



60
49

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**Aislamiento e Identificación de Aeromonas Hydrophila
Enterotoxigénica, en Pacientes con Síndrome Diarreico
del Hospital General Centro Médico "La Raza"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
NORMA ANGELICA SANCHEZ MARIN

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
A. ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCION	2
II. GENERALIDADES	
1.- Características Generales de <u>Aeromonas</u> <u>hydrophila</u>	4
2.- Aspectos Epidemiológicos	5
3.- Importancia Clínica	7
4.- Objetivos	14
III. MATERIAL Y METODOS	
1.- MATERIAL	
a) Material Biológico	15
b) Medios de Cultivo para Aislamiento e - Identificación Bioquímica	15
c) Reactivos	16
d) Soluciones	17
2.- METODOS	
a) Aislamiento Primario	17
b) Identificación Bioquímica	19

c) Método Estandar de Difusión en Disco en Agar	20
d) Obtención de Filtrado Celular	22
e) Ensayo de Hemolisinas	23
IV. RESULTADOS	
1.- Aislamiento e Identificación de <u>Aeromonas hydrophila</u>	24
2.- Sensibilidad a Antibióticos	26
3.- Valores Hemolíticos	27
4.- Frecuencia de Aislamiento de Bacterias Interpatógenas	27
V. DISCUSION	29
VI. CONCLUSIONES	31
VII. BIBLIOGRAFIA	33

Lista de Abreviaturas

	Abreviatura
Agar Mac Conkey	Mac
Agar Salmonella-Shigella	S-S
Agar Sangre	A-S
Lactosa	Lact
Lactosa Positiva	Lact (+)
Lactosa Negativa	Lact (-)
Lisina Descarboxilasa	LDC
Ornitina Descarboxilasa	ODC
Citrato	Cit
Movilidad	Mov
Malonato	Mal
Sacarosa	Sac
Gentamicina	Genta
Amikacina	Amika
Cloranfenicol	Cloran
Ampicilina	Ampl
Carbenicilina	Carbe

I INTRODUCCION

En los últimos 20 años ha habido un gran incremento en el número de agentes etiológicos asociados con infecciones gastrointestinales, en donde además del agente causal clásico del cólera (Vibrio Cholerae), se han encontrado miembros del género Vibrio tales como Aeromonas hydrophila. Recientemente diversos investigadores, señalan a éste agente, como causa de enfermedad diarreica aguda, por la producción de una enterotoxina extracelular, evidencia que lo señala como un patógeno entérico (2, 3, 9, 11, 13, 18). Sin embargo éste microorganismo es reconocido como un patógeno oportunista en enfermedades debilitantes, como la enfermedad leucémica y la cirrosis hepática, así como en individuos inmunológicamente comprometidos (1, 9, 13).

La importancia de Aeromonas hydrophila como causa de enfermedad gastrointestinal en personas sanas es controversial, debido a que éstos bacilos gram negativos son fácilmente confundidos con enterobacterias, a no ser que un ensayo de oxidasa se realice en forma rutinaria en el laboratorio.

Estudios epidemiológicos realizados en otros países sugieren que la incidencia de infecciones por aeromonas aumenta durante los meses calurosos del año, principalmente en verano, cuando ocurre la concentración máxima de aeromonas -

en peces y reptiles (2,18).

La alta incidencia de infecciones por microorganismos oportunistas en los centros hospitalarios, causantes de infecciones severas, hace necesario el estudio de su etiología, con el objeto de establecer su prevención y control.

Actualmente en la Ciudad de México no se cuenta con datos epidemiológicos al respecto, ésto aunado a la frecuencia de aparición de Aeromonas hydrophila en la práctica médica de otros países, ha motivado el presente estudio.

II. GENERALIDADES

1.- Características Generales de Aeromonas hydrophila

El género aeromonas pertenece a la familia vibrionaceae con las siguientes características: morfología bacilar -- gram negativa con predominio de flagelación polar, anaeróbico facultativo (metabolismo respiratorio y fermentativo) y reacción positiva de oxidasa

Los miembros del género aeromonas son bacilos anaeróbicos facultativos, asporógenos, gram negativos, de 1.0 a 4.4 μ m de largo y 0.4 a 1.0 μ m de ancho, con flagelos polares generalmente monótricos de 1.7 μ m de longitud (a excepción de la especie no móvil A. salmonicida). Las aeromonas son heterotróficas, producen catalasa y oxidasa y fermentan glucosa y otros carbohidratos con o sin producción de ácido o gas. Los nitratos se reducen a nitritos, la ornitina no se descarboxila y se forman muchas exoenzimas como desoxirribonucleasa, lipasa, gelatinasa y caseinasa (17, 18).

Muchas cepas son bioquímicamente más activas a 22°C que a 37°C. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C-- y la máxima de 38°C a 40°C para casi todas las cepas, excepto la A. salmonicida que crece poco o no crece a 37°C. La temperatura mínima de crecimiento es de 10°C a 15°C (8, 17). Los-

límites de pH de crecimiento son de 5.5 a 9.0 (8, 12).

Basándose en estudios de Schubert (1960-1971), la 8a. edición de Bergey's Manual menciona tres especies: Aeromonas hydrophila (con las subespecies hydrophila, anaerógenes y proteolítica, Aeromonas punctata (con las subespecies punctata y caviae) y Aeromonas salmonicida (con las subespecies salmonicida, achomógenes y masoucida) (17).

