni-Gouveia, G. y Costa, M. 2012. Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 32(8):701-706.

- Ormen, O.; Granum, P.; Lassen, E. y Figueras, M. 2005. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *A. spp.* APMIS. 113:203–207.

- Pablos, M.; Remacha, M.; Rodríguez-Calleja, J.; Santos, J.; Otero, A. y Garcia-Lopez, M. 2010. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases. 29:1163–1172.

- Pang, M.; Jiang, J.; Xie, X.; Wu, Y.; Dong, Y.; Kwok, A.; Zhang, W.; Yao, H.; Lu, C.; Leung, F. y Liu, Y. 2015. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. Scientific Report. 5:9833. doi: 10.1038/srep09833.

- Park, T.; Lee, S.; Lee, E.; Park, T.; Figueras, M. y Chang, C. 2003. Misidentification of *A. veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. Letters of Applied Microbiology. 37:349-353.

- Parodi, G y Preso, O. 1983. Study of *Aeromonas* (motile) in the sewage from the city of Buenos Aires and water from the Río de la Plata. Revista Argentina de Microbiología. 15(1):33-39.

- Pavan, M.; Abbott, S.; Zorzópulos, J. y Janda, J. 2000. *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. Int J Syst Evol Microbiol. 50(3):1119-1124.

- Peng, G.; Na, W.; Yong-jie, L. y Cheng-ping, L. 2013. Antimicrobial susceptibility and characterization of outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* isolated in China. Veterinary Medicine. 40:16-19.

- Pereira, C.; Possas, C.; Viana, C. y Rodríguez, D. 2004. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* aisladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24(4):562-566.
- Perretta, A. 2015. Evaluación de Australoheros (Cichlasoma) facetus (Pisces:Cichlidae) como modelo para el estudio de la septicemia por *Aeromonas* móviles. Actas de la V Conferencia Latinoamericana sobre el Cultivo de Peces Nativos y IV Congreso Nacional de Acuicultura. Lima, Perú 12 al 16 de octubre de 2015. pp.:130.
- Perretta, A.; Letamendia, M.; Carnevia, D. y Conijesky, D. 2009a. Primera experiencia de infección experimental de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) con *Streptococcus dysgalactiae*. Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras. 27:29-33.
- Perretta, A.; Letamendia, M. y Carnevia, D. 2009b. Infección experimental de peces ornamentales con *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*. Primer ensayo. Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras. 27:49-51.
- Perretta, A.; Carnevia, D. y Conijeski, D. 2007. Identificación de bacterias del género *Aeromonas* aisladas de episodios de mortalidad en esturión siberiano (*Acipenser baerii*) cultivado en Uruguay. Actas de las V Jornadas Técnicas Veterinaria.
- Picao, R.; Poirel, L.; Demarta, A.; Ferreira, C.; Corvaglia, A.; Petrini, O y Nordmann, P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 62:948-950.
- Plumb, J. y Hanson, L. 2011. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Third Edition. Wiley-Blackwell eds. New Delhi, India. pp:492.
- Poobalane, S. 2007. *A. hydrophila* vaccine development using immunoproteomics. Doctoral Thesis. Institute of Aquaculture. University of Stirling. pp:202.
- Poole, T.; Callaway, T.; Bischoff, K.; Warnes, C. y Nisbet, D. 2006. Macrolide inactivation gene cluster *mphA-mrx-mphR* adjacent to a class 1 integron in *Aeromonas hydrophila* isolated from a diarrhoeic pig in Oklahoma. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 57:31-38.
- Popoff, M. y Veron, M. 1976. A taxonomy study of the *A. hydrophila* - *A. punctata* group. Journal of General Microbiology. 94:11-22.
- Popoff, M.; Coynault, C.; Kiredjian, M. y Lemelin, M. 1981. Polynucleotide sequence relatedness among motile *A.* species. Current Microbiology. 5:109-114.
- Pu, J.; Huang, X. y Lu, C.; 2007. Virulence detection of *Streptococcus suis* Type 2 in Zebrafish. Scientia Agricultura Sinica. 40:2655-2658.

- Pupo, G.; Karaolis, D.; Lan, R. y Reeves, P. 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infection and Immunity*. 65(7):2685-2692.
- Radu, S.; Ahmad, N.; Ling, F y Reezal, A. 2003. Prevalence and resistance to antibiotics for *A.* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*. 81:261-266.
- Rahim, Z.; Sanyal, S.; Aziz, K.; Huq, M. y Chowdhury, A. 1984. Isolation of Enterotoxigenic, Hemolytic, and Antibiotic-Resistant *A. hydrophila* Strains from Infected Fish in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*. 48(4):865-867.
- Razzolini, M.; Risso, W.; Martone-Rocha, S.; Duarte, H. y Alves, R. 2010. *Aeromonas* presence in drinking water from collective reservoirs and wells in periurban area in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:694-699.
- Rhodes, G.; Huys, G.; Swing, J.; McGann, P.; Hiney, M.; Smith, P. y Pickup, R. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant TetA. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9):3883-3890.
- Roberts, R. 2012. *Fish Pathology* 4th edition. Edited by: Ronald J. Roberts. Willey-Blackwell, United Kingdom. 588pp.
- Rodriguez, I.; Novoa, B. y Figueras, A. 2008. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 25:239-249.
- Ruimy, R.; Breittmayer, V.; Elbaze, P.; Lafay, B.; Boussemart, O.; Gauthier, M. & R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *A.*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44:416-426.
- Saha, p. y Chakrabarti, T. 2006. *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:1905-1909.
- Sahi, N.; Mallik, S.; Sahoo, M. y Das, P. 2009. Characteristics and pathogenicity of a virulent *Aeromonas hydrophila* associated with ulcerative syndrome in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*. 65:1-10.
- Sánchez-Céspedes, J.; Blasco, M; Marti, S.; Alcalde, E. y Vila, J. 2008. Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(8):2990-2991.

- Sandegren, L.; Lindqvist, A.; Kahlmeter, G. y Andersson, D. 2008. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62:495–503.
- Sakazaki, R. y Shimada, T. 1984. O-serogrouping scheme for mesophilic *A.* strains. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 37:247–255.
- Sarkar, M. y Rashid, M. 2012. Pathogenicity of the bacterial isolate *Aeromonas hydrophila* to catfishes, carps and perch. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 10(1):157–161.
- Schmidt, A.; Bruun, M.; Dalsgaard, I. y Larsen, J. 2001. Incidence, Distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12):5675-5682.
- Schubert, R y Hegazi, M. 1988. *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*. 268(1):34-39.
- Scoaris, D.; Bizerra, F.; Yamada-Ogatta, S.; Alves, B.; Ueda-Nakamura, T.; Vataru, C. Prado, B. 2008. The Occurrence of *Aeromonas* spp. in the bottled mineral water, well water and Tap water from the municipal supplies. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51(5):1049-1055.
- Sen, K. y Rodgers, M. 2004. Distribution of six virulence factors in *A.* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*. 97:1077-1086.
- Senderovich, Y.; Ken-Dror, S.; Vainblat, I.; Blau, D.; Izhaki, I. y Halpern, M. 2012. A molecular study on the prevalence and virulence potential of suffering from diarrhea in Israel. *PlosOne*. 7(2):e30070.
- Sha, J.; Kozlova, E. y Chopra, K. 2002. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infection and Immunity*. 70(2):1924-1935.
- Shao-wu, L.; Di, W.; Hong-bai, L. y Tong-yan, L. 2013. Molecular typing of *Aeromonas hydrophila* isolated from common carp in northeast China. *Journal of Northeast Agricultural University*. 20(1):30-36.
- Shaw, D. Y Hodder, H. 1978. Lipopolysaccharides of the motile aeromonads, core oligosaccharide analyses as an aid to taxonomic classification. *Canadian Journal of Microbiology*. 24:864-868.
- Singh, V.; Chaudhary, D.; Mani, I.; Somvanshi, P.; Rathore, G. y Sood, N. 2010. Genotyping of *Aeromonas hydrophila* by BOX elements. *МИКРОБИОЛОГИЯ*. 79(3):390–393.

