

EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES DE *Aeromonas hydrophila* Y SUS EFECTOS EN TILAPIA ROJA (*Oreochromis* spp.) Y CACHAMA BLANCA (*Piaractus brachypomus*)

Aeromonas hydrophila Extracelullar Products Extraction and its Effects on Tilapia Roja (*Oreochromis* spp.) and Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*)

RODRÍGUEZ M, BOTERO E, IREGUI CA, FIGUEROA J
Grupo de Investigación en Fisiopatología Veterinaria,
Departamento de Ciencias para la Salud Animal,
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia,
Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Presentado abril 29 de 2005, aceptado agosto 22 de 2005, correcciones septiembre 1 de 2005.

RESUMEN

Se obtuvo un extracto crudo toxigénico (ECT) de *A. hydrophila* en diversos medios de cultivo como caldo BHI con extracto de levadura, soya tripticasa (TSB) y medio de sales mínimas (MSM). Además, se usaron diversas técnicas de concentración como la precipitación con solventes ácidos y concentración por deshidratación a 4 °C; como técnica integrada de cultivo y concentración se usó el cultivo sobre papel celofán. Los extractos se pasaron por columna de cromatografía (QAE)-Sephadex A-50 y se les efectuó electroforesis en SDS-PAGE. Se midió la actividad biológica *in vitro* (actividad hemolítica y proteolítica) e *in vivo* (toxicidad en peces). Los resultados indican que para la cepa de trabajo utilizada y bajo nuestras condiciones de cultivo (28 °C) el medio óptimo para la obtención de extracto es el MSM, y la técnica de concentración más adecuada es la deshidratación a 4 °C. El extracto obtenido en TBS tuvo una actividad hemolítica de 128 UH/ μ L, proteolítica de 38,4 UP/ μ L, produjo alta mortalidad en peces y severas lesiones multiorgánicas. La electroforesis reveló bandas nítidas de 50 a 52 kDa y 63 a 68 kDa, que pueden corresponder a β hemolisina y a α hemolisina y otras tenues de 30 a 36 kDa que pueden corresponder a la metaloproteasa termoestable.

Palabras clave: *Aeromonas hydrophila*, productos extracelulares (PEC), hemolisinas, septicemia hemorrágica.

ABSTRACT

A toxigenic raw extract of *A. hydrophila* was obtained from diverse culture medium (BHI with extract of yeast, (TSB) y minimum salt medium (MSM)) and diverse concentration techniques. Extracts were processed by Sephadex A-50 (QAE) and SDS-PAGE electrophoresis. Biological activity was measured *in vitro* (hemolytic and proteolytic activity)

and *in vivo* (toxicity in fish). The results indicate that the optimal culture condition was 28 °C and MSM was the optimum medium to extract. Dehydration at 4 °C was the most adequate concentration technique. TBS extract obtained had an hemolytic activity of 128 UH/ μ L and a proteolytic activity of 38.4 UP/ μ L and produced high fish mortality and severe multiorganic lesions. Electrophoresis revealed bands from 50 to 52 kDa y 63 to 68 kDa, that could correspond to the β hemolisina or α hemolisina y other from 30 to 36 kDa that could correspond to the thermostable metalloprotease.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, extracelular products, hemolinsins, haemorrhagic septicemia.

INTRODUCCIÓN

La *Aeromonas hydrophila* es un cocobacilo Gram-negativo, mótil, anaerobio facultativo, habitante normal del agua y del tracto gastrointestinal de animales acuáticos y terrestres. Sin embargo, bajo condiciones ambientales no completamente conocidas, puede iniciar procesos patológicos en peces y mamíferos. Se aísla frecuentemente de peces enfermos y causa mortalidad con grandes pérdidas económicas (CTSA, 1996; Lilley *et al.*, 1998). En el humano se reportan infecciones con *A. hydrophila* que inducen gastroenteritis, meningitis, endocarditis, etc., principalmente en neonatos (Pazzaglia *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1990; Begue *et al.*, 1994; García *et al.*, 1999; Falcon *et al.*, 2001). En peces se describen tres formas de la enfermedad: la septicémica; la cutánea, con lesiones limitadas a piel y músculo; y una forma latente, que es una forma sistémica sin presentación de signos clínicos (Grizzle y Kiryu, 1993). La bacteria posee múltiples factores de virulencia, como los productos extracelulares (PEC), los factores de superficie, factores asociados a células, plásmidos y sistemas de restricción/modificación, que parecen desempeñar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad en peces. No obstante, no se ha logrado esclarecer con exactitud cuál de todos es el que tiene mayor importancia en el desencadenamiento y desarrollo de la enfermedad (Thune *et al.*, 1986; Khalil y Mansour, 1997).

Los PEC corresponden a las diferentes proteínas extracelulares secretadas por la bacteria que se obtienen a partir de un extracto crudo toxigénico, y entre las cuales están principalmente la α y β hemolisina, varias proteasas como la metaloproteasa termoestable (MPTE), una serina proteasa termoestable (SPTE) y otra termolábil (SPTL), lipasas, enterotoxinas como la citotóxica y la citotónica, sideróforos, quitina-sas y amilasas. Los PEC de *A. hydrophila* causan muerte en peces al ser inoculados intraperitonealmente y cursan con lesiones extensas en músculo al ser inyectados por esta vía. Se considera que dicha acción se debe a la actividad de proteasas y hemolisinas (Allan y Stevenson, 1981; Thune *et al.*, 1986; Cahill, 1990). Existe controversia referente al papel de la β hemolisina en la patogénesis de la enfermedad en peces. En algunos estudios, (revisado por Cahill 1990), no encontraron actividad tóxica de las hemolisinas en peces, en contradicción con los hallazgos de Allan y Stevenson (1981), quienes describieron correlación entre la producción de hemolisinas y toxicidad en estas especies. Khalil y Mansour (1997) atribuyeron la mortalidad en peces a las hemolisinas y proteasas. Estos dos

factores de virulencia parecen ser los de mayor importancia en el desarrollo de la enfermedad en peces. El propósito de este trabajo fue obtener un extracto crudo toxigénico con los PEC de *A. hydrophila*, estandarizar una técnica para su producción determinado las condiciones de cultivo adecuadas para nuestra cepa de trabajo y verificar su actividad hemolítica y proteolítica *in vitro* e *in vivo*; además, se intentó la extracción y caracterización de la β hemolisina.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPA BACTERIANA

La cepa de *A. hydrophila* se obtuvo de un brote de septicemia hemorrágica en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) en el Japón (amablemente donada por el Doctor. H. Kawatzu). La cepa se sembró en agar soya tripticasa (TSA) y en medio AH (medio *Aeromonas hydrophila*) a 28 °C durante 18 horas, se hizo tinción de Gram, se clasificó por pruebas bioquímicas (Imzilin *et al.*, 1997; Imbert y Gancel, 2004) y se efectuó la prueba de Cristal BBL® para enterobacterias no fermentadoras. Para determinar la actividad hemolítica se cultivó en TSA con sangre ovina al 5% (v/v) y se sembró en agar con leche descremada al 5% (v/v) para estimar la actividad proteolítica (Espinosa de los Monteros y Labarta, 1988; Esteve *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1998). Posteriormente la bacteria se conservó en caldo soya tripticasa (TSB) con glicerol al 25% (v/v) a -20 °C (Santos *et al.*, 1996, 1999).

VALORACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LA CEPA

Para incrementar el grado de virulencia de la cepa y evaluar su patogenicidad se inocularon intraperitonealmente cinco híbridos de tilapias rojas (*Oreochromis spp.*) y cinco cachamas blancas (*Piaractus brachipomus*) de 7-10 g de peso a la dosis de 10⁷ UFC en 0,1 μ L de solución salina fisiológica (SSF), previa anestesia con tricaina metasulfonato [Etil m-aminobenzoato metasulfonato (TMS)] (Dierckens *et al.*, 1998; Moretti, 2002; Outside Microbiology, 2002). Los peces se mantuvieron en acuarios de 70 L a 28 °C y se observaron por 72 horas. Los que presentaron signología se sacrificaron por corte cervical previa anestesia, y se intentó el reaislamiento de la bacteria en TSA a partir de hígado, riñón y bazo. Los tejidos se fijaron en formaldehído al 3,7% y se procesaron para la técnica histológica de rutina de hematoxilina y eosina (H&E). Los peces que no presentaron signología 72 horas post-infección, se sacrificaron y se manejaron en la misma forma que los enfermos (Grizzle y Kiryu, 1993; Khalil y Mansour, 1997; Matsche y Grizzle, 1999).

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO TOXIGÉNICO E INTENTO DE PURIFICACIÓN DE LA HEMOLISINA

Cultivo para la producción de los PEC. Se emplearon combinaciones de medios de cultivo y diferentes condiciones para la producción de los PEC. Se ensayaron: caldo infusión cerebro-corazón (BHI) más extracto de levadura (0,2% p/v; Ljungh *et al.*, 1981; Scheffer *et al.*, 1988; Barry *et al.*, 2001), TSB con y sin extracto de levadura al 0,2% (p/v); (Burke *et al.*, 1984; Majeed *et al.*, 1990), medio de sales mínimas con glicerol y ácido l-glutámico (MSM); (Allan y Stevenson, 1981; Riddle *et al.*, 1981; Asao *et al.*, 1986) y cultivo sobre papel celofán (Liu, 1957; Fackrell y Wiseman, 1976; Fujita *et al.*, 1988). La

bacteria previamente cultivada en TSA a 28 °C por 18 horas se suspendió en 5 µL de SSF y se sembraron 2 µL (10⁵ UFC) de la suspensión bacteriana por mL de cada uno de los medios líquidos mencionados a 28 °C por 40 horas con o sin agitación constante (Ljungh *et al.*, 1981; Asao *et al.*, 1984). Se inyectó aire filtrado por membrana de Millipore® 0,22 µm, para oxigenar y agitar el medio (Wretlind *et al.*, 1973; Asao *et al.*, 1984). Al finalizar el período de incubación los medios se centrifugaron a 6.000 x g por una hora a 4 °C y el sobrenadante se filtró en membrana de millipore 0,22 µm.

Determinación del pico de actividad hemolítica. La dinámica de la actividad hemolítica se determinó a través del tiempo con el fin de identificar el momento óptimo de cultivo para la producción de los PEC. La bacteria se sembró en TBS a 28 °C. Se utilizaron los sobrenadantes del medio de cultivo cada 2 horas por un intervalo de 50 horas, previa centrifugación a 3.000 x g por 30 minutos a temperatura ambiente (18 °C; Khalil y Mansour, 1997) y filtración a través de membrana de Millipore® 0,22 µm. Se usó la técnica de determinación de la actividad hemolítica reportada por Asao *et al.* (1984) y Kozaki *et al.* (1987).

Separación de la hemolisina. Para el intento de extracción de la hemolisina se utilizaron los extractos crudos obtenidos en TSB. Se concentraron y separaron por cromatografía. Para concentrar los extractos crudos se utilizó deshidratación a 4 °C y precipitación ácida de proteínas. La primera se hizo en membranas de diálisis (Sigma) de 12 kDa de tamaño de poro que se expusieron a flujo de aire frío constante a 4 °C por un lapso de 12 a 18 horas (Ljungh *et al.*, 1981; Loghothetis y Austin, 1996). Para la precipitación ácida se ensayaron dos técnicas: precipitación con H₂SO₄ 3 N más ARN de levadura tipo VI (Sigma® R-6625) y precipitación con ácido tricloroacético al 5% (Iwasaki y Sakaguchi, 1978; Asao *et al.*, 1984). La separación se efectuó por cromatografía en columna de aminoetil cuaternario (QAE)-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals®). Se midió la proteína a una longitud de onda de 280 nm, posteriormente se conservaron con azida de sodio al 0,02 % a 4 °C (Sigma® S-2002; Loghothetis y Austin, 1996). A los picos de proteína se les midió actividad hemolítica, y al que mostró mayor actividad se le hizo electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE. Igualmente se efectuó esta prueba a los extractos crudos de los cultivos en los medios de sales mínimas y TSB, y a los concentrados por deshidratación: al precipitado con ácido tricloroacético y al pico de proteínas obtenido por cromatografía. Se usó un gel de resolución 12,5%T-2,5%C y otro de concentración de 3%T-2,5%C con 0,1% de SDS en cámara Mini-V 8-10 BRL® y fuente de poder Kyoritsu KM-86® a 110 V (Towbin *et al.*, 1979; García, 2000). Se utilizaron patrones de bajo peso molecular constituidos por lisozima (14 kDa), tripsinógeno (24 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y albúmina sérica bovina (66 kDa; Neville, 1971). Para la visualización de las bandas de proteína se hizo tinción con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,2% (Asao *et al.*, 1984; Stelma *et al.*, 1986; Kozaki *et al.*, 1987; Tegtmeier *et al.*, 1995).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PEC

Para la determinación de la actividad hemolítica se desarrolló una prueba cualitativa utilizando cultivos en cajas de *Petri* con TSA con sangre ovina desfibrinizada al 5% (v/v)

con el fin de observar halos de hemólisis alrededor de las colonias y una cuantitativa en placa de microtécnica utilizando glóbulos rojos de diferentes especies (tilapia, cachama, ratón, rata, conejo, ovino, canino, caballo, bovino y humano, grupo sanguíneo A+) usando volúmenes finales de 200 μ L, que se leyó a una longitud de onda de 540 nm, en un lector de microplaca de ELISA (Kozaki *et al.*, 1989; Ferguson *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998). Se usaron los PEC sin concentrar y concentrados por deshidratación en diluciones al doble desde 1:2 hasta 1:8192. Una unidad hemolítica (UH) se definió como el recíproco de la mayor dilución capaz de lisar el 50% de los eritrocitos (+0,4 de absorbancia; Ljungh *et al.*, 1981). Como la literatura reporta que el tratamiento con tripsina mejora la actividad hemolítica se incubó una muestra de PEC con 1 mg/mL de tripsina para probar su efecto (Asao *et al.*, 1986; Ferguson *et al.*, 1997; Krause *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999). Para la determinación de la actividad proteolítica se estableció una prueba cualitativa cultivando la bacteria en TSA con leche descremada al 5% (v/v). Halos translúcidos alrededor de las colonias se consideraron un resultado positivo. (Ljungh *et al.*, 1981; Sakai, 1985; Paniagua *et al.*, 1990). De forma cuantitativa se empleó la técnica descrita por Sakai (1985) empleando caseína. Una unidad proteolítica (UP) se definió como el incremento de 0,001 en la absorbancia a 280 nm respecto al control negativo (Marsden *et al.*, 1996; Khalil y Mansour, 1997).

PATOGENICIDAD DE LOS PEC EN PECES

Se tomaron híbridos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y cachamas blancas (*Piaractus brachypomus*) de 7-10 g de peso, y se inocularon intraperitonealmente con los PEC producidos en TBS con una concentración original de proteína de 2,3 μ g/mL, 128 UH/mL y 38,4 UP/mL. Se hicieron diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:64 y se inocularon cinco animales para cada dilución y especie de pez, con 0,1 mL/pez; se inoculó un grupo con los PEC sin diluir. Se utilizó la misma metodología y las condiciones que para la valoración de la patogenicidad de la cepa (Allan y Stevenson, 1981; Khalil y Mansour, 1997). El grupo control fue inoculado con SSF estéril. A los peces moribundos se les hizo necropsia y los tejidos se fijaron en formaldehído al 3,7% y se procesaron con la técnica histológica de rutina para H&E; se procesaron dos animales por cada especie a los 5, 15, 30, 60, 120 y 240 min; al cabo de 72 horas los que sobrevivieron fueron sacrificados.

