

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

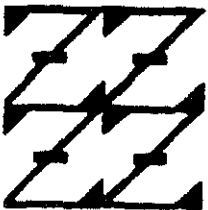
ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

"Aislamiento y caracterización de *Aeromonas* a partir de muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM"

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA: LILIA TEQUIANES BRAVO

DIRECTOR. Q.B.P DORA A. PÉREZ GONZÁLEZ  
ASESOR: Q.F B. YOLANDA FLORES CABRERA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

200080

JULIO 2001.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## DEDICADA A

Mi papá **Enrique Tequianes Hernández**

*Por prepararme para la gran batalla de la vida; por confiar en mí y ayudarme en cada momento. La mejor Herencia que me ha dado es el apoyarme a terminar mi carrera.*

Mi mamá **Juanita Bravo Hernández**

*Por enseñarme a caminar no solo paso a paso, si no también a caminar con el pensamiento y ser mi mejor amiga.*

Mis hermanos **Oswaldo y Enrique**

*Por ser parte de mi vida y estar conmigo en las buenas y en las malas, los quiero mucho.*

Mis hermanas **Jazmín, Nancy y Hannanel**

*Por ser parte de mis motivaciones de triunfar y compartir sus alegrías, las quiero muchísimo.*

En memoria de mi papá **Daniel Tequianes Morales**

*Por haberme enseñado el amor al trabajo de Dios y su lucha por salir adelante.*

En memoria de mi Abuelo **Manuel Bravo Maríz**

*Que siempre me alentó a continuar con mis estudios y enseñó la bondad del ser humano.*

*Mis Amigas Q.F.B.*

**Miriam Soriano López, Miriam Hinojosa Morales, Elena Flores Ponce,  
Martha Grifaldo Padrón, Luz María González Huerta**

*Por todo lo que compartimos durante la carrera y su valiosísima amistad.*

**Q.F.B. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez**

*Por su apoyo incondicional y amistad. Gracias por tu tiempo para que este  
trabajo saliera lo mejor posible.*

**Q.F.B. Raquel Cariño Cortés**

*Por su amistad y consejos valiosísimos que me ha brindado.*

*Nunca te olvidaré*

*Mis amigos del Laboratorio L-313*

**Rosangela Castañares Ramírez, Beatriz Barrera Martínez, Laura  
Ventura Ayala, Perla Fernández Preciado, Marilandy Vite, Raúl  
Sánchez, Cuitlahuac Estrada Segundo**

*Por compartir excelentes momentos y buenos deseos.*

**Q.B.P. Graciela Castro Escarpulli y Q.B.P. Guadalupe Aguilera A.**

*De E.N.C.B. IPN Laboratorio de Bacteriología Médica*

*Por sus atenciones e información brindada para la realización de este  
trabajo.*

*Nunca las olvidaré, muchas gracias.*

## AGRADECIMIENTOS

### **Q.B.P. Dora Alicia Pérez González**

*Por todo su apoyo, tiempo y enseñanzas, para la realización de este trabajo,  
como el mostrarme a la gran mujer que es.  
Siempre la admirare y recordare con mucho cariño*

### **Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera**

*Por su paciencia, tiempo y correcciones para la realización de este trabajo,  
y ser una maravillosa persona.*

### **Dr. Rubén Marroquín Segura**

*Por su apoyo incondicional, consejos durante la carrera y el haberme  
permitido conocerlo como un gran profesor y ser humano.*

### **M.C. Maurilio Flores Pimentel**

*Por todas sus atenciones y apoyo durante mi estancia en el Laboratorio  
L-313. Y haber aceptado ser mi sinodal.*

### **Q.F.B. Roberto C. González Meléndez**

*Por su disponibilidad, enseñanzas durante la carrera y consejos para la  
realización de este trabajo.*

### **Q.F.B. Patricia Vidal Millán**

*Por enseñarme una parte fundamental de ser Q.F.B.*

*Y a todos mis profesores de la carrera de Q.F.B. de la F.E. S. Zaragoza, y a  
esta gran Institución que es la U.N.A.M.*

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campus II Laboratorio L-313, dentro del programa de "Análisis microbiológico y de aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1 en muestras de agua de la F.E.S. Zaragoza, Clínicas Multidisciplinarias y otras dependencias de la U.N.A.M."

## INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
1. Antecedentes históricos	5
2. Hábitat natural	6
3. Taxonomía	7
4. Género <i>Aeromonas</i>	9
5. Factores de virulencia	9
5.1 Enterotoxinas	
5.1.1 Enterotoxinas citotónicas	10
5.1.2 Enterotoxinas citotóxicas	11
5.2 Hemolisinas	
5.2.1 $\alpha$ -hemolisinas	12
5.2.2 $\beta$ -hemolisinas	13
5.3 Proteasas	14
5.4 Lipasas	14
5.5 Adherencia	14
6. Aislamiento	15
7. Caracterización bioquímica	17
8. Importancia clínica del género	18
9. Resistencia a compuestos antimicrobianos	21
10. Ecología y mecanismos de transmisión	22
11. Datos epidemiológicos	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
OBJETIVOS	29
HIPÓTESIS DE TRABAJO	29
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	30
DISEÑO ESTADÍSTICO	31



---

## RESUMEN

El género *Aeromonas* pertenece a la familia *Vibrionaceae*, son bacilos Gram negativos de vida libre que se encuentran en agua dulce o salada, cloradas, en grifos de tuberías sanitarias y de desagüe, peces, suelos y en alimentos. Su importancia médica radica en que ocasiona cuadros diarreicos similares a los de la toxina de *Vibrio cholerae*.

Las tres especies de riesgo para el humano son *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*, pero se han caracterizado otras especies debido al grado considerable de complejidad genética (HGs) y heterogeneidad biológica.

En México existen datos escasos del aislamiento de *Aeromonas* a partir de muestras de agua potable, fuente potencial de infecciones intestinales, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar este género en 70 muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM que dan servicio a la comunidad; utilizando tres métodos: Factor de CAMP, convencional y miniaturizado. Lográndose aislar 37 cepas del género *Aeromonas* con predominio de la especie *A. hydrophila*. La frecuencia de los aislamientos se incrementó en los meses de mayo a agosto, debido a que las condiciones ambientales favorecieron su crecimiento. Es necesario obtener más información que permita conocer la epidemiología de este género y el riesgo que representa en las aguas que han sido tratadas.

---

## INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Aeromonas*, están siendo reconocidos como importantes patógenos intestinales y extraintestinales, tanto de humanos como de una gran variedad de vertebrados e invertebrados.

Las enfermedades causadas por *Aeromonas* en el hombre pueden dividirse en dos grandes grupos:

- A) infecciones localizadas (gastroenteritis y celulitis) y,
- B) infecciones invasivas (bacteremia, meningitis, peritonitis, necrosis muscular).

La gastroenteritis es la presentación más común de infecciones en niños y adultos, la cual es usualmente autolimitada. Las diarreas provocadas por *Aeromonas* son debidas frecuentemente a cepas toxigénicas las cuales pueden ser investigadas por diferentes pruebas in vitro (células Vero, células Adrenales Y-1), se han incrementado los reportes acerca del aislamiento de estas bacterias de una amplia variedad de alimentos contaminados. Como las *Aeromonas* se distribuyen en la naturaleza, la principal fuente de infección lo constituye los alimentos y el agua; lo que incluye el agua potable, clorada, las aguas negras y en menor frecuencia el agua del mar. Algunos estudios refieren que es posible aislar a las *Aeromonas* hasta en un 7% de las aguas de consumo y en un 50% en peces que viven en agua dulce. Aquellas áreas en las que se presenta actividad de los humanos y como resultado se tienen altos índices de contaminación fecal, se consideran óptimos estos lugares para la recuperación de *Aeromonas*. La distribución de las especies parece estar relacionada con la contaminación fecal, ya que *A. caviae* predomina en aguas de alcantarillado, mientras que en agua dulce o marina con bajo nivel de contaminación la distribución de *A. caviae* y *A. hydrophila* parece ser igual. En aguas sin contaminación, la proporción de *A. sobria* con respecto a la de las otras especies aumenta de manera significativa. Dada la diversidad de muestras en las que podemos encontrar a las *Aeromonas*, así como de su presencia ubicua en la naturaleza, es que se hace necesario el tipificar o caracterizar las cepas obtenidas a partir de diferentes fuentes y así tener información útil para estudios epidemiológicos. Esto es, obtener información microbiológica para entender más acerca de los factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad y la distribución en el medio ambiente del género *Aeromonas*.

---

## MARCO TEÓRICO

Las enfermedades infecciosas, ocupan uno de los primeros lugares a nivel mundial de las causas de muerte del ser humano, registrándose principalmente entre 1985 a 1990. Entre ellas las enfermedades del aparato gastrointestinal son un gran problema de salud pública especialmente entre la población infantil y preescolar; que en su forma patológica se presenta como diarrea, definiéndose ésta como el incremento de los líquidos en el lumen intestinal, aunado al aumento en el número de evacuaciones normales.<sup>1,2</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que en 1992 los niños menores de 5 años que vivían en los países en vías de desarrollo presentaron en promedio 3 episodios de diarrea en ese año, además de representar la cuarta causa de mortalidad. La tasa nacional de riesgo de morir por diarrea es 13.6 veces mayor en menores de un año, 19 veces mayor en preescolares y 5.3 veces mayor en la población de más de 65 años; mostrando variación estacional con el incremento en el número de casos en primavera-verano y descenso en los meses de diciembre-febrero.<sup>3,4</sup>

Los agentes etiológicos asociados a la infección gastrointestinal son diversos microorganismos como: bacterias, parásitos, hongos y virus. Las bacterias son uno de los principales microorganismos patógenos a nivel mundial, incluyendo México, se han considerado como patógenos clásicos a los géneros *Salmonella* (2-6%), *Shigella* (8-12%), algunos serotipos de *E. Coli* (10-20%), *Campylobacter jejuni* (12-15%), *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringes*.<sup>5,6</sup>

Con el avance de las técnicas de aislamiento e identificación bacteriana, se han agregado al ambiente clínico otros agentes bacterianos entre los cuales destaca el género *Aeromonas* que ha tomado gran interés por su alta frecuencia de aislamiento de diferentes sitios anatómicos del cuerpo humano.<sup>7</sup>

**Cuadro 1. SITIOS ANATÓMICOS DE LOS CUALES SE HA AISLADO  
Aeromonas ENTRE 1981-1985.<sup>8</sup>**

<b>SITIO ANATÓMICO</b>	<b>No. DE CASOS AISLADOS (%)</b>
<i>APARATO GASTROINTESTINAL</i>	<b>40</b>
(+) Heces	38 (95)
Biopsia de colon	2 (5)
<i>HERIDAS /ABCESOS</i>	<b>19</b>
Pierna	6(32)
Abdomen	3(16)
Boca/ perioral	2(10)
Pecho	1(15)
Inespecífico	7(37)
<i>APARATO RESPIRATORIO</i>	<b>10</b>
Espujo	5(50)
Garganta	4(40)
Pulmón	1(10)
<b>SANGRE</b>	<b>11</b>
<i>OTROS FLUIDOS</i>	<b>20</b>
Bilis	9(45)
Diálisis	3(15)
Peritoneal	2(10)
Ascitis	1(5)
Punción	1(5)
Pericardial	1(5)
Pleural	1(5)
Epiplón	1(5)
Orina	1(5)

El género *Aeromonas* también es considerado como un patógeno en animales principalmente en sapos, reptiles, peces y otros anfibios (Cahill,1990); provocando problemas en el ámbito pesquero en numerosas décadas.<sup>8</sup>

## I. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El nombre *Aeromonas* proviene de las raíces griegas "aer" que significa aire o gas ; "monas" que significa unidad . Así el nombre de *Aeromonas* es **UNIDAD FORMADORA DE GAS**. Este género fue aislado por primera vez de agua potable por Zimmerman en 1890 y el año siguiente fue aislado de sangre de rana por Sanarelli's, el cuál demostró la patogenicidad del género en estos anfibios. Durante varios años muchos investigadores la aislaron y nombraron de diferentes formas.