- Smith, P.; Hiney, M. y Samuelsen, O. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*. 4:273-313.
- Sneath, P. 2005. Numerical Taxonomy. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume 2: The Proteobacteria. Part A: Introductory Essays. Brenner, D.; Krieg, N. y Staley, J. Eds. Springer. pp:39-42.
- Soler, L.; Marco, F.; Vila, J.; Chacon, M.; Guarro, R. y Figueras, M. 2003. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *A. spp.* *Journal of Clinical Microbiology*. 41:5732-5734.
- Soler, L.; Figueras, M.; Chacón, M.; Guarro, J. y Martínez-Murcia, A. 2003b. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 00:341-349.
- Soler, L.; Yáñez, M.; Chacón, M.; Aguilera-Arreola, M.; Catalán, V.; Figueras, M y Martínez-Murcia, A. 2004. Phylogenetic analysis of the genus *A.* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:1511-1519.
- Song, T.; Toma, C.; Nakasone, N. y Iwanaga, M. 2004. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *Journal of Medical Microbiology*. 53:477-482.
- Sneath, P. y Sokal R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Ed: Freeman, San Francisco, USA.
- Stackebrandt, E.; Frederiksen, W.; Garrity, G.; Grimont, P.; Kämpfer, P.; Maiden, M.; Nesme, X.; Rossello-Mora, R.; Swings, J.; Trüper, H.; Vauterin, L.; Ward, A. y Whitman, W. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:1043-1047.
- Stojanov, I.; Plavska, N.; Stojanovic, D.; Ratajac, R.; Radulovic, J.; Pusic, I. y Kapetanov, M. 2010. Susceptibility of *A. hydrophila* isolates to antimicrobial drugs. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara*. XLIII(1):132-136.
- Suhet, M.; Schocken-Iturrino, R. y Amaral, L. 2011. Atividade hemolitica e resistencia a antimicrobianos por especies de *A.* isoladas de criação intensiva de tilapias do nilo (*Oreochromis niloticus*). *ARS Veterinaria, Jaboticabal*. 27(1):36-44.
- Szczuka, E. y Kaznowski, A. 2004. Typing of Clinical and Environmental *A. sp.* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(1):220-228.

- Tacao, M.; Alves, A.; Saavedra, M. y Correia, A. 2005. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*. 88:173–179.
- Tamura K., Nei M. y Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*.101:11030-11035.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. y Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Tanaka, K.; Frenette, M. y Charette, S. 2013. IS-mediated loss of virulence by *Aeromonas salmonicida*. A tangible piece of an evolutionary puzzle. *Mobile Genetic Elements*. 3(1):1-4.
- Teruskin, I.; do Carmo, M.; Januzzi, D.; Gripp, I.; Correa, A. y Soares, S. 2007. The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. 102(7):861-866.
- Trust, T.; Bull, L.; Currie, B. y Buckley, J. 1974. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 36:1174-1179.
- Uruguay. 2008. Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura. Estrategia general para el desarrollo de la acuicultura sostenible en la República Oriental del Uruguay / Uruguay. Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura. Montevideo: DINARA – FAO. pp:40.
- Vazquez-Piñeros, M.; Rondón-Barragan, I.; Restrepo-Bentancur, I. y Eslava-Mocha, P. 2010. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *A. hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. *Orinoquia*. 14(1):33-44.
- Ventura, M. y Grizzle, J. 1988. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*. 11:397-407.
- Verner-Jeffreys, D; Welch, T.; Schwarz, T.; Pond, M.; Woodward, M.; Haig, S.; Rimmer, G.; Roberts, E.; Morrison, V. y Baker-Austin, C. 2009. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PlosOne*. 4(12):e3838.
- Vila, J; Marcos, M. y Jiménez de Anta, M. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *Journal of medical Microbiology*. 44:482-489.
- Vipond, R.; Brocknell, I.; Durant, E.; Bowden, T.; Ellis, A.; Smith, M. y MacIntyre. 1998. Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not

essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infection and Immunity*. 66(5):1990-1998.

- Yáñez, M.; Catalán, V.; Apraiz, D.; Figueras, M. y Martínez-Murcia, A. 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *A.* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:875-883.

- Yi, S.; Kim, D.; You, M.; Kim, B.; Kim, W. y Shin, G. 2014. Antibiotic and heavy-metal resistance in motile *Aeromonas* strains isolated from fish. *African Journal of Microbiology Research*. 8(17):1793-1797.

- Yu, H., Srinivasa, P.; Lee, H.; Vilches, S.; Merino, S.; Tomas, J. y Leung, K. 2004. A Type III Secretion System Is Required for *A. hydrophila* AH-1 Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 72(3):1248-1256.

- Zhang, D.; Pridgeon, J. y Klesius, P. 2014. Vaccination of channel catfish with extracellular products of *Aeromonas hydrophila* provides protection against infection by the pathogen. *Fish & Shellfish Immunology*. 36:270-275.

- Zhang, D.; Xu, D. y Shoemaker, C. 2016. Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports*. 3:18–23.

Anexo 1

1. Composición del medio de cultivo: "**BBL™ Trypticase™ soyagar (Soybean-Casein Digest Agar)**". Becton, Dickinson and Company Laboratories, n° catalogo: L007418

Fórmula aproximada para un litro de agua purificada:

- digerido pancreático de caseína: 15,0 g.
- digerido papaínico de soja: 5,0 g.
- cloruro de sodio: 5,0 g.
- agar: 15,0 g.

2. Composición del medio de cultivo: "**Muller-Hinton II**". Becton, Dickinson and Company Laboratories, n° catalogo: L007393.

Fórmula aproximada para un litro de agua purificada:

- extracto de carne: 2,0 g.
- hidrolizado ácido de caseína: 17,5 g.
- almidón: 1,5 g.
- agar: 17,0 g.

3. Composición del medio de cultivo: "**LB Broth, Miller (Luria-Bertani)**". Amresco®, n° catalogo: J106.

Fórmula aproximada para un litro de agua purificada:

- Bacto triptona: 10,0 g.
- Extracto de levadura: 5,0 g.
- Cloruro de sodio: 10,0 g.

Anexo 2

- "DNEasy Blood and Tissue" de Qiagen®

Protocolo de extracción de ADN para cultivos celulares:

- 1- centrifuge un máximo de 5×10^6 células por 5 minutos a 190 rpm. Resuspender in 200 μ L de PBS. Adicionar 20 μ l de proteinasa K.
- 2- Adicionar 200 μ L de buffer AL. Mezclar en vortex. Incubar 10 min a 56°C.
- 3- Agregar 200 μ L de etanol. Mezclar en vortex.
- 4- Pasar la mezcla a una columna "DNeasy Mini spin" introducida en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Descartar el líquido eludido y el tubo colector.
- 5- Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL. Agregar 500 μ L de buffer AW1. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el líquido eludido y el tubo colector.
- 6- Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL. Agregar 500 μ L de buffer AW2. Centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm. Descartar el líquido eludido y el tubo colector.
- 7- Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.
- 8- Eludir el ADN agregando 200 μ L de buffer AE en el centro de la membrana de la columna. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.

- Solución fijadora de Davidson (fórmula OIE para organismos acuáticos)

- . 330 mL de alcohol 95°
- . 220 mL de formalina 100%
- . 115 mL de acido acético glacial
- . 335 mL de agua corriente

Anexo 3

A continuación se presentan los perfiles de identificación molecular de los aislamientos de *Aeromonas* spp. empleados en este estudio. Los mismos fueron obtenidos a partir de la comparación de las secuencias de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARNr y la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*) de los aislamientos nacionales, con las depositadas en la base de datos de *GenBank*, para lo cual se empleó la herramienta BLASTn. Se presentan los primeros diez resultados de alineación significativa arrojados por el algoritmo. La identificación definitiva de cada especie se llevo a cabo comparando los resultados obtenidos para cada uno de los genes *housekeeping* secuenciados. Se tomó como criterio para la asignación de especies, la coincidencia en el taxón indicado por ambos genes con un nivel de identidad igual o superior al 98%.