RESULTADOS

AISLAMIENTO DE LA CEPA Y VALORACIÓN DE SU PATOGENICIDAD

Tanto la morfología como las pruebas bioquímicas practicadas a la bacteria coincidieron con los patrones descritos para la *A. hydrophila* (Popoff y Véron, 1976; Popoff *et al.*, 1984; Imzilin *et al.*, 1997; Popovic *et al.*, 2000). La prueba de Cristal BBL® mostró una especificidad del 99,9%. En la prueba de patogenicidad, tanto las tilapias como las cachamas mostraron el cuadro de septicemia hemorrágica reportado por la literatura (Paniagua *et al.*, 1990; Swann y White, 1991; Grizzle y Kiryu, 1993). Fue evidente la dilatación abdominal, la ascitis, la protrusión anal y las múltiples hemorragias petequiales en diversos órganos. Algunas tilapias desarrollaron intususcepción intestinal. La cepa inoculada se recuperó de bazo, hígado y riñón de animales moribundos.

PREPARACIÓN DE LOS PEC Y EXTRACCIÓN DE LA HEMOLISINA

La figura 1 indica la dinámica hemolítica de la cepa sobre eritrocitos de conejo, el pico máximo de actividad hemolítica se notó a partir de las 36 horas de cultivo sin agitación, y se mantuvo hasta las 50 horas, tiempo que se utilizó en los ensayos posteriores.

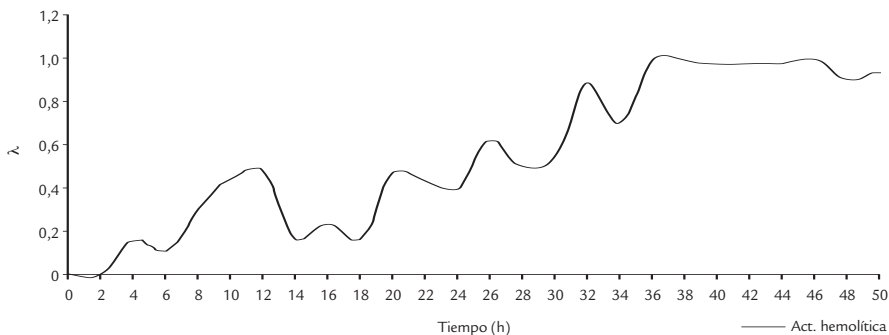


Figura 1. Dinámica hemolítica de la *A. hydrophila* sobre eritrocitos de conejo. El pico máximo de actividad hemolítica ocurrió a partir de las 36 horas y se mantuvo durante el tiempo evaluado (50 horas).

Las técnicas para la precipitación ácida de proteínas no dieron buenos resultados. La técnica de precipitación proteica con solventes ácidos (H_2SO_4) no mostró ningún precipitado y con la de ácido tricloroacético al 5% (p/v) se obtuvo un volumen muy pequeño de precipitado (600 μ L), con concentración baja de proteína (293 μ g/mL). En contraste, la deshidratación a 4 °C produjo 1.900 μ g/ μ L de proteína y un volumen de 4 mL. Este extracto se cargó en columna de cromatografía y mostró dos picos pequeños de proteína retenida que fueron eluidos por el gradiente lineal con NaCl (Fig. 2), el primer pico no tuvo actividad hemolítica y el segundo presentó actividad muy leve (2 UH/mL), y baja concentración de proteína (108 μ g/mL). En las condiciones anotadas, la baja actividad hemolítica de los PEC sumada a la concentración de proteína igualmente baja no permitió la separación de la toxina.

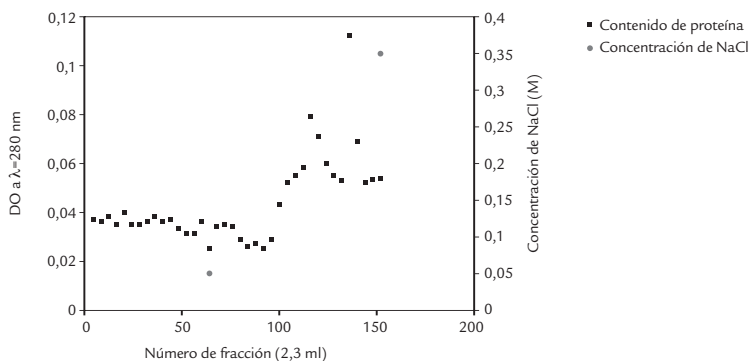


Figura 2. Cromatografía de los PEC en (QAE)-Sephadex A-50. Se obtuvieron dos picos pequeños de proteína con el eluido de gradiente lineal de NaCl.

Como se muestra en la figura 3, cuando se efectuó la prueba de SDS-PAGE a los extractos crudos del cultivo en TBS precipitados con ácido tricloroacético, a los concentrados por deshidratación y al segundo pico de proteínas de la cromatografía se obtuvieron bandas muy tenues de tres pesos moleculares diferentes: una de 30 a 36 kDa, otra de 50 a 52 kDa y la tercera de 63 a 68 kDa. Por otra parte, con el concentrado a partir del cultivo en MSM se obtuvieron bandas de los mismos pesos pero mucho más nítidas en el gel, especialmente las de 50 a 52 kDa y 63 a 68 kDa.

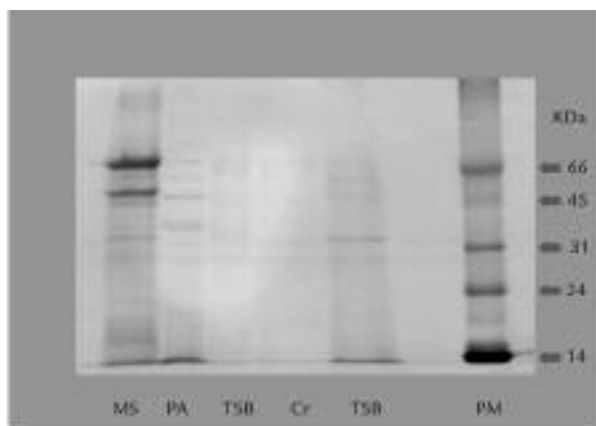


Figura 3. Electroforesis de extractos crudos de *A. hydrophila*. Se observan bandas muy tenues de tres diferentes pesos obtenidos de cultivo en caldo soya tripticasa (TSB), precipitado con ácido tricloroacético (PA), segundo pico de proteínas de cromatografía (Cr): 32 a 36 kDa (v), otra de 50 a 52 kDa (Ø) y la tercera de 63 a 68 kDa (v). En el PEC obtenido a partir del cultivo en MSM (MS) se visualizan bandas más notorias: 50 a 52 kDa y 63 a 68 kDa. En orden: MS: PEC a partir de MSM, PA: precipitado con ácido tricloroacético, TSB: caldo soya tripticasa (15 µg de proteína), Cr: segundo pico de proteína de cromatografía, TSB: caldo soya tripticasa (30 µg de proteína), PM: patrón de peso molecular.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PEC

Pruebas *in vitro*. La bacteria cultivada en TSA con sangre al 5% (v/v) presentó zonas claras de hemólisis alrededor de las colonias después de 24 horas a 28 °C. Del mismo modo, se apreciaron halos claros de proteólisis con leche descremada al 5% (v/v). Los extractos crudos no concentrados producidos en TSB dieron título hemolítico en sangre de conejo de 8 UH/mL y proteolítico de 1 UP/mL, y los de cultivo sobre papel celofán, caldo BHI y medio MSM, mostraron 8, 4 y 10 UH/mL, respectivamente. Los extractos en TSB concentrados por deshidratación incrementaron en 16 veces la actividad hemolítica (128 UH/mL) y en 38,4 la proteolítica (38,4 UP/mL); los PEC concentrados por precipitación ácida tuvieron menos de 2 UH/mL. En la tabla 1 se encuentran los títulos hemolíticos de los PEC producidos en TSB y concentrados por deshidratación enfrentados a eritrocitos de diferentes especies animales. Los glóbulos rojos de rata demostraron la mejor actividad hemolítica seguidos por los de ratón, canino y conejo. A los PEC producidos en MSM no se les hizo el anterior procedimiento debido al bajo volumen disponible.

