

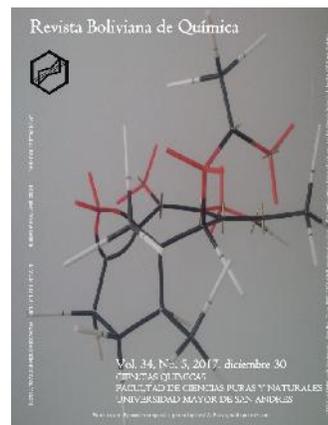


REVIEW OF THE CHARACTERIZATION OF AEROMONAS SPP. AND ITS CLINICAL IMPORTANCE

REVISIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN DE AEROMONAS SPP. Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA

Received 10 19 2017
Accepted 11 28 2017
Published 12 30 2017

Vol. 34, No.5, pp. 132-137, Nov./Dic. 2017
34(5), 132-137, Nov./Dec. 2017
Bolivian Journal of Chemistry



Short review

Peer-reviewed

Alejandro Sánchez Varela*, Isabel C. Rodríguez Luna y Xian Wu Guo

Laboratorio de Biotecnología Genómica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro, con Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, s/n, CP. 88710, Reynosa Tamaulipas, México

Keywords: Aeromonas, Methods, Molecular, Gene, Specificity.

ABSTRACT

Advances in Microbiology and applications of Molecular Biology, has been achieved an improvement, complementary to the classical techniques of bacterial identification, this also allowed the discovery or regrouping of bacterial genera and species, which had failed to be identified correctly, by biochemical and phenotypic methods, since these have some limitations such as false positives or low specificity. Among the molecular tools used to identify the *Aeromonas* genus, we have used sequencing from *16S* rRNA gene, maintenance genes such as *rpoD* or *gyrB*, which have a greater discrimination power than the *16S* rRNA gene, the technique of RFLP-PCR and more recently the technique of Mass Spectrometry has been increased by Laser Assisted Matrix Desorption-Ionization of Flight Time (MALDI-TOF MS) which is able to identify species of *Aeromonas* quickly and accurately. This is important because of the increasing evidence that these species are widely distributed in the environment and can cause a variety of infections in animals and humans.

*Corresponding author: asanchezv@ipn.mx

RESUMEN

Los recientes avances en Microbiología y la aplicación de la Biología Molecular, han logrado un mejoramiento, complementario para las técnicas clásicas de identificación bacteriana, también esto, ha permitido el descubrimiento o reagrupamiento de géneros y especies bacterianas, las cuales no habían logrado ser identificadas correctamente, por métodos bioquímicos y fenotípicos, ya que estos, presentan algunas limitaciones como falsos positivos o baja especificidad. Dentro de las herramientas moleculares empleadas para la identificación del género *Aeromonas*, se han empleado la secuenciación a partir de gen *16S* de rRNA, genes de mantenimiento como *rpoD* o *gyrB*, los cuales



poseen mayor poder de discriminación que el gen *16S* de rRNA, la técnica de RFLP-PCR y más recientemente se ha incorporado el uso de la técnica de Espectrofotometría de Masas por Matriz Asistida por laser Desorción-Ionización de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF MS), la cual es capaz de identificar especies de *Aeromonas* de forma precisa y rápidamente. Lo cual es de gran importancia, debido al incremento de evidencias que indican que estas especies se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente y que pueden causar una variedad de infecciones en animales y en el humano.