Aislamiento A1: *Aeromonas allosaccharophila*

ARNr 16S_A1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone OTU-9-ABB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2586	2586	99%	0.0	99%	JQ624317.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain CECT 4199 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2586	2586	99%	0.0	99%	NR_025945.2
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain CPT207 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2586	2586	99%	0.0	99%	FJ940841.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain QL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	99%	0.0	99%	KC130967.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JNC912 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	99%	0.0	99%	GU205192.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain PIC2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	99%	0.0	99%	GQ359956.1
Uncultured bacterium clone MC1_16S_87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	99%	0.0	99%	EU662656.1
Uncultured bacterium clone MC1_16S_14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	99%	0.0	99%	EU662584.1
Uncultured bacterium clone Niu12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	98%	0.0	99%	EU862312.1
<i>Aeromonas</i> sp. 'CDC 715-84' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	98%	0.0	99%	U88658.1

*gyrB*_A1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain CPT207 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	699	699	40%	0.0	95%	FJ940790.1
<i>Aeromonas</i> sp. MM.2.10 DNA gyrase subunit beta-like (<i>gyrB</i>) gene, partial sequence	693	693	40%	0.0	95%	GQ471026.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain MDC561 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	691	691	40%	0.0	95%	DQ411471.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain MDC2276 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	688	688	40%	0.0	94%	HQ701898.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain MDC2126 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	688	688	40%	0.0	94%	HQ701884.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain MDC2124 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	688	688	40%	0.0	94%	HQ701883.1
<i>Aeromonas</i> sp. MM.2.5 DNA gyrase	688	688	40%	0.0	94%	GQ471022.1

subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds							
<i>Aeromonas</i> sp. KC9 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	688	688	40%	0.0	94%	AB473132.1	
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain ER.1.4 <i>GyrB</i> (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	688	688	40%	0.0	94%	FJ238491.1	
<i>Aeromonas sobria</i> strain S8 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	682	682	40%	0.0	94%	KT036667.1	

Aislamiento A2: *Aeromonas allosaccharophila*

ARNr 16S_A2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain QL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	99%	KC130967.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JNC912 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	99%	GU205192.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain PIC2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	99%	GQ359956.1
Uncultured bacterium clone MC1_16S_87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	99%	EU662656.1
Uncultured bacterium clone MC1_16S_14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	99%	EU662584.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JNC612 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2606	2606	100%	0.0	99%	GU722154.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JA07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2606	2606	100%	0.0	99%	GU205199.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain K_G_AN-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2601	2601	99%	0.0	99%	KJ186908.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain MHK10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2601	2601	99%	0.0	99%	KC884670.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain S5-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	99%	0.0	99%	KC202275.1

*gyrB*_A2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas sobria</i> strain S8 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1805	1805	100%	0.0	99%	KT036667.1
<i>Aeromonas sobria</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: 14 H 26	1805	1805	100%	0.0	99%	AB473155.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain CPT207 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1805	1805	100%	0.0	99%	FJ940790.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain MDC561 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1796	1796	99%	0.0	99%	DQ411471.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: 14 H 24	1794	1794	100%	0.0	99%	AB473153.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JNC902 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1788	1788	100%	0.0	99%	GU205204.1
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JNC612 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1788	1788	100%	0.0	99%	GU205203.1
<i>Aeromonas sobria</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: JCM 2145	1788	1788	100%	0.0	99%	AB473088.1

<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JNC912 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1783	1783	100%	0.0	99%	GU205205.1
<i>Aeromonas</i> sp. KC9 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1783	1783	100%	0.0	99%	AB473132.1

Aislamiento B1: *Aeromonas bestiarum*

ARNr 16S_B1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured bacterium clone X178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	100%	0.0	100%	JX872320.1
<i>Aeromonas</i> sp. M_S_TSA_2-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KP967508.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain NY-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KT215606.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain w-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KM117161.1
<i>Aeromonas</i> sp. IW-211 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KF556692.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> strain FP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KF413426.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> strain HL-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KF413416.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain ZD3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	99%	0.0	100%	KC884674.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain 8C41-L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KC884668.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain 8C31-L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	100%	0.0	99%	KC884667.1

*gyrB*_B1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain HE73 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1133	1133	89%	0.0	96%	JN711753.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain LMG 13663 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1116	1116	89%	0.0	96%	JN711757.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain LMG 13666 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1099	1099	89%	0.0	96%	JN711760.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain ATCC 23213 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1090	1090	84%	0.0	97%	AY987523.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain LMG 13667 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1088	1088	89%	0.0	95%	JN711761.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CECT 4227 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1085	1085	84%	0.0	97%	JN711732.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> partial <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit B, strain CDC9533-76T	1085	1085	84%	0.0	97%	AJ868362.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain AE145 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1083	1083	89%	0.0	95%	JN711740.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain 112A DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1083	1083	89%	0.0	95%	JN711733.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> clone DK-A.besti-3 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1079	1079	84%	0.0	97%	KJ747111.1

Aislamiento B2: *Aeromonas bestiarum*

ARNr 16S_B2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas</i> sp. UG1-MRL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2477	2477	100%	0.0	99%	KC128843.1
<i>Aeromonas</i> sp. SXHSY1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2475	2475	100%	0.0	99%	JX110711.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> partial 16S rRNA gene, isolate KK-18	2475	2475	100%	0.0	99%	HE979861.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> partial 16S rRNA gene, isolate KK-20	2475	2475	100%	0.0	99%	HE979860.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> partial 16S rRNA gene, isolate KA-22	2475	2475	100%	0.0	99%	HE979859.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> strain NBRC 13784 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2475	2475	100%	0.0	99%	NR_113635.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> strain NY4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2475	2475	100%	0.0	99%	HQ283362.1
[<i>Haemophilus</i>] <i>piscium</i> strain CIP 106116 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2475	2475	100%	0.0	99%	NR_104935.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain W2Aug13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2475	2475	100%	0.0	99%	JN106432.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 872	2475	2475	100%	0.0	99%	FR853718.1

gyrB_B2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain HE73 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1860	1860	100%	0.0	100%	JN711753.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain LMG 13663 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1844	1844	100%	0.0	99%	JN711757.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain LMG 13666 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1799	1799	100%	0.0	99%	JN711760.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CECT 4227 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1777	1777	100%	0.0	99%	JN711732.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> partial <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit B, strain CDC9533-76T	1777	1777	100%	0.0	99%	AJ868362.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> clone DK-A.besti-3 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1772	1772	100%	0.0	98%	KJ747111.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain 559A DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1772	1772	100%	0.0	98%	JN711736.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain ATCC 23213 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1772	1772	100%	0.0	98%	AY987523.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CECT 7451 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1766	1766	100%	0.0	98%	JN711751.1
<i>Aeromonas bestiarum</i> strain CECT 5226 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1766	1766	100%	0.0	98%	JN711748.1

Aislamiento C1: *Aeromonas caviae*

ARNr 16S_C1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas caviae</i> strain J5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KP262417.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KP262415.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KP262414.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KP262413.1
<i>Aeromonas caviae</i> partial 16S rRNA gene, strain TWW3	2556	2556	100%	0.0	99%	LN624814.2
<i>Aeromonas caviae</i> strain MSSRF QS61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KJ877655.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain N25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KJ650079.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain S-X14A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KJ806517.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain A-X6A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KJ806368.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain Z129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	100%	0.0	99%	KF835804.1

gyrB_C1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-66 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1796	1796	100%	0.0	99%	KJ747156.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-19 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1790	1790	100%	0.0	98%	KJ747124.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 GyrB(<i>gyrB</i>)gene, partial cds	1790	1790	100%	0.0	98%	AY987491.1
<i>Aeromonas</i> sp. No. 34 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1783	1783	99%	0.0	99%	AB473051.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-30 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1779	1779	100%	0.0	98%	KJ747132.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-18 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1779	1779	100%	0.0	98%	KJ747123.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 27611 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1779	1779	100%	0.0	98%	AY987526.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-14 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1773	1773	100%	0.0	98%	KJ747119.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 65541 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1773	1773	100%	0.0	98%	AY987527.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-58 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1768	1768	100%	0.0	98%	KJ747151.1