Aeromonas hydrophila tiene una distribución cosmopolita en sal natural y el agua dulce estancada o circulante, con densidades desde menos de uno, se ha encontrado con valores de pH de 5.2 a 9.8 y a la temperatura de 4°C a 45°C, pero no se la considera como bacteria marina ni como halófila. Su tolerancia al NaCl es de 0 al 4%. También se ha aislado de suelos y alimentos. La supervivencia parece depender de la humedad y de la presencia de materia orgánica (12).

2.- Aspectos Epidemiológicos.

Aeromonas hydrophila fué aislada por primera vez de huevos en 1937 y fué identificada posteriormente como un patógeno en peces y reptiles (24). Desde 1961, cuando se aislaron Aeromonas sp. de heces, durante un cuadro de diarrea, surgió la posibilidad de que dicho microorganismo pudiera ser un patógeno entérico (20,22).

La mayor parte de las evidencias del papel de éste organismo como patógeno entérico, proviene de estudios que -- han mostrado que la proporción de aislamientos de Aeromonas hydrophila en relación a otras bacterias intestinales ha sido elevado en sujetos que presentan diarrea (13).

En un estudio llevado a cabo en 1983 en Perth, ---- Western Australia, se mostró un tipo de aeromonas enterotoxigénica por en ensayo del ratón lactante, que fué aislada como patógeno potencial en más del 8% de 975 niños con diarrea y -- más frecuentemente que Salmonella sp. y Shigella sp. durante los meses de marzo, abril y mayo. En el mismo estudio en la distribución por edades de los 975 niños, se encontró que la enfermedad diarreica debida a Aeromonas hidrophila se presenta en niños menores de cinco años (2,11).

A partir de 1961, diversos casos de ataque de gas-- troenteritis por aeromonas se han presentado en Colombia, In dia, Checoslovaquia, Dinamarca, Etiopía y los Estados Unidos de Norteamérica (2, 13, 18).

De acuerdo a los estudios efectuados se propone que la mayor incidencia de infecciones por aeromonas, es durante los meses calurosos del año (2,11, 18).

Casos fatales de septicemia se han presentado por--

su invasión y patogenicidad, a partir de heridas que son expuestas a agua que contiene aeromonas. En un reporte del Hospital Memorial de New York fueron observados nueve casos de septicemia debida a Aeromonas hydrophila en un período de 32 meses entre octubre de 1969 y mayo de 1972 (2, 16).

Debido a que Aeromonas hydrophila generalmente causa gastroenteritis moderada en personas sanas, tales pacientes no han requerido un tratamiento rutinario con agentes antimicrobianos, que solo se emplean en aquellos pacientes de alto riesgo (1, 2, 12, 13).

3.- Importancia Clínica.

De acuerdo a los datos epidemiológicos mencionados, parece razonable que la bacteria Aeromonas hydrophila, pueda causar enfermedad entérica humana por la producción de una enterotoxina, dado que la mayoría de las investigaciones demuestran la producción de efectos enterotoxigénicos, lo cual contribuye a la patogénesis de la infección (2, 4, 9, 11, 13 y 18).

Aeromonas hydrophila puede producir tres tipos de exotoxinas: enterotoxinas, hemolisinas y citotoxinas. En algunos trabajos existe gran controversia con respecto a la identidad de enterotoxinas y hemolisinas (2, 4, 6, 11, 14),

sin embargo existe una correlación entre las cepas B-hemolíticas con la producción de enterotoxinas, por lo que un ensayo de hemolisinas para diferenciar cepas enterotoxigénicas de las no enterotoxigénicas, puede realizarse en el laboratorio-clínico con un 97% de exactitud, a partir de la obtención de un filtrado de cultivo celular (2, 3, 11, 18).

Tales factores tóxicos han sido probados en diferentes modelos, que son usados para ensayos de enterotoxinas (2, 4, 9, 11, 15, 24).

Modelos propuestos por Gemmel para demostrar la enterotoxigenicidad de Aeromonas hydrophila.

Ensayos In-Vitro	Ensayos In-vivo
Eritrocitos de diferente origen	Asa Intestinal de conejo
Células Adrenales Y1	Dermonecrosis en piel
Linfocitos	Ratón Lactante
Fibroblastos	

En tales modelos se ha observado que las bacterias colonizan el intestino empezando en el duodeno y de ahí pasan al ileón terminal, donde se cree que existen receptores específicos para que se fijen las exotoxinas. Estas van a es

timular la actividad de la adenilciclasa, la cual va a activar el ATP que se transforma en AMP cíclico, el que ocasiona una alteración en el mecanismo de transporte de agua y desequilibrio electrolítico inhibiendo el transporte celular de sodio, aumentando la salida de cloruros y potasio, dando lugar a la diarrea en el ratón lactante (4, 9).

De los ensayos in vivo, se han probado eritrocitos de diferente origen como los de humano tipo 0, de carnero, de buey y de conejo con los diferentes filtrados celulares, observándose la producción de hemólisis, debido a la presencia de hemolisinas en dicho filtrado, siendo más sensibles los eritrocitos humanos (2, 3, 18).

