



Revista de Biología Tropical

ISSN: 2215-2075

ISSN: 0034-7744

Universidad de Costa Rica

Ortega-Balleza, Jessica L.; Sánchez-Varela, Alejandro; Rodríguez-Luna, Isabel C.; Guo, Xianwu
Genes de virulencia en *Aeromonas* spp. (Aeromonadales: Aeromonadaceae) aisladas
de *Oreochromis* spp. (Perciformes: Cichlidae) para consumo humano en México
Revista de Biología Tropical, vol. 66, núm. 4, 2018, pp. 1606-1613
Universidad de Costa Rica

DOI: 10.15517/rbt.v66i4.32829

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44959684022>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEM redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Genes de virulencia en *Aeromonas* spp. (Aeromonadales: Aeromonadaceae) aisladas de *Oreochromis* spp. (Perciformes: Cichlidae) para consumo humano en México

Jessica L. Ortega-Balleza, Alejandro Sánchez-Varela*, Isabel C. Rodríguez-Luna & Xianwu Guo

Laboratorio de Biotecnología Genómica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, CP. 88710, Cd. Reynosa, Tamaulipas, México; jessica_ortega7@hotmail.com, asanchezv@ipn.mx, isacr1@hotmail.com, gaopingguozhou@gmail.com

* Correspondence

Recibido 23-III-2018. Corregido 01-VIII-2018. Aceptado 20-IX-2018.

Abstract: Virulence genes in *Aeromonas* spp. (Aeromonadales: Aeromonadaceae) isolated from *Oreochromis* spp. (Perciformes: Cichlidae) destined for human consumption in Mexico. The genus *Aeromonas* are widely distributed in aquatic ecosystems are Gram-negative rods, oxidase-positive, and glucose-fermenting, considered emerging pathogens in humans. *Aeromonas* belongs to the fish microbiota, these microorganisms have a diversity of virulence factors responsible for a variety of infections in humans mainly gastrointestinal diseases. The presence of *Aeromonas* in products intended for consumption with high commercial demand such as tilapia generates sanitary concern due to the pathogenic potential of this bacteria. In this context, identification of virulence genes in strains of *Aeromonas* isolated in *Oreochromis* spp. intended for human consumption in Reynosa, Tamaulipas, Mexico is important due to the lack of molecular studies in this geographical area. In the present study the pathogenic potential of 15 strains of *Aeromonas* (*A. veronii*, *A. hydrophila* and *A. schubertii*) from *Oreochromis* spp. for human consumption were analyzed. Through PCR six virulence genes were analyzed (*alt*, *ast*, *aerA*, *hlyA*, *gcat* and *stxI*) and the strains used as control were: *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, *Aeromonas caviae* 429865 INP, *Escherichia coli* O157: H7 and *Escherichia coli* K12. El 100 % (n = 15) of the strains harbored at least one virulence gene, *aerA* gene was detected in 86.66 % of the analyzed strains, while *ast* and *stxI* genes were not identified. Moreover, *Aeromonas* strains had associated genes in the same strain: *aerA* / *gcat*, *alt* / *aerA*, *alt* / *aerA* / *gcat* / *hlyA* and *alt* / *aerA* / *gcat*, of which *aerA* / *gcat* were observed mostly in *A. veronii*, while *A. hydrophila* had the highest associations. These findings indicate that the strains of *Aeromonas* isolated in *Oreochromis* spp. have the potential to cause human diseases, and therefore, this species used as food, could be a vehicle for infections caused by *Aeromonas*. It also allows to provide information on this emerging microorganism to effectively treat and control any epidemiological event caused by *Aeromonas* spp. in the future.

Key words: *Aeromonas*; ecosystem; virulence genes; gastrointestinal; *Oreochromis*.

Ortega-Balleza, J. L., Sánchez-Varela, A., Rodríguez-Luna, I. C., & Guo, X. (2018). Genes de virulencia en *Aeromonas* spp. (Aeromonadales: Aeromonadaceae) aisladas de *Oreochromis* spp. (Perciformes: Cichlidae) para consumo humano en México. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1606-1613.

Las especies de *Aeromonas* son bacterias ubicuas de ecosistemas acuáticos, de morfología bacilar y Gram negativas, pueden ser mesófilas con movilidad o psicrófilas sin movilidad.