Pruebas *in vivo*. De las tilapias y cachamas inoculadas intraperitonealmente con los PEC, únicamente presentaron signos y lesiones las inoculadas con el extracto crudo sin diluir y en dilución 1:2. En las cachamas no hubo mortalidad y en general fueron más resistentes que las tilapias, aunque se vio letargia severa y ascitis marcada. Al cabo de dos horas se recuperaron y no exhibieron cambios macro ni microscópicos después de este tiempo. Las cachamas que se procesaron antes de las dos horas post-inoculación en general mostraron congestión severa y hemorragias petequiales en la cavidad abdominal. En las que mostraron signos, microscópicamente se observó degeneración hialina en músculo liso del tracto gastrointestinal, principalmente en estómago, con contracción de las fibras musculares, formación de espacios translúcidos entre sí y necrosis multifocal severa de la pared (Fig. 4B), necrosis severa del páncreas (Fig. 4D) y vacuolización severa en el hígado. En el tejido hematopoyético esplénico y del riñón anterior hubo alteración de la arquitectura y acúmulo de estructuras hialinas, aparentemente glóbulos rojos en proceso de muerte (Figs. 4F y 4H). En el riñón posterior fue frecuente el desprendimiento y la degeneración de las células tubulares por material hialino (Fig. 4J). Se presentaron degeneración hialina en la pared muscular de la cavidad abdominal y en el miocardio, y endocarditis. Los cambios microvasculares fueron leves y se limitaron a la cavidad abdominal, el hígado y el tracto gastrointestinal, con leve congestión, edema y hemorragia (Fig. 4B). Las tilapias tuvieron en los estadios iniciales (1-2 horas post-inoculación) signos como nado errático, oscurecimiento de la piel, excitación con estadios de letargia y episodios de aumento marcado o disminución de movimientos operculares. En la necropsia se vio enrojecimiento de las branquias, ascitis con fluido hemorrágico (en ocasiones oscuro y de mal olor), reblandecimiento de la pared abdominal, y hemorragias petequiales en pared y en diversos órganos de la cavidad abdominal. En dos casos, una tilapia inoculada con extracto crudo sin diluir y una con dilución 1:2, se presentó intususcepción del intestino.

Especie	UH/ μ L
Ovino	<2
Humano (A+)	2
Tilapia	2
Cachama	2
Bovino	2
Equino	4
Conejo	128
Canino	256
Ratón	512
Rata	1024

Tabla 1. Actividad hemolítica de los PEC de *A. hydrophila* sobre eritrocitos de diferentes especies.

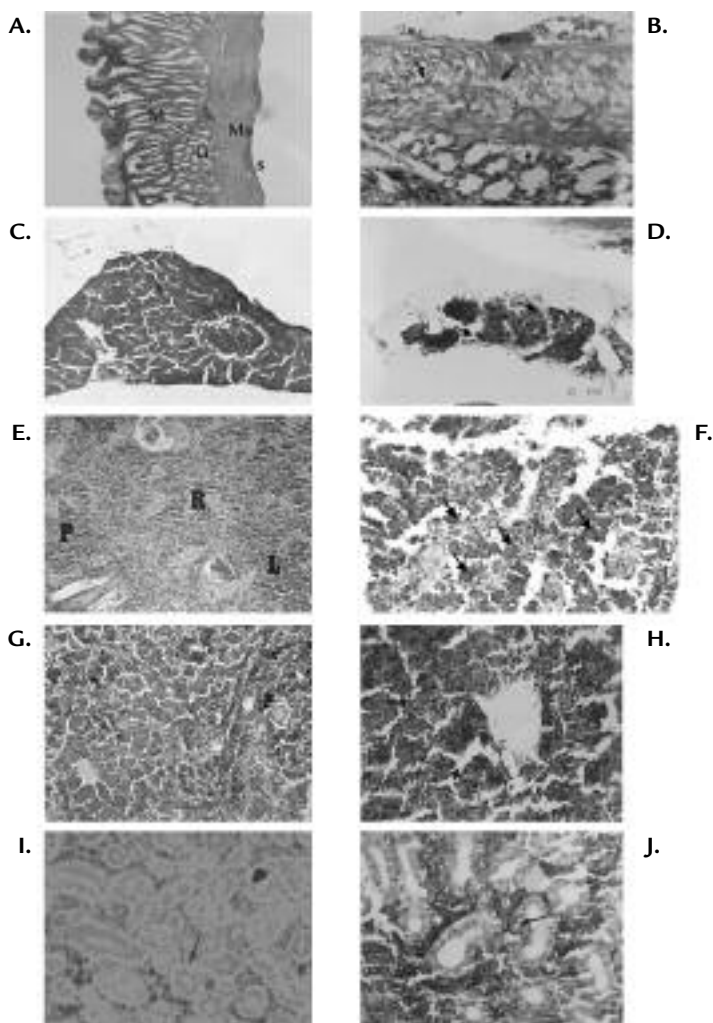


Figura 4. Morfología. A. Estómago normal de cachama blanca. Mucosa gástrica (M), tejido glandular (G), muscular (Ms) y serosa (S) H-E (aprox. 100x). B. Estómago de cachama blanca inoculada con PEC. Hialinización y vacuolización severas del tejido muscular (→) H-E (aprox. 400x). C. Páncreas normal de cachama blanca. Se observa la estructura acinar compuesta por células con citoplasma basófilo y con numerosos gránulos secretorios citoplasmáticos de color eosinófilo (→) H-E (aprox. 200x). D. Páncreas de cachama blanca inoculada con PEC. Necrosis, nótese los núcleos picnóticos (→) y separación entre células (◆) H-E (aprox. 400x). E. Bazo normal de cachama blanca. Pulpa roja (P), tejido reticular (R) y tejido linfoide (L) H-E (aprox. 100x). F. Bazo de cachama blanca inoculada con PEC. Acúmulo severo de estructuras hialinas, en algunas se aprecia el núcleo desplazado a la periferia (→) H-E (aprox. 400x). G. Riñón anterior normal de cachama blanca. Abundantes leucocitos (→) y tejido tiroideo (◆) H-E (aprox. 200x). H. Riñón anterior de cachama blanca inoculada con PEC. Acúmulo de estructuras hialinas (◆) H-E (aprox. 400x). I. Riñón posterior normal de cachama blanca. Túbulos renales (→) y escaso tejido hematopoyético (◆) H-E (aprox. 200x). J. Riñón posterior de cachama blanca inoculada con PEC. Acúmulo de estructuras hialinas principalmente entre el tejido hematopoyético (→) H-E (aprox. 400x).

En el grupo de tilapias inoculadas con los PEC sin diluir murieron cuatro de cinco, mientras que en el de dilución 1:2 murieron tres de cinco. La mortalidad ocurrió antes de la hora y media post-inoculación. En esta especie los cambios histopatológicos fueron similares a los de las cachamas.

DISCUSIÓN

Las pruebas bioquímicas practicadas a la cepa junto con la morfología y tinción de Gram siempre correspondieron a lo reportado por la literatura para *A. hydrophila* (Popoff y Véron, 1976; Popoff *et al.*, 1984; Imzilin *et al.*, 1997; Popovic *et al.*, 2000). Los signos clínicos de los peces inoculados con la misma confirmaron su virulencia y fueron compatibles con los reportados por diferentes autores (Paniagua *et al.*, 1990; Swann y White, 1991; Grizzle y Kiryu, 1993). En la mayor parte de la literatura internacional se utilizan temperaturas de cultivo de 37 °C para la producción de los PEC. La cepa en este trabajo se cultivó a 28 °C, temperatura en la cual se obtuvieron los PEC. Tsai *et al.* (1997) encontraron que las toxinas de *A. hydrophila* se producen a 37, 28 y 5 °C, pero la β hemolisina es más estable cuando la bacteria se cultiva a 28 °C, lo cual fue confirmado en este trabajo, por esta razón concluimos que esta temperatura es la adecuada para la obtención de la β hemolisina.