**Cuadro 2. DIFERENTES NOMBRES QUE ADOPTÓ EL GÉNERO *Aeromonas* DESDE 1890 A 1955.<sup>9</sup>**

AÑO	AUTOR	NOMBRE
1890	Zimmerman	<i>Bacillus punctatus</i> <sup>b</sup>
1890	Ernst	<i>Bacillus ranicida</i> <sup>b</sup>
1891	Sanarelli's	<i>Bacillus hydrophilus fuscus</i>
1891	Lehmann and Neumann	<i>Bacterium punctatum</i>
1900	Beijerinck	<i>Aerobacter liquefaciens</i>
1901	Chester	<i>Bacillus hydrophilus Sanarelli</i>
1917	Bergey y col. 1923, 1934	<i>Bacillus (Proteus, Pseudomonas, Escherichia) ichthyosmius</i>
1923	Bergey y col. 1934	<i>Achromobacter punctatum</i>
1930	Bergey y col. 1934	<i>Pseudomonas (Flavobacterium) fermentans</i>
1930	Breed y col. 1948	<i>Pseudomonas punctata</i>
1936	Miles y Halnan	<i>Proteus melanovogenes</i>
1936	Sherago	<i>Pseudomonas caviae</i>
1954	Crawford	<i>Pseudomonas formicans</i>
1955	Caselitz	<i>Vibrio jamaicensis</i>

(b) *B. punctatus* y *B. ranicida* fueron probablemente miembros de *Pseudomonas*

Durante 60 años estos microorganismo fueron aislados a partir de una variedad de animales de sangre fría y caliente, clasificándolos como miembros de diversos géneros tales como *Aerobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Vibrio*, por lo que se buscó una correcta posición taxonómica. En 1936, Kluyver y van Niel

---

proponen que el género *Aeromonas*, significa “unidad productora de gas”, propiedad que distingue al género, esto fue respaldado por los estudios de Stainer’s.<sup>9,10</sup>

Eventualmente fue adoptado en la séptima edición del *Manual de Bergey de bacteriología Sistemática*, en donde Sniesko propone cuatro especies dentro de la familia Pseudomonadaceae, tres con **movilidad** *A. hydrophila*, *A. punctata* y *A. liquefaciens* y una **no móvil** *A. salmonicida*. No sólo la movilidad del microorganismo fue útil para su clasificación si no también se considero su grado de patogenicidad. La historia patológica de las *Aeromonas* no móviles data desde 1894 con la descripción de Emmerich y Weibel con *Bacillus der Forrellenseuche* que causa una epizoonosis en trucha, similar a la bacteria que causa furunculosis en peces, llevando al nombre de *Bacillus salmonicida*. En 1930 se dieron los primeros reportes sobre las especies de *Aeromonas* móviles que provocan infección en el ser humano. Hill y colaboradores en 1954 encontraron una “nueva” bacteria que provocó la muerte fulminante de una mujer que padeció una septicemia metastatica, de acuerdo con los resultados del análisis del material de la necropsia, el microorganismo causante fue *Aeromonas*. En los años sesentas, Shubert propone una nueva clasificación de las *Aeromonas*, en la cual incluyó tres especies y seis subespecies: **especies móviles** *A. hydrophila* con subespecie *hydrophila*, *anaerogenes* y *proteolítica*, *A. punctata* con subespecie *punctata* y *caviae*, y **especie no móvil** *A. salmonicida* con subespecies *A. salmonicida*, *achromogenes* y *masoucida* Esta clasificación fue publicada en la octava edición del manual de Bergey dentro de la Familia Vibrionaceae y nombrada como género *Aeromonas*.<sup>11,12</sup>

## 2. HABITAT NATURAL

Las *Aeromonas* se aíslan frecuentemente de fuentes naturales como son suelo y agua dulce o salada, aún de agua clorada y no clorada, esta última es probablemente la fuente más importante ya que ha llegado a aislarse de ríos, lagos, piscinas y mar. El número de *Aeromonas* es generalmente menos de 10 UFC/ mL en un sistema de distribución de agua. Este es un hecho muy significativo ya que se han descrito varios casos de infección en piel y musculo (por herida o traumatismo) en personas que se exponen al agua como los nadadores incluyendo a los buzos, también se ha aislado de alimentos como productores de carne de res, cerdo, aves, mariscos, helados y leche cruda.

---

*A. sobria* se aísla frecuentemente de casos clínicos que del medio ambiente, mientras que *A. hydrophila* se aísla con mayor frecuencia del ambiente que de muestras clínicas.

### 3. TAXONOMIA

La taxonomía del género ha dependido de una compleja mezcla de datos fenotípicos y genotípicos. Las especies se refieren como fenoespecies mientras que los grupos de hibridación (HG) se denominan genoespecies con base en la hibridación de DNA total. El género *Aeromonas* fue descrito por Popoff (1984) en cuatro grupos: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* y *A. salmonicida*, las cuales son contempladas en la Familia Vibrionaceae, bajo la sección quinta del *Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática*; en la actualidad, por ser un bacilo Gram negativo y anaerobio facultativo aún esta comprendida en esta sección, sin embargo, como resultado de los estudios de hibridación de DNA-DNA hechos por Cowell y colaboradores (1986), se ha propuesto excluir a éste género de la Familia Vibrionaceae, dando origen a la Familia Aeromonadaceae, esta propuesta ha sido respaldada por pruebas de secuenciación y comparación de rRNA por Janda & Abbott, (1998). La constante investigación de las características fenotípicas y genotípicas del género *Aeromonas* har. llevado a que en la actualidad se consideran once fenoespecies y catorce genoespecies reconocidas. *A. hydrophila* (HG 1,2,3), *A. sobria* (HG 7,8,9), *A. caviae* (HG 4, 5A, 5B y 6), *A. veronii* sv *veronii* (HG 10), *A. media* (HG 5A y 5B), *A. salmonicida* (HG 3), *A. eucrenophila*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allusaccharophila*. En el manual de Microbiología Clínica de Murray (1999), se dan a conocer nuevas especies y subespecies: *A. ichthiosmia*, *A. enteropelogenes*, *A. encheleia* (HG 11), *A. bestiarum*, *A. popoffi* y *A. salmonicida* subespecie *smithia*.<sup>13-16</sup>

**Cuadro 3. GENOESPECIES Y FENOESPECIES DE *Aeromonas* Y SU FRECUENCIA EN MUESTRAS CLÍNICAS.<sup>13</sup>**

DNA DGS	GENOESPECIE	FENOESPECIE	FRECUENCIA MUESTRAS CLÍNICAS	COMENTARIOS
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	++	
2	<i>A. bestiarum</i>		+	
3	<b>PSICROFÍLICOS NO MÓVILES</b> <i>A. salmonicida</i> subs <i>salmonicida</i> <i>A. salmonicida</i> subs <i>achromogenes</i> <i>A. salmonicida</i> subs <i>masoucida</i> <i>A. salmonicida</i> subs <i>smitha</i> <b>MESOFÍLICOS MÓVILES</b> Anónimo	<i>A. salmonicida</i>	-	Sorbitol positivo
		<i>A. hydrophila</i>	+	
4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	++	
5A	( <i>A. media</i> )	<i>A. caviae</i>	+	HGs 5A y 5B forman dos subespecies y 5B forma dos biotipos
5B	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>	-	
6	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>	- <sup>b</sup>	Similitud con <i>A. encheleia</i> . Gas de glucosa +
7	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	-	
8	<i>A. veronii</i> biotipo <i>sobria</i>	<i>A. sobria</i>	+-	Es incluida como <i>A. ichthiosmia</i>
10	<i>A. veronii</i> biotipo <i>veronii</i>	<i>A. veronii</i>	+	
9	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	+	
11	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>	-	Descarboxilación de la ornitina positivo
12	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>	+	Manitol negativo
13	Anónimo	<i>Aeromonas</i> grupo 501	+ <sup>c</sup>	Indol positivo Descarboxilación de lisina negativa
14	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>	+	Incluyendo <i>A. enteropelogenes</i>
15	<i>A. allasaccharophila</i>	<i>A. allasaccharophila</i>	- <sup>d</sup>	
16	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>	-	

(++) comúnmente, (+) rara vez, (-) no hay datos del aislamientos.

<sup>b</sup> una cepa se aisló de herida en Suiza.

<sup>c</sup> dos cepas son conocidas y se relacionan con *A. schubertii*

<sup>d</sup> una cepa se aisló de muestras de diarrea en Estados Unidos.



---

#### 4. GÉNERO AEROMONAS

Las características morfológicas del género *Aeromonas* son bacilos rectos Gram negativos con extremos redondeados o cocoides; miden de 0.3 a 1.0 micras de diámetro y de 1.0 a 3.5 micras de largo, ocasionalmente pueden presentar cierta curvatura somática, pueden encontrarse aislados en pares o cadenas cortas, no forman esporas. Generalmente son móviles por un solo flagelo polar de 1.7 micras de largo y en cultivos jóvenes en medios sólidos pueden formar flagelos peritricos ( la única especie móvil es *A. salmonicida* y *A. media*) pero algunas otras especies pueden presentar un pequeño flagelo.<sup>17</sup>

Las características fisiológicas corresponden a anaerobios facultativos, el metabolismo de la glucosa es respiratorio y fermentativo, otros carbohidratos son hidrolizados a ácido o ácido / gas (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>). Son oxidasa y catalasa positivas, reducen los nitratos a nitritos, son capaces de crecer en un intervalo amplio de temperatura, las especies mesófilas (*A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*) entre los 0 ° y los 45°C, mientras que *A. salmonicida* es considerada como una especie psicrófila, solo crece por debajo de los 35°C: se desarrollan a pH de 4.5 a 9.0 . pueden crecer en medios que contengan cloruro de sodio (NaCl) al 0% y 4% de concentración La relación guanina-citosina de su DNA es 57 a 63 moles %.<sup>18 19</sup>

Estudios recientes demuestran que producen exoenzimas por ejemplo D-Nasas, lipasas, amilasas, fosfatasas, proteasas, gelatinasas, entre otras. Las *Aeromonas* son resistentes al componente Vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpreindina), pero se han reportado algunas especies susceptibles al O/129.<sup>20</sup>

#### 5. FACTORES DE VIRULENCIA

Las investigaciones sobre *Aeromonas* han conducido al descubrimiento de una variedad de factores de virulencia principalmente en cepas de *A. hydrophila*, tales como  $\alpha$  y  $\beta$  hemolisinas, enterotoxinas, citotoxinas y factores de adherencia e invasividad; Se ha tratado de establecer una relación entre estos factores y los biotipos de *Aeromonas*, observándose que en la mayoría de los casos, las cepas toxigénicas aisladas de muestras fecales de niños con diarrea se asocian a pruebas positivas de lisina descarboxilasa y de Voges-Proskauer; no hidrolizan la arabinosa y producen gas a partir de la glucosa. En la literatura se encuentra una clasificación de cepas enterotoxigénicas por su biotipo basándose en una separación por medio de la prueba Voges-Proskauer. Si ésta prueba es negativa, no oxida el

---

gluconato y no produce gas de la glucosa por lo que se consideran que no son productoras de enterotoxina. Si las cepas son Voges-Proskauer positivas se recurre a la prueba de la hemolisina, ya que se sabe que aproximadamente el 97% de las cepas  $\beta$ -hemolíticas coinciden con la producción de la enterotoxina. En el caso de las cepas arabinosa negativas pueden implicarse como enterotoxigénicas con un 10% de error.<sup>21</sup>

También se ha demostrado que los biotipos de *A. hydrophila* para las pruebas positivas lisina descarboxilasa y Voges-Proskauer son enteropatogénicas, las cuales se han definido por pruebas de asa ligada en conejo o citotoxicidad en células Hela. Sin embargo la enterotoxina de *Aeromonas* en asa ligada de conejo provoca una acumulación de un líquido claro, mientras que las hemolisinas dan negativa la prueba, pero puede haber acumulación de un fluido sanguinolento debido al daño de la mucosa. Las hemolisinas causan induración de capilares y dermonecrosis en la piel de conejos, mientras que la toxina produce induración pero no dermonecrosis. Inmunológicamente existe una reacción cruzada entre ambas hemolisinas<sup>22</sup>

## 5.1 ENTEROTOXINAS

Son productos extracelulares que tienen la capacidad de afectar al epitelio intestinal. Se clasifican en citotónicas y citotóxicas.

### 5.1.1 ENTEROTOXINAS CITOTÓNICAS

Dos de ellas se caracterizan por estudios con enzimas de restricción y clonación. La primera esta codificada en una región de 4.0 Kb y su producto es un polipéptido de 35 KDa, éste es termolábil, perdiendo su actividad biológica al calentarlo a 56 °C por 20 minutos; mientras que la otra toxina es termoestable y esta codificada en una región de 4.8 kb, ésta es producida por la mayoría de las cepas de *A. hydrophila* y *A. sobria*. En su actividad biológica en células CHO (células de mono verde) elevan el nivel de PgE<sub>2</sub> y estimulan la esteroidogénesis. Las prostaglandinas producidas por las células a su vez, estimulan a la enzima adenilato ciclasa intestinal, por lo que se incrementa el nivel de AMPc y se produce la salida de sales y agua, esto también se ha podido observar al instalarlas directamente en el lumen intestinal de conejo o en las arterias mesentéricas

---

Por lo anterior se comprende que en infecciones provocadas por las cepas de *Aeromonas* aisladas, la diarrea sea el síntoma más común. Para probar la presencia de la enterotoxina citotónica de *A. hydrophila* en sobrenadantes de cultivo, se ha usado la respuesta de las células adrenales de ratón Y1, ya que ante su presencia estas se redondean, esta actividad es neutralizada con anticuerpos anti-toxina colérica. Las pruebas anteriores y la acumulación de fluido en asa ligada de conejo se correlacionan bien. Por otra parte se ha comprobado que la capacidad de alargar células CHO también es una típica respuesta enterotóxica.<sup>24</sup>

### 5.1.2 ENTEROTOXINAS CITOTÓXICAS

Estas incrementan el daño o muerte celular y producen síntomas parecidos a los de disentería en cerca del 20% de las infecciones con cepas enterotoxigénicas de *Aeromonas*. Su efecto ha sido estudiado en diversas líneas celulares (Vero, INT 407, Chimp liver, CHO o Hela) usando sobrenadantes libres de células. La producción de citotóxicas se ha relacionado estadísticamente con una reacción positiva de lisina descarboxilasa, por lo que esta prueba podría ser considerada como marcador de virulencia. Se ha publicado que las cepas de *Aeromonas sobria* son citotóxicas para células Vero.