Esta bacteria es considerada un patógeno entérico emergente que además se asocia a infecciones de heridas, en sistema hepatobiliar, tracto respiratorio, tejidos blandos y septicemia

en humanos (Janda & Abbott, 2010; Figueras & Beaz-Hidalgo, 2015; Batra Mathur, & Misra, 2016).

El género *Aeromonas* posee una variedad de factores de virulencia como componentes estructurales y toxinas, además el género *Aeromonas* tiene la capacidad de capturar e integrar factores de virulencia en su genoma (Palma-Martínez et al., 2016) mismos que están involucrados en la colonización, invasión y proliferación de la bacteria conduciendo al desarrollo de la infección (Figueras & Beaz-Hidalgo, 2015; Batra et al., 2016). Las manifestaciones clínicas en infecciones por *Aeromonas* sugieren que múltiples factores de virulencia actúan en conjunto, por lo que la virulencia podría ser específica de cada cepa que interviene evadiendo el sistema inmunitario mediante sus propias estrategias (Yu et al., 2005; Tomás, 2012).

A pesar de que algunos estudios han demostrado enterotoxigenicidad de algunas cepas de *Aeromonas*, no se ha establecido como un agente etiológico, ya que *Aeromonas* forma parte de las bacterias de difícil identificación bioquímica y comúnmente confundida por el género *Vibrio* (Castro-Escarpulli et al., 2003) por lo que los datos epidemiológicos de infecciones asociadas con esta bacteria son escasos y aunado también a la carencia de un modelo animal establecido para reproducir las infecciones causadas por *Aeromonas* (Tomás, 2012). Sin embargo, en 2004, ocurrió un brote de diarrea en Brasil, con 2 170 casos, *Aeromonas* fue el patógeno aislado de 119 de 145 muestras. En 2012, en Brasil se reportó a *Aeromonas* en 2.7 % a partir de muestras diarreicas aislando a *A. caviae* más frecuentemente seguida de *A. hydrophila* (Prediger et al., 2012). Mientras que, Tsheten et al., 2016, en el reino asiático de Bután reportaron un brote por intoxicación alimentaria causado por el consumo de carne con *A. hydrophila*.

Cabe señalar que *Aeromonas* es un microorganismo que forma parte de la microbiota de los peces, y estos productos alimenticios son de los más comercializados a nivel mundial y más de la mitad del valor de las

exportaciones pesqueras procede de países en desarrollo (FAO, 2016). La tilapia es una especie cuya demanda a nivel mundial ha incrementado desde 1970, siendo el segundo grupo de peces más importante (Fuentes, Valladares, Grass, & Pico, 2011). La presencia de *Aeromonas* en dichos productos puede causar enfermedades entéricas y por lo tanto son bacterias de interés para la salud pública, asimismo especies de *Oreochromis* spp. son endémicas en aguas del Río Bravo y canales que atraviesan la zona fronteriza de Reynosa, Tamaulipas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar genes de virulencia presentes en cepas de *Aeromonas* aisladas en *Oreochromis* spp. destinado a consumo humano en Reynosa, Tamaulipas, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Aeromonas*: En este estudio fueron analizadas 15 cepas de *Aeromonas* procedentes de un cepario del Laboratorio de Biotecnología Genómica del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, dichas cepas fueron aisladas a partir de *Oreochromis* spp. destinadas a consumo humano y obtenidas entre junio y octubre de 2016 en aguas del Río Bravo y canales Rodhe y Anzaldúas que atraviesan la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, México.

Identificación preliminar: a partir de las cepas almacenadas en glicerol al 85 % a -70 °C, se tomaron 20 µl y se inocularon en Agar Aeromonas, incubando a 37° C por 18 h para comprobar la pureza. Posteriormente, se procedió a realizar la identificación preliminar para lo cual las colonias típicas fueron sembradas en Agar Luria Bertani (IBI SCIENTIFIC) para después realizar las pruebas de tinción de Gram; actividad citocromo-c-oxidasa; actividad catalasa; oxidación-fermentación de la glucosa y hemólisis.

Identificación molecular: Se corroboró molecularmente la identidad de las cepas a través PCR del gen *gyrB* y secuenciación.