INTRODUCCIÓN

Aeromonas es una bacteria ubicua principalmente en ambientes acuáticos y está considerado dentro de los patógenos emergentes a nivel mundial, asociándose a cuadros infecciosos, existen reportes de aislados provenientes de pacientes con infecciones gastrointestinales y de infecciones de la piel [1]. La transmisión de la bacteria ocurre por consumo de pescado, mariscos y agua [4]. En algunos estudios señalan que las especies más involucradas en procesos infecciosos son: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas veronii* bv. *Sobria* [18]. El género *Aeromonas*, fue observado por primera vez en 1890 y propuesta en la década de 1980 como un agente enteropatógeno. En el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey *Aeromonas* spp está clasificado como miembro de la familia *Vibrionaceae*, hasta el 2008 el género incluía 20 especies [9,30-32]. Debido al desarrollo de técnicas de mayor sensibilidad y más eficaces, como las moleculares, se ha logrado el aislamiento e identificación de diversos microorganismos que por métodos microbiológicos y bioquímicos no podían ser identificados [9]. Las técnicas moleculares han permitido una correcta caracterización del genero de *Aeromonas*, la amplificación del gen *16S* rRNA presenta baja discriminación inter-específica, por lo que se ha recurrido a genes de mantenimiento como *gyrB* o *rpoD* que presentan una tasa de sustituciones sinónimas mayor que el *16S* rRNA [15,36]. Los genes de mantenimiento antes mencionados, han presentado una alta capacidad para diferenciar a nivel de especie, otros genes que codifican resistencia al uso de antibióticos, genes de virulencia que codifican para aerolisinas, hemolisinas, serín proteasas, GCAT, lipasas y DNasas, PCR-RFLPs utilizada para la tipificación de especies del género y más recientemente se ha incrementado la técnica de Espectrofotometría de Masas por Matriz Asistida por laser Desorción-Ionización de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF MS) la cual es capaz de identificar especies de *Aeromonas* rápidamente y precisa [2,3,13,15,33-36]. Esta revisión se basó en la caracterización de *Aeromonas* spp. y su importancia clínica.

RESULTADOS (REVIEW)

Los métodos bioquímicos y microbiológicos clásicos de identificación son indispensables en la caracterización del género *Aeromonas*, sin embargo, por sí mismo resultan poco concluyentes, por lo que se ha recurrido a las técnicas moleculares para complementar y reforzar la caracterización e identificación de miembros del género [13,17]. Estudios realizados han demostrado, en base al análisis de las secuencias de los genes *16S* rRNA y *5S* rRNA y a los resultados de la hibridación DNA-RNA, que el género *Aeromonas* presenta una evolución filogenética distinta al de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, por lo que han propuesto elevar al género *Aeromonas* a la categoría de familia *Aeromonadaceae* [15,20,21,27]. Figura 1.



Figura 1. Hasta 2008, fueron clasificadas 20 especies del genero *Aeromonas* spp, mediante el uso del *16S* del rRNA.

Dentro de los genes empleados para la identificación de *Aeromonas* se encuentran secuencias del *16S* del rRNA, genes de mantenimiento los cuales poseen mayor poder de discriminación como el *rpoD* y el *gyrB*. En distintos estudios, las secuencias del gen *gyrB* mostraron ser un excelente marcador molecular para la inferencia filogenética en el género *Aeromonas*. Este marcador filogenético ha revelado grupos consistentes con las taxonomías propuestas previamente, en la mayoría de los estudios genéticos y filogenéticos particularmente de acuerdo con el análisis de



secuencias del gen 16S del rRNA, así como estudios de discrepancias entre diferentes hibridaciones de DNA-DNA, la diversidad de secuencias observadas a nivel intraespecíficas, permite proponer el uso del marcador *gyrB*, con un doble propósito, como útil para la diferenciación de cepas, y al mismo tiempo para identificación de especies [34].

En otro estudio basado en RFLPs del 16S del rRNA utilizando enzimas de restricción tales como AluI, CfoI y MnlI encontraron resultados controversiales en distintos aislamientos de *Aeromonas popoffi*, tal vez debido a que probablemente se tratara de nuevas especies de *Aeromonas* o si los sitios de restricción en especies conocidas se ven afectados por diversidad inter-específica de nucleótidos, es decir diferencias entre cepas de la misma especie. Este estudio representa un método confiable para identificar especies conocidas de *Aeromonas*, así como muy útil para determinar la incidencia real de especies del género [27]. En otro estudio se realizó la detección de genes de virulencia y se exploró la distribución los genes probables entre aislamientos de *Aeromonas hydrophila*, estos fueron *gcat* (n= 30, 96.7%), *aer/hem* (n=25, 80.64%), *ast* (n= 30, 96.7%) y *lafA* (n= 26, 83.87%) [7]. Lo cual muestra la variabilidad de genes de virulencia probable dentro de cada aislado de *Aeromonas* spp. y su asociación a patogenicidad de esta cepa hacia el humano.