Sin embargo, en el caso de *A. caviae* existe variabilidad según el país de origen y las condiciones en que se determina su citotoxicidad. En cuanto a las condiciones en que se hace la determinación, en un estudio se observó que la glucosa reprime la producción de citotóxicas en *A. caviae* pero no en *A. hydrophila* y *A. sobria*, y que la producción de toxinas es también dependiente del tiempo. Se ha reportado la influencia de la temperatura de incubación sobre los resultados, pues en un estudio realizado la mayoría de cepas de *A. caviae* que produjeron citotoxinas a 30 °C fueron incapaces de producirlas a 5°C. Por otra parte, muchas cepas de *Aeromonas* móviles (*A. hydrophila* en especial) son psicrotóxicas y son capaces de producir enterotoxinas a temperatura de refrigeración (2<sup>o</sup>-13<sup>o</sup> C).<sup>25,27</sup>

**Cuadro 4. PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS PRODUCIDAS POR  
*Aeromonas* MÓVILES.<sup>27</sup>**

ENTEROTOXINA CITOTÓNICA		ENTEROTOXINA CITOTÓXICA	
ACTIVIDAD "In vitro"	ACTIVIDAD "In vivo"	ACTIVIDAD "In vitro"	ACTIVIDAD "In vivo"
*redondeamiento de células Y-1 sin muerte celular.	* acumulación de líquido en asa ligada de conejo.	*redondeamiento y muerte celular Y-1 y CHO.	*acumulación de líquido en asa ligada de conejo.
*alargamiento de células CHO.	*incrementa la permeabilidad vascular en piel de conejo.	*en cantidades subletales causa alargamiento en células CHO y melanogénesis en células de melanoma.	*acumulación de fluido en intestino de ratones lactantes.
*estimula síntesis de AMPc.			
*estimula la esteroidogénesis.			

### 5.2 HEMOLISINAS

Son proteínas citolíticas extracelulares las cuales son producidas por muchas cepas móviles de *Aeromonas*. Estas forman poros en las membranas por su inserción en la bicapa lipídica. Las hemolisinas se clasifican de acuerdo con el tipo de hemólisis producida, en  $\beta$ -hemolisina y  $\alpha$ -hemolisina.

#### 5.2.1 $\alpha$ - hemolisina.

Considerada un factor letal en algunas cepas, es tóxica para células Vero (ocasiona redondeo y retracción de cultivos celulares), causa muerte en ratón al minuto de aplicarla por vía intravenosa, es hemolítica, citotóxica y enterotóxica. Su peso molecular es de 60 KDa y es lábil a 56 °C por cinco minutos. No es producida a temperaturas mayores de 30 °C y es liberada durante la fase estacionaria del cultivo. Algunas cepas de *A. caviae* produce esta hemolisina.

### 5.2.2 $\beta$ -hemolisinas.

Son proteínas hidrofílicas y solubles, las cuales son sintetizadas como precursores de alto peso molecular y cuya mayor producción se da a 37 °C. Algunos pesos moleculares determinados para ellas en KDa son: 54.5, 63.65 y 45-50 (Husslein,1988; Hirono,1991; Asao, 1984). Dentro de las  $\beta$  hemolisinas, una de especial interés es la aerolisina, debido a su enterotoxigenicidad, los genes que la codifican han sido caracterizados en diferentes especies de *Aeromonas* por estudio de DNA cromosómico.<sup>28-30</sup>

Cuadro 5. GENES QUE CODIFICAN PARA LA aerolisina DE CEPAS DE *Aeromonas*.<sup>30</sup>

ESPECIE	ORIGEN DE LA CEPA	GÉN	PARES DE BASES	FUNCION ESTRUCTURAL
<i>A. sobria</i>	Clínico	<i>Aer A</i> <i>Aer C</i>	2510 desconocido	Estructural Regula actividad
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Clínico	<i>Aer A</i>	1734	Estructural
<i>A. caviae</i>	Desconocido	<i>Aer A</i>	1884	Estructural
<i>A. trota</i>	Desconocido	<i>Aer A</i>	2104	Estructural

Las hemolisinas se detectan por la presencia de zonas de hemólisis alrededor de las colonias crecidas en agar sangre de carnero al 5%. También es posible medir la actividad hemolítica, la cual es considerada como la dilución más alta del sobrenadante de un cultivo filtrado, en la que aún hay hemólisis total de glóbulos rojos en microplaca. Para determinar la actividad hemolítica hay que tomar en cuenta factores como la temperatura, ya que estos ocasionan variación en los resultados. También se sabe de algunos compuestos químicos que la afectan, tales como el salicilato de sodio que la inhibe y el ribonucleato de sodio que la incrementa. En cuanto a los patrones de hemólisis que presenta la bacteria, *A. hydrophila* produce un halo de hemólisis formado por dos zonas, una de total hemólisis y otro de lisis incompleta, *A. sobria* solo produce un halo de hemólisis parcial y *A. caviae* según muchos autores es No hemolítica, sin embargo, en un estudio se vió que existen un porcentaje de cepas que sí lo son (Kuijper et al, 1989), de hecho, en México estudios realizados por el grupo de trabajo de Escamilla demuestran 12.1% de cepas de *A. caviae* aisladas de cuadros

---

diarreicos son productoras de  $\beta$  hemolisinas y Villarruel en 1997 demostró que el 13.3 % de cepas de *A. caviae* aisladas de una planta potabilizadora eran  $\beta$ -hemolíticas.<sup>31-33</sup>

### 5.3 PROTEASAS

Son proteínas que contribuyen a la patogenicidad, causan daño a tejidos y proveen de nutrientes a la bacteria. En el caso de *A. hydrophila* activan extracelularmente al precursor de la aerolisina ( $\beta$ -hemolisina). Para detectarias se ha medido la actividad caseinólítica y se ha determinado el grupo azo de la azocaseína. Tomando en cuenta el inhibidor que actúa sobre las proteasas, se encuentran dos tipos de éstas en diferentes cepas de *Aeromonas*: las metaloproteasas y las serin proteasas (inhibidas por EDTA y por fenilmetanosulfonil fluoruro, respectivamente). Estudios realizados por Lujungh y col. demostraron que la producción de proteasa de cultivos de *A. hydrophila*, era estimulada en presencia de zinc e inhibida por hierro.<sup>34-36</sup>

### 5.4 LIPASAS

Este factor de virulencia, estudiado en diferentes cepas de *A. hydrophila*, se encuentra codificado en el gen llamado *lip*, el cual consta de 2052-2253 pares de bases y codifica un péptido de 71.8-80 KDa. La proteína *lip* (glicerolfosfolipido-colesterol aciltransferasa) es un análogo a la enzima plasmática de mamíferos lecitin-colesterol aciltransferasa. Su triada catalítica esta compuesta por Ser-16, Asp-116 e His-291. Al usarla purificada se ha visto que la longitud óptima del sustrato a hidrolizar, en caso de p-nitrofenil ésteres es de 10 a 12 carbonos y en el caso de triacilgliceroles es de 8 a 10 carbonos. (Anguita et al.1993; Brumlik & Buckley, 1996; Chuang et al, 1997).

Las lipasas pueden ser enzimas extracelulares importantes para la nutrición bacteriana y también pueden ser factores de virulencia que afecta varias funciones del sistema inmune, a través de los ácidos grasos libres generados por la actividad lipolítica.<sup>37-40</sup>

### 5.5 ADHERENCIA

Como se sabe, para que se dé un proceso infeccioso, el microorganismo debe adherirse a la superficie del epitelio para luego invadir (en caso de que sea invasivo) y comenzar a multiplicarse. En el género *Aeromonas* se ha observado como patrón predominante de

---

adherencia el agregativo y se ha visto que la presencia de *pilis* esta fuertemente asociada con su capacidad para adherirse. Este factor también se ha relacionado con la presencia de plásmidos; detectando en un caso un control negativo posible del plásmido de 40 Mda sobre la adherencia de una cepa parenteral de *Aeromonas* MS-2.<sup>41</sup>

## 6. AISLAMIENTO

Para el aislamiento de *Aeromonas* no es necesaria la utilización de medios especiales, estas pueden crecer bien en agar MacConkey (algunas cepas son fermentadoras de lactosa y otras no). En medios para muestras fecales, es más difícil aislarlas porque los medios entéricos selectivos con frecuencia son inhibidores para algunas especies de *Aeromonas*. Se han formulado a lo largo de numerosos estudios, distintos medios diferenciales y/o selectivos para el aislamiento de *Aeromonas*.

En el aislamiento primario de *Aeromonas*, es recomendable el uso de un medio selectivo, como es agar sangre de carnero al 5% con ampicilina (10 a 30µg /mL) y para aislamientos posteriores el medio que se recomienda es agar soya tripticaseína. La morfología colonial del género *Aeromonas* en el medio agar sangre es: colonias pequeñas (2-4 mm de diámetro), brillantes, convexas, borde enteros y color gris, pueden ser hemolíticas ( $\alpha$  ó  $\beta$ ) y en agar soya tripticaseína las colonias son de 3 a 4 mm de diámetro; No se recomienda el uso de otros medios de aislamiento para Enterobacterias o Vibrios, ya que puede darse el caso de que las *Aeromonas* no se desarrollen o no puedan diferenciarse de otros microorganismos.<sup>42</sup>

Otros medios de cultivo diferenciales y/o selectivos formulados para el aislamiento de *Aeromonas* son medio *Aeromonas hydrophila* (AH) cuyas reacciones se basan en los principios de los medios de TSI ó LIA, agar dextrina fuscina sulfito (DFS), agar DNasa azul de toluidina ampicilina (DNATA), agar inositol sales biliares verde brillante (IBB), agar peptona extracto de carne glucógeno (PBG), agar Rimler-Shotts (RS), agar Ripey-Cabelli (RC), agar sal almidón xilosa lisina desoxicolato (SSXLD), agar xilosa desoxicolato citrato de sodio (XDC), agua peptonada alcalina (APW), caldo soya tripticaseína ampicilina (TSBA).<sup>43</sup> Desafortunadamente la mayoría de los medios no son lo suficientemente selectivos para una sola especie y se deben realizar pruebas bioquímicas para la identificación diferencial de especie

Uno de los métodos tradicionales según el Criterio de Abbott, engloban una serie de pruebas especiales y bioquímicas que facilitan la identificación del género *Aeromonas*, estas pruebas son:

- a) crecimiento en TCBS
- b) crecimiento en NaCl en concentraciones de 0% y 6%
- c) producción de Indol
- d) producción de gas de glucosa
- e) descarboxilación de la arginina
- f) descarboxilación de la lisina
- g) descarboxilación de la ornitina
- h) producción de acetoina ( Voges-Proskauer)
- i) producción de ácido a partir de: L-arabinosa, m-inositol, lactosa, D-manitol, sacarosa, salicina.