Para lo cual las cepas bacterianas fueron inoculadas en caldo LB a 37 °C por 24 h. El ADN genómico se extrajo con el kit Promega Wizard® Genomic Ref. A1120. Posteriormente se realizó una PCR del gen *gyrB* utilizando las condiciones reportadas por Sánchez-Varela, Ortega-Balleza, Rodríguez-Luna y Guo (2018) los productos obtenidos correspondían a 967 pb los cuales fueron secuenciados en el equipo ABI®3130 Genetic Analyzer, después las secuencias fueron analizadas en BLAST del NCBI para corroborar la especie a la cuál pertenecían. Se utilizaron como referencia las cepas *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, *E. coli* O157:H7 y *E. coli* K12.

Detección de genes de virulencia por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): La PCR de los genes de virulencia (*alt*, *ast*, *aerA*, *hlyA*, *gcat* y *stx1*) se realizó a partir del ADNg extraído de las cepas de *Aeromonas* spp. Los iniciadores que se utilizaron se indican en el cuadro 1. La PCR se realizó a volumen final de 25 µl; en cada tubo de reacción se colocó 1µl ADN genómico (concentración promedio de 100-200 ng/µl), 5µl de solución amortiguadora 1X, 0.75 µl de MgCl₂ 1.5 mM, 0.5µl dNTPs 0.05 mM, 0.5 µl de iniciadores 0.1 µM (Cuadro 1) y 1.25 U/µl de Taq polimerasa y 19 µl de agua milli-Q estéril. La reacción se

realizó en un termociclador Veriti® de Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 2 min, enseguida 30 ciclos a 95 °C por 30 seg, la temperatura de alineamiento de cada uno de los iniciadores se muestra en el cuadro 1, extensión a 72°C por 1.50 min, y finalizar a 72 °C por 10 min. Los productos resultantes fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5 % en solución amortiguadora de Tris Borato EDTA, pH 8 (TBE 1X), durante 1 h a 90 Volts. Después el gel fue visualizado en un fotodocumentador Kodak® con cámara Gel Logic 112.

Análisis estadístico: Los datos se analizaron usando el programa IBM® SPSS® Statistics versión 22 (SPSS Inc., Chicago, IL). La distribución de los genes de virulencia entre las especies de *Aeromonas* obtenidas se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Un valor de P < 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La identificación a nivel de especie mostró que, del total de cepas, 12 correspondían a *A. veronii*, dos a *A. hydrophila* y una correspondió a *A. schubertii*.

CUADRO 1
Iniciadores para detección de seis genes de virulencia en *Aeromonas* spp.

TABLE 1
Primers for the detection of six virulence genes of *Aeromonas* spp.

Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Referencia
alt-F	tga ccc agt cct ggc acg gc	442	64	Nawaz et al., 2010
alt-R	ggt gat cga tca cca cca gc			
ast-F	atc gtc agc gac agc ttc tt	504	60	Aguilera-Arreola et al., 2005
ast-R	ctc atc cct tgg ctt gtt gt			
aer-F	cct atg gcc tga gcg aga ag	431	64	Soler et al., 2002
aer-R	cca gtt cca gtc cca cca ct			
hlyAF	cca cgc aaa ttc atc acg	1079	57	Abdullah et al., 2003
hlyAR	atc ctt gtt cac ctc gac			
gcat-F	ctc ctg gaa tcc caa gta tca g	237	62	Soler et al., 2002
gcat-R	ggc agg ttg aac agc agt atc t			
stx1F	agc agt cat tac ata aga ac	144	53	Hernández-Cortez et al., 2013
stx1R	tgg att taa tgt cgc ata g			

CUADRO 2
Genes de virulencia detectados en cepas de *Aeromonas*

TABLE 2
Virulence genes detected in *Aeromonas* strains

Cepa / Gen de virulencia	<i>A. veronii</i> (n = 12)	<i>A. hydrophila</i> (n = 2)	<i>A. schubertii</i> (n = 1)	Total (n = 15)
alt	4	2	0	6
ast	0	0	0	0
aerA	10	2	1	13
hlyA	0	1	0	1
gcat	6	2	0	8
stx1	0	0	0	0

La identificación molecular de los genes de virulencia mostró que el 100 % de las cepas de *Aeromonas* presentó al menos un gen de virulencia (Cuadro 2). El gen *aerA* se presentó en el 86.66 % (13/15) y fue el más común. El gen *gcat* se detectó en 53.33 % (8/13) de *Aeromonas*. Mientras que los genes *alt* y *hlyA* fueron identificados en 40.0 (6/15) y 6.66 % (1/15) de las cepas. Por otra parte, tanto el gen *ast* como *stx1* no fueron identificados en este estudio. No hubo diferencias significativas entre la distribución de los genes *alt*, *ast*, *aerA*, *hlyA*, *gcat* y *stx1*, y las tres especies detectadas ($P > 0.05$).