Recientemente el método de MALDI-TOF MS se ha introducido rápidamente en laboratorios clínicos. Varios estudios respaldan su uso en la identificación de *Aeromonas* a nivel de especie. Por otro lado, el método por MALDI-TOF MS, ha mostrado buena correlación con los resultados de la secuenciación de genes de mantenimiento *rpoD* y *gyrB* especialmente para *Aeromonas hydrophila* y cepas *Aeromonas veronii*, por lo que se considera que el método de MALDI-TOF MS podría diferenciar a nivel de especie, aunque a nivel de género presentó alguna discrepancia ya que un caso de *Aeromonas caviae* no pudo ser identificado [33,35].

DISCUSIÓN (REVIEW)

Dentro de las características fisicoquímicas y biológicas propias del género *Aeromonas*, se encuentran la presencia de una [pared celular](#) de peptidoglicano entre dos membranas lipídicas; son anaerobias facultativas; presentan una enzima degradadora de peróxido de hidrogeno, una catalasa, así como también una oxidasa que participa en la transferencia de electrones a una molécula de oxígeno, permitiendo la formación de agua; reducen nitrato a nitrito y fermentan la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía; además estas pueden crecer en medios que contienen 3% de NaCl, pero no en concentraciones salinas de 6% [13,14].

Los miembros del género *Aeromonas* pueden crecer tanto en medios de cultivos diferenciales o selectivos, como los utilizados para el crecimiento de bacterias enteropatógenas. En cuanto a su cultivo, para el aislamiento en heces, se recomiendan: Agar Cefsulodina Irgasan Novobiocina (CIN), agar sangre ampicilina (ABA) y también Agar *Aeromonas* (AA), este contiene los agentes selectivos verde brillante e Irgasan, ideales para el crecimiento de *Aeromonas* susceptibles a la ampicilina, el uso de AA ha duplicado la frecuencia de aislamiento de *Aeromonas* y por lo tanto se considera el medio selectivo más eficiente [25,26]. La habilidad de crecer en medios específicos, así como sus capacidades metabólicas, son consideradas para su identificación bioquímica, pero como ya se ha observado en diversos estudios estos métodos muestran algunas limitaciones como falsos positivos, ya que algunas características son compartidas con bacterias de otros géneros como *vibrio* y también muestran baja especificidad [13,17].

Actualmente se recurre al uso de las técnicas moleculares con lo cual, se ha logrado aumentar el número de especies del género que pueden ser identificados y validados, las cuales ascienden a más de 25 especies.

En la identificación molecular de *Aeromonas* se han empleado distintos marcadores principalmente el 16S del rRNA, RFLPs, otros más específicos tales como *rpoD* o *gyrB*, y más recientemente MALDI-TOF MS permitiendo en algunos casos la identificación de especies de *Aeromonas* de forma eficiente [15,33,35].

Lo cual es importante debido al incremento de evidencias que indican que estas especies se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente y que pueden causar una variedad de infecciones en animales y en el humano. Dada la creciente importancia de *Aeromonas* en infecciones clínicas y las limitaciones de los métodos existentes, hay una necesidad de diseñar sistemas precisos que puedan identificar de forma inequívoca estos microorganismos [17].

El papel de *Aeromonas* spp, como agente causal de gastroenteritis es debatible, debido a la baja incidencia de grandes brotes epidémicos reportados y a la carencia de un modelo animal adecuado. Como se ha mencionado anteriormente son tres las especies de importancia clínica *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria*. Las fuentes de infección gastrointestinal y cutánea por *Aeromonas* son principalmente agua o alimentos contaminados, así como el contacto directo del agua con heridas [29]. Los miembros de este género producen varias exoenzimas, algunas de ellas considerados factores de virulencia, que al parecer tienen un papel importante en la patogenicidad de las infecciones intestinales y sistémicas. Diversos son los factores de virulencia asociados a la patogenicidad de *Aeromonas*, estas producen una serie de factores de virulencia y la patogénesis de la infección por *Aeromonas* es