**Cuadro 6. CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LOS GENEROS *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* DE LA FAMILIA VIBRIONACEAE<sup>41</sup>**

CARACTERÍSTICA	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Oxidasa	+	+	+
Movilidad	+	(+)	+
Reducción de nitratos	+	+	+
Resistencia a 0/129 10µg	+	+	+
Sensibilidad a 6% NaCl	+	-	-
Mol % G+C de ADN	38-51	57-63	51
D-manitol	(+)	(+)	-

(+) algunas especies son positivas, + todas las especies son positivas, - todas las especies son negativas

Otro factor importante a considerar durante el aislamiento de este microorganismo es la prueba de oxidasa positiva la cual deberá hacerse en un medio sin carbohidrato y sin indicador (agar soya tripticaseína o agar nutritivo) porque si en el medio hay un azúcar el



---

cual sea hidrolizado por *A. hydrophila* (por ejemplo la sacarosa en el medio de MacConkey) se puede obtener una prueba de oxidasa falsa.<sup>44</sup>

## 7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

En la actualidad, el requerimiento de ahorro de materiales y tiempo para la fenotipificación de los microorganismos implica la utilización de métodos más rápidos, económicos y reproducibles, los métodos miniaturizados son la alternativa más conveniente para estos fines, pues éstos conllevan al ahorro de material, esfuerzo y tiempo, además de utilizar los mismos materiales que los métodos tradicionales; los métodos miniaturizados no comprometen su eficacia. Uno de los sistemas miniaturizados creado en 1970 para la identificación bacteriana es el sistema *API*, el cual miniaturizó y estandarizó las técnicas convencionales empleadas en la bacteriología diagnóstica. El *API 20E*, *API 20NE*, *API 50CH* son algunos de los sistemas que se emplean para la identificación de las *Aeromonas*, como para la investigación en lo que respecta al metabolismo de los carbohidratos. Existen algunos problemas de estos equipos comerciales, ya que solo se puede realizar la identificación de tres especies de *Aeromonas*. Con frecuencia en aislamientos de muestras clínicas *A. caviae* es identificada como *Vibrio fluvialis*, a pesar de que bioquímicamente estas dos especies son fácilmente diferenciadas usando dos pruebas básicas como tolerancia a cloruro de sodio y la hidrólisis de la esculina. Otro caso de confusión es el de *A. veronii* biotipo *veronii* por *Vibrio cholerae* ya que ambos son ornitina descarboxilasa positiva y no está incluido en la base de datos del sistema *API*.<sup>45-47</sup>

En el laboratorio clínico de rutina, las características más importantes que deben conducir a un diagnóstico presuntivo de *Aeromonas* son: desarrollo en agua peptonada a pH 9.0 (medio de enriquecimiento efectivo para Aeromonadales); agar Sangre de carnero al 5% con 30 µg de ampicilina por mL, en agar MacConkey, reacción de oxidasa positiva a partir de agar soya tripticaseína; no es recomendable el uso de agar Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS) porque se considera un medio inhibitorio de *Aeromonas*; en agar triple azúcar hierro la mayoría de las cepas dan fondo ácido y superficie ácida ó superficie alcalina y/o formación de gas, pero no producción de ácido sulfhídrico. El empleo de medios de oxidación-fermentación (medio basal OF de Hugh-Leifson) con glucosa, se produce acidificación tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, estas pruebas

separan *Aeromonas* de bacilos Gram negativos no fermentadores oxidasa positivos. Debido a la necesidad de realizar un diagnóstico rápido en los pacientes que cursan con cuadros clínicos causados por *Aeromonas*, es importante disminuir en lo posible el tiempo de identificación del agente etiológico de estas patologías, por lo que se han buscado nuevas alternativas para diferenciar hasta la especie del género *Aeromonas*. Figura y colaboradores proponen que la prueba del factor CAMP puede ser utilizada como una prueba de identificación rápida de las tres especies más aisladas *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* *bt sobria*. Dado que *A. hydrophila* da la prueba positiva tanto en condiciones aeróbica como anaeróbica, *A. veronii* *bt sobria* sólo da la prueba positiva en condiciones aeróbicas y *A. caviae* da la prueba negativa en ambas.<sup>48-50</sup>

**Cuadro 7. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE ESPECIES DE *Aeromonas* DE SIGNIFICADO CLÍNICO.<sup>50</sup>**

PRUEBA	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i> <i>bt veronii</i>	<i>A. veronii</i> <i>bt sobria</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. schubertii</i>
LDC	+	-	+	+	+	+
ODC	-	-	+	-	-	-
ADH	+	+	-	+	+	+
VP	+	-	+	+	+	-
ESCULINA	+	+	+	-	-	-
SACAROSA	+	+	+	+	-	-
ARABINOSA	+	+	-	-	-	-
MANITOL	+	+	+	+	+	-

bt = biotipo; LDC = descarboxilación de lisina, ODC = descarboxilación de la ornitina, ADH = dihidroxilación de arginina, VP = Voges-Proskauer, + = más del 85% positivo, - = menos del 15% positivo

### 8. IMPORTANCIA CLÍNICA DEL GÉNERO.

Aunque las *Aeromonas* fueron descubiertas hace más de 100 años, durante las tres últimas décadas han jugado un papel importante como enteropatógenos y como agente etiológico de enfermedades, este microorganismo se consideró primero como un patógeno oportunista de baja virulencia en humanos y posteriormente se asoció a infecciones polimicrobianas

afectando principalmente a huéspedes inmunocomprometidos, con deficiencias hepáticas u otras enfermedades de tipo crónico. Sin embargo, en la actualidad se considera como un patógeno primario de serias consecuencias, ya que puede causar infección en huéspedes sin ninguna enfermedad de tipo crónico. Desde la década de los sesentas se intensificaron los estudios sobre este microorganismo, y se ha visto que *A. hydrophila* es causante de muy variados procesos infecciosos en humanos como son: celulitis, septicemia, bacteriemia, endocarditis, eritema gangrenoso necrosante, osteomielitis, meningitis e infecciones urinarias.<sup>51</sup>

**Cuadro 8. AISLAMIENTOS DEL GÉNERO *Aeromonas* A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS<sup>51</sup>**

<i>AEROMONAS</i>	TIPO DE INFECCION	MUESTRA
<i>A. veronii</i> bt <i>veronii</i>	Bacteremia, gastroenteritis, colecistitis.	Heces, esputo, sangre, tubo Endotraqueal, herida
<i>A. jandaei</i>	Bacteremia, celulitis	Sangre, heridas, heces
<i>A. shubertii</i>	Celulitis, bacteremia	Sangre, heridas, abscesos, fluido pleural
<i>A. trola</i>	-	Heces, apéndice
<i>A. allosaccharophila</i>	-	Heces
<i>A. encheleia</i>	-	Lesión de una fractura
<i>A. eucrenophila</i>	-	Heridas
<i>A. bestiarum</i>	-	Heces

También se ha aislado de casos de peritonitis, cáncer de ovario, absceso intraabdominal, heridas infectadas, miositis necrosante, esputo, bilis, úlceras, exudado de otitis media crónica, carcinoma hipofaríngeo, heridas de ojos y garganta. La infección más importante es la sepsis, que es frecuente en huéspedes comprometidos que padecen: cirrosis, tumores malignos, nefrosis, meningitis y colesistitis crónica. Raramente se presenta en huéspedes no comprometidos. La sepsis generalmente es de fuente endógena, a partir del tracto

gastrointestinal y la especie más aislada es *A. hydrophila*. Las infecciones de piel y tejido blando son probablemente el segundo grupo de aislamientos de *Aeromonas* en humanos, como es el caso de la celulitis la cual se presenta en individuos que han sufrido algún traumatismo en la piel y que han estado en contacto con agua contaminada con este microorganismo. En el caso de la endocarditis, *Aeromonas* causa destrucción del tejido cardiaco y valvular, se presenta en huéspedes comprometidos. La bacteremia producida por *Aeromonas* es menos frecuente que la causada por algunas *Enterobacterias*.<sup>52</sup>

**Cuadro 9. IMPORTANCIA CLÍNICA DEL GÉNERO *Aeromonas*.**<sup>52</sup>

Más patógeno	Menos patógeno	Especie
<i>A. hydrophila</i> (HG1)	<i>A. veronii</i> bt <i>veronii</i>	<i>A. salmonicida</i> (HG3)
<i>A. caviae</i> (HG4)	(HG10)	<i>A. sobria</i> (HG7)
<i>A. veronii</i> bt <i>sobria</i>	<i>A. jandaei</i> (HG9)	<i>A. media</i> (HG5)
(HG8)	<i>A. schubertii</i> (HG12)	<i>A. eucrenophila</i> (HG6)
		<i>A. trola</i>
		<i>A. allosaccharophila</i>
		<i>A. encheletra</i> (HG11)
		<i>A. bestiarum</i> (HG2)
		<i>A. popoffii</i>

El cuadro clínico más importante debido a su frecuencia lo constituyen las gastroenteritis, que afectan principalmente a niños menores de cinco años, pero que también puede causar problemas en adultos. Entre los síntomas de las gastroenteritis son, diarrea acuosa, fétida, de color amarillo verdosa, puede presentarse con sangre y moco, fiebre moderada, vómito y dolor abdominal entre lo más sobresaliente.

La diarrea puede durar de una semana a tres meses, pero generalmente es una enfermedad de corta duración y autolimitada, cuyo tratamiento consiste en la restauración de líquidos perdidos y que solo en los casos más serios requiere de una terapia antimicrobiana.<sup>53</sup>

**Cuadro 10. TIPOS DE DIARREA GENERADA POR *Aeromonas*<sup>53</sup>**

TIPOS DE DIARREA	CARACTERÍSTICAS
COLÉRICA	Diarrea con aspecto de agua de arroz
CRÓNICA	Diarrea con más de 10 días de evolución
DISENTÉRICA	Diarrea con sangre y moco.
SECRETORIA	Diarrea de tipo acuoso, vómito frecuente

### **9. RESISTENCIA A COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS.**

Algunas *Aeromonas* son resistentes a la penicilina, ampicilina, carbenicilina, pero son susceptibles a los antibióticos de amplio espectro como las cefalosporinas, aminoglucósidos, al cloranfenicol, tetraciclinas, trimetoprina con sulfametoxazol y quinolinas. Algunas *Aeromonas* son productoras de  $\beta$ -lactamasas, por lo que esta característica le confiere grandes problemas al tratamiento de enfermedades por *Aeromonas* con antibioticos  $\beta$ -lactamicos. La susceptibilidad de las cefalosporinas esta relacionada con las especies *A. veronii* bt *sobria*, *A. hydrophila* y *A. caviae*. *A. trota* es susceptible a la ampicilina. El uso de la ampicilina dentro de medios selectivos para aislar *Aeromonas* es necesario para inhibir otros microorganismos y poder permitir solo el crecimiento de éste género. Existen datos en Taiwán sobre la resistencia de las *Aeromonas* a la tetraciclina, trimetoprina-sulfametoxazol y algunas cefalosporinas. En Estados Unidos de América como en Australia las *Aeromonas* fueron resistentes a los aminoglucósidos. En algunos estudios se ha comprobado la relación entre la resistencia a antibióticos y la posesión de plásmidos, tal es el caso de un estudio en que se comprobó la resistencia a antibióticos por parte de cepas de *Aeromonas* aisladas de agua dulce, agua de mar y animales, antes y después de ser curadas con naranja de acridina. Los plásmidos con resistencia antimicrobiana comprobada, aislados de cepas de *A. hydrophila*, fueron plásmidos de 1.1 MDa a 100 MDa, siendo una asociación frecuente la de tres plásmidos pequeños de 4.2, 3.2 y 2.8 MDa. La resistencia codificada en plásmidos involucró los siguientes antibióticos, estreptomina, cloranfenicol, sulfadiazina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico, neomicina, colistina, tobramicina, kanamicina y gentamicina (Borrego y col. 1991). Hanes en 1993 encontró resultados similares para novobiocina y carbenicilina. También se sabe de

---

resistencia antimicrobiana a ampicilina y a tetraciclina trasferida por plásmidos de 3 a 63.4 Kb de una cepa de *A hydrophila* causante de lesiones en pescado.<sup>54-56</sup>

## 10. ECOLOGÍA Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.

Las *Aeromonas* no son consideradas como habitantes normales del aparato gastrointestinal del hombre, se ha estimado que la velocidad de transmisión fecal entre pacientes asintomático varía de 0 a 8%. Esto indica que el hombre no es el principal transmisor del microorganismo al ambiente. Las *Aeromonas* móviles han sido implicadas como patógenos transmitidos por alimentos debido a las evidencias existentes, incluyendo su frecuente aislamiento de heces de pacientes con diarrea, su enteropatogenicidad en modelos animales y su presencia en una gran variedad de alimentos, incluyendo ostiones y agua asociados a brotes de gastroenteritis. Un hecho de mayor trascendencia es que el género *Aeromonas* se ha aislado de suministros de reserva y distribución de agua potable antes y después de ser tratadas con cloro en donde puede alcanzar cifras de 3,600 UFC/mL y su aislamiento de esta fuente depende de varios factores : a) *Aeromonas* se aísla de agua clorada con más frecuencia en los meses de verano y corresponde a la época del año en que más cuadros diarreicos se presentan; b) la concentración de oxígeno disponible y del cloro libre. así como la salinidad y la conductividad eléctrica del agua potable. De lo anterior se puede considerar que el NMP de coliformes en agua potable a veces no se correlaciona con la de *Aeromonas* y se propone que este microorganismo sea considerado como un indicador para evaluar la calidad microbiológica del agua potable.<sup>57,58</sup>

En 1998, dentro del programa de "Análisis microbiológico y aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01 en muestras de agua en la F.E.S. Zaragoza" que se realiza en el laboratorio L-313 de Campus II, a cargo de la Q.B.P. Dora A. Pérez González y la Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera, en donde se analiza constantemente la calidad del agua potable de los depósitos (cisternas, filtros, tanques de almacenamiento, grifos) de la F.E.S. Zaragoza y otras dependencias de la U.N.A.M. que dan servicio a la comunidad del Estado de México y colonias cercanas de la Delegación Iztapalapa, identificaron un aislamiento de *Aeromonas*, la cual solo se logró hasta nivel de género debido a que en ese tiempo no se contaba con los medios de cultivo necesarios para la identificación de este microorganismo que habita el agua potable.