En este trabajo se probaron diferentes medios de cultivo para la producción de los PEC, entre ellos la β hemolisina. En los que se obtuvo la mejor actividad hemolítica fueron el TSB (8 UH/mL) y el MSM (10 UH/mL). Algunos autores recomiendan la técnica de cultivo sobre papel celofán para mejorar el título hemolítico (Santos *et al.*, 1991 y 1996; Esteve *et al.*, 1995), en nuestros ensayos ni esta técnica, ni la agitación del medio, mejoraron tal actividad (8 UH/mL). Se reporta que los mejores medios para la producción de hemolisina son el TSB y el MSM, y algunos medios suplementados con extracto o RNA de levadura (Wretlind *et al.*, 1973; Riddle *et al.*, 1981, Di Pietro *et al.*, 2004). En nuestro caso, la actividad hemolítica y la producción de bandas de PEC mejor definidas se mostraron cuando la cepa creció en MSM.

El sistema de concentración de los PEC por deshidratación con aireación permanente a 4 °C fue el más efectivo, no solo porque causó la menor pérdida de actividad hemolítica comparado con los métodos de precipitación ácida, sino porque se obtuvo un volumen aceptable de extracto concentrado con buena concentración de proteína. En contraste, algunos reportes consideran que la actividad hemolítica puede disminuir a 4 °C (Allan y Stevenson, 1981). Se reportan otros métodos de concentración como la precipitación con solventes ácidos como HCl 5 N y H₂SO₄ 3 N (Asao *et al.*, 1984 y 1986), sin embargo, nuestros resultados nos permiten sostener que el método de deshidratación aquí utilizado es sencillo y efectivo. Cuando los PEC concentrados se pasaron por la columna de (QAE)-Sephadex A-50 se obtuvieron dos picos pequeños de proteína de los cuales solo el segundo tuvo actividad hemolítica, aunque disminuida en comparación con los PEC concentrados previo a su paso por la columna. La purificación y el almacenamiento hacen lábiles las toxinas de los extractos, perdiendo sus actividades biológicas tanto *in vivo* como *in vitro* debido a factores físicos,

como la temperatura, o químicos, que causan desnaturalización de las proteínas (Allan y Stevenson, 1981; Stelma *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1989a). Barry *et al.* (2001) proponen que la hemolisina se une a geles basados en matrices de agarosa, como los de sephadex, hecho que incrementa su retención y disminuye la actividad hemolítica. Asao *et al.* (1984) encontraron que en cromatografía en (QAE)-Sephadex A-50 la hemolisina eluye en el segundo pico, lo que sugeriría que es factible que en nuestro ensayo el segundo pico corresponda a la hemolisina reportada por ellos, la cual tendría actividad biológica disminuida (Fig. 2), y que no fue posible purificar debido a su baja concentración (108 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total).

El mejor rendimiento de los PEC se obtuvo con el MSM y en la electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes mostraron bandas de tres pesos moleculares de diferente rango: una banda muy nítida, con un peso entre 50 y 52 kDa; otra, igualmente nítida, con un peso entre 63 y 68 kDa; y varias bandas tenues entre 30 y 36 kDa (Fig. 3). La de 50-52 kDa coincide con el peso reportado para la β hemolisina (52 kDa aproximadamente; Bernheimer *et al.*, 1975; Chakraborty *et al.*, 1986, Ferguson *et al.*, 1997; Pemberton *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1998) y la de 63-68 kDa con el reportado para la β hemolisina (65 ± 5 kDa; Ljungh *et al.*, 1981; Thelestam y Ljungh, 1981; Wong *et al.*, 1998). No obstante, también se describe una serina proteasa termolábil de 68 kDa (Cascón *et al.*, 2000) y otra hemolisina reportada por Potomski *et al.* (1987) de 63 kDa cuyas características biológicas son iguales a las de la β hemolisina. Las bandas tenues de 30-36 kDa pueden ser otras proteínas secretadas por la bacteria o liberadas después de la lisis de los microorganismos (Santos *et al.*, 1996). Según el peso, estas proteínas podrían corresponder a: DNAasa (25-30 kDa), glicerofosfolípidocolesterol aciltransferasa (30 kDa), metaloproteasa termoestable (36 kDa) y elastasa (38 kDa; Pemberton *et al.*, 1997; Cascón *et al.*, 2000). En nuestra opinión, en los extractos crudos de *A. hydrophila* se encontrarían las α y β hemolisinas y algunas proteasas. Diferentes autores reportan toxinas en rangos cercanos a 50 y 52 kDa con características hemolíticas, citotóxicas y enterotóxicas, que han recibido diferentes nombres. Algunas son la enterotoxina citolítica o citotóxica (Act; Chopra *et al.*, 2000), aerolisina (Buckley, 2001), AHH3, AHH5 y ASA1 (revisado por Wong *et al.*, 1998), ASH1 y ASH3 (revisado por Heuzenroeder *et al.*, 1999), y HlyA y AerA (Heuzenroeder *et al.*, 1999). Basados en la actividad serológica y la secuenciación de aminoácidos, algunos autores consideran que son diferentes toxinas (Chopra y Houston, 1999; Chopra *et al.*, 2000), mientras que otros creen que podría ser el mismo tipo de molécula con variaciones estructurales según la cepa (Buckley y Howard, 1999).

Cuando la bacteria se cultivó en agar con sangre ovina al 5%, produjo zonas de hemólisis translúcidas como las que reporta la literatura para las cepas productoras de β hemolisina. Aun así, no podemos descartar la presencia de α hemolisina, ya que la α hemólisis es una hemólisis incompleta que se manifiesta como zonas opacas, y la actividad de β hemólisis puede enmascarar la de la α . Aún más, los resultados de la electroforesis mostraron bandas de pesos moleculares muy cercanos para ambas hemolisinas. En nuestro caso, los extractos crudos sin concentrar produjeron actividad hemolítica baja (8 UH/mL en TSB) que mejoró cuando se sometieron a deshi-

dratación (128 UH). Asao *et al.* (1984) encontraron un título de 980 UH/mL en medio TSB sin concentrar, Ljungh *et al.* (1981) describieron un título de 1024 UH/mL, Riddle *et al.* (1981) 156,5-400 UH/mL y Asao *et al.* (1986) 1410 UH/mL. Dado que en este estudio se utilizaron diversos medios para la producción de la β hemolisina, creemos que la escasa producción no dependería del medio de cultivo, sino más bien de que la cepa no sea buena productora de exotoxinas *in vitro* e *in vivo*. La escasa actividad hemolítica podría deberse a la baja concentración de estas toxinas en los extractos. Algunos investigadores reportan diferencias en la actividad biológica de la β hemolisina y en la cantidad de toxina producida dependiendo de la cepa, con diferencias de hasta 30 veces más actividad hemolítica entre una cepa de alta producción frente a otra de poca actividad (Asao *et al.*, 1986). También se han encontrado cepas que son más sensibles a cambios de temperatura para que su toxina se adhiera a eritrocitos de diferentes especies; Kozaki *et al.* (1987) demostraron que la toxina de la cepa AH-1 se une mejor a eritrocitos equinos a 25 °C que a 37 °C y que la toxina de la cepa CA-11 es mucho más hemolítica para estos eritrocitos que la de la AH-1.