Asimismo, diferentes especies de *Aeromonas* llevan conjuntos distintos de genes de virulencia estudiados. En total se obtuvo que 53.33 % de *Aeromonas* presentaron más de un gen asociado en una misma cepa. En *A. veronii* se presentó prevalentemente *aerA/gcat* en 50.0 % (3/6), *alt/aerA* 16.66 % (1/6) y *alt/aerA/gcat* en 33.33 % (2/6); mientras que en las dos cepas de *A. hydrophila* se observó tanto *alt/aerA/gcat/hlyA* como *alt/aerA/gcat*. Sin embargo, en *A. schubertii* no fue detectada ninguna asociación.

DISCUSIÓN

Varios estudios han establecido un vínculo epidemiológico entre las fuentes de infección y los aislados clínicos de *Aeromonas* spp. (Hoel, Vadstein, & Jakobsen, 2017), estudiar la

composición bacteriana de productos alimenticios acuícolas es de vital importancia para evaluar la seguridad, riesgo de exposición a patógenos humanos y la adopción de medidas de control destinadas a disminuir la propagación de posibles bacterias patógenas (Grande-Burgos et al., 2018), ya que las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema de salud mundial principalmente en países en vías de desarrollo (Tsheten et al., 2016).

Por otra parte, aunque el potencial de virulencia y los mecanismos patogénicos del género *Aeromonas* aún no están claros (Silva et al., 2017), se han estudiado factores de virulencia relacionados con la patogenicidad de la bacteria como estructuras y enzimas extracelulares, descritas principalmente en *A. hydrophila* (Castro-Escarpulli et al., 2002; Suárez & Herrera, 2012) con la capacidad de dañar los tejidos del huésped y evadir su defensa inmune (Figueras & Beaz-Hidalgo, 2015).

En este estudio, el gen *aerA* estuvo presente en mayor porcentaje (80 %) en las cepas analizadas, principalmente en *A. veronii*. A pesar de que esta enterotoxina es común en cepas clínicas de *Aeromonas*, estudios han mostrado que cepas ambientales también poseen dicho gen encontrándose en más del 80 % de las cepas, las cepas analizadas en este trabajo proceden *Oreochromis* spp. de agua dulce, en dicha fuente este gen suele ser más prevalente (Ottaviani et al., 2011; Igbinosa & Okoh, 2013; Abu-Elala, Abdelsalam, Marouf, & Setta,

2015). El gen *aerA* se presentó en *A. veronii*, *A. hydrophila* y *A. shubertii* que están asociadas a procesos infecciosos ya que la aerolisina (AerA), tiene actividad hemolítica y citotóxica, y causa daño extenso al epitelio (Chopra & Houston, 1999).

Las lipasas son consideradas de importancia para la nutrición bacteriana, además de actuar como factores de virulencia (Onuk et al., 2013) y participar en la patogénesis en *A. salmonicida* (Chacón, Figueras, Castro-Escarpulli, Soler, & Guarro, 2003). En México, a partir de tilapia comercializada (*Oreochromis niloticus niloticus*) *gcat* estuvo presente en todos los aislados analizados (Castro-Escarpulli et al., 2003). En Turquía, 2013, se obtuvo 36.6 % de *gcat* a partir de aislados procedentes de pescado y agua superficial (Onuk et al., 2013), mientras que, los resultados obtenidos en este trabajo señalan que en 53.33 % de las cepas evaluadas se detectó dicho gen, presentándose en *A. veronii* y *A. hydrophila*, cepas de alta frecuencia de detección en infecciones, no obstante, se esperaría encontrar a dicho gen en todas las cepas evaluadas ya que se considera específico del género *Aeromonas* y ha llegado a ser de utilidad en la identificación del género (Khor, Puah, Tan, Puthuchear, & Chua, 2015), en este estudio probablemente los cebadores empleados no son específicos para todas las cepas o estas presentan polimorfismos en esa región génica.