En la actualidad, *Aeromonas* ha llamado la atención principalmente por su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración, suscitando la preocupación de que cualquier amenaza que pueda suponer aumentará con el uso creciente de los alimentos refrigerados. Aparte de su posible intervención en gastroenteritis, los alimentos y el agua probablemente también son el origen de las graves infecciones extraintestinales por *Aeromonas* asociadas a individuos inmunocomprometidos. La especie *A. hydrophila* ha sido aislada de una larga lista de alimentos frescos que incluyen el pescado, la carne, las aves de corral, la leche fresca y las hortalizas que se consumen en ensalada y también en el agua. También se les ha considerado como una parte importante de la flora que altera la carne refrigerada. No es probable que las *Aeromonas* sobrevivan ni siquiera a los procedimientos de cocción suave pero pueden ser introducidas en los alimentos después de su tratamiento con contaminantes de un producto no cocido o con agua contaminada.<sup>59</sup>

**Cuadro 11. BROTES DE INTOXICACIÓN ASOCIADOS AL CONSUMO DE ALIMENTOS CONTAMINADOS CON *A. hydrophila*.**<sup>59</sup>

FECHA	LUGAR	No. DE CASOS	ALIMENTO
1977	Rusia	Intoxicación masiva	Pescado
1978	Inglaterra	3/3	Ostiones
1980	Hungría	Casos severos	Sopas
1980	Escocia	20	Coctel de camarón
1982	Nigeria	½	Caracol comestible
1984	Inglaterra	¼	Cóctel de camarón
1985	Inglaterra	2	Cóctel de camarón
1986	Lousiana, USA	472	Ostión
1986	Florida, USA	7/7	Ostión
1986	Household, Japón	4/5	Mariscos
1989	Japón	29/37	Desayuno escolar
1989	Inglaterra	14	Cóctel de camarón

---

## 11. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

La frecuencia de aislamiento de *A. hydrophila* en población sin evidencia de enfermedad gastrointestinal es de 0.2 a 3.2%, mientras que en individuos con diarrea se aísla con una frecuencia mayor al 10%.

Se ha visto que *Aeromonas* puede causar un cuadro diarreico semejante al cólera (en India y Tailandia), o en diarreas del viajero en norteamericanos que han viajado al extranjero o que viven en zonas costeras. Estos síntomas pueden asociarse con epidemias de cólera o en forma aislada. En Bangladesh estos cuadros diarreicos se asociaron al consumo de pescado contaminado con *Aeromonas* al cual no se le dio un tratamiento adecuado de cocción.

En un estudio realizado por Sally E. Millership, Stephen R Curnow y colaboradores, obtuvieron 4.2 % de muestras positivas para *Aeromonas*, de estos pacientes el 50 % fue posible asociar *A. hydrophila* con síntomas entero patógenos. En mayo de 1988 en California, Gail E. King, S. Benson y colaboradores reportaron casos de infecciones de *Aeromonas* en donde el sitio de mayor número de aislamientos fue el tracto gastrointestinal en un 81%. En 1988 y 1989 Lina P. Deodhar y colaboradores aislaron *Aeromonas* en un 1.8% en pacientes con gastroenteritis aguda, de las cepas aisladas el 77.8% fue *A. hydrophila*, 15.5% *A. sobria* y el 6.7 % fue *A. caviae*. Los pacientes en este caso fueron pediátricos (cinco años de edad) y todas las cepas fueron positivas para enterotoxigenicidad en asa ligada de conejo y positivas para hemolisinas (eritrocitos de conejo) estos resultados sugieren que *Aeromonas* son patógenos entéricos potenciales.<sup>60-63</sup>

En un periodo de 15 años de 1974- 1988, I. Gluskin D. Batas y colaboradores realizaron un estudio en Israel en niños con gastroenteritis siendo el principal causante *Aeromonas*. Varios autores en años pasados han reportado diversos casos clínicos, por ejemplo: en 1968 Von Graevenitz reportó un caso de celulitis por *A. hydrophila*. En ese mismo año López y colaboradores describieron un caso de osteomielitis y septicemia causada por *A. hydrophila* en un niño con leucemia. En 1972 Washington describió un interesante grupo de pacientes, los cuales presentaron heridas infectadas por *A. hydrophila*. Estos y muchos otros casos de infecciones causadas por *Aeromonas* se han presentado en heridas, laceraciones y sitios de amputación. Se han reportado a la fecha más de 40 casos de bacteriemia causada por *Aeromonas*, los cuales varios autores han descrito en pacientes inmunológicamente comprometidos, así tenemos que Kjemis y Conn fueron los primeros investigadores que



---

describieron sepsis en pacientes con cirrosis; Bulger en 1966 y Dean en 1967 reportaron un caso de sepsis fulminante por *A. hydrophila* en un paciente leucémico.<sup>64</sup>

En noviembre de 1972 en Georgetown University Hospital se presentó un caso de endocarditis por *A. hydrophila* y se documentó por primera vez la habilidad de estos microorganismos para invadir tejido valvular. Kenneth, Ong y colaboradores en 1991 reportaron un caso de endocarditis causada por *A. hydrophila*, este es el segundo caso de endocarditis causado por *Aeromonas* reportado en literatura mundial. Teira R y colaboradores en 1991 reportaron un caso de bacteremia por *A. caviae*, aisladas de líquido biliar en un paciente aparentemente sano. Goncalves J. R. En 1992 reportaron un caso de un paciente con neumonía fulminante causada por *A. hydrophila*.<sup>65</sup>

CUADRO 12. ANTECEDENTES DEL GÉNERO *Aeromonas* EN MÉXICO.

AÑO	AUTOR	TÍTULO DEL TRABAJO	LUGAR
1981	Escamilla A.E	Diarrea producida por especies de la familia <i>Vibrionaceae</i>	INNSZ
1984	Téllez O./ Aguirre L.	Búsqueda de factores de virulencia de <i>A. hydrophila</i> y <i>C. jejuni</i>	UPA
1984	Rebollo Bazo/Escamilla A.E	Aislamiento e identificación de <i>Aeromonas spp</i> y <i>P. shigelloides</i> como causa de diarrea en humanos	INNSZ
1986	Ruiz S.C /Escamilla A.E.	Detección de enterotoxina de <i>Aeromonas spp</i>	ENCB IPN
1991	Díaz Flores L /Escamilla A.E.	Investigación de la enterotoxigenicidad de <i>A. hydrophila</i> y su relación con otras bacterias asociadas al síndrome diarreico.	ENCB IPN
1992	Xala V A /Fernández R.E	Estudio preliminar para la investigación de <i>A. hydrophila</i> en productos marinos	ENCB IPN
1995	Ramírez- Castro Escarpulli	Producción de enterotoxina, sensibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico en <i>Aeromonas spp</i>	ENCB IPN
1996	López- Fernández R.E.	Recuperación de <i>A. hydrophila</i> a partir de alimentos contaminados artificialmente.	ENCB IPN
1996	Martínez- Escamilla	Caracterización de <i>Aeromonas spp</i> aisladas de pacientes con sintomatología de origen infeccioso en el Distrito Federal	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS
1997	Villarruel- Mota de la Garza	Investigar los riesgos que presenta la sobrevivencia de <i>Aeromonas spp</i> en agua tratada.	ENCB IPN
1998	Castro Escarpulli- Aparicio O.G.	Determinación de algunos factores de virulencia en cepas de <i>Aeromonas</i> aisladas de muestras clínicas y agua.	ENCB IPN
1999	Jiménez- Rivas	Obtención y clonación del plásmido A71 de <i>A. caviae</i>	ENCB IPN
1999	Hernández- Domínguez	Producción de un suero polivalente contra <i>A. hydrophila</i> .	UNIVERSIDAD LA SALLE
2000	Alor R S.-Sánchez	Identificación de <i>Aeromonas spp</i> en hisopos rectales en el estado de Hidalgo, México.	I.A. DE SALUD PUBLICA DE HIDALGO
2000	Aguilera Arreola M.G.- Castro Escarpulli G.	Caracterización de cepas de <i>Aeromonas spp</i> aisladas de pescado congelado	ENCB IPN

---

En México, en el Instituto de Nutrición, en 1989, se aisló de muestras de heces a las *Aeromonas* con una frecuencia del 7.7% en casos de diarrea aguda, mientras que estudios realizados por el grupo del Q.B.P. Everardo Escamilla Avilés en el laboratorio de Bacteriología Médica de la E.N.C.B. del I.P.N.; demostraron en el mismo año un 10 % de aislamientos. En 1996 se aisló de muestras de heces *Aeromonas* en un 5.7 % en niños menores de cinco años con diarrea de larga evolución; algunos autores consideran que la información disponible respalda la afirmación de que en los grupos de edad pediátrica éste microorganismo es el agente causal de diarreas crónicas de larga evolución, así como pacientes inmunocomprometidos y de edad avanzada.<sup>66,67</sup>

En nuestro país las enfermedades gastrointestinales constituyen uno de los problemas de salud más importantes ya que el porcentaje de morbi-mortalidad es alto, los estudios que se han realizado en la búsqueda de *Aeromonas* son pocos, sin embargo, la frecuencia con que este microorganismo se ha identificado en otros países como el agente causal de infecciones es muy alta, y se ha considerado que el agua potable es una fuente importante de transmisión de este género, por lo que es necesario la realización de más estudios, justificando así su investigación en México.<sup>68</sup>

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El agua es una fuente potencial de transmisión de agentes etiológicos involucrados en enfermedades gastrointestinales. El género *Aeromonas* ha surgido en años recientes como agente potencial de infecciones parecidas a las que provoca *Vibrio cholerae*. México no está exento de estas enfermedades y estos problemas de salud se incrementan en las zonas de asentamientos irregulares, como es el caso del Estado de México en el municipio de Ciudad Nezahualcóyotl y colonias cercanas de la delegación Iztapalapa en el D.F., por lo que es necesario hacer una investigación de este género en el agua potable que se utiliza en estas comunidades.

---

## OBJETIVOS

- ❖ Analizar muestras de agua potable obtenidas de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM, buscando microorganismos del género *Aeromonas*.
- ❖ Caracterizar los microorganismos aislados del género *Aeromonas* obtenidos de las muestras de agua potable, utilizando los siguientes métodos: presuntivo (factor de CAMP), convencional y miniaturizado (en microplaca).
- ❖ Determinar productos extracelulares: lipasas, hemolisinas, proteasas (caseinasas y gelatinasas) y D-Nasas.
- ❖ Determinar la frecuencia del género *Aeromonas* en el agua potable utilizada en la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si existe una contaminación del agua potable por el género *Aeromonas* en estas muestras de agua, se aislarán y caracterizarán estos microorganismos, por métodos microbiológicos.

---

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### *TIPO DE ESTUDIO*

Este estudio es prospectivo, descriptivo, transversal y observacional

### *POBLACION DE ESTUDIO*

Se incluyeron 70 muestras de agua potable, las cuales fueron tomadas de ciertos puntos fijos, tales como tanques de almacenamiento o sitios que al haber sido muestreados con anterioridad hayan revelado problemas de contaminación. Otras muestras se tomaron al azar a través de la red de distribución (grifos, filtros, etc.). Se tomaron dos muestras por cada dos de los lugares donde se realizó el muestreo semanal: CENDI Zaragoza, CCH Oriente, Clínica Multidisciplinaria Tamaulipas, Clínica Multidisciplinaria Aurora, Clínica Multidisciplinaria Reyes, Clínica Multidisciplinaria Reforma, Clínica Multidisciplinaria Benito Juárez, Clínica Multidisciplinaria Zaragoza, Clínica Multidisciplinaria Estado de México, FES Zaragoza Campus I y Campus II.

El análisis de dichas muestras se realizó en la F.E.S Zaragoza Campus II Laboratorio L-313

### *CRITERIOS DE INCLUSIÓN*

Muestras de 600 mL de agua potable obtenidas en forma aséptica en matraces Erlenmeyer con tapón de algodón y gasa estériles de sitios fijos ( grifos, filtros, cisternas y/o tanques de almacenamiento y bombeo), las cuales debieron ser analizadas dentro de las dos horas después de su muestreo.

### *CRITERIOS DE EXCLUSIÓN*

Se excluyeron todas aquellas muestras de agua potable trasladadas de manera inadecuada o sin etiquetar y después de dos horas de haber sido tomadas.

---

### *VARIABLE DEPENDIENTE*

Frecuencia de aislamientos del género *Aeromonas* en las muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM.