Se utiliza la tripsina para incrementar la actividad hemolítica de los PEC considerando que una buena proporción de las toxinas hemolíticas se encuentran en forma de protoxina y que la adición de tal enzima las activaría (Krause *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999). En nuestro experimento no encontramos un aumento en la actividad hemolítica cuando se trataron los PEC con dicha enzima. Como se demostró, los PEC obtenidos en esta investigación tienen actividad proteolítica; esto permitiría suponer que gran parte de las toxinas hemolíticas ya se encontraban en forma activa, y no como protoxina; pequeñas cantidades de proteasa de *A. hydrophila* pueden ser tan efectivas para activar la protoxina como la tripsina (Howard y Buckley, 1985; Cahill, 1990). Kozaki *et al.* (1989) demostraron que la cepa AH-6 de *A. sobria* a las nueve horas de cultivo no mostraba actividad hemolítica, y que solo se manifestaba cuando la toxina se trataba con tripsina; sin embargo, a las 24 horas cuando la cepa liberaba su propia proteasa, la actividad hemolítica era idéntica que al agregar la tripsina. Estos hechos apoyan, aún más, la hipótesis de que la cepa utilizada en este trabajo no es buena productora de hemolisina. Cuando la bacteria se cultivó en agar leche, los PEC produjeron halos tenues de aclaramiento, los cuales correspondieron a 38,4 UP/mL en los extractos concentrados por deshidratación, de manera similar a lo documentado por otros investigadores (Sakai, 1985; Paniagua *et al.*, 1990). Estos hallazgos sugieren que la cepa aquí utilizada produce proteasas que corresponderían a las bandas cercanas a 30-36 kDa mencionadas anteriormente como la MPTE (35-38 kDa).

La inoculación intraperitoneal del extracto crudo sin diluir y con la dilución 1:2 indujo signos clínicos en la mayoría de los animales y ocasionó lesiones en distintos tejidos y órganos. En general, las cachamas fueron más resistentes en cuanto a letalidad que las tilapias, aunque histológicamente presentaron lesiones similares en intensidad y calidad (Fig. 4). Allan y Stevenson (1981) inocularon truchas intraperitonealmente con PEC y encontraron que las truchas de 4 g eran más resistentes que las de 9 g. La mortalidad en truchas fue muy similar (80%) a la de las tilapias en nuestro ensayo (80%), pero aparentemente estas últimas son más susceptibles que las primeras, porque algo menos de

la mitad de la concentración de proteína indujo mayor mortalidad en la dilución 1:2. En nuestro trabajo murieron cuatro tilapias de cinco con los PEC sin diluir, con 12,8 UH, 3,84 UP y 230 μg de proteína por dosis; y murieron tres de cinco para la dilución 1:2 en las primeras dos horas. Por el contrario en el experimento de Allan y Stevenson (1981) los PEC sin diluir (5,3 UH, 34,6 UP y 490 μg de proteína por dosis) produjeron mortalidad en cuatro de cinco truchas; y en una de cinco para la dilución 1:2. Con una cepa deficiente en proteasas (10,84 UH y 460 μg de proteína por dosis), los anteriores autores obtuvieron mortalidad total con inóculos no diluidos y en dilución 1:2. Santos *et al.* (1991) encontraron alta mortalidad en truchas entre las 24 y 48 horas post-inoculación intraperitoneal a dosis de 108-350 μg de proteína. Khalil y Mansour (1997) reportaron mortalidad entre las 12 y 72 horas para tilapias, y encontraron que los PEC causan mayor mortalidad que las bacterias vivas completas, ellos lo explican por las actividades proteolíticas y hemolíticas de los PEC, puesto que la inactivación de las toxinas con calor disminuyó la mortalidad en un 100%. Las mayores lesiones por los PEC se produjeron en el sistema gastrointestinal y sobre los eritrocitos de las cachamas y tilapias (Fig. 4). Debido a la actividad biológica de las exotoxinas sobre el tejido, se le ha dado gran importancia a la β hemolisina (aerolisina o citotoxina enterotóxica), que según múltiples autores posee actividad hemolítica, enterotóxica y citotóxica (Abrami *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1999; Field y Menon, 2000; Nelson y Buckley, 2000). Tal parece ser el caso nuestro, en que el reblandecimiento de la pared abdominal, el acúmulo de fluido ascítico fétido, y la degeneración del músculo liso de tracto gastrointestinal fueron la expresión citolítica de la β hemolisina, o la expresión de la propuesta metaloproteasa termoestable (banda entre 30 y 36 kDa), evidenciada por el redondeamiento y la deformación de los glóbulos rojos de una forma hemolítica incompleta.

En mamíferos, la hemolisina de *A. hydrophila* induce la producción de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleuquina 1 β (IL-1 β) por los macrófagos y células epiteliales del intestino. Esto conduce al aumento en la permeabilidad vascular, causando edema y muerte celular (Cahill, 1990; Chopra y Houston, 1999; Matsche y Grizzle, 1999; Matsuyama e Iida, 1999); es posible que este mecanismo también funcione en los peces. Adicionalmente, esta molécula induce apoptosis en ciertos tipos de células (Fivaz *et al.*, 1999). Esteve *et al.* (1995) encontraron licuefacción de la pared abdominal en anguilas inoculadas con PEC y relacionaron la lesión con alta actividad proteolítica. Sakai (1985) demostró estrecha relación entre la actividad proteolítica de *A. salmonicida* y su patogenicidad, cepas mutantes deficientes en la producción de proteasas fueron menos patógenas que la misma cepa de campo. Khalil y Mansour (1997) concluyen algo similar y consideran que las exotoxinas, hemolisinas, y proteasas de *A. hydrophila* son letales para tilapia, puesto que cepas con alta producción de ellas son más letales que otras con menor producción. Nuestros PEC perdieron completamente su actividad hemolítica y proteolítica, y dejaron de ser letales para los peces cuando se expusieron a temperatura de ebullición del agua por 30 min. Hallazgos similares son reportados a temperaturas superiores de 56 °C por 10 min para hemolisinas (Donta y Haddow, 1978; Ljungh *et al.*, 1981; Khalil y Mansour, 1997) y de 98-100 °C por 10-15 min para proteasas (Allan y Stevenson, 1981; Rose *et al.*, 1989b; Khalil y Mansour, 1997).

En resumen, se obtuvo un extracto crudo toxigénico que contenía los PEC de la *A. hydrophila* con actividad hemolítica de 128 UH/mL y proteolítica de 38,4 UP/mL, y que produjeron bandas entre 30 a 36, 50 a 52 y 63 a 68 kDa, capaces de inducir daños en tejidos de cachama y tilapia, y letalidad en esta última; aparentemente la actividad proteolítica sería más marcada que la hemolítica. El medio de elección para la producción de los PEC es el MSM, que mostró bandas nítidas de proteína en SDS-PAGE. La técnica de deshidratación a 4 °C resultó ser la más adecuada para concentrar el extracto crudo. Los intentos de extracción de la hemolisina fueron infructuosos posiblemente debido a la baja concentración de toxina en los PEC. Se deben adelantar trabajos tendientes a buscar técnicas que permitan manejar volúmenes mayores de PEC.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Gerardo Pérez y Nohora Vega del Grupo de Investigación en Proteínas, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, por su valiosa colaboración y guía.

BIBLIOGRAFÍA

ABRAMI L, FIVAZ M, DECROLY E, SEIDAH NG, JEAN F, THOMAS G, LEPPLA SH, *et al.* The Pore-Forming Toxin Proaerolysin is Activated by Furin. *J Biol Chem.* 1998;273:32656-32661.

ALLAN B, STEVENSON R. Extracellular Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila* in Fish Infections. *Can J Microbiol.* 1981;27:1114-1122.

ASAO T, KINOSHITA Y, KOZAKI S, UEMURA T, SAKAGUCHI G. Purification and some Properties of *Aeromonas hydrophila* Hemolysin. *Infect Immun.* 1984;46:122-127.

_____, KOZAKI S, KATO K, KINOSHITA Y, OTSU K, UEMURA T, *et al.* Purification and Characterization of an *Aeromonas hydrophila* Hemolysin. *J Clin Microbiol.* 1986;24:228-232.

BARRY R, MOORE S, ALONSO A, AUSIÓ J, BUCKLEY JT. The Channel-Forming Protein Proaerolysin Remains a Dimer at Low Concentrations in Solution. *J Biol Chem.* 2001;276:551-554.