Aislamiento H2: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain UTM 2268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	KP822822.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2579	28256	100%	0.0	99%	CP011100.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	2579	25790	100%	0.0	99%	CP010947.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain N27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	KJ650078.1
<i>Aeromonas</i> sp. T9 16S ribosomal RNA, partial sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	KJ210843.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SGC55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	KF358435.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	NR_074841.1
<i>Aeromonas</i> sp. DH-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	JX839764.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JCM 1027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	NR_113342.1
Uncultured bacterium clone QHYB-130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2579	2579	100%	0.0	99%	JF741928.1

gyrB_H2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	1808	1808	83%	0.0	98%	CP010947.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 4330 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1808	1808	83%	0.0	98%	JN711787.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, complete cds	1808	1808	83%	0.0	98%	JX275840.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5236 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1797	1797	83%	0.0	98%	JN711791.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JCM 3976 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1792	1792	83%	0.0	97%	JN711796.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5738 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1792	1792	83%	0.0	97%	JN711793.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5174 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1792	1792	83%	0.0	97%	JN711788.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AE215 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1792	1792	83%	0.0	97%	JN711785.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL97-91 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, complete cds	1792	1792	83%	0.0	97%	JX275837.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain wp3 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1792	1792	83%	0.0	97%	FJ608552.1

Aislamiento H3: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H3

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	2604	25749	100%	0.0	99%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2604	28574	100%	0.0	99%	CP011100.1
Bacterium enrichment culture clone S_2011_0.5_m_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	KM091654.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z83c	2604	2604	100%	0.0	99%	AB698740.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG11	2604	2604	100%	0.0	99%	HE681732.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG04	2604	2604	100%	0.0	99%	HE681727.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain HD16_1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	JN644601.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ZA-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	JN391411.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate Pa014	2604	2604	100%	0.0	99%	FR687003.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	GQ352498.1

gyrB_H3

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> clone DK-A.hdrop-28 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1386	1386	86%	0.0	95%	KJ747131.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. decolorationis DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1386	1386	86%	0.0	95%	AY968042.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 18245 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1380	1380	86%	0.0	95%	JN711801.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain FZMH2 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1376	1376	83%	0.0	96%	KC812118.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain D4, complete genome	1375	1375	86%	0.0	95%	CP013965.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1375	1375	86%	0.0	95%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> NJ-35, complete genome	1375	1375	86%	0.0	95%	CP006870.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> J-1, complete genome	1375	1375	86%	0.0	95%	CP006883.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> pc104A, complete genome	1375	1375	86%	0.0	95%	CP007576.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> AL09-71, complete genome	1375	1375	86%	0.0	95%	CP007566.1

Aislamiento H4: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H4

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas eucrenophila</i> strain MD2F 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2338	2970	88%	0.0	97%	KP196822.1
Uncultured bacterium clone A254_CAI 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1877	2057	99%	0.0	88%	FJ456353.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain W-R-3-1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1642	2884	99%	0.0	100%	KU570380.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain INF-80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1642	2105	73%	0.0	100%	KP813747.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> YL17, complete genome	1642	28837	99%	0.0	100%	CP007518.2
<i>Aeromonas caviae</i> strain J5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1642	2881	100%	0.0	100%	KP262417.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1642	2881	100%	0.0	100%	KP262415.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1642	2881	100%	0.0	100%	KP262414.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1642	2881	100%	0.0	100%	KP262413.1
<i>Aeromonas dhakensis</i> strain B86 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1642	2884	99%	0.0	100%	KU041795.1

gyrB_H4

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B11 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1234	1234	76%	0.0	96%	JQ234885.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> strain LMG 3769 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1218	1218	76%	0.0	95%	JN711806.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: KAE16	1218	1218	76%	0.0	95%	AB473178.1
<i>Aeromonas aquariorum</i> strain MDC 310 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1212	1212	76%	0.0	95%	JN711817.1
<i>Aeromonas</i> sp. KC5 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1212	1212	76%	0.0	95%	AB473124.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: AOK2	1212	1212	76%	0.0	95%	AB473112.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: YA04	1212	1212	76%	0.0	95%	AB473076.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> strain LMG 19559 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1206	1206	76%	0.0	95%	JN711809.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B32 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1206	1206	76%	0.0	95%	JQ234900.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B31 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1206	1206	76%	0.0	95%	JQ234899.1

Aislamiento H5: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H5

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	2612	25823	100%	0.0	100%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2612	28650	100%	0.0	100%	CP011100.1
Bacterium enrichment culture clone S_2011_0.5_m_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	100%	KM091654.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z83c	2612	2612	100%	0.0	100%	AB698740.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG11	2612	2612	100%	0.0	100%	HE681732.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG04	2612	2612	100%	0.0	100%	HE681727.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain HD16_1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	100%	JN644601.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ZA-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	100%	JN391411.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate Pa014	2612	2612	100%	0.0	100%	FR687003.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2612	2612	100%	0.0	100%	GQ352498.1

gyrB_H5

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	1923	1923	84%	0.0	99%	CP011100.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH121 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1860	1860	84%	0.0	98%	FJ159403.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 18245 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1849	1849	84%	0.0	98%	JN711801.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JCM 3968 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1849	1849	84%	0.0	98%	JN711795.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain IB102 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1849	1849	84%	0.0	98%	JQ085433.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH83 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1849	1849	84%	0.0	98%	AF208259.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A DNA gyrase subunit beta gene, partial cds	1845	1845	84%	0.0	98%	GQ352499.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain D4, complete genome	1844	1844	84%	0.0	98%	CP013965.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1844	1844	84%	0.0	98%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain DJ141209 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1844	1844	84%	0.0	98%	KR149458.1

Aislamiento H6: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H6

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain UTM 2268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	KP822822.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2595	28434	100%	0.0	100%	CP011100.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	2595	25956	100%	0.0	100%	CP010947.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain N27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	KJ650078.1
<i>Aeromonas</i> sp. T9 16S ribosomal RNA, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	KJ210843.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SGC55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	KF358435.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	NR_074841.1
<i>Aeromonas</i> sp. DH-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	JX839764.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JCM 1027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	NR_113342.1
Uncultured bacterium clone QHYB-130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	JF741928.1

gyrB_H6

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A DNA gyrase subunit beta gene, partial cds	1871	1871	87%	0.0	98%	GQ352499.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain D4, complete genome	1860	1860	87%	0.0	98%	CP013965.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1860	1860	87%	0.0	98%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> NJ-35, complete genome	1860	1860	87%	0.0	98%	CP006870.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> J-1, complete genome	1860	1860	87%	0.0	98%	CP006883.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> pc104A, complete genome	1860	1860	87%	0.0	98%	CP007576.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> AL09-71, complete genome	1860	1860	87%	0.0	98%	CP007566.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> ML09-119, complete genome	1860	1860	87%	0.0	98%	CP005966.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ML09-119 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, complete cds	1860	1860	87%	0.0	98%	JX275836.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ML09-139 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1860	1860	87%	0.0	98%	JX275834.1

Aislamiento H7: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H7

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain UTMC 2268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KP822822.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2652	29069	100%	0.0	99%	CP011100.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	2652	26529	100%	0.0	99%	CP010947.1
<i>Aeromonas</i> sp. T9 16S ribosomal RNA, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KJ210843.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SGC55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KF358435.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	NR_074841.1
<i>Aeromonas</i> sp. DH-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	99%	0.0	100%	JX839764.1
Uncultured bacterium clone QHYB-130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	JF741928.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	NR_118944.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	HQ259695.1

gyrB_H7

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 13660 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1783	1783	85%	0.0	97%	JN711800.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 13658 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1760	1760	85%	0.0	96%	JN711799.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 4330 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1744	1744	85%	0.0	96%	JN711787.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH121 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1711	1711	85%	0.0	95%	FJ159403.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain MDC261 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1709	1709	79%	0.0	97%	DQ665888.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 1054148 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1705	1705	85%	0.0	95%	JN711777.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain D4, complete genome	1700	1700	85%	0.0	95%	CP013965.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1700	1700	85%	0.0	95%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> NJ-35, complete genome	1700	1700	85%	0.0	95%	CP006870.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> J-1, complete genome	1700	1700	85%	0.0	95%	CP006883.1