### *VARIABLES INDEPENDIENTES*

Procesamiento de las muestras de agua potable; métodos de aislamiento y caracterización del género *Aeromonas*, temperaturas y tiempos de incubación.

## DISEÑO ESTADÍSTICO

Se realizó gráficos en la que se muestra la frecuencia de aislamientos del género *Aeromonas* en las muestras de agua potable obtenidas de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM.

---

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### **MATERIAL Y METODOS**

Matraces Erlenmeyer de 1000 mL *Kimax*

Matreces Erlenmeyer de 500 mL con tapa de vaquelita *Kimax*.

Cajas de Petri estériles *Kimax*.

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm *Kimax*.

Tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapa de vaquelita *Kimax*.

Probeta graduada de 100 mL *Pyrex*.

Vasos de precipitados de 250 mL *Pyrex*.

Vaso de precipitado de 50 mL *Pyrex*.

Asas bacteriológicas.

Mecheros.

Tripiés

Aplicadores de madera estériles.

Algodón

Gasa

Papel indicador de pH escala 1 a 12 *Essential laboratory*.

Gradillas.

### **EQUIPO**

Balanza granataria de 2600 g *OHAUS*

Balanza analítica Max 160 g *Mettler H80*

Olla de presión de 21 litros *Presto steele*

Tripié

Incubadora a 37°C *ROSS.1*



---

Refrigerador *Philips*

Microscopio de contraste de fases *Zeiss*.

Lámpara de luz ultravioleta *Minnerlight & Blak-Ray compact 4-watt*

Nefelómetro de *Mcfarland*

Termómetro de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  *LH de México*

## **REACTIVOS**

Cloruro de sodio grado reactivo *Merck*

Hidróxido de sodio grado reactivo *Merck*

Alcohol etílico grado reactivo *Merck*

N, N, N, N tetrametil-p-fenilen-diamina grado reactivo *Merck*

Rojo de metilo grado reactivo sin marca

Alfa- naftol grado reactivo *Sigma*

p-dimetilamino benzaldehído grado reactivo *Merck*

Alcohol amílico grado reactivo *Sigma*

Ácido clorhídrico grado reactivo *Técnica Química*

Peróxido de hidrógeno grado reactivo sin marca

Cloruro férrico grado reactivo *Sigma*

Ampicilina de uso comercial laboratorio *Lakeside*

Sulfato de amonio grado reactivo *Merck*

Leche descremada *Svelty Nestle*

---

## MEDIOS DE CULTIVO

Base Agar Sangre *Bioxon*.

Agar Tiosulfatocitrato-bilis-sacarosa (TCBS) *Merck*.

Peptona-Caseína *Bioxon*

Agar para prueba de DNAasa *Becton Dickinson BBL*.

Agar soya tripticaseína *Bioxon*.

Agar Muller Hinton *Merck*.

Caldo Muller Hinton *Merck*

Caldo Tood Hewitt *Merck*

Agar Bilis Esculina *Sigma*.

Agar Citrato de Simmons *Merck*

Caldo base rojo de fenol *Merck*.

Base de Moeller Deshidratado *Difco*

Medio Basal OF (de Hugh-Leifson) *Becton Dickinson*.

Caldo Rojo de Metilo -Voges Proskauer (MRVP) *Bioxon*

Agar-Hierro-Lisina (LIA) *Bioxon*.

Medio MIO *Bioxon*

Gelatina bacteriológica *Bioxon*

## CARBOHIDRATOS

D-Arabinosa grado reactivo *productos químicos Monterrey*

D-inositol grado reactivo *Merck*

D-manitol grado reactivo *Merck*

D-ramnosa grado reactivo *Merck*

D-sorbitol grado reactivo *Merck*

---

Glucosa grado reactivo *Merck*  
Lactosa grado reactivo *Merck*  
Sacarosa grado reactivo *Merck*  
Salicina grado reactivo *Merck*.  
D-Manosa grado reactivo *Merck*

### **AMINOÁCIDOS**

DL-Ornitina grado reactivo sin marca.  
L-Lisina grado reactivo sin marca.  
L-Arginina grado reactivo *Sigma*

### **EQUIPO DE COLORANTES PARA TINCIÓN DE GRAM SIGMA**

Violeta de genciana  
Compuesto de yodo Gram  
Decolorante de alcohol y acetona.  
Safranina  
Agua destilada

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

*Staphylococcus aureus* ATCC 12598  
*Streptococcus agalactiae* ATCC 123886  
*Escherichia coli* ATCC 25922  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966  
37 Cepas aisladas de las muestras de agua potable.

## DIAGRAMA DE FLUJO

Toma de muestras de agua potable (600 mL)

Enriquecimiento doble, cultivo en agua peptonada con Conc. 10X a pH 9.0 37°C

Sembrar muestra de cultivo anterior en: TCBS, agar sangre al 5% con ampicilina (10µg) a 37°C, 24hs.

Depositar hisopo en cultivo de agua peptonada conc. 1X pH 9.0

Sembrar muestra de cultivo anterior en: TCBS, agar sangre al 5% con ampicilina (10µg) a 37°C, 24hs

Frote y tinción de Gram

Cultivo en agar soya tripticaseína a 37°C, 24hs.

Pruebas especiales: oxidasa y catalasa

Caracterización

Determinación de productos extracelulares

---

---

## METODOS

### **1. TOMA DE MUESTRA.**

**1.1** Las muestras fueron tomadas en ciertos puntos fijos, tales como estaciones de bombeo, tanques de almacenamiento, cisternas, grifos o sitios que al haber sido muestreados con anterioridad hayan revelado problemas de contaminación.

Para el muestreo de agua se utilizaron matraces Erlenmeyer de 1000 mL con tapón de algodón y gasa estéril tomando aproximadamente 600 mL de muestra.

**1.2** Para toma de muestras de agua provenientes de grifos, filtros, tuberías, se limpió perfectamente la boca de la llave o salida de agua, por medio de una torunda de algodón tallando hasta que no se desprenda más suciedad u óxido. Se abrió la llave y dejó correr el agua durante un minuto o el tiempo necesario para desalojar la tubería. Se disminuyó la velocidad de salida y llenó el matraz Erlenmeyer con 600 mL aproximadamente y durante la maniobra se cuidó de no contaminar la boca del matraz

**1.3** En el caso de sitios fijos (tanques, cisternas, etc.) se introdujo el matraz Erlenmeyer e impulsó suavemente hacia arriba, de tal manera que al salir a la superficie se llenó 2/4 partes de su volumen. Se tapó el matraz y llevó al laboratorio.

**1.4** En el caso de agua corriente se efectuó una maniobra similar como el punto anterior, ejecutando el desplazamiento del matraz en dirección opuesta a la corriente.

**1.5** Se marcaron los matraces Erlenmeyer con los datos de identificación de la fuente, fecha y hora de muestreo. Se trasladó al laboratorio inmediatamente, conservándolos a una temperatura de 5 ° a 15 °C.

### **2. ENRIQUECIMIENTO DOBLE EN AGUA PEPTONADA.**

**2.1** Se emplearon matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de vaquelita. Añadiendo 50 mL de agua peptonada concentrada alcalina 10X, conteniendo 10% de peptona y 10% de cloruro de sodio y 450 mL de la muestra de agua (dilución 1:10).

---

Se ajustó el pH a 9.0 con hidróxido de sodio 10N y se esterilizó en olla de presión a 15 libras (121 °C) durante 15 minutos.

2.2 Se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

2.3 Con un hisopo se tomó una muestra de la superficie del agua contenida en el matraz, se sembró una placa de Agar Sangre con ampicilina (10 ó 30 µg/mL).

2.4 Este hisopo se colocó en un tubo que contiene 10 mL de agua peptonada alcalina 1X, pH 9.0, con 1% de cloruro de sodio.

2.5 Tanto la placa como el tubo se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

### 3. AISLAMIENTO.

3.1 A partir del crecimiento en el tubo, se sembró en una placa de TCBS y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

3.2 Del mismo tubo se sembró otra placa de Agar Sangre con ampicilina (10 ó 30 µg/mL). Se incubaron a 37°C durante 24 horas, aislando colonias  $\alpha$  y/o  $\beta$  hemolíticas.

3.3 Se realizaron frotos y tinción de Gram de las colonias aisladas.

3.4 Se resembraron las colonias  $\alpha$  y/o  $\beta$  hemolíticas, en una placa de agar soya trypticaseína incubándolas a 37 °C durante 24 horas.

3.5 Se realizaron frotos y tinción de Gram.

---

## 4. CARACTERIZACION

### 4.1 Método presuntivo (factor de CAMP)

Se utilizaron placas de agar sangre de carnero al 5%. Se inocularon haciendo una estría central con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 125998, y estrías perpendiculares de las colonias aisladas, este procedimiento se hizo por duplicado. Se incubaron una de las placas en aerobiosis y la otra en condiciones de anaerobiosis, a 37 °C durante 24 horas. Se emplearon como testigo positivo de la prueba de CAMP la cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386.

### 4.2 Método miniaturizado en microplaca

Se utilizó un método miniaturizado en microplaca para determinar la producción de ácido del microorganismo a partir de los carbohidratos glucosa, lactosa, L-arabinosa, D-manosa, D-sorbitol, sacarosa, salicina, D-manitol, D-inositol. Preparándose 5 mL de cada carbohidrato al 0.5 % en base de caldo rojo de fenol, esterilizándose por filtración. Se depositaron 90 µL de cada medio con el carbohidrato en los pozos de una microplaca de 96 pozos para cultivo celular, inoculando con 10 µL de una suspensión bacteriana crecida en caldo Muller Hinton ajustada al 0.5 del nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  células/mL) en cada uno de los pozos (debe inocularse también el testigo de la cepa de *A. hydrophila* ATCC 7966 ). Incubándose a 37 °C durante 24 horas. se observó el vire del indicador

**4.3 Método convencional:** En cada una de las pruebas se inoculará e incubará a la par de las cepas problemas, un testigo positivo de *A. hydrophila* ATCC 7966 (interpretación de las pruebas Apéndice-D).

#### 1. Producción de gas apartir de glucosa

Se disolvieron 15 g del medio caldo rojo de fenol en un litro de agua destilada, agregando 1% de glucosa, se distribuyeron en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón, colocando una campana de Durham, se esterilizó a 10 libras de presión durante 10 minutos, se inoculó el tubo e incubó a 37 °C durante 24 horas. Se observó la formación de una burbuja dentro de la campana.

## **2. Producción de indol, movilidad y ornitina descarboxilasa**

Se disolvieron 31 g del medio deshidratado MIO en un litro de agua destilada. Remojando unos 5 minutos. Se calentó hasta ebullición por un minuto y distribuyó en tubos de ensaye de 13x 100 mm con tapón de gasa y algodón, esterilizando a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Se dejó en reposo en posición vertical e inocularon el tubo por picadura, incubar 24 horas a 37 °C. Observar movilidad y descarboxilación de la ornitina. Adicionando cinco gotas del reactivo de Kovacs, observando la producción de Indol, Positivo = rojo.

## **3. Prueba de rojo de metilo y reacción de Voges-Proskauer**

Se disolvió 17 g del medio deshidratado de MRVP en un litro de agua destilada. Mezclando bien, se distribuyó en tubos de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón, esterilizándose a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos y dejar enfriar. Se inoculo e incubo a 37 °C durante 24 horas. Prueba de rojo de metilo: se agregó 5 gotas de rojo de metilo a 2 mL del cultivo incubado, Positivo =rojo. Reacción de Voges-Proskauer: se agregó a 2 mL del medio de cultivo incubado 0.2 mL de hidróxido de sodio al 40% y 0.6 mL de alfa naftol, mezclando perfectamente. La lectura final fue después de 15 minutos. Positivo =rojo

## **4. Descarboxilación de la lisina**

Se Suspendieron 33 g del medio deshidratado agar hierro-lisina (LIA) en un litro de agua destilada. Remojando unos 15 minutos Calentando cuidadosamente, se agitó con frecuencia y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos con tapón de gasa y algodón, esterilizando a 121 °C ( 15 libras de presión) durante 15 minutos. Se enfrió en posición inclinada. Inoculándose el fondo del medio por picadura y la superficie en estría e incubar a 37 °C durante 24 horas. Positivo = púrpura.

## **5. Fermentación de glucosa y lactosa junto con la formación de sulfuros**

Se suspendió 59.4 g del medio deshidratado agar hierro triple azúcar (TSI) en un litro de agua destilada. Remojando de 10 a 15 minutos. Calentando con agitación frecuentemente hasta ebullición. Se distribuyó en tubos de 13 x 100 mm con tapón de



---

gasa y algodón, esterilizando a 121 °C ( 15 libras de presión) durante 15 minutos. Los tubos se enfriaron en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 cm. Se inoculó el fondo del medio por picadura y la superficie en estría. Incubando a 37 °C durante 24 horas. Positivo =glucosa amarillo en el fondo lactosa sacarosa ó ambas, superficie amarilla. Gas, el medio es desbaratado en el fondo.