BEGUE RE, CASTELLARES G, HAYASHI KE, RUIZ R, MEZA R, ENGLISH CK, *et al.* Diarrheal Disease in Perú After the Introduction of Cholera. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:585-589.

BERNHEIMER AW, AVIGAD LS, AVIGAD G. Interactions Between Aerolysin, Erythrocytes and Erythrocyte Membranes. *Infect Immun.* 1975;11:1312-1319.

BUCKLEY JT, HOWARD SP. The Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is Aerolysin. Letter to the editor. *Infect Immun.* 1999;67:466-467.

BUCKLEY JT. Protox Biotech [on-line]. Victoria Canada. University of Victoria Innovation and Development Corporation. 8 June 2001, [cited February, 2002]. Disponible en: URL: <http://web.uvic.ca/idc/protox/protox.html>

BURKE V, COOPER M, ROBINSON J, GACEY M, LESMANA M, ECHEVERRÍA P, *et al.* Hemagglutination Patterns of *Aeromonas* spp. in Relation to Biotype and Source. *J Clin Microbiol.* 1984;19:39-43.

CAHILL MM. Virulence Factors in Motile *Aeromonas* Species. J Appl Bacteriol. 1990;69:1-16.

CASCÓN A, YUGUEROS J, TEMPRANO A, SÁNCHEZ M, HERNANZ C, LUENGO JM, *et al.* A Major Secreted Elastase is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 2000;8:3233-3241.

CHAKRABORTY T, HUHLE B, BERGBAUER H, GOEBEL W. Cloning, Expression and Mapping of the *Aeromonas hydrophila* Aerolysin Gene Determinant in Escherichia coli K-12. J Bacteriol. 1986;67:368-374.

CHOPRA AK, HOUSTON CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-Associated Gastroenteritis. Microbes Infect. 1999;1:1129-1137.

_____, XU XJ, RIBARDO D, GONZÁLEZ M, KUHL K, PETERSON JW, *et al.* The Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* Induces Proinflammatory Cytokine Production and Activates Arachidonic Acid Metabolism in Macrophages. Infect Immun. 2000;68:2808-2818.

CTSA (CENTER FOR TROPICAL AND SUBTROPICAL AQUACULTURE). Bacterial diseases in chinese catfish. 1996. Publication 122.

DIERCKENS KR, VYENBERGHE J, BELADJAL L, HUYS G, MERTENS J, SWINGS J. *Aeromonas hydrophila* causes "Black Disease" in Fairy Shrimps (Anostraca; Crustacea). J Fish Dis. 1998;1:113-119.

DI PIETRO A, PICERNO I, SCOGLIO ME. Effect of Growth Conditions on Extracellular Products (ECPs) of *Aeromonas hydrophila*. Ann Ig. 2004;6(4):523-30.

DONTA ST, HADDOW AD. Cytotoxic Activity of *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1978;989-993.

ESPINOSA DE LOS MONTEROS J, LABARTA U. Patología de los peces. 1ª ed. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros; 1998. p. 519.

ESTEVE C, AMARO C, GARAY E, SANTOS Y, TORANZO AE. Pathogenicity of Live Bacteria and Extracellular Products of Motile *Aeromonas* Isolated From Eels. J Appl Bacteriol. 1995;78:555-562.

FACKRELL HB, WISEMAN GM. Production and Purification of the Gamma Haemolysin of *Staphylococcus aureus* "Smith 5R". J Gen Microbiol. 1976;92:1-10.

FALCON RM, CARVALHO HF, JOAZEIRO PP, GATTI MS, YANO T. Induction of Apoptosis in HT29 Human Intestinal Epithelial Cells by the Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. Biochem Cell Biol. 2001;79(4):525-31.

FERGUSON MR, XU XJ, CWHOUSTON CW, PETERSON JW, COPPENHAVER DH, POPOV VL, CHOPRA AK. Hyperproduction, Purification and Mechanism of Action of the Cytotoxic Enterotoxin Produced by *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1997;65:4299-4308.

FIELD MC, MENON AK. Glycosylphosphatidylinositol Membrane-Anchored Proteins [on-line]. 2000. [cited February, 2002]. Laboratories for Molecular Parasitology, Imperial College of Science Technology and Medicine, Department of Biochemistry. Disponible en:

<http://www.bc.ic.ac.uk/research/field/PDFs/field%20y%20Menon%202000.pdf>

FIVAZ M, VELLUZ MC, VAN DER GOOT FG. Dimer Dissociation of the Pore-Forming Toxin Aerolysin Precedes Receptor Binding. J Biol Chem. 1999;274:37705-37708.

FUJITA K, AKINO T, YOSHIOKA H. Characteristics of Heat-Stable Extracellular Hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1998;56:1385-1387.

GARCÍA CL, CLAVIJO AM, SANTYER J. Incidencia del complejo *Aeromonas* spp. en algunas especies piscícolas en los estados Aragua, Carabobo, Monagas y Cojedes en Venezuela. Memorias Congreso de Acuicultura 99, Acuicultura en Armonía con el Ambiente. Puerto de la Cruz, Venezuela; 1999.

GARCÍA HMP. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ Diag. 2000;1:31-41.

GORDON VM, NELSON KL, BUCKLEY JT, STEVENS VL, TWETEN RK, ELWOOD PC, et al. Clostridium Septicum Alpha Toxin Uses Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Receptors. J Biol Chem. 1999;274:27274-27280.

GRIZZLE JM, KIRYU Y. Histopathology of Gill, Liver and Pancreas, and Serum Enzyme Levels of Channel Catfish Infected with *Aeromonas hydrophila* Complex. J Aquat Anim Health. 1993;5:36-50.

HEUZENROEDER MW, WONG CYF, FLOWER RLP. Distribution of Two Hemolytic Toxin Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Aeromonas* spp.: Correlation with Virulence in a Suckling Mouse Model. FEMS Microbiol Lett. 1999;174:131-136.

HOWARD SP, BUCKLEY JT. Activation of the Hole-Forming Toxin Aerolysin by Extracellular Processing. J Bacteriol. 1985;163:336-340.

IMBERT M, GANCEL F. Effect of Different Temperature Downshifts on Protein Synthesis by *Aeromonas hydrophila*. Curr Microbiol. 2004;49(2):79-83.

IMZILN B, LAFDAL O, BARAKATE M, HASSANI L, OUHDOUCH Y, BOUSSAID A, et al. Pril-Ampicillin-Dextrin-Ethanol Agar for the Isolation and Quantification of *Aeromonas* spp. from Polluted Environmental Waters. J Appl Microbiol. 1997;82:557-566.

IWASAKI M, SAKAGUCHI G. Acid Precipitation of *Clostridium botulinum* Type C and D Toxins from Whole Culture by Addition of Ribonucleic Acid as a Precipitation Aid. Infect Immun. 1978;19:749-751.

KHALIL AH, MANSOUR EH. Toxicity of Crude Extracellular Products of *Aeromonas hydrophila* in Tilapia, *Tilapia nilotica*. Lett Appl Microbiol. 1997;25:269-273.

KOZAKI S, KATO K, ASAO T, KAMATA Y, SAKAGUCHI G. Activities of *Aeromonas hydrophila* Hemolysins and Their Interaction with Erythrocyte Membranes. Infect Immun. 1987;55:1594-1599.

KRAUSE KH, FIVAZ M, MONOD A, VAN DER GOOT FG. Aerolysin Induces G-Protein Activación and Ca²⁺ Release From Intracellular Stores in Human Granulocytes. J Biol Chem. 1998;273:18122-18129.

LILLEY JH, CALLINAN RB, CHINABUT S, KANCHANAKHAN S, MACRAE IH, PHILLIPS MJ. Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Technical Hybook. Bangkok: The Aquatic Animal Health Research Institute; 1998.

LIU PV. Survey of Hemolysin Production Among Species of Pseudomonads. J Bacteriol. 1957;74:718-727.