compleja y por lo tanto multifactorial [11]. Dentro de los factores de virulencia correspondiente a *Aeromonas* encontramos algunos lipopolisacáridos, su cápsula, la capa S, pilis, hemolisinas, enterotoxinas citotónicas, citotoxinas, fosfolipasas, proteínas de membrana externa, adhesinas, proteasas, lipasas y sideróforos, de los cuales las hemolisinas y enterotoxinas están estrechamente relacionadas con la patogenicidad de este microorganismo [8]. Existen algunas metodologías empleando distintos primers, descritas previamente por algunos autores, basados en la amplificación por PCR de genes de virulencia que codifican para aerolisinas, hemolisinas, serín proteasas, GCAT, lipasas y DNAsas donde muestran la diversidad y distribución de estos genes en las especies de *Aeromonas* aisladas de muestras ambientales y clínicas [2,3,6,7,19].

En un estudio se encontró que algunos aislados de *Aeromonas* provenientes de humanos poseen genes *stx1* y *stx2* muy similares a genes de virulencia encontrados a *E. coli* [10]. Estas bacterias se han relacionado con varios procesos infecciosos intestinales e extraintestinales. A nivel intestinal, el padecimiento más frecuentemente relacionado es la diarrea, mientras que, en las extraintestinales, las infecciones de heridas son las de mayor incidencia [5]. Especies como *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria*, son las más comúnmente asociadas con diarrea del viajero; algunos estudios también han relacionado a estas dos especies con enteritis presentando como principal síntoma la diarrea acuosa, mientras que enteritis causada por *A. hydrophila* y *A. jandae* se ha caracterizado por presentar heces blandas, por su parte *A. caviae* es particularmente frecuente en los casos de diarrea pediátrica; individuos inmunocompetentes también han sido afectados por gastroenteritis vinculado a infección por *Aeromonas* [22,23,24]. Otro tipo de infecciones muy comunes a la que se relaciona *Aeromonas* son las de herida, reportadas en individuos sanos después de una lesión en un medio acuático o suelo; las infecciones de herida incluyen celulitis, mionecrosis, y ectima gangrenosa, además han sido reportados casos de gangrena. Estas infecciones pueden manifestarse como pústulas, úlceras o abscesos; este tipo de infecciones puede conducir a septicemias o bacteriemias en pacientes inmunocomprometidos [29]. La septicemia se asocia principalmente con los pacientes inmunocomprometidos con predisponentes condiciones médicas, como la función hepatoiliar deteriorada y los tumores malignos, aunque también se ha reportado en individuos sanos tras infecciones de herida, en pacientes con infección severa la tasa de mortalidad se ve incrementada drásticamente [34].

EXPERIMENTAL (REVIEW)

En la identificación de microorganismos, la microbiología ha jugado un papel fundamental empleando técnicas como observaciones de la morfología macroscópica y microscópica, desarrollo, y características bioquímicas o metabólicas.

Los miembros del género *Aeromonas* pueden crecer tanto en medios de cultivos diferenciales como selectivos. Para el aislamiento a partir de heces, se recomiendan: Agar Cefsulodina Irgasan Novobiocina (CIN), agar sangre ampicilina (ABA) y también Agar *Aeromonas* (AA), este contiene los agentes selectivos verde brillante e Irgasan, que también permiten el crecimiento de *Aeromonas* susceptibles a la ampicilina, AA ha duplicado la frecuencia de aislamiento de *Aeromonas* y por lo tanto se considera el medio selectivo más eficiente [25,26]. En cuanto a pruebas bioquímicas existen medios de identificación manuales multipuebas o sistemas automatizados, los cuales son procedimientos largos y complejos, así como la obtención de falsos positivos, limitada precisión y baja especificidad [13]. Sin embargo, en la identificación del género *Aeromonas*, con la aplicación de las herramientas moleculares se ha logrado aumentar el número de especies del género que pueden ser identificados y validados, las cuales ascienden a más de 25 especies. Dentro de los genes empleados para la identificación de *Aeromonas* se encuentran el 16S del rRNA, genes de mantenimiento los cuales poseen mayor poder de discriminación como son *rpoD* o *gyrB*, genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia, PCR-RFLPs utilizada para la tipificación de especies del género y más recientemente se ha incrementado la técnica de Espectrofotometría de Masas por Matriz Asistida por laser Desorción-Ionización de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF MS) la cual es capaz de identificar especies de *Aeromonas* de una forma rápida y precisa [2,3,13,15,33,35].