Por otra parte, en este estudio, el gen *alt* fue detectado tanto en *A. veronii* como *A. hydrophila*, otros trabajos también han reportado su presencia en diferentes especies (Ottaviani et al., 2011; Zhou et al., 2013), la enterotoxina citotónica termolábil (Alt) no provoca la degeneración de las criptas y las vellosidades intestinales, sin embargo, interviene en la aparición de diarrea secretora (Chopra & Houston, 1999). Además, cepas positivas para el gen *alt* están asociadas con la aparición de heces blandas (Pablos, Rodríguez-Calleja, Santos, Otero, & García-López, 2009). En este trabajo *alt* se detectó individualmente y también en asociación con otros genes incrementando la patogenicidad de *Aeromonas*, sin embargo, es

importante destacar que, solo pueden expresarse en ciertas condiciones de crecimiento (Silva et al., 2017).

No se han encontrado reportes sobre la presencia de *aerA/gcat* en cepas de *Aeromonas*, cabe mencionar que tanto *aerA* como *gcat* son activados por serin proteasas (Aguilera-Arreola, Hernández-Rodríguez, Zúñiga, Figueras, & Castro-Escarpulli, 2005) además de otras enzimas extracelulares, contribuyendo y potenciando la virulencia de *Aeromonas* (Nawaz et al., 2010). Aguilera-Arreola et al., 2007 reportaron 6.4 % *alt/aerA* en cepas de *A. veronii* y *A. caviae* de España y México (Aguilera-Arreola et al., 2007). Además, no se ha establecido la relación entre la presencia de genes de toxinas específicos y la presentación clínica de la enfermedad (Hoel et al., 2017). Las combinaciones encontradas pueden depender de la región donde sea aislada la bacteria ya que además están sometidas a diferentes presiones ambientales.

La incidencia de *Aeromonas* en las heces de pacientes con diarrea ha incrementado en los últimos años. En 2015, diferentes especies de *Aeromonas* fueron recuperadas de heces de pacientes con gastroenteritis o diarrea aguda en la Ciudad de México, presentándose en cuarto lugar sólo por debajo de *E. coli* enteropatógena, *Shigella* y *Salmonella*, y por encima de bacterias que en diferentes países son frecuentemente causantes de enfermedades diarreicas como *Campylobacter jejuni* o *Vibrio* spp. (Novoa-Farías et al., 2016), por lo cual la búsqueda de *Aeromonas* debe ser parte del diagnóstico de rutina en coprocultivos (Mendes-Marques et al., 2012).

En conclusión, estos hallazgos indican que las cepas de *Aeromonas* aisladas en *Oreochromis* spp. tienen el potencial de causar enfermedades en humanos, y por lo tanto este alimento podría ser vehículo de *Aeromonas* spp. Los resultados de este trabajo enfatizan la importancia de monitorear *Aeromonas* spp. en alimentos y con elevado potencial patogénico con la finalidad de contribuir en la aportación de información sobre este microorganismo emergente y para tratar y controlar eficazmente

cualquier evento epidemiológico causado por *Aeromonas* spp. en el futuro.

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de cualquier tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. El documento firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, a la Secretaría de Investigación y Posgrado, y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFAA), asimismo al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por los recursos otorgados para la realización del presente trabajo de investigación.