Aislamiento H8: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H8

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	2636	26063	100%	0.0	99%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2636	28914	100%	0.0	99%	CP011100.1
Bacterium enrichment culture clone S_2011_0.5_m_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	KM091654.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z83c	2636	2636	100%	0.0	99%	AB698740.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG11	2636	2636	100%	0.0	99%	HE681732.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG04	2636	2636	100%	0.0	99%	HE681727.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain HD16_1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	JN644601.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ZA-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	JN391411.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate Pa014	2636	2636	100%	0.0	99%	FR687003.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	GQ352498.1

gyrB_H8

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 18245 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	JN711801.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain DJ141209 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1781	1781	100%	0.0	99%	KR149458.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AhS633 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1781	1781	100%	0.0	99%	HQ326180.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5233 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1775	1775	100%	0.0	99%	JN711790.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 1073633 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1775	1775	100%	0.0	99%	JN711778.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> truncated DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1773	1773	99%	0.0	99%	FJ917137.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 12665 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JN711798.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5236 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1764	1764	100%	0.0	99%	JN711791.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate NJ-28 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1764	1764	100%	0.0	99%	JX025787.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain D4, complete genome	1759	1759	100%	0.0	99%	CP013965.1

Aislamiento H9: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H9

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas</i> sp. DH-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2610	2610	100%	0.0	99%	JX839764.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain UTMC 2268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	KP822822.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2604	28541	100%	0.0	99%	CP011100.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	2604	26048	100%	0.0	99%	CP010947.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain N27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	KJ650078.1
<i>Aeromonas</i> sp. T9 16S ribosomal RNA, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	KJ210843.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SGC55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	KF358435.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	NR_074841.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JCM 1027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	NR_113342.1
Uncultured bacterium clone QHYB-130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99%	JF741928.1

gyrB_H9

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas</i> sp. JH121 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1803	1803	100%	0.0	99%	FJ159403.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5233 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1792	1792	100%	0.0	99%	JN711790.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain D4, complete genome	1786	1786	100%	0.0	99%	CP013965.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1786	1786	100%	0.0	99%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> NJ-35, complete genome	1786	1786	100%	0.0	99%	CP006870.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> J-1, complete genome	1786	1786	100%	0.0	99%	CP006883.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> pc104A, complete genome	1786	1786	100%	0.0	99%	CP007576.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> AL09-71, complete genome	1786	1786	100%	0.0	99%	CP007566.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> ML09-119, complete genome	1786	1786	100%	0.0	99%	CP005966.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JNC302 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	JX469467.1

Aislamiento H10: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H10

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain UTMC 2268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	KP822822.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2651	29043	74%	0.0	99%	CP011100.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	2651	26510	74%	0.0	99%	CP010947.1
<i>Aeromonas</i> sp. T9 16S ribosomal RNA, partial sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	KJ210843.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SGC55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	KF358435.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	NR_074841.1
Uncultured bacterium clone QHYB-130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	JF741928.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	NR_118944.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	HQ259695.1
<i>Aeromonas</i> sp. GD4(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	74%	0.0	99%	GU566305.1

gyrB_H10

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 18245 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1820	1820	100%	0.0	99%	JN711801.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5233 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1820	1820	100%	0.0	99%	JN711790.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AE53 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1820	1820	100%	0.0	99%	JN711780.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain TN97-08 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, complete cds	1820	1820	100%	0.0	99%	JX275842.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH121 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1820	1820	100%	0.0	99%	FJ159403.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain D4, complete genome	1814	1814	100%	0.0	99%	CP013965.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1814	1814	100%	0.0	99%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain DJ141209 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1814	1814	100%	0.0	99%	KR149458.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> NJ-35, complete genome	1814	1814	100%	0.0	99%	CP006870.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> J-1, complete genome	1814	1814	100%	0.0	99%	CP006883.1

Aislamiento H11: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H11

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B146 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KU188291.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1917	19035	100%	0.0	99%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KU041788.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain P11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KU041787.1
<i>Aeromonas sobria</i> strain BX0815 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KR010958.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain WXX-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KT425065.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain GPG-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KT425066.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain HZN198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KT364220.1
<i>Aeromonas</i> sp. Sh 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KT427918.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain NY-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	KT215607.1

gyrB_H11

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A DNA gyrase subunit beta gene, partial cds	1941	1941	86%	0.0	99%	GQ352499.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate NJ-28 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1916	1916	85%	0.0	99%	JX025787.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain DJ141209 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1890	1890	86%	0.0	99%	KR149458.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AhS633 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1890	1890	86%	0.0	99%	HQ326180.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	1884	1884	86%	0.0	99%	CP010947.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AE150 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1884	1884	86%	0.0	99%	JN711781.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 1073633 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1884	1884	86%	0.0	99%	JN711778.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, complete cds	1884	1884	86%	0.0	99%	JX275840.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 4330 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1879	1879	86%	0.0	99%	JN711787.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JCM 3995 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1873	1873	86%	0.0	98%	JN711797.1

Aislamiento H12: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H12

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	2621	25916	100%	0.0	99%	CP013178.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2621	28751	100%	0.0	99%	CP011100.1
Bacterium enrichment culture clone S_2011_0.5_m_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	KM091654.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z83c	2621	2621	100%	0.0	99%	AB698740.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG11	2621	2621	100%	0.0	99%	HE681732.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate SG04	2621	2621	100%	0.0	99%	HE681727.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain HD16_1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	JN644601.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ZA-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	JN391411.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> partial 16S rRNA gene, isolate Pa014	2621	2621	100%	0.0	99%	FR687003.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	GQ352498.1

gyrB_H12

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 322A DNA gyrase subunit beta gene, partial cds	1871	1871	100%	0.0	99%	GQ352499.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate NJ-28 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1860	1860	99%	0.0	99%	JX025787.1
<i>Aeromonas</i> sp. MU2 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1860	1860	97%	0.0	99%	AB473139.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain DJ141209 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1832	1832	100%	0.0	98%	KR149458.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> strain CECT 839 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1832	1832	100%	0.0	98%	JN711776.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AhS633 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1832	1832	100%	0.0	98%	HQ326180.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966, complete genome	1832	1832	100%	0.0	98%	CP000462.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH83 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1832	1832	100%	0.0	98%	AF208259.1
<i>Aeromonas</i> sp. Klanj 4.1 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1831	1831	99%	0.0	99%	KF929379.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain IB102 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1831	1831	99%	0.0	99%	JQ085433.1

Aislamiento H13: *Aeromonas hydrophila*

ARNr 16S_H13

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain UTMC 2268 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	KP822822.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	2649	29023	100%	0.0	99%	CP011100.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AL06-06, complete genome	2649	26492	100%	0.0	99%	CP010947.1
<i>Aeromonas</i> sp. T9 16S ribosomal RNA, partial sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	KJ210843.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SGC55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	KF358435.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	NR_074841.1
Uncultured bacterium clone QHYB-130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	JF741928.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	NR_118944.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	HQ259695.1
<i>Aeromonas</i> sp. GD4(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	GU566305.1

gyrB_H13

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas hydrophila</i> clone DK-A.hdrop-46 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1406	1406	100%	0.0	99%	KJ747144.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JCM 3967 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1406	1406	100%	0.0	99%	JN711794.1
<i>Aeromonas</i> sp. 67P24 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase beta subunit, partial cds	1406	1406	100%	0.0	99%	AB436654.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: 14 H 20	1406	1406	100%	0.0	99%	AB473150.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: KR652	1406	1406	100%	0.0	99%	AB473068.1
<i>Aeromonas</i> sp. Klanj 4.1 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1400	1400	100%	0.0	99%	KF929379.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain LMG 21080 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1400	1400	100%	0.0	99%	JN711802.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CECT 5233 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1400	1400	100%	0.0	99%	JN711790.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain MDC 27 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1400	1400	100%	0.0	99%	HQ442745.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: KAE3	1400	1400	100%	0.0	99%	AB473165.1