Las características biológicas de Aeromonas hydrophila recuerdan a la enterotoxina del cólera y a la toxina termolábil de E. coli, pero existen algunas diferencias, las cuales se pueden atribuir a la naturaleza de la toxina misma que tiene un Peso Molecular mucho más bajo, no tiene subunidades en su estructura y es muy sensible a la digestión proteolítica, que la inactiva. La forma nativa de ésta toxina puede tener un Peso Molecular más grande y ser rota inmediatamente después de la biosíntesis intracelular. Tal hipótesis se fundamenta por la incapacidad de los gangliósidos o de los anticuerpos antitoxina del cólera o antitoxina termolábil de

E. coli para neutralizar los efectos biológicos (9, 18).

También se ha mostrado que la enterotoxina induce cambios citotóxicos en las células adrenales Y1 y alargamiento de las células de ovario de Hamster chino similares a los producidos por la toxina del cólera y la toxina termolábil de E. coli. Sin embargo la sensibilidad de las células adrenales a la toxina de aeromonas fué menor (7, 9, 14).

Características biológicas de la enterotoxina de A. hydrophi la propuesta por Gemmel.

Sistema ensayado	Resultados
Letalidad	Negativa
Acumulación de fluido (asa intestinal)	Positiva
Elongación de células adrenales Y1	Positiva
Dermonecrosis en piel de conejo	Positiva
Potenciación de la síntesis de AMPc	Positiva
Esteroidogénesis de células adrenales	Positiva
Neutralización por gangliósidos	Negativa
Neutralización de efectos por antisuero de la toxina del cólera o <u>E. coli</u> LT	Negativa

Otra de las exotoxinas producida por A. hydrophila son las hemolisinas, las cuales se han podido purificar por precipitación ácida así como por filtración en gel de Sephadex G-100, la cual presenta un Peso Molecular de --- 48000 y tiene las siguientes características: actividad hemolítica con eritrocitos de conejo, produce acumulación de --- fluido en los intestinos de ratón lactante así como en asa- ligada de conejo y citotoxicidad en las células Vero, sin ---- embargo al calentarse el filtrado que contiene las hemolisinas a 56° C por cinco minutos, la actividad biológica se ve disminuida. Debido a las características que presenta la hemolisina de Aeromonas hydrophila se le puede considerar como una enterotoxina citotónica (9, 23).

Así pues, las exotoxinas producidas por A. hydrophila han demostrado proveer un mecanismo por el cual - esta bacteria puede causar enfermedad gastrointestinal, por lo que es probable, que mínimo una enterotoxina citotónica - así como hemolisinas y otros factores tóxicos, sean los responsables de la infección (6, 13, 18).

La gastroenteritis causada por aeromonas se re conoce clínicamente en donde hay producción de diarrea líquida con tres o más evacuaciones al día, no mucolde y no sanguinolenta con una duración de una o dos semanas, fiebre, vó

mito, dolor abdominal y náuseas, en la mayoría de los pacientes no inmunocomprometidos, en donde la infección es limitada por sí sola requiriendo el reemplazamiento de fluidos y electrolitos. Reportes recientes mencionan que la gastroenteritis por aeromonas en infantes menores de cinco años puede presentarse como una diarrea de color verde-amarillento, espumosa, sanguinolenta, fiebre, náuseas y vómito que llega a extenderse por varias semanas, similar a un síndrome disentérico producido por Salmonella sp. o Shigella sp. y en pacientes adultos se presenta como un cólera fulminante. En estos casos severos y en grupos de alto riesgo como pacientes inmunocomprometidos y en enfermedad leucémica o hepatobiliar, se justifica una terapia antimicrobiana (2, 13, 14, 15).

La enfermedad natural debida a A. hydrophila - se ha encontrado en anfibios; la más conocida es la enfermedad de patas rojas en las ranas. Los reptiles y los peces - también pueden infectarse o ser portadores, por lo que la -- fuente eventual de este microorganismo parece ser peces, --- agua, suelos, alimentos y flora intestinal, los causantes -- de infecciones humanas (17).

Aparte de la enfermedad diarreica causada por Aeromonas hydrophila otras infecciones humanas figuran en -- reseñas de varios autores que describen tres tipos de infección más:

- 1.- Infección en herida, relacionada con exposición al agua o tierra y más frecuentemente durante las estaciones cálidas.
- 2.- Septicemia, casi siempre asociada con cirrosis hepática o leucemia aguda.
- 3.- Otras infecciones como las posoperatorias de heridas, - las de vías urinarias y los casos raros de otitis, meningi-- tis, peritonitis y endocarditis (17).

4.- Objetivos:

a) Llevar a cabo un estudio bibliográfico y experimental sobre el aislamiento e identificación de Aeromonas hydrophila de muestras diarreicas, en el laboratorio de Microbiología - del Hospital General Centro Médico La Raza.

b) Diferenciar cepas enterotoxigénicas de las no enterotoxigénicas mediante un ensayo de hemolisinas.

c) Conocer la frecuencia de Aeromonas hydrophila con respecto a otros patógenos infecciosos, en pacientes con gastroenteritis.

III MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL

a) Se colectaron las 1477 muestras, obtenidas mediante hisopo rectal, de pacientes que presentaban síndrome diarreico, tanto hospitalizados como de consulta externa, durante el periodo de Octubre de 1985 a Mayo de 1986; donde la mayoría de las muestras trabajadas son de origen infantil, sin embargo también fueron considerados 44 adultos. Al mismo tiempo se trabajó con una cepa tipo de Aeromonas hydrophila, proporcionada por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN).

b) Medios de Cultivo para Aislamiento e Identificación.

Los medios de cultivo utilizados para desarrollar el presente trabajo fueron adquiridos de los laboratorios -- Bioxón de México, S. A. y son los siguientes:

- 1.- Agar Mac Conkey
- 2.- Base para Agar Sangre
- 3.- Agar Mueller Hinton
- 4.- Agar Salmonella-Shigella
- B.- Medios Sólidos inclinados en tubo
 - 1.- Agar hierro triple azúcar
 - 2.- Agar lisina descarboxilasa
 - 3.- Agar citrato de Simmons

C.- Medios Semisólidos

1.- Medio de movilidad-Indol-ornitina (MIO)

2.- Medio de oxidación-fermentación (OF)

D.- Medios Líquidos

1.- Caldo Mueller-Hinton suplementado con 10% de glicerol

2.- Caldo soya tripticasa suplementado con 0.6% de extracto de levadura

3.- Caldo de sarraco

c) Reactivos

1.- Reactivo de oxidasa (dimetil-p-fenilendiamino-alfa --- naftol al 1% (19).

2.- Etanol al 96%

3.- Peróxido de hidrógeno

4.- Vaselina Estéril

5.- Discos de papel filtro impregnados con agentes antimicrobianos:

a) Ampicilina (10 mcg)

b) Amikacina (30 mcg)

c) Carbenicilina (100 mcg)

d) Cloranfenicol (30 mcg)

e) Gentamicina (10 mcg)

f) Bactrim (Trimetropin-Sulfametoxazol) (25 mcg)

g) Soluciones

1.- Solución de PBS (buffer de fosfatos) con pH de 6.7

2.- Solución de eritrocitos humanos tipo 0 al 1% y al 5%

3.- Solución de eritrocitos de carnero al 1% y al 5%

2.- METODOS

a) Aislamiento Primario

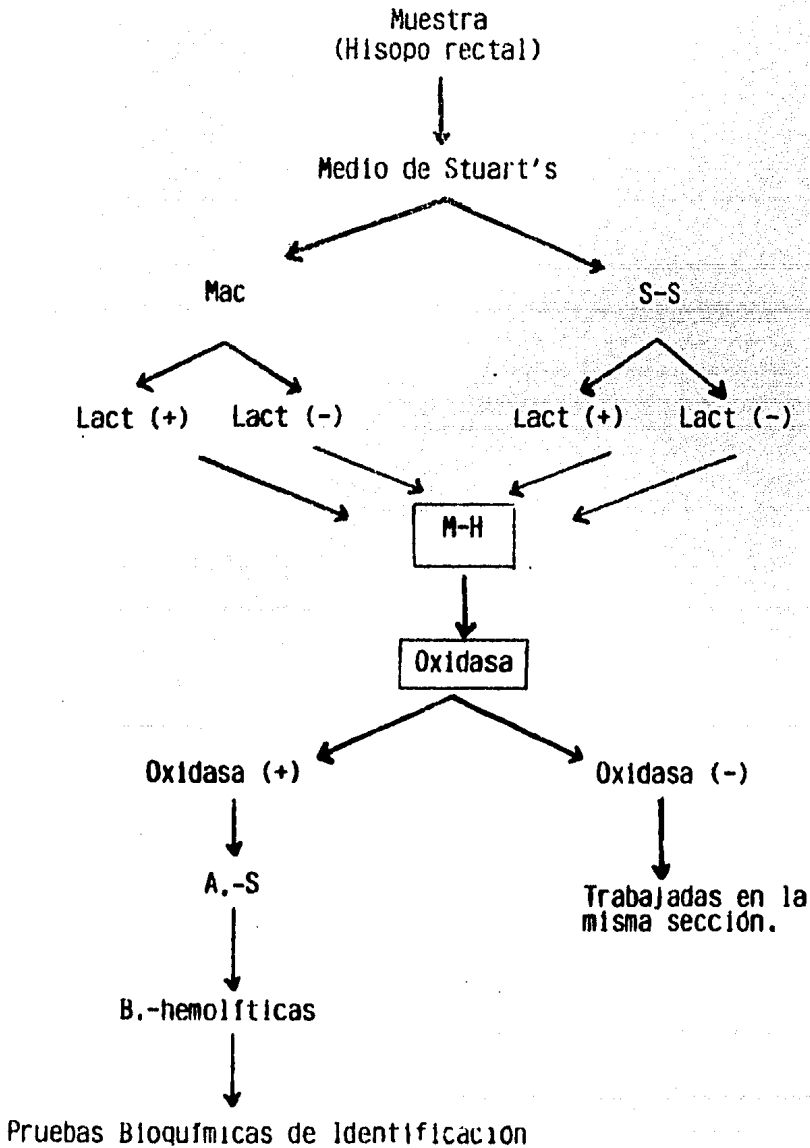
Las muestras clínicas se sembraron en los medios entéricos de Agar Mac Conkey y Agar Salmonella-Shigella, incubando - se a 37°C por 24 horas. Una vez que se logró el crecimiento de microorganismos, se procedió a aislar las colonias de - - - - Aeromonas hydrophila de acuerdo al diagrama no. 1; donde se seleccionaron las colonias de acuerdo a su morfología: redondas, convexas, mucoides y secas, tanto lactosa positivas como lactosa negativas, las cuales se resembraron en Agar Mueller - Hinton bajo las mismas condiciones, a partir del cual se realizó la prueba de citocromo oxidasa.