RESUMEN

Las especies del género *Aeromonas* se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas acuáticos, son bacilos Gram negativas, oxidasa positivas y fermentadoras de glucosa que han sido consideradas patógenas emergentes en humanos. Por otra parte, *Aeromonas* pertenece a la microbiota normal de los peces, no obstante, estos microorganismos poseen una diversidad de factores de virulencia responsables de una variedad de infecciones en humanos, principalmente de tipo gastrointestinal. La presencia de *Aeromonas* en productos destinados a consumo de alta demanda comercial como la tilapia genera preocupación sanitaria por el potencial patogénico que posee esta bacteria. En este contexto, identificar genes de virulencia presentes en cepas de *Aeromonas* aisladas en *Oreochromis* spp. para consumo humano en Reynosa, Tamaulipas, México; es de importancia ante la escasez de estudios moleculares al respecto en la zona. En el presente estudio se analizó el potencial patogénico de 15 cepas de *Aeromonas* previamente identificadas molecularmente mediante PCR y secuenciación, procedentes de *Oreochromis* spp. Mediante PCR se analizaron seis genes de virulencia (*alt*, *ast*, *aerA*, *hlyA*, *gcat* y *stx1*) y las cepas utilizadas como control fueron: *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, *Aeromonas caviae* 429865 INP, *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* K12. El 100 % (n = 15) de las cepas presentaron al menos un gen de virulencia, el gen *aerA* se detectó en 86.66 % de las cepas analizadas,

mientras que los genes *ast* y *stx1* no fueron identificados. Se encontró que las cepas de *Aeromonas* presentaban genes asociados en una misma cepa: *aerA/gcat*, *alt/aerA*, *alt/aerA/gcat/hlyA* y *alt/aerA/gcat*, de los cuales *aerA/gcat* se observó con mayor frecuencia y principalmente en *A. veronii*, mientras que, *A. hydrophila* presentó el mayor número de asociaciones de genes de virulencia. Estos hallazgos indican que las cepas de *Aeromonas* aisladas en *Oreochromis* spp. tienen el potencial de causar enfermedades en humanos. Por lo tanto, es necesario proporcionar información sobre esta bacteria emergente, para tratar y controlar eficazmente cualquier posible evento epidemiológico causado por la misma.

Palabras clave: *Aeromonas*; ecosistema; humanos; genes de virulencia; gastrointestinal; *Oreochromis*.

REFERENCIAS

- Abdullah, A. I., Hart, C. A., & Winstanley, C. (2003). Molecular characterization and distribution of virulence-associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1001-1007.
- Abu-Elala, N., Abdelsalam, M., Marouf, S., & Setta, A. (2015). Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and *gvrB*-based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. *Letters in Applied Microbiology*, 61(5), 429-436.
- Aguilera-Arreola, M. G., Hernández-Rodríguez, C., Zúñiga, G., Figueras, M. J., & Castro-Escarpulli, G. (2005). *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiology Letters*, 242(2), 231-240.
- Aguilera-Arreola, M. G., Hernández-Rodríguez, C., Zúñiga, G., Figueras, M. J., Garduño, R. A., & Castro-Escarpulli, G. (2007). Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 877-87.
- Batra, P., Mathur, P., & Misra, M. C. (2016). *Aeromonas* spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 8(1), 1-4.
- Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M. G., Giono-Cerezo, S., Hernández-Rodríguez, C. H., Rodríguez-Chacón, M., Soler-Falgas, L., ... Figueras-Salvat, M. J. (2002). El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 22(4), 1-12.
- Castro-Escarpulli, G., Figueras, M. J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G. O., ... Chacón, M. R. (2003). Characterisation of

- Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 41-49.
- Chacón, M. R., Figueras, M. J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., & Guarro, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84, 269-278.
- Chopra, A. K., & Houston, C. W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, 1(13), 1129-1137.
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma, Italia: FAO.
- Figueras, M. J., & Beaz-Hidalgo, R. (2015). *Aeromonas* infections in humans. In J. Graf (Ed.), *Aeromonas* (pp. 65-108). Norfolk, GB: Caister Academic Press.
- Fuentes, M., Valladares, J., Grass, G., & Pico, Y. (2011). Microbiota de interés para la salud pública de *Oreochromis* spp. (tilapia roja) cultivada en jaulas flotantes en agua dulce. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 28(2), 74-80.
- Grande-Burgos, M. J., Romero, J. L., Pérez-Púlido, R., Cobo-Molinos, A., Galvez, A., & Lucas, R. (2018). Analysis of potential risks from the bacterial communities associated with air-contact surfaces from tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish farming. *Environmental Research*, 160, 385-390.
- Hernández-Cortez, C., Méndez-Tenorio, A., Aguilera-Arreola, M. G., & Castro-Escarpulli, G. (2013). Design and standardization of four multiplex polymerase chain reactions to detect bacteria that cause gastrointestinal diseases. *African Journal of Microbiology Research*, 7(21), 2673-2681.
- Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2017). Species Distribution and Prevalence of Putative Virulence Factors in Mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from Fresh Retail Sushi. *Frontiers in Microbiology*, 8, 931.
- Igbinosa, I. H., & Okoh, A. I. (2013). Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. *Journal of Basic Microbiology*, 53(11), 895-901.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35-73.
- Khor, W. C., Puah, S. M., Tan, J., Puthucherry, S., & Chua, K. H. (2015). Phenotypic and Genetic Diversity of *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Lakes in Malaysia. *PLoS ONE*, 10(12), e0145933.
- Mendes-Marques, C. L., Nascimento, L. M., Theophilo, G. N. D., Hofer, E., Melo-Neto, O. P., & Leal, N. C. (2012). Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during a diarrhea outbreak. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(6), 299-304.
- Nawaz, M., Khan, S. A., Khan, A. A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., & Steele, R. (2010). Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiology*, 27(3), 327-331.
- Novoa-Farías, O., Frati-Munari, A. C., Peredo, M. A., Flores-Juárez, S., Novoa-García, O., Galicia-Tapia, J., & Romero-Carpio, C. E. (2016). Susceptibilidad de las bacterias aisladas de infecciones gastrointestinales agudas a la rifaximina y otros agentes antimicrobianos en México. *Revista de Gastroenterología de México*, 81(1), 3-10.
- Onuk, E. E., Findik, A., Turk, N., Altun, S., Korun, J., Ozer, S., ... Ciftci, A. (2013). Molecular identification and determination of some virulence genes of *Aeromonas* spp. in fish and water from Turkish coastal regions. *Revista de Medicina Veterinaria*, 164, 200-206.
- Ottaviani, D., Parlani, C., Citterio, B., Masini, L., Leoni, F., Canonico, C., ... Pianetti, A. (2011). Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 538-545.
- Pablos, M., Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. L. (2009). Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 158-164.
- Palma-Martínez, I., Guerrero-Mandujano, A., Ruiz-Ruiz, M. J., Hernández-Cortez, C., Molina-López, J., Bocanegra-García, V., & Castro-Escarpulli, G. (2016). Active shiga-like toxin produced by some *Aeromonas* spp., isolated in Mexico City. *Frontiers in Microbiology*, 7(1), 1-7.
- Prediger, K. de C., Pereira, R. da S., Neto, C. H. del P. W., Santos, R. C. V., Fadel-Picheth, C. M. T., & Vizzotto, B. S. (2012). A prospective study on *Aeromonas* in outpatients with diarrhea in the central region of Rio Grande do Sul State. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 966-968.
- Sánchez-Varela, A., Ortega-Balleza, J. L., Rodríguez-Luna, I. C., & Guo, X. (2018). Molecular identification of *Aeromonas* spp. isolated from water in northeastern México. *ECORFAN Journal-Bolivia*, 5-8, 14-8.
- Silva, L. C. A. da, Leal-Balbino, T. C., Melo, B. S. T. de, Mendes-Marques, C. L., Rezende, A. M., Almeida, A. M. P. de, & Leal, N. C. (2017). Genetic diversity and virulence potential of clinical and environmental *Aeromonas* spp. isolates from a diarrhea outbreak. *BMC Microbiology*, 17, 179.

- Soler, L., Figueras, M. J., Chacón, M. R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A. J., & Guarro, J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32(3), 243-247.
- Suárez, Q. W. & Herrera, A. F. (2012). Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2846-2851.
- Tomás, J. M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiology*, 2012, 1-22.
- Tsheten, T., Tshering, D., Gyem, K., Dorji, S., Wangchuk, S., Tenzin, T., ... Jamtsho, T. (2016). An Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Food Poisoning in Deptsang Village, Samdrup Jongkhar, Bhutan. *Journal of Research in Health Sciences*, 16(4), 224-227.
- Yu, H. B., Zhang, Y. L., Lau, Y. L., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., ... Leung, K. Y. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134 / 91. *Applied Environmental Microbiology*, 71(8), 4469-4477.
- Zhou, Q. L., Wang, Y. J., Xie, J., Ge, X. P., Xi, B. W., & Liu, B. (2013). Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment. *Polish Journal of Microbiology*, 62(3), 299-302.