CONCLUSIÓN

Los laboratorios de diagnóstico deben ofrecer métodos sensibles y específicos apoyándose en métodos microbiológicos clásicos. Sin embargo, se han realizado diversos estudios los cuales, han demostrado que los métodos fenotípicos a los cuales se recurre habitualmente presentan diversas inconsistencias al momento de identificar, a nivel de género, y de especie, tal como ocurre con *Aeromonas* y *Vibrio*, las cuales anteriormente estaban clasificadas en la misma familia, incluso también ha ocurrido con familias distintas como la *Enterobacteriaceae*. El empleo de métodos más precisos y específicos como son los moleculares tales como 16S del rRNA ha servido para



ahora colocar a *Aeromonas* en la familia *Aeromonadaceae*, así como diferenciar a especies dentro del mismo género, sin embargo no ha funcionado para todas las especies del género, para lo cual, se ha recurrido a otros marcadores mucho más específicos como son el *rpoD* y el *gyrB*, así como detección de genes de virulencia, y resistencia a multidroga, entre otras aplicaciones moleculares como MALDI-TOF MS, que han venido a complementar el diagnóstico clínico, con lo cual muy probablemente se pueda proporcionar un tratamiento más adecuado a los pacientes al contribuir con información sobre patogenicidad y resistencia a multidroga de los aislados de *Aeromonas*.

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas.

REFERENCIAS

1. Abbott, S. L., Seli, L. S., Catino, M., Hartley, M. A., Janda, J. M. **1998**. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(4) 1103–1104.
2. 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.
3. Abu-Elala, N., Abdelsalam, M., Marouf, S., Setta, A. **2015** Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and *gyrB*-based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. *Letters in Applied Microbiology*, 61(5), 429–436.
4. Adams, M. R., Moss, M. O. *Food Microbiology*. Third Edition, **2008**, RSC Publishing. Cambridge, UK, pp. 447.
5. Acosta-García, J. y Aguilar-García, C.R. **2014**. Infección de tejidos blandos por *Aeromonas salmonicida*. Primer reporte de caso en México. *Medicina Interna de México*. 30 (2) 221-226.
6. 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.
7. 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.
8. Albert, M. J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K. A., Chopra, A. K., Kuhn, I., Rahman, M., Sack, R. B. (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10), 3785–3790.
9. Alperi, A. **2009**. Taxonomía y epidemiología del género *Aeromonas*. Tesis doctoral. Universitat Rovira I Virgili. España. pp. 267.
10. Alperi, A., Figueras, M. J. **2010**. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. 16(10) 1563–1567.
11. Aravena-Román, M., Inglis, T. J. J., Riley, T. V., Chang, B. J. **2014**. Distribution of 13 virulence genes among clinical and environmental *Aeromonas* spp. in Western Australia. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 33(11) 1889–1895.
12. Batra, P., Mathur, P and Misra, M. C. **2016**. *Aeromonas* spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*. 8 (1) 1-4.
13. Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J. L., Figueras, M. J. **2010**. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*. 33(3) 149–53.
14. Beraun-Villa, M., Valdez, L.M. **2013**. Diarrea del viajero. *Revista Médica Herediana*. 24 (1) 54-61.
15. Borrell, N., Acinas, S., Figueras, M., Martínez-Murcia, A. **1997**. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(7) 1671–1674.
16. Castro-Escarpulli, G., Aguilera Arreola, M. G., Giono Cerezo, S., Hernández Rodríguez, C. H., Rodríguez Chacón, M., Soler Falgas, L., Aparicio Ozores, G., Figueras Salvat, M. J. **2002**. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 22 (4) 1-12.
17. Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M. G., Hernández Rodríguez, C. H., Arteaga Garibay, R. I., Carmona Martínez, A. A., Pérez Valdespino, A., Giono Cerezo, S., Figueras Salvat, M. J., Aparicio Ozores, G. **2003** a. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímica*. 28(4) 11–18.
18. Castro-Escarpulli, G., Figueras, M. J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G. O., Guarro, J., Chacón, M. R. **2003** b. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in México. *International Journal of Food Microbiology*. 84(1) 41–49.
19. Chacón, M.R., Figueras, M.J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L. and J. Guarro **2003**. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*. 84, 269–278.
20. Chopra, A. K., Houston, C. W. **1999**. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*. 1 (13) 1129-1137.
21. Colwell, R. R., Macdonell M. R., De Ley J. **1986**. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36 (3) 473-477