#### 6. *Utilización del citrato*

Se suspendió 24.2 g del medio deshidratado citrato de Simmons en un litro de agua destilada. Dejando remojar durante 5 minutos, mezclando bien y calentando con agitación frecuente hasta ebullición. Se distribuyó en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón. Esterilizando a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Los tubos se dejaron enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1 cm. Inoculando con estría la superficie y puncionando el fondo e incubándose a 37 °C durante 24 horas. Positivo =hay crecimiento vire del medio a azul.

#### 7. *Reacciones de oxidación y/o fermentación*

Se suspendió 9.8 g del medio Basal OF (De Hugh y Leifson) en un litro de agua destilada. Remojando 10 minutos y calentando con agitación frecuente hasta disolución del medio, esterilizando a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Se agregó 10 mL de solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración por cada 100 mL del medio fluido. Se mezcló y distribuyó asépticamente a razón de 5 mL por tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón (los tubos y tapones deberán estar estériles), e inocularon dos tubos recientemente preparados por punción profunda con el microorganismo en estudio, a uno de los tubos se adicionó una capa de 5mm de petrolato o aceite de parafina. Se incubaron ambos tubos a 37 °C durante 48 horas. Positivo = color amarillo en ambos tubos

---

## 8. *Pruebas para descarboxilasas:*

Se disolvieron bien los ingredientes del medio de Moeller, el aminoácido a probar 1% de L-arginina y L-ornitina, si el aminoácido está en forma DL se deberá usar a una concentración al 2%. El pH final fue de 6.0, vaciándose 2mL en tubos de vidrio de 13 x 100 con tapón de algodón, esterilizándose a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Se dejó enfriar, después se inocularon y colocaron 0.5 mL de aceite mineral estéril. Incubándose a 37 °C durante 24 horas. Positivo = púrpura.

## 9. *Crecimiento en placas de agar Muller Hinton con NaCl al 0, 3 y 6% de concentración:*

Se prepararon tubos con tapón de rosca con caldo Muller Hinton, los cuales se inoculan con las colonias aisladas, e incubaron a 37 °C durante 2 horas, se ajustó la suspensión bacteriana al 0.5 del nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  células/mL). Se colocó 5 µL de la suspensión bacteriana con una micropipeta en cada una de las placas de agar Muller Hinton con NaCl al 0, 3 y 6% de concentración, incubar a 37 °C durante 24 horas.

## 5. PRUEBAS ESPECIALES

### 5.1 *Prueba de la Oxidasa*

Se realiza con bacterias en crecimiento (18 a 24 horas) procedentes de un cultivo en LIA o en un medio que no contenga azúcar como lo es la base agar Sangre (No usar cultivos en TCBS). En un pedazo de papel filtro colocado sobre una caja Petri estéril, se agregaron de dos a tres gotas del reactivo de oxidasa, e inmediatamente se esparció un pequeño inóculo con un palito de madera estéril a través del papel humedecido previamente con el reactivo. La reacción positiva se indicó por la aparición de un color púrpura oscuro sobre el papel en un lapso de diez segundos.

---

## 5.2 Prueba de la Catalasa

Con una aguja de inoculación se recogió el centro de una de las colonias aisladas y colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio (no es recomendable utilizar cultivos de agar sangre), agregar una gota de  $H_2O_2$  al 30%. Inmediatamente se observó la formación de burbujas (liberación de gas) registrándose los resultados.

## PRUEBAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES

### 5.3 Agar para prueba D-Nasa (*Desoxirribonucleasa*)

Se suspendió 42 g del medio en un litro de agua destilada. Remojando de diez a quince minutos y mezclando con todo cuidado. Se requirió, agregar en ese momento 10g de Manitol y 0.025 g de Azul de Bromotimol. Mezclando cuidadosamente de nuevo para obtener una suspensión homogénea. Calentando a ebullición durante un minuto.

Se esterilizó en autoclave de 12 a 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriando a 45-50 °C y posteriormente se vació en cajas de Petri. Si se desea, puede agregarse al medio sin Manitol, sangre al 5% para preparar placas de Agar Sangre.

Se adicionó después del desarrollo bacteriano una gota de ácido clorhídrico normal o unas gotas de solución de Azul de Toluidina al 0.1%. Con algunas cepas a veces es necesario aumentar la concentración de HCl a 2N para obtener una reacción nítida para que aparezca bien definida la formación del halo claro alrededor del desarrollo bacteriano. En presencia de ácido clorhídrico diluido, éste reacciona con el Acido Desoxirribonucleico (ADN) del medio de cultivo formando un precipitado nebuloso. En cambio, las colonias productoras de desoxirribonucleasa, aparecieron rodeadas de una zona o halo claro que contienen fracciones de nucleótidos solubles procedentes de la degradación del ácido desoxirribonucleico, que no son precipitados por el ácido clorhídrico. Prueba positiva = alrededor de la colonia hay un precipitado y un halo color rosa

### 5.4 Producción de hemolisinas

Inoculándose 3 mL de caldo Muller Hinton con las cepas a identificar, se incubó a 37 °C durante dos horas. la suspensión bacteriana se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de

---

McFarland ( $1.5 \times 10^8$  células/mL). Se colocó 5 de la suspensión bacteriana con una micropipeta en una placa de agar sangre al 5%, e incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas, posteriormente se observó el halo de la hemólisis.

### **5.5 Determinación de lipasas.**

Inoculándose 3 mL de caldo Muller Hinton con las cepas a identificar, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas y ajustó la suspensión bacteriana al tubo 0.5 del nefelómetro de Mcfarland ( $1.5 \times 10^8$  células /mL). Se adicionó 5  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana en una placa con medio de yema de huevo incubándola a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. La aparición de una zona transparente en el agar alrededor de la inoculación se lee como una reacción de lipasas positiva.

### **5.6 Determinación de Proteasas**

#### **a) Caseinasa**

Inoculando 3 mL de caldo Muller Hinton con las colonias aisladas, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas y ajustando la suspensión bacteriana al tubo 0.5 del nefelómetro de Mcfarland ( $1.5 \times 10^8$  células /mL). Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión en una placa de agar leche descremada al 10%, e incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. La aparición de un halo transparente en la zona de inoculación se lee como una reacción positiva a la producción de caseinasa.

#### **b) Gelatinasa**

Inoculando 3 mL de caldo Muller Hinton con las colonias aisladas, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas y ajustando la suspensión bacteriana al tubo 0.5 del nefelómetro de Mcfarland ( $1.5 \times 10^8$  células/ mL). Se inocularon tubos ya preparados y esterilizados con medio de gelatina nutritiva por punción, la cual se hizo en el medio hasta una profundidad de 1.5 cm. Simultáneamente los tubos de prueba y de control se incubaron a temperatura ambiente ( $22^0$ - $25^0\text{C}$ ) durante 24 horas a 14 días. Y antes de anotar resultados se refrigeraron por una hora y observó la licuefacción de la gelatina.

---

---

## MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

### **1. CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO**

La composición del medio para la conservación a corto plazo se encuentra en el apéndice A. Se prepararon tubos de ensayo de 13 x 100 con este medio y se sembró la cepa por estría. Se etiquetaron con su número correspondiente y se conservaron en el refrigerador a 4°C.

### **2. CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO.**

La conservación a largo plazo se realizó por liofilización la cual consiste en la deshidratación de un producto previamente congelado cuya agua se elimina por sublimación al vacío.

- a. Se realizó una revisión de viabilidad y pureza de las cepas caracterizadas en agar soya tripticaseina, incubadas por 37°C durante 18 horas.
- b. Se prepararon ampollitas de 2 mL con la etiqueta correspondiente a casa cepa y se esterilizaron a 15 libras/15 minutos.
- c. Se preparó el medio soporte para la suspensión bacteriana suero con glucosa al 7.5%
- d. A partir del crecimiento masivo en gelosa soya tripticaseina e incubado a 37°C durante 24 horas, se hizo una suspensión en el medio soporte. Se distribuyó en las ampollitas cuidando de que quedará a una altura de 0.5 cm Las ampollitas se colocaron en una charola de acero inoxidable, la cual fue colocada en la cámara de liofilización.
- e. Se realizó cuenta bacteriana antes de liofilizar.
- f. El proceso de liofilización consistió en congelar la atmósfera de la liofilizadora para posteriormente iniciar la deshidratación hasta alcanzar el equilibrio entre los tres estados de la materia (llamado punto eutéctico) y finalmente la etapa de secado. Todo este proceso se realizó en 36 horas.
- g. Las ampollitas con el liofilizado se colocaron en un recipiente con material desecante (bicarbonato) Y por último se procedió al sellado con vacío.

## RESULTADOS

### I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

Se analizaron 70 muestras de agua potable obtenidas de la F.E.S. Zaragoza y otras dependencias de la U.N.A.M., obteniéndose 37 aislamientos del género *Aeromonas*, lo cual significó el 52.85% de los muestreos realizados.

**CUADRO 13. FRECUENCIA OBTENIDA DEL NÚMERO DE AISLAMIENTOS DE CADA LUGAR DONDE SE TOMARON LAS MUESTRAS DE AGUA POTABLE.**

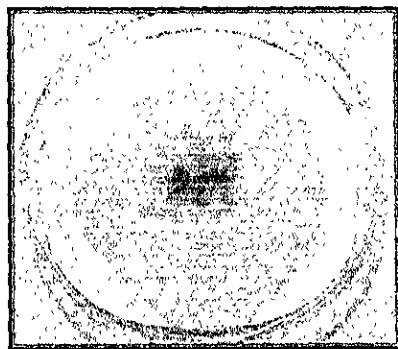
LUGAR	SITIO DE MUESTREO	AISLAMIENTOS (%)
FES Zaragoza CAMPUS I	Tanque de almacenamiento Cisterna	0 (0)
FES Zaragoza CAMPUS II	Cisterna Grifo	3 (4.28)
Clínica Multidisciplinaria Zaragoza	Cisterna Grifo	4 (5.71)
Clínica Multidisciplinaria Estado de México	Cisterna Tanque de almacenamiento	2 (2.85)
Clínica Multidisciplinaria Reforma	Cisterna Tanque de almacenamiento	2 (2.85)
Clínica Multidisciplinaria Reyes	Cisterna Tanque de almacenamiento	0 (0)
Clínica Multidisciplinaria Aurora	Cisterna Tanque de almacenamiento Grifo	6 (8.57)
Clínica Multidisciplinaria Benito Juárez	Cisterna Tanque de almacenamiento Grifo	4 (5.71)
Clínica Multidisciplinaria Tamaulipas	Cisterna Tanque de almacenamiento Grifo	5 (7.14)
CENDI Zaragoza	Cisterna Filtro	9 (12.85)
CCH Oriente	Cisterna Grifo	2 (2.85)

El género *Aeromonas* es una bacteria de fácil crecimiento que se desarrollan en los medios diferenciales y selectivos de uso común empleados en el aislamiento de las bacterias Gram negativas. Sin embargo, es recomendable el empleo de un caldo de enriquecimiento como

---

Agua peptonada alcalina 10X pH 9.0 que se incubó a 37°C, para posteriormente sembrar en medios de cultivo como el medio selectivo agar sangre al 5% con 30 µg/mL de ampicilina (estas bacterias son resistentes a este antibiótico) y agar soya tripticaseína, los cuales demostraron ser efectivos para el desarrollo bacteriano. El crecimiento bacteriano en agar soya tripticaseína dio como resultado colonias redondas, de 2-3 mm de diámetro, con bordes enteros y superficie lisa, convexas, de color blanco o ligeramente rosadas.

En agar sangre 5% con ampicilina se observaron colonias redondas, de 2-3 mm de diámetro, con bordes enteros y superficie lisa, de color gris perlado, que dependiendo de la especie se presentó la formación de un halo de  $\alpha$  o  $\beta$  hemólisis. Las especies del género *Aeromonas* son citocromoxidasa positivas y es posible excluirlas rápidamente de la familia Enterobacteriaceae por medio de la prueba de oxidasa. Al colocar dos gotas de reactivo N,N,N,N tetrametil-p-fenilenamidiámina (reactivo para oxidasa) en colonias superficiales y observar la aparición de un color oscuro, característico de colonias de este género.