La prueba de oxidasa es positiva si se hace con cualquier de los reactivos, sobre colonias de Agar Mueller Hinton pero puede ser negativa en colonias que fermentan lactosa en - agares entéricos (17).

La prueba de citocromo oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa, la cual en presencia del oxígeno atmosférico oxida el reactivo fenilendiamino.-

DIAGRAMA No. 1

Aislamiento de Aeromonas hydrophila



alfa-naftol, para formar un compuesto coloreado, el azul de indofenol, en donde la reacción positiva de oxidasa está indicada por la presencia de una coloración azul al agregar directamente el reactivo sobre la colonia y cuando la colonia se deposita con un palillo sobre tiras de papel filtro impregnadas -- con el reactivo (15, 17, 19).

Las cepas oxidasa positivas fueron sembradas en --- Agar Gelosa Sangre para observar la producción de B-hemólisis, sin embargo las cepas no hemolíticas también existen.

B) Identificación Bioquímica.

Los dos pasos más importantes hacia un diagnóstico-presuntivo de Aeromonas hydrophila y su separación de ciertos miembros de la familia Enterobacteriaceae y de ciertos bacilos gram negativos no fermentadores fueron las verificaciones de la reacción de citocromo oxidasa y de la fermentación de carbohidratos, además se emplearon una serie de pruebas complementarias tales como la descarboxilación de la lisina y ornitina, - la movilidad, la gelatinasa y la producción de indol, para su identificación de acuerdo al esquema propuesto por (Cowan y -- Cols), según el diagrama número 2.

DIAGRAMA No. 2

Esquema de Identificación Bioquímica tomado del Cowan y Colis.

Prueba	<u>Aeromonas</u> <u>hydrophila</u>	<u>Plesiomonas</u> <u>Shigelloides</u>	(otros) Vibrios
Lactosa	-/+	+	-/+
Ornitina	-	+	+
Movilidad	+/-	+	+
Indol	+/-	+	+
Lisina	-	+	+
Sacarosa	+	-	-
Gelatina	+	-	+
Manitol	+	-	+

- c) Método estandar de difusión de disco en agar
(método de Bauer-Kirby) (17)

En éste método se colocó con todo cuidado sobre la pla-

ca de cultivo de agar, inoculada en el cultivo de la bacteria en estudio, discos de papel filtro impregnados con diferentes antibióticos en concentraciones específicas. Se incubaron -- las placas toda la noche y se observaron a la mañana siguiente la aparición de una zona de inhibición del crecimiento, al rededor del disco que contenía el agente al cual es susceptible el microorganismo, mientras que las bacterias resistentes crecieron hacia la periferia del disco.

Para la preparación del inóculo se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Con un asa de platino estéril se levantaron 4 ó 5 colonias que mostraron una morfología similar y fueron transferidas a un tubo que contenía 4 a 5 ml de caldo Mueller Hinton.
- 2.- Se incubó el caldo a 35°C hasta lograr una turbidez mayor que la del medio estandar. Por lo general se requirieron 3 horas de incubación.
- 3.- Se ajustó la turbidez con el tubo No. 3 del Nefelómetro de Mc Farland. El inóculo estandar se distribuyó en tubos con tapa de rosca que contenía aproximadamente 4 ml por tubo, se cerraron herméticamente y se conservaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

A los 15 minutos de ajustar la densidad del inóculo, se introdujo un hisopo estéril en la suspensión bacteriana estandar. Se quitó el líquido excesivo presionando el hisopo sobre la pared interna del tubo, por encima del nivel del

líquido. Se sembró en una placa de Agar Mueller Hinton sobre la superficie seca y colocándose los discos de la manera siguiente: utilizando pinzas de punta fina, pasadas por la llama del mechero, se colocaron los discos sobre la placa inoculada, presionando sobre el agar con las pinzas, para que se produzca un contacto total con la superficie del agar. Se distribuyeron los discos de manera uniforme de forma tal que no quedaron a menos de 15 mm del borde de la placa.

Después de la incubación se demostró la susceptibilidad del microorganismo al antibiótico por la presencia de una zona clara de inhibición del crecimiento alrededor del disco.

La interpretación de la zona de inhibición en mm -
fue la siguiente:

Antibiótico	Concentración ug/ml	Resistente	Sensible
Ampicilina	30	≤ 11	≥ 14
Amikacina	30	≤ 14	≥ 17
Carbenicilina	100	≤ 17	≥ 23
Cloranfenicol	30	≤ 12	≥ 18
Gentamicina	10	≤ 12	≥ 15
Bactrim	25	≤ 10	≥ 16

d) Obtención de Filtrado Celular

Las cepas B-hemolíticas de A. hydrophila fueron inoculadas en matraces erlenmeyer conteniendo 25ml de caldo soya-tripticosa suplementado con 0.6% de extracto de levadura, se incubaron con agitación a 37°C durante 24 hrs. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 4°C por 30 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se paso a través de un filtro Millipore de poro 0.45 μ m.