LJUNGH Å, WRETLIND B, MÖLLBY R. Separation and Characterization of Enterotoxin and Two Haemolysins From *Aeromonas hydrophila*. Acta Path Microbiol Scy Sect B. 1981;89:387-397.

LOGHOTHETIS PN, AUSTIN B. Antibody Responses of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to Live *Aeromonas hydrophila* as Assessed by Various Antigen Preparations. *Fish Shellfish Immunol.* 1996;6:455-464.

MAJEED KN, EGAN AF, MACRAE IC. Production of Exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5 °C. *J Appl Bacteriol.* 1990;69:332-337.

MARSDEN MJ, FREEMAN LC, COX D, SECOMBES CJ. Non-Specific Immune Responses in Families of Atlantic Salmon, Psalm to Salt, Exhibiting Differential Resistance to Furunculosis. *Aquaculture.* 1996;146:1-16.

MATSCHE MA, GRIZZLE LM. Early Changes in Pigmented Macrophages in Head Kidney of Channel Catfish Infected with *Aeromonas hydrophila*. *J Aquat Anim Health.* 1999;11:253-261.

MATSUYAMA T, IIDA T. Degranulation of Eosinophilic Granular Cells with Possible Involvement in Neutrophil Migration to Site of Inflammation in Tilapia. *Dev Comp Immunol.* 1999;23:451-457.

MORETTI PE. Curvas de crecimiento [on-line]. Curvas de sobrevivencia. Métodos de microbiología. Microorganismos. Brasil. Febrero 2002. [consultado Abril, 2002]. Disponible en: http://members.aol.com/micorganismos/curvas_de_sobrevivencia.htm

NELSON KL, BUCKLEY JT. Channel Formation by the glycosylphosphatidylinositol Anchored Protein Binding Toxin Aerolysin is Not Promoted by Lipid Rafts. *J Biol Chem.* 2000;275:19839-19843.

NEVILLE DM. Molecular Weight Determination of Protein-Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis in a Discontinuous Buffer System. *J Biol Chem.* 1971;246:6328-6334.

OUTSIDE MICROBIOLOGÍA. Bacteriología [on-line] Fisiología bacteriana medida de crecimiento. Buenos Aires, Argentina. Abril del 2002 [Consultado Abril, 2002]. Disponible en: <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php>

PANIAGUA C, RIVERO O, ANGUITA J, NAHARRO G. Pathogenicity Factors and Virulence for Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) of Motile *Aeromonas* spp. Isolated from a River. *J Clin Microbiol.* 1990;28:350-355.

PAZZAGLIA G, ESCALANTE RJ, SACK RB, ROCCA C, BENAVIDES V. Transient Intestinal Colonization by Multiple Phenotypes of *Aeromonas* Species During the First Week of Life. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1842-1846.

PEMBERTON JM, KIDD SP, SCHMID TR. Secreted Enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;152:1-10.

POPOFF M, VÉRON M. A Taxonomic Study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* Group. *J Gen Microbiol.* 1976;94:11-22.

_____. En: Krieg NR, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Volume 1, Section 5, 1^a ed. Ed. William & Wilkins; 1984. p. 545-548.

POPOVIC NT, TESKEREDZIC E, PEROVIC IS, RAKOVAC RC. *Aeromonas hydrophila* Isolated from Wild Freshwater Fish in Croatia. *Vet Res Communi.* 2000;24:371-377.

POTOMSKI J, BURKE V, WATSON I, GRACEY M. Purification of Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas sobria* by Use of Monoclonal Antibodies. *J Med Microbiol.* 1987;23:171-177.

RIDDLE LM, GRAHAM TE, AMBORSKI RL. Medium for the Accumulation of Extracellular Hemolysin and Protease by *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1981;33:728-733.

ROSE JM, HOUSTON CW, COPPENHAVER DH, DIXON JD, KUROSKY A. Purification and Chemical Characterization of a Cholera Coxin-Cross-Reactive Cytolytic Enterotoxin Produced by a Human Isolate of *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1989a;57:1165-1169.

_____, HOUSTON CW, KUROSKY A. Bioactivity and Immunological Characterization of a Cholera Toxin-Cross-Reactive Cytolytic Enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1989b;57:1170-1176.

SAKAI DK. Loss of Virulence in a Protease-Deficient Mutant of *Aeromonas salmonicida*. Infect Immun. 1985;48:146-152.

SANTOS JA, GONZÁLEZ CJ, OTERO A, GARCÍA-LÓPEZ ML. Hemolytic Activity and Siderophore Production in Different *Aeromonas species* Isolated from Fish. Appl Environ Microbiol. 1999;65:5612-5614.

SANTOS Y, TORANZO AE, BARJA JL, NIETO TP, VILLA TG. Virulence Properties and Enterotoxin Production of *Aeromonas strains* isolated from Fish. Infect Immun. 1999;56:3285-3293.

_____, LALLIER R, BYÍN I, LAMAS J, TORANZO AE. Susceptibility of Turbot (*Scophthalmus maximus*), Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*), and Rainbow Trout (*O. mykiss*) to Strains of *Vibrio anguillarum* and Their Exotoxins. J Appl Ichthyol. 1991;7:160-167.

_____, BYÍN I, TORANZO AE. Immunological Analysis of Extracellular Products and Cell Surface Components of Motile *Aeromonas isolated* from Fish. J Appl Bacteriol. 1996;81:585-593.

SCHEFFER J, KÖNIG W, BRAUN V, GOEBEL W. Comparison of Four Hemolysin-Producing Organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes*) for Release of Inflammatory Mediators from Various Cells. J Clin Microbiol. 1988;26:544-551.

STELMA GN, JOHNSON CH, SPAULDING P. Evidence for the Direct Involvement of β -hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. Curr Microbiol. 1986;14:71-77.

SWANN L, WHITE MR. Diagnosis and Treatment of *Aeromonas hydrophila* Infection of Fish. Aquaculture Extension, Illinois-Indiana Sea Grant Program, Fact Sheet AS-461; 1991.

TEGTMEIER C, JENSEN NE, JENSEN HE. Development of a Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Technique for the Identification of *Haemophilus somnus* in Pneumonic Calf Lungs in Denmark. APMIS. 1995;103:540-547.

THELESTAM M, LJUNGH A. Membrane-Damaging and Cytotoxic Effects on Human Fibroblasts of Alpha- and Beta-Hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1981;34:949-956.

THOMAS LV, GROSS RJ, CHEASTY T, ROWE B. Extended Serogrouping Scheme for Motile, Mesophilic *Aeromonas species*. J Clin Microbiol. 1990;28:980-984.

THUNE RL, JOHNSON MC, GRAHAM TE, AMBORSKI RL. *Aeromonas hydrophila* β -Haemolysin: Purification and Examination of Its Role in Virulence in 0-Group Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. J Fish Dis. 1986;9:55-61.

TOWBIN HT, STAHELIN, GORDON J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Biochemistry*. 1979;76:4350-4354.

TSAI GJ, TSAI FC, KONG ZL. Effects of Temperature, Medium Composition, pH, Salt and Dissolved Oxygen on Haemolysin and Cytotoxin Production by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Oyster. *Int J Food Microbiol*. 1997;38:111-116.

WONG CYF, HEUZENROEDER MW, FLOWER RLP. Inactivation of Two Haemolytic Toxin Genes in *Aeromonas hydrophila* Attenuates Virulence in a Suckling Mouse Model. *Microbiol*. 1998;144:291-298.

WRETLIND B, HEDÉN L, WADSTRÖM T. Formation of Extracellular Haemolysin by *Aeromonas hydrophila* in Relation to Protease and Staphylolytic Enzyme. *J Gen Microbiol*. 1973;78:57-65.

XU XJ, FERGUSON MR, POPOV VL, HOUSTON CW, PETERSON JW, CHOPRA AK. Role of a Cytotoxic Enterotoxin in *Aeromonas*-mediated Infections: Development of Transposon and Isogenic Mutants. *Infect Immun*. 1998;66:3501-3509.