22. Cortés-Cortés, I. L. **2015**. Diversidad Genética, Genes de Virulencia y Estructuras de Superficie Implicadas en la Patogenicidad del Género *Aeromonas*. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. España. pp 135.
23. Creydt, V. P., Nuñez, P., Boccoli, J., Silberstein, C., Zotta, E., Goldstein, J., Ibarra, C. **2006**. Papel de la toxina shiga en el síndrome urémico hemolítico. *Medicina*. 66 (1) 11–15.
24. Dos Santos, P.A., Pereira, A.C.M., Ferreira, A.F., Alves, M.A., Rosa, A.C. Freitas-Almeida, A.C. **2015**. Adhesion, invasion, intracellular survival and cytotoxic activity of strains of *Aeromonas* spp. in HEp-2, Caco-2 and T-84 cell lines. *Antonie van Leeuwenhoek*. 107 (5) 1225–1236.
25. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. Stackebrandt, E.. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. **2014**, Springer. New York. pp. 1039.
26. Fernández-Olmos, A., García-Fuente, C., Saéz-Nieto, J. A. Valdezate Ramos, S. **2010**. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. *Elsevier*. 29 (8) 1-28.
27. Figueras, M. J., Soler, L., Chacón, M. R., Guarro, J. Martínez-Murcia, J.A. **2000**. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(6) 2069–2073.
28. Figueras, M. J., Alperi A., Saavedra, M.J., Ko, W.C., Gonzalo, N., Navarro, M., Martínez-Murcia, J. **2009**. Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas aquariorum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47 (11) 3742–3746.
29. Figueras, M. J. Beaz-Hidalgo, R. **2015**. *Aeromonas* infections in humans, in *Aeromonas*, Chap. 4. Chap. 4. Ed. Graf J. Caister Academic Press. EE. UU. 65–108.
30. Janda, J. M. Abbott, S. L. **2010**. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 23 (1) 35-73.
31. Kozin ska, A., Figueras, M. J., Chacon, M.R. and Soler, L. **2002**. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Journal of Applied Microbiology*, 93, 1034-1041.
32. Martin-Carnahan, A. Joseph S.W. Family I. Aeromonadaceae Colwell, MacDonell and DeLey 1986. In: Brennan DJ, Krieg NR, Staley JT (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 2nd edn. **2005**, New York: Springer-Verlag, p.p. 556-578.
33. Nowakiewicz, A., ZioAokowska, G., Zieba, P., Gnat, S., Troscianczyk, A. And Adaszek, E. **2017**. Characterization of multidrug resistant *E. faecalis* strain from pigs of local origin by ADSRRS-Fingerprinting and MALDI-TOF MS, Evaluation of the compatibility of methods employed for multidrug Resistance analysis. *Journal PLOS ONE*, 1-19.
34. Parker, J. L. Shaw, J. G. **2011**. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*. 62 (2) 109-118.
35. Shin, H. B., Yoon, J., Lee, Y., Kim, M. S. Lee, K. **2015**. Comparison of MALDI-TOF MS, Housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Medical Journal*. 56(2) 550–555.
36. Yáñez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J. Martínez-Murcia, A.J. **2003**. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53(3) 875–883.