El filtrado que contenía las hemolisinas se almacenó a 4°C por 24 horas (1,2,4).

e) Ensayo de Hemolisinas

Se prepararon una serie de diluciones dobles de 100 microlitos del filtrado en PBS con pH de 6.7 y se adicionaron en igual volumen una suspensión de eritrocitos humanos tipo O-ó eritrocitos de carnero (previamente lavados con solución salina fisiológica al 0.85%) al 1%, se incubaron posteriormente -- una hora a 37°C y luego una hora a 4°C.

La hemólisis se consideró con un 50% de eritrocitos hemolizados y los resultados se expresaron como \log_2 del recíproco de la mayor dilución que mostró hemólisis. Valores mayores de 2 fueron considerados como positivos (2, 4, 21).

IV RESULTADOS

1.- Aislamiento e Identificación de Aeromonas hydrophila

De un total de 1477 muestras trabajadas, se aislaron 8 cepas de Aeromonas hydrophila (0.5%), las cuales crecieron en los medios de agar Mc Conkey, agar Salmonella-Shigella, agar Gelosa Sangre con 5% de eritrocitos de carnero, así como en agar Sangre de Cassman, observándose en los dos últimos medios una gran zona de B-hemólisis (a excepción de la A. hydrophila cepa 809).

En agar Mac Conkey y en agar Salmonella-Shigella se observaron cuatro cepas lactosa positivas y cuatro cepas lactosa negativas, cuya morfología colonial se presentó como colonias lisas, redondas, convexas y algunas mucoides, las cuales se desarrollaron a 37°C y 24 horas de incubación.

Todas las cepas fueron positivas para la producción de las enzimas citocromo oxidasa, catalasa y gelatinasa, asimismo presentaron metabolismo respiratorio y fermentador.

Los resultados de las pruebas bioquímicas complementarias para la identificación de A. hydrophila se muestran en el cuadro No. 1, las cuales fueron relacionadas al diagrama No. 2 de acuerdo al esquema propuesto por (Cowan y Cols).

Cuadro No. 1

Pruebas Bioquímicas de las ocho cepas de Aeromonas hydrophila aisladas de un total de 1477 muestras

Cepa	Lact	LDC	Cit	Mov	Indol	ODC	Mal	Sac
917	+	+	+	+	+	-	-	+
505	+	-	-	+	-	-	-	+
926	+	-	+	+	+	-	-	+
809	+	+	+	-	+	-	-	+
910	+	-	-	-	-	-	-	+
943	-	-	+	+	+	-	-	+
Ext	+	-	+	-	-	-	-	+
402	+	-	-	+	+	-	-	+

De los ocho aislamientos de A. hydrophila, cinco-
 cepas corresponden a niños menores de seis años, con un cua-
 dro clínico de gastroenteritis, siendo éste microorganismo el
 único patógeno entérico aislado. Mientras que las tres cepas
 restantes corresponden a los adultos, uno de ellos presentaba
 enfermedad leucémica, otro había sido sometido a una opera-
 ción quirúrgica del bilipitoneo y el último con un síndrome
 diarreico severo y con el único enteropatógeno aislado.

2.- Sensibilidad a los Antibióticos.

Las cepas de A. hydrophila fueron sometidas a una prueba de sensibilidad a los antibióticos y los resultados obtenidos se muestran en el cuadro No. 2.

Patrón de Sensibilidad a los Agentes Antimicrobianos de las ocho cepas de A. hydrophila aisladas

Cepa	Genta	Amika	Cloran	Bactrim	Ampl	Carbe
917	S	S	R	S	R	R
505	S	S	S	S	R	R
929	S	S	R	S	R	R
809	S	S	S	S	R	R
910	S	S	R	R	R	R
943	S	S	S	R	R	R
Ext	S	S	S	S	R	S
402	S	S	R	R	R	R

en donde S = Sensible

R = Resistente

3.- Valores Hemolíticos

Se probaron las ocho cepas de A. hydrophila para la producción de hemolisinas, tanto con eritrocitos tipo 0 como con eritrocitos de carnero, encontrándose solamente una cepa, la 402 (que fué la última aislada del estudio) capaz de hemolizar ambos eritrocitos, con los eritrocitos humanos tipo 0 se observó un título de 1:256 y un valor hemolítico de 8, mientras que con los eritrocitos de carnero se obtuvo un título de 1:16 y un valor hemolítico de 4. Los mismos valores fueron observados en el caso de la cepa tipo

4.- Frecuencia de Aislamiento de Bacterias Enteropatógenas

Para conocer la frecuencia de Aeromonas hydrophila con respecto a otros enteropatógenos en el laboratorio clínico, se determinó el porcentaje de microorganismos aislados durante el período de Octubre de 1985 a Mayo de 1986 y los resultados se muestran en la tabla No. 1.