Aislamiento P1: *Aeromonas punctata*

ARNr 16S_P1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain 694c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2453	2453	100%	0.0	97%	FJ168772.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain N25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	97%	KJ650079.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain T84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	97%	HQ407259.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain VIT-SHRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	97%	KJ716457.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2451	2451	100%	0.0	97%	AY987725.1
<i>Aeromonas punctata</i> partial 16S rRNA gene, strain WAB1953	2451	2451	100%	0.0	97%	AM184292.1
Bacterium G3_GreenLake 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	100%	0.0	97%	AY345394.1
Uncultured bacterium clone G3DCM-159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2449	2449	100%	0.0	97%	EU037343.2
<i>Aeromonas dhakensis</i> strain LBA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2447	2447	100%	0.0	97%	KF938660.1
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> strain AN-35 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2447	2447	100%	0.0	97%	AY987742.1

gyrB_P1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1842	1842	88%	0.0	97%	AY987491.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-19 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1836	1836	88%	0.0	97%	KJ747124.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-66 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1836	1836	88%	0.0	97%	KJ747156.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-18 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1832	1832	89%	0.0	97%	KJ747123.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 27611 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1831	1831	88%	0.0	97%	AY987526.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-14 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1820	1820	88%	0.0	97%	KJ747119.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 65541 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1820	1820	88%	0.0	97%	AY987527.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-30 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1818	1818	88%	0.0	97%	KJ747132.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-53 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1816	1816	89%	0.0	97%	KJ747148.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 25447 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1816	1816	89%	0.0	97%	AY987525.1

Aislamiento P2: *Aeromonas punctata*

ARNr 16S_P2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain 694c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	FJ168772.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain T84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	HQ407259.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain N25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	KJ650079.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain tu4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	FJ544391.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	AY987725.1
<i>Aeromonas punctata</i> partial 16S rRNA gene, strain WAB1953	2621	2621	100%	0.0	99%	AM184292.1
Bacterium G3 GreenLake 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	AY345394.1
<i>Aeromonas aquariorum</i> Antonio Martinez-Murcia:MDC310 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	99%	JQ034591.1
<i>Aeromonas</i> sp. FD41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	99%	HM587254.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> YL17, complete genome	2615	26148	100%	0.0	99%	CP007518.2

gyrB_P2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1807	1807	100%	0.0	98%	AY987491.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-19 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1801	1801	100%	0.0	98%	KJ747124.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-66 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1801	1801	100%	0.0	98%	KJ747156.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-18 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1796	1796	100%	0.0	98%	KJ747123.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 27611 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1796	1796	100%	0.0	98%	AY987526.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-30 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1790	1790	100%	0.0	98%	KJ747132.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-14 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1784	1784	100%	0.0	98%	KJ747119.1
<i>Aeromonas</i> sp. 2P1F9 partial gyrB gene for subunit B of DNA gyrase, strain 2P1F9	1784	1784	100%	0.0	98%	HG799679.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 65541 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1784	1784	100%	0.0	98%	AY987527.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-58 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1779	1779	100%	0.0	98%	KJ747151.1

Aislamiento P3: *Aeromonas punctata*

ARNr 16S_P3

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain 694c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	99%	FJ168772.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	AY987725.1
<i>Aeromonas punctata</i> partial 16S rRNA gene, strain WAB1953	2636	2636	100%	0.0	99%	AM184292.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain N25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	KJ650079.1
<i>Aeromonas aquariorum</i> Antonio Martinez-Murcia:MDC310 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	JQ034591.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain T84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	HQ407259.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain VIT-SHRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	KJ716457.1
Bacterium G3 GreenLake 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	100%	0.0	99%	AY345394.1
<i>Aeromonas dhakensis</i> strain LBA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	100%	0.0	99%	KF938660.1
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> strain AN-35 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2632	2632	100%	0.0	99%	AY987742.1

gyrB_P3

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1764	1764	100%	0.0	99%	AY987491.1
<i>Aeromonas</i> sp. No. 34 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1764	1764	100%	0.0	99%	AB473051.1
<i>Aeromonas punctata</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: 12 H 338	1759	1759	100%	0.0	98%	AB473141.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-66 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1759	1759	100%	0.0	98%	KJ747156.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-30 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1748	1748	100%	0.0	98%	KJ747132.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-18 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1748	1748	100%	0.0	98%	KJ747123.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-19 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1748	1748	100%	0.0	98%	KJ747124.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 27611 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1748	1748	100%	0.0	98%	AY987526.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-14 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1742	1742	100%	0.0	98%	KJ747119.1

Aislamiento P4: *Aeromonas punctata*

ARNr 16S_P4

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured bacterium clone 3.13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2327	2327	100%	0.0	99%	EF179844.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain VITSCA01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	GQ401237.1
<i>Aeromonas</i> sp. KC7 gene for 16S rRNA, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	AB472988.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	KP262417.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	KP262415.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain J2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	KP262414.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain 694c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	FJ168772.1
Uncultured bacterium clone X380 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	JX872321.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain CH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	KC252600.1
<i>Aeromonas caviae</i> strain T84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	100%	0.0	99%	HQ407259.1

gyrB_P4

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1589	1589	96%	0.0	95%	AY987491.1
<i>Aeromonas</i> sp. No. 34 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1589	1589	93%	0.0	96%	AB473051.1
<i>Aeromonas caviae</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: WL4-655	1585	1585	95%	0.0	96%	LC003064.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-19 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1583	1583	96%	0.0	95%	KJ747124.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-66 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1583	1583	96%	0.0	95%	KJ747156.1
<i>Aeromonas</i> sp. 2P1F9 partial <i>gyrB</i> gene for subunit B of DNA gyrase, strain 2P1F9	1574	1574	95%	0.0	95%	HG799679.1
<i>Aeromonas</i> sp. KYO548 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1574	1574	95%	0.0	95%	AB473099.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-58 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1572	1572	96%	0.0	95%	KJ747151.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-30 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1572	1572	96%	0.0	95%	KJ747132.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A.caviae-23 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1572	1572	96%	0.0	95%	KJ747127.1

Aislamiento P5: *Aeromonas punctata*

ARNr 16S_P5

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain 694c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	FJ168772.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	AY987725.1
<i>Aeromonas punctata</i> partial 16S rRNA gene, strain WAB1953	2621	2621	100%	0.0	99%	AM184292.1
Bacterium G3_GreenLake 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2621	2621	100%	0.0	99%	AY345394.1
<i>Aeromonas aquariorum</i> Antonio Martinez-Murcia:MDC310 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	99%	JQ034591.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> YL17, complete genome	2615	26148	100%	0.0	99%	CP007518.2
<i>Aeromonas caviae</i> strain VIT-SHRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2615	2615	99%	0.0	99%	KJ716457.1
Uncultured bacterium clone T0-An-20C-21 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2615	2615	100%	0.0	99%	JX105534.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> Consuelo Esteve:MA131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2615	2615	100%	0.0	99%	JQ034596.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> Consuelo Esteve:MA17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2615	2615	100%	0.0	99%	JQ034595.1

gyrB_P5

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas punctata</i> strain AE-23 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1784	1784	99%	0.0	98%	AY987491.1
<i>Aeromonas</i> sp. No. 34 <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds	1783	1783	99%	0.0	98%	AB473051.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A. <i>caviae</i> -19 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1779	1779	99%	0.0	98%	KJ747124.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A. <i>caviae</i> -66 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1779	1779	99%	0.0	98%	KJ747156.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A. <i>caviae</i> -30 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1768	1768	99%	0.0	98%	KJ747132.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A. <i>caviae</i> -18 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1768	1768	99%	0.0	98%	KJ747123.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK 27611 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1768	1768	99%	0.0	98%	AY987526.1
<i>Aeromonas punctata</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: 12 H 338	1766	1766	99%	0.0	98%	AB473141.1
<i>Aeromonas caviae</i> clone DK-A. <i>caviae</i> -14 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1762	1762	99%	0.0	98%	KJ747119.1
<i>Aeromonas punctata</i> strain RK	1762	1762	99%	0.0	98%	AY987527.1

65541 GyrB (*gyrB*) gene, partial
cds

Aislamiento V1: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-ED1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	KU554699.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-EB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	KU507540.1
<i>Aeromonas</i> diversa strain VITKKAJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	KU560509.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain PO_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	KT371350.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain NMP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	KP938309.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	KF661548.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain SMC24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	KF358431.1
<i>Aeromonas veronii</i> B565 strain B565 16S ribosomal RNA, complete sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	NR_102789.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12658	2638	2638	100%	0.0	100%	AB680307.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain G10_2A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0.0	100%	JN644562.1