TABLA No. 1

Enterobacterias Identificadas durante cada mes del Estudio
en %

Mos.	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May
<u>Aeromonas</u>								
<u>hydrophila</u>	1.5	0	0.8	1.0	0	0	0	0
Salmonella	1.8	0.9	4.8	0	0.9	0	0.6	2.4
Shigella	0.9	0	0	0.5	0.9	0	1.2	1.4
<u>Escherichia</u>								
<u>Coli</u>	31	44	31	19	21	27	32	23

V D I S C U S I O N

Las ocho cepas de Aeromonas hydrophila aisladas, crecieron en los medios de Agar Mac Conkey y Agar Sangre, los cuales son satisfactoriamente recomendados por Jennifer y --- Robinson (1984) para el aislamiento de Aeromonas. Otros autores como Von Graevenitz (1983) recomiendan como medio de enriquecimiento el agua peptonada alcalina, así como los medios de Agar Inositol-verde brillante-sales biliares, Agar Dextrina-fuchsina-sulfito, Agar Xylosa-desoxicolato de sodio-citrato así como el Agar Pril-xylosa-ampicilina como medios complementarios para el aislamiento de A. hydrophila.

De las ocho cepas aisladas, solamente siete presentaron B-hemólisis en Agar Sangre, lo cual corresponde a un 87% del Total de aislamientos, lo que se correlaciona con los estudios realizados por Jennifer (1984), en donde la presencia de B-hemólisis frecuentemente indica la producción de hemolisinas por parte de algunas cepas, lo cual marca la enterotoxicidad en el 97% de las muestras. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que la cepa no hemolítica aislada sea enterotoxigénica, debido a la capacidad de la bacteria de A. hydrophila a producir otras exotoxinas diferentes a las hemolisinas como las enterotoxinas citotónicas, citotoxinas y factores tóxicos que le pueden conferir la enteropatogenicidad y que no fueron probados en éste estudio (13).

Cuando los filtrados celulares fueron probados in vitro con eritrocitos humanos y de carnero, fracasó el ensayo de hemolisinas, debido a que la actividad hemolítica se pierde con el tiempo y por encima de un subcultivo de forma similar ocurrido con los hallazgos de Ljungh y Col. (1977).

Estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos de Norteamérica y en Perth, Western Australia por Burke y Col. (1982, 1983), sugieren que la incidencia de infecciones gastrointestinales por Aeromonas hydrophila (10.8%) es durante los meses calurosos del año (marzo, abril y mayo), sin embargo en México encontramos una mayor incidencia de enfermedades diarreicas por A. hydrophila en el mes de Octubre (1.5%). Por lo que es posible que las variaciones geográficas y estacionales sean importantes para las diferencias en la proporción de aislamientos de A. hydrophila, ya que en aquellos lugares se alcanzan temperaturas mayores a los 35°C, temperatura que favorece el desarrollo de dicha bacteria.

En el mismo estudio una distribución por edades de los pacientes con gastroenteritis producida por Aeromonas hydrophila, se encuentra una mayor incidencia en niños menores de seis años (1983), lo cual se relaciona con nuestros resultados, en donde cinco cepas corresponden a niños menores de seis años y de alto riesgo con enfermedad leucémica e inmunocomprometidos.

VI CONCLUSIONES

- 1.- Se puede realizar el aislamiento de Aeromonas hydrophila en los medios de Agar Mac Conkey y Agar Sangre con 5% de eritrocitos de carnero, así como en agua peptonada alcalina como medio de enriquecimiento, a partir de muestras diarreicas y otras muestras clínicas en el laboratorio de Microbiología.
- 2.- Las pruebas más importantes para la identificación de Aeromonas hydrophila y su diferenciación de la familia-Enterobacteriaceae y otros vibrios son: la reacción de oxidasa, la fermentación de lactosa y sacarosa así como la descarboxilación negativa de lisina y ornitina.
- 3.- Las cepas de Aeromonas hydrophila B-hemolíticas podrían ser caracterizadas y diferenciadas como enterotoxigénicas por la producción de hemolisinas en pacientes con síndrome diarreico.
- 4.- Las propiedades de las hemolisinas se pierden después de un subcultivo así como a través del tiempo, por lo que se debe realizar el ensayo de hemolisinas inmediatamente después del aislamiento de la cepa de Aeromonas hydrophila.

- 5.- El microorganismo Aeromonas hydrophila presenta una elevada sensibilidad a los agentes antimicrobianos Gentamicina y Amikacina (100%), mientras que a Ampicilina y Carbenicilina es resistente, por lo que puede sugerirse una terapia con éstos antimicrobianos.
- 6.- Durante el tiempo en el que se efectuó el estudio, de Octubre de 1985 a Mayo de 1986, se encontró a Aeromonas hydrophila como causa de enfermedad diarreaica en mayor frecuencia en Octubre (1.5%) que en los demás meses.
- 7.- La frecuencia de aparición de Aeromonas hydrophila en pacientes con gastroenteritis, con respecto a otros patógenos es el siguiente: Aeromonas hydrophila 8 (0.5%), Shigella sp 10 (0.7%) Salmonella sp 22 (1.4%) y Escherichia coli enteropatógena 430 (15.4%), de un total de 1477 muestras trabajadas.

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Atkinson, H.M., Trust, T.J.: Hemagglutination Properties And Adherence Ability Of *Aeromonas hydrophila*. Infection and Immunity. Mar.1980:938-946
- 2.- Burke, V., Gracey, M., Robinson, J., Peck, D., Beaman, J., and Bundel, C.; The Microbiology Of Childhood Gastroenteritis *Aeromonas* Species and Other Infective Agents. J. Infect. Diseases., 1983; 148:68-73
- 3.- Burke, V., Robinson, Jennifer., Atkinson, H.M., and Gracey, Michael.; Biochemical Characteristics of Enterotoxi---genic *Aeromonas* spp. J. Clin. Microbiol. Jan.1982:48-52
- 4.- Burke V., Robinson, Jennifer., Berry, R.J., and Gracey, M.:-- Detection of Enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by a Suckling Mouse Test. Pathol. Society., 1981; 14:401-408
- 5.- Cowan and Steel.; Manual For the Identification of Medical Bacteria. New York., Cambridge University Press, -- 1974, p.p.100
- 6.- Cumberbatch, N., M.J. Gurwith., C. Langston, R.B. Sack, and - J.L. Brunton.; Cytotoxic Enterotoxin Produced By *Aeromonas*

- hydrophila; Relationship of Toxigenic Isolates to Diarrheal Disease. Infect. Immun. 1979;23:829-837
- 7.- Chakrabort Y.T., Montenegro, M.A., Sanyal, S.C., Helmuth, R., Bulling, E., and Timmis, K.N.: Cloning of Enterotoxin-Gene from *Aeromonas hydrophila* Provide Conclusive Evidence of Production of Cytotoxic Enterotoxin. Infect. Immunity. Nov. 1984;435-441
- 8.- Fllemars, C.B., Gordon, R.W., Hazen, T.C., and Esch, G.W.: - *Aeromonas* Distribution and Survival in a Thermally Altered Lake. Appl. Environ. Microbiol. Jan. 1977;114-122
- 9.- Gemmel, C.G.: Comparative Study of the Nature and Biological Activities of Bacterial Enterotoxins. J. Med Microbiol. 1984; 17:217-235
- 10.- Goodman, L.S., and Gilman, Alfred.: Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México D.F. Editorial Interamericana, 1979 5a. edición.
- 11.- Gracey, Michael., Burke, V., Robinson, Jennifer.: *Aeromonas* Associated Gastroenteritis. Lancet. Dec. 1982;1304-1306

- 12.- Haze, C., Terry, Fliermans, B. Carl., Hirsch, P. Robert., and Esch, W. Gerald.: Prevalence and Distribution Of *Aeromonas hydrophila* in the United States. Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36:731-738
- 13.- Holmberg, D., Scott., and Farmer, III J.: *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas Shigelloides* Causes of Intestinal Infection. Review. Infect., 1984, 6:633-639
- 14.- Janda, Michael. J., Bottone, Edward., Skinner, C. V., and Donna, C.: Phenotypic Markers Associated with Gastrointestinal *Aeromonas hydrophila* Isolates from Symptomatic Children. J. Clin. Microbiol 1983; 17:588-591
- 15.- Janda, M. J., Dixon Agnes., Raucher, Beth., Clarck, R. B., and Bottone E. J.: Value of Blood Agar for Primary Plating and Clinical Implication of Simultaneous Isolation of *Aeromonas hydrophila* and *aeromonas caviae* from a Patient with Gastroenteritis. J. Clin. Microbiol., 1984; 20: 1221-1222
- 16.- Ketover Bart. P., Young, Lowell. S. and Armstrong, Donald.: Septicemia due To *Aeromonas hydrophila*: Clinical and Immunologic Aspects. J. Infect. Diseases. March, 1973; 127: 284-299

- 17.- Lennete, Balows, Hausler, Truant.: Manual de Microbiología Clínica. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana 1982, p.p. 279-285
- 18.- Ljungh, Asa., Popoff, Michael., and Wadstrom, Torkel.: Aeromonas hydrophila In Acute Diarrheal Disease: Detection of Enterotoxin and Biotyping of Strains. J. Clin Microbiol. Aug. 1977: 96-100
- 19.- Mac Fadin, Jean.F.: Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. México, D.F.- Ed. Médica Panamericana, 1984, p.p. 154, 236
- 20.- Martínez-Silva, Guzmán-Urrego., Caselitz, F.H.: Zur Frage der Bedeutung von Aeromonasstämmen Bei Säuglingsenteritis. Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie. - 1961; 12: 445-451
- 21.- Robinson, Jennifer., Burke, V., Worthy, P.J., Beaman, Jannice., and Wagener, Linda.: Media for Isolation Of Aeromonas spp from faeces. J. Med. Microbiol., 1984; 18: 405-411
- 22.- Trust, T.J., Chipman D.C.: Clinical Involvement Of Aeromonas hydrophila. Canadian Medical Association Journal. - 1979; 120: 942-946
- 23.- Tsutomu, Asao., Yoshio, Kinoshita, Shunji, Kuzaki., Takashi -

Uemura, and Genji, Sakaguchi.: Purification and Some -
Properties of *Aeromonas hydrophila* Hemolysin. Infect.-
Immun. Oct.1984:122-127

- 24.- Von, G.A., and Buchener, Candid.: Evaluation of Differential
and Selective Media for Isolation of *Aeromonas* and ---
Plesiomonas sp from Human Faeces. J. Clin.Microbiol., -
1983;17:16-21.