*gyrB*_V1

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain LT-1 gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	645	645	27%	0.0	97%	KR297112.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-2 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	636	636	27%	4e-178	97%	JX025911.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain 453 gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	634	634	27%	1e-177	97%	EF064801.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain TH0426, complete genome	628	628	27%	7e-176	97%	CP012504.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain HNZZ-3 gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	628	628	27%	7e-176	97%	KR537458.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain HNZZ-2 gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	628	628	27%	7e-176	97%	KR537457.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain HNZZ-1 gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	628	628	27%	7e-176	97%	KR537456.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-44 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	628	628	27%	7e-176	97%	JX025941.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-54 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	628	628	27%	7e-176	97%	JX025881.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH111 DNA gyrase subunit	628	628	27%	7e-176	97%	FJ159422.1

B (*gyrB*) gene, partial cds

Aislamiento V2: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured bacterium clone X381 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	1759	100%	0.0	99%	JX872318.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain w-s-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	1759	99%	0.0	99%	JF490061.1
<i>Aeromonas dhakensis</i> strain P13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU188299.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain K31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU188296.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU188295.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU188294.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU188293.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain V3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU058435.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain N-2-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU601307.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain I-M-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	100%	0.0	99%	KU570316.1

*gyrB*_V2

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas</i> sp. JF1214 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1882	1882	92%	0.0	99%	KR869635.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-17 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1879	1879	91%	0.0	99%	JX025953.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate NJ-40 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1860	1860	92%	0.0	99%	JX025902.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate CS-30 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1860	1860	92%	0.0	99%	JX025847.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate JH-3 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1855	1855	92%	0.0	99%	JX025889.1
<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i> strain PDB gyrase B gene, partial cds	1853	1853	94%	0.0	98%	KR049227.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH117 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1847	1847	94%	0.0	98%	FJ159391.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH112 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1847	1847	94%	0.0	98%	FJ159390.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain MRM0908 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1845	1845	93%	0.0	98%	GU001910.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CECT 4246 GyrB (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1844	1844	93%	0.0	98%	AY987514.1

Aislamiento V3: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V3

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain V3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	KU058435.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-EB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	KU507539.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain JBN2301, complete genome	1714	17048	100%	0.0	99%	CP013178.1
<i>Aeromonas cavernicola</i> strain MDC 2508 16S ribosomal RNA, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	NR_132718.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain YC-RL3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	KR819398.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10, complete genome	1714	18811	100%	0.0	99%	CP011100.1
Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone n27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	KP231771.1
Bacterium enrichment culture clone S_2011_0.5_m_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	KM091654.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain WPD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	KM013811.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	100%	0.0	99%	KF661547.1

gyrB_V3

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain IQ309 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1868	1868	100%	0.0	99%	GU573721.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CHS108 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1845	1845	100%	0.0	98%	GU174509.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-35 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1844	1844	98%	0.0	99%	JX025963.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate CS-46 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1844	1844	98%	0.0	99%	JX025866.1
<i>Aeromonas veronii</i> clone DK-A.veronii-51 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1840	1840	100%	0.0	98%	KJ747146.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain IH118 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1834	1834	100%	0.0	98%	GU573718.1
<i>Aeromonas veronii</i> clone DK-A.veronii-39 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1829	1829	100%	0.0	98%	KJ747139.1
<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i> strain HS120920 gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1829	1829	100%	0.0	98%	KF543780.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain MS12 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1823	1823	100%	0.0	98%	GU573725.1
<i>Aeromonas veronii</i> clone DK-A.veronii-32 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1818	1818	100%	0.0	98%	KJ747134.1

Aislamiento V4: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V4

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-ED1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KU554699.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-EB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KU507540.1
<i>Aeromonas diversa</i> strain VITKKAJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KU560509.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain PO_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KT371350.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain NMP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KP938309.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KF661548.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain SMC24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	KF358431.1
<i>Aeromonas veronii</i> B565 strain B565 16S ribosomal RNA, complete sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	NR_102789.1
<i>Aeromonas</i> sp. REm-amp_42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	99%	JX899598.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12658	2652	2652	100%	0.0	99%	AB680307.1

gyrB_V4

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas</i> sp. JF1342 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1808	1808	100%	0.0	99%	KR869633.1
<i>Aeromonas</i> sp. MCCB 140 gyrase B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1797	1797	100%	0.0	99%	JN602734.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-54 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1792	1792	100%	0.0	99%	JX025881.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain LT-1 gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	KR297112.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-2 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	JX025911.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-37 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	JX025880.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-32 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	JX025870.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-25 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	JX025808.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CYJ209 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	1786	1786	100%	0.0	99%	FJ940792.1

gene, partial cds						
<i>Aeromonas</i> sp. JH111 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	100%	0.0	99%	FJ159422.1

Aislamiento V5: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V5

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas caviae</i> strain w1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KJ157321.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain N17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU188292.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B146 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU188291.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU188290.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-ED1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU554699.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-EB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU507540.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain G-R-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU570340.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain W-T-3-1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU570376.1
<i>Aeromonas</i> sp. HBW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU686689.1
<i>Aeromonas diversa</i> strain VITKKAJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	100%	0.0	100%	KU560509.1

*gyrB*_V5

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-32 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1860	1860	87%	0.0	99%	JX025926.1
<i>Aeromonas</i> sp. MCCB 142 gyrase B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1855	1855	88%	0.0	98%	JN602733.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain IH317 DNA gyrase subunit B gene, partial cds	1855	1855	88%	0.0	98%	GU573720.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-7 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1840	1840	85%	0.0	99%	JX025924.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XH-32 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1832	1832	87%	0.0	98%	JX025803.1
<i>Aeromonas culicicola</i> strain MTCC 3249 substrain SH DNA gyrase	1827	1827	88%	0.0	98%	AY130993.1

subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds							
<i>Aeromonas sobria</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: fay1209	1821	1821	88%	0.0	98%	LC012334.1	
<i>Aeromonas culicicola</i> DNA gyrase subunit beta gene, partial cds	1821	1821	88%	0.0	98%	AF488548.1	
<i>Aeromonas sobria</i> strain NQ090701 gyrase subunit B-like (<i>gyrB</i>) gene, complete sequence	1816	1816	88%	0.0	97%	HM358837.1	
<i>Aeromonas</i> sp. JH115 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1816	1816	88%	0.0	97%	FJ159423.1	

Aislamiento V6: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V6

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain NK05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	100%	KP899502.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain NK02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	100%	KP899500.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain V3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	100%	0.0	99%	KU058435.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	100%	0.0	99%	KF661547.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain SCMC23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	100%	0.0	99%	KF358430.1
Uncultured bacterium clone C6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	100%	0.0	99%	JX262562.1
Uncultured bacterium clone ELU0005-T44-S-NIPCRAMgANa_000200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	100%	0.0	99%	HQ739473.1
Uncultured bacterium clone 1-42015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	100%	0.0	99%	JN032816.1
Uncultured bacterium clone 1-41035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2641	2641	100%	0.0	99%	JN032815.1
<i>Aeromonas veronii</i> B565, complete genome	2641	26379	100%	0.0	99%	CP002607.1

*gyrB*_V6

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-29 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1877	1877	100%	0.0	100%	JX025927.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate CS-23 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1877	1877	100%	0.0	100%	JX025851.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-31 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	1866	1866	100%	0.0	99%	JX025965.1

gene, partial cds						
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-40 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	1864	1864	99%	0.0	99%	JX025878.1
gene, partial cds						
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-11 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	1849	1849	100%	0.0	99%	JX025922.1
gene, partial cds						
<i>Aeromonas sobria</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: fay1209	1805	1805	100%	0.0	99%	LC012334.1
gene, partial cds						
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-43 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	1799	1799	100%	0.0	99%	JX025942.1
gene, partial cds						
<i>Aeromonas veronii</i> clone DK- A. veronii-49 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1794	1794	100%	0.0	99%	KJ747145.1
gene, partial cds						
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-42 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	1794	1794	100%	0.0	99%	JX025943.1
gene, partial cds						
<i>Aeromonas</i> sp. JH115 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1794	1794	100%	0.0	99%	FJ159423.1

Aislamiento V7: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V7

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain K31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU188296.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU188295.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU188294.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU188293.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain TH0426, complete genome	1375	13717	100%	0.0	99%	CP012504.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain V3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU058435.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-EB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU507539.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain N-3-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU601315.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain N-2-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU601307.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain I-M-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	KU570316.1

gyrB_V7

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> isolate CS-44 DNA gyrase subunit B (gyrB) gene, partial cds	1875	1875	98%	0.0	99%	JX025867.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH89 DNA gyrase subunit B (gyrB) gene, partial cds	1838	1838	100%	0.0	98%	FJ159393.1
<i>Aeromonas</i> sp. MCCB 140 gyrase B (gyrB) gene, partial cds	1832	1832	100%	0.0	98%	JN602734.1
<i>Aeromonas</i> sp. JF2689 partial gyrB gene for DNA gyrase subunit B, strain JF2689	1832	1832	100%	0.0	98%	AJ868389.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain TH0426, complete genome	1827	1827	100%	0.0	98%	CP012504.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain HNZZ-3 gyrase B subunit (gyrB) gene, partial cds	1827	1827	100%	0.0	98%	KR537458.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain HNZZ-2 gyrase B subunit (gyrB) gene, partial cds	1827	1827	100%	0.0	98%	KR537457.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain HNZZ-1 gyrase B subunit (gyrB) gene, partial cds	1827	1827	100%	0.0	98%	KR537456.1
<i>Aeromonas sobria</i> strain NQ090701 gyrase subunit B-like (gyrB) gene, complete sequence	1827	1827	100%	0.0	98%	HM358837.1
<i>Aeromonas</i> sp. JH118 DNA gyrase subunit B (gyrB) gene, partial cds	1827	1827	100%	0.0	98%	FJ159394.1

Aislamiento V8: *Aeromonas veronii***ARNr 16S_V8**

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas</i> sp. REmp-amp_63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0.0	99%	JX899604.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-ED1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	99%	KU554699.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-EB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	99%	KU507540.1
<i>Aeromonas diversa</i> strain VITKKAJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	99%	KU560509.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain PO_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	99%	KT371350.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain NMP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	99%	KP938309.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	99%	KF661548.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain SMC24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	99%	KF358431.1
<i>Aeromonas veronii</i> B565 strain B565 16S ribosomal RNA,	2625	2625	100%	0.0	99%	NR_102789.1

complete sequence						
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12658	2625	2625	100%	0.0	99%	AB680307.1

gyrB_V8

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain B09 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1315	1315	61%	0.0	94%	JQ234883.1
<i>Aeromonas</i> sp. Kumr 3.5 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1280	1280	60%	0.0	94%	KF929382.1
<i>Aeromonas veronii</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: BT1-701	1271	1271	58%	0.0	95%	LC003070.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate NJ-36 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1269	1269	60%	0.0	94%	JX025968.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-15 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1269	1269	60%	0.0	94%	JX025954.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-22 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1269	1269	60%	0.0	94%	JX025950.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-60 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1269	1269	60%	0.0	94%	JX025938.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XH-28 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1269	1269	60%	0.0	94%	JX025898.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-58 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1269	1269	60%	0.0	94%	JX025891.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate JH-8 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1269	1269	60%	0.0	94%	JX025886.1

Aislamiento V9: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V9

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-ED1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KU554699.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CICR-EB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KU507540.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain G-R-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KU570340.1
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain W-T-3-1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KU570376.1
<i>Aeromonas</i> sp. HBW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KU686689.1

<i>Aeromonas diversa</i> strain VITKKAJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KU560509.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain PO_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KT371350.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain K11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KU041801.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain S4-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KP716691.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain NY-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	100%	KT215605.1

gyrB_V9

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain B09 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1842	1842	100%	0.0	99%	JQ234883.1
<i>Aeromonas</i> sp. Kumr 3.5 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1786	1786	99%	0.0	99%	KF929382.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate NJ-36 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025968.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-15 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025954.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XY-22 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025950.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-73 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025948.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate XH-28 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025898.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-58 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025891.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate JH-8 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025886.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-26 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1770	1770	100%	0.0	99%	JX025873.1

Aislamiento V10: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V10

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> partial 16S rRNA gene, strain 1305-2-H11	1550	1550	92%	0.0	95%	LT160816.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain HT13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1544	1544	93%	0.0	95%	KF285586.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain LD-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1541	1541	93%	0.0	95%	KF761318.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CPO 4.003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1535	1535	93%	0.0	95%	KC902426.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain DCH-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1535	1535	93%	0.0	95%	KC166864.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain M-T-TSA 91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1535	1535	93%	0.0	95%	JQ795740.1
Uncultured bacterium clone JFR0502_aaa14e12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1535	1535	93%	0.0	95%	HM779086.1
Uncultured bacterium clone H0068 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1535	1535	93%	0.0	95%	FJ820364.1
<i>Aeromonas</i> sp. 08003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1535	1535	93%	0.0	95%	FJ494904.1
Uncultured bacterium clone nbw881g11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1535	1535	93%	0.0	95%	GQ030714.1

*gyrB*_V10

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain CECT 4257 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1376	1376	99%	0.0	99%	HQ442728.1
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: YA07	1376	1376	99%	0.0	99%	AB473079.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CECT 4257 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1376	1376	99%	0.0	99%	AY101795.1
<i>Aeromonas veronii</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: BT5-828	1371	1371	99%	0.0	99%	LC003119.1
<i>Aeromonas veronii</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: WL1-515	1371	1371	99%	0.0	99%	LC003048.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-6 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1371	1371	99%	0.0	99%	JX025876.1
<i>Aeromonas</i> sp. MCCB 140 gyrase B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1371	1371	99%	0.0	99%	JN602734.1
<i>Aeromonas veronii</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: WL81-3367	1365	1365	99%	0.0	99%	LC003094.1
<i>Aeromonas veronii</i> <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: WL4-656	1365	1365	99%	0.0	99%	LC003065.1

<i>Aeromonas veronii</i> isolate XX-60 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1365	1365	99%	0.0	99%	JX025938.1
---	------	------	-----	-----	-----	------------

Aislamiento V11: *Aeromonas veronii*

ARNr 16S_V11

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii</i> strain HT13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1448	1448	88%	0.0	97%	KF285586.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CIFA- APWGR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1447	1447	89%	0.0	97%	KM277749.1
Uncultured bacterium clone aab17h03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1447	1447	88%	0.0	97%	DQ816423.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain JY66 35624 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	97%	KR094133.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CPO 4.003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	97%	KC902426.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain JY-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	97%	JX164207.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain M-T- TSA 91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	97%	JQ795740.1
Uncultured bacterium clone JFR0502_aaa14e12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	97%	HM779086.1
Uncultured bacterium clone JFR0501_aaa05g10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	97%	HM778499.1
Uncultured bacterium clone nbw881g11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	97%	GQ030714.1

*gyrB*_V11

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Aeromonas veronii gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: BT5-828	1445	1445	99%	0.0	97%	LC003119.1
<i>Aeromonas veronii</i> isolate GY-6 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1445	1445	99%	0.0	97%	JX025876.1
<i>Aeromonas sobria</i> strain XY18 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1445	1445	99%	0.0	97%	JQ815379.1
<i>Aeromonas</i> sp. MCCB 137 gyrase B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1445	1445	99%	0.0	97%	JN602735.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CECT 4257 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1445	1445	99%	0.0	97%	HQ442728.1
<i>Aeromonas hydrophila gyrB</i> gene for DNA gyrase subunit beta, partial cds, strain: YA07	1445	1445	99%	0.0	97%	AB473079.1

<i>Aeromonas</i> sp. JH118 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1445	1445	99%	0.0	97%	FJ159394.1
<i>Aeromonas veronii</i> strain CECT 4257 DNA gyrase subunit beta (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1445	1445	99%	0.0	97%	AY101795.1
<i>Aeromonas veronii</i> clone DK-A.veronii-11 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	1439	1439	99%	0.0	97%	KJ747117.1
<i>Aeromonas veronii gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain: WL81-3367	1439	1439	99%	0.0	97%	LC003094.1

Anexo 4

Árbol filogenético concenso confeccionado a partir de las secuencias del gen *gyrB* de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. y las depositadas en la base datos PubMLST/*Aeromonas*.



Árbol filogenético concenso confeccionado a partir de las secuencias del gen ARN 16S de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. y las depositadas en la base datos *Ribosomal Data Project*