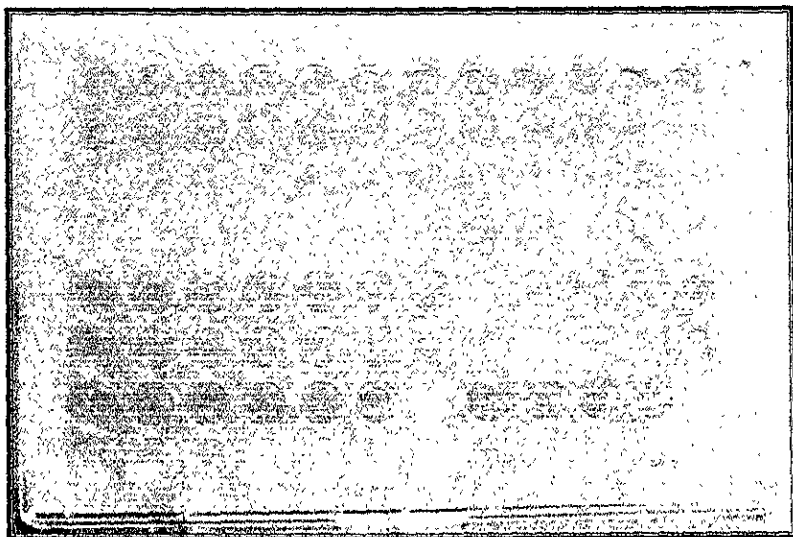
**FIG 1. PRUEBA DE LA OXIDASA POSITIVA PARA LAS CEPAS DE *Aeromonas* AISLADAS**

Debido a que los géneros *Aeromonas* y *Vibrio* cuentan con una alta similitud, y a la existencia de varios reportes en los que se ha identificado erróneamente, se utilizó el criterio de Abbott que consistió en sembrar las colonias aisladas en agar TCBS y en agar Fuller Hinton con NaCl al 0%, 3% y 6%, la ausencia del crecimiento en el medio selectivo

---

TCBS y en Muller con NaCl al 6% permitieron la diferenciación de estos géneros y continuar con la caracterización.

Los métodos miniaturizados en microplaca y convencional permitieron la caracterización de las especies de este género.

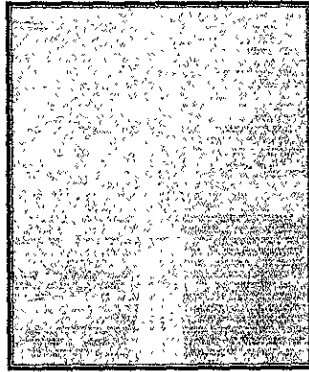


**FIG. 2. METODO MINIATURIZADO EN MICROPLACA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Aeromonas*.**

Las placas con microtubos de 96 pozos contenían medio de cultivo con una variedad de carbohidratos al 0.5%, cada cepa que se tendría que identificar se inoculó e incubó a 37°C durante 24 horas. Después las reacciones se interpretaron observando la presencia o ausencia de crecimiento en los pozos, como el vire del indicador de rojo a amarillo que indicó la producción de ácido a partir de los carbohidratos: arabinosa, lactosa, sacarosa, manito, inositol, salicina, ramnosa, manosa.

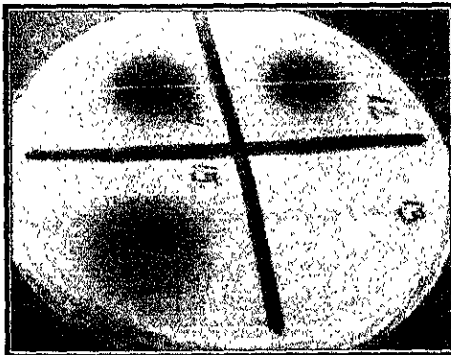
El método CAMP-like permitió determinar ciertas especies de *Aeromonas* como la habilidad de estas bacterias para producir el factor CAMP produciéndose un fenómeno lítico que crea una cabeza de flecha entre el *Staphylococcus* y las *Aeromonas*.





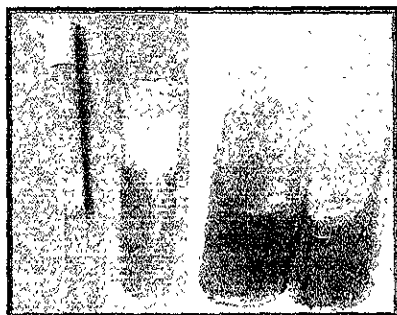
**FIG.3 PRUEBA DE CAMP. LA SIEMBRA DIAGONAL A TRAVÉS DE LA PLACA ES UN *Staphylococcus*  $\beta$ -HEMOLÍTICO; LA SIEMBRA PERPENDICULAR ES DE UN CULTIVO AISLADO DEL GÉNERO *Aeromonas*.**

La prueba de la hidrólisis de la esculina permitió diferenciar a las especies *A. hydrophila* de *A. caviae*, la primera es capaz de crecer en el medio e hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa, utilizándose como indicador el citrato de hierro.



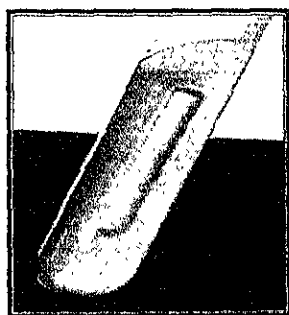
**FIG.4 PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE ESCULINA POSITIVA VISTA CON LÁMPARA UV.**

Otras pruebas bioquímicas para separar las fenoespecies del género *Aeromonas*, fueron: utilización de Citrato de Simmons, descarboxilación de Ornitina, TSI (Agar hierro triple azúcar), MIO (Movilidad - indol - ornitina).



**FIG.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS NECESARIAS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Aeromonas*: de izquierda a derecha TSI (Alcalino/Ácido-Gas), MIO (Movilidad (+), Indol (+), Ornitina (+)), CITRATO DE SIMMONS (Utilización del citrato (+) azul).**

Los tubos con caldo rojo de fenol y glucosa con tubos de Durham, demostraron la formación de gas y de ácido a partir de la glucosa (color amarillo), característica del género *Aeromonas*, principalmente *A. hydrophila*.



**FIG.6 PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE GLUCOSA CON TUBO DE DURHAM PARA DEMOSTRAR LA FORMACIÓN DE ÁCIDO Y GAS**

TABLA 1-A. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y  
CARACTERIZADAS DE *Aeromonas*

PRUEBAS	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>OXIDASA</b>	+	+	-	+	-	+	+	+
<b>CATALASA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>NaCl 0%</b>	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>NaCl 3%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl 6%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HEMÓLISIS</b>	β	α	β	β	α	β	β	β
<b>CAMP- O<sub>2</sub></b>	+	-	+	+	-	+	+	+
<b>CAMP- CO<sub>2</sub></b>	+	-	-	+	-	+	+	+
<b>ESCULINA</b>	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>ARABINOSA</b>	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>SALICINA</b>	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>MANOSA</b>	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>MANITOL</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>INOSITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LACTOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SORBITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SACAROSA</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>FERMENTACIÓN DE GLUCOSA</b>	+/+	+/-	+/-	-/+	+/-	+/+	+/+	-/+
<b>Lys</b>	+	-	+	+	-	-	+	-
<b>Arg</b>	+	+	-	+	-	+	+	+
<b>TSI</b>	A/A Gas	A/A	A/A Gas	A/A Gas	A/A	A/A Gas	A/A Gas	K/A Gas
<b>LIA</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>C.SIMMONS</b>	+	-	-	+	-	+	-	-
<b>RM</b>	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>VP</b>	+	-	+	-	-	+	+	-
<b>MOVILIDAD</b>	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>INDOL</b>	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>ORNITINA</b>	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>OF-G c/s</b>	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>OF-G s/s</b>	+	-	+	+	+	-	+	+
<b>ESPECIE IDENTIFICADA</b>	<i>hydrophila</i>	<i>caviae</i>	<i>sobria</i>	<i>hydrophila</i>	<i>caviae</i>	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>	<i>salmonicida</i>

TABLA 1-B. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y  
 CARACTERIZADAS DE *Aeromonas*

PRUEBAS	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>OXIDASA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>CATALASA</b>	+	-	+	+	+	-	+	+
<b>NaCl 0%</b>	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>NaCl 3%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl 6%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HEMOLISIS</b>	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\alpha$
<b>CAMP- O<sub>2</sub></b>	-	-	+	+	+	+	+	-
<b>CAMP- CO<sub>2</sub></b>	+	-	-	+	-	-	+	-
<b>ESCULINA</b>	-	+	-	+	-	+	+	-
<b>ARABINOSA</b>	-	+	-	-	-	-	-	+
<b>SALICINA</b>	-	+	-	-	-	-	-	+
<b>MANOSA</b>	+	-	+	-	+	-	+	+
<b>MANITOL</b>	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>INOSITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LACTOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SORBITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SACAROSA</b>	+	-	+	-	+	-	-	-
<b>FERMENTACIÓN DE GLUCOSA</b>	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-
<b>Lys</b>	-	-	+	+	+	+	+	-
<b>Arg</b>	+	+	+	+	+	-	+	-
<b>TSI</b>	A/A Gas	A/A	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A
<b>LIA</b>	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>C.SIMMONS</b>	+	-	-	+	+	+	+	-
<b>RM</b>	-	+	-	+	-	+	-	-
<b>VP</b>	+	-	-	+	-	+	+	-
<b>MOVILIDAD</b>	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>INDOL</b>	+	+	-	+	-	+	+	-
<b>ORNITINA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>OF-G c/s</b>	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>OF-G s/s</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>ESPECIE IDENTIFICADA</b>	<i>jandaei</i>	<i>caviae</i>	<i>sobria</i>	<i>hydrophila</i>	<i>sobria</i>	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>	<i>caviae</i>

TABLA 1-C. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y  
CARACTERIZADAS DE *Aeromonas*

PRUEBAS	17	18	19	20	21	22	23	24
<b>OXIDASA</b>	+	+	+	+	-	+	+	-
<b>CATALASA</b>	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>NaCl 0%</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>NaCl 3%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl 6%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HEMOLISIS</b>	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$
<b>CAMP- O<sub>2</sub></b>	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>CAMP- CO<sub>2</sub></b>	-	+	+	-	+	+	+	+
<b>ESCULINA</b>	+	-	+	+	+	+	-	-
<b>ARABINOSA</b>	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>SALICINA</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>MANOSA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MANITOL</b>	-	+	-	+	+	+	+	+
<b>INOSITOL</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>LACTOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SORBITOL</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>SACAROSA</b>	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>FERMENTACIÓN GLUCOSA</b>	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	-/+	+/+
<b>Lys</b>	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>Arg</b>	+	-	+	-	+	-	+	+
<b>TSI</b>	A/A	A/A Gas	K/A	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas
<b>LIA</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>C.SIMMONS</b>	-	-	-	-	+	-	+	+
<b>RM</b>	+	-	-	+	+	+	+	+
<b>VP</b>	-	+	+	+	-	+	+	+
<b>MOVILIDAD</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>INDOL</b>	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>ORNITINA</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>OF-G c/s</b>	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>OF-G s/s</b>	+	+	+	+	+	+	-	-
ESPECIE IDENTIFICADA	<i>caviae</i>	<i>jandaei</i>	veronii bt veronii	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>

TABLA 1-D. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y  
CARACTERIZADAS DE *Aeromonas*

PRUEBAS	25	26	27	28	29	30	31	32
<b>OXIDASA</b>	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>CATALASA</b>	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>NaCl 0%</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>NaCl 3%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NaCl 6%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HEMOLISIS</b>	β	β	α	β	β	β	β	β
<b>CAMP- O<sub>2</sub></b>	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>CAMP- CO<sub>2</sub></b>	+	-	-	+	+	+	-	+
<b>ESCULINA</b>	+	+	+	-	-	-	-	+
<b>ARABINOSA</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>SALICINA</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>MANOSA</b>	-	+	+	+	+	-	+	+
<b>MANITOL</b>	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>INOSITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LACTOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SORBITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SACAROSA</b>	-	-	-	+	+	+	+	-
<b>FERMENTACION DE GLUCOSA</b>	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/-
<b>Lys</b>	-	+	-	-	-	-	+	-
<b>Arg</b>	+	+	+	+	-	+	-	+
<b>TSI</b>	A/A Gas	A/A Gas	A/A	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas
<b>LIA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C.SIMMONS</b>	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>RM</b>	+	+	+	-	-	-	-	+
<b>VP</b>	+	+	-	+	+	+	-	+
<b>MOVILIDAD</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>INDOL</b>	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>ORNITINA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>OF-G c/s</b>	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>OF-G s/s</b>	+	+	-	+	+	-	+	-
ESPECIE IDENTIFICADA	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>	<i>caviae</i>	<i>jandaei</i>	<i>jandaei</i>	<i>jandaei</i>	<i>sobria</i>	<i>hydrophila</i>

TABLA 1-E . PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y  
 CARACTERIZADAS DE *Aeromonas*

<b>PRUEBAS</b>	33	34	35	36	37
<b>OXIDASA</b>	+	+	+	+	-
<b>CATALASA</b>	+	+	+	+	+
<b>NaCl 0%</b>	+	+	+	+	-
<b>NaCl 3%</b>	-	-	-	-	-
<b>NaCl 6%</b>	-	-	-	-	-
<b>HEMÓLISIS</b>	β	β	β	β	β
<b>CAMP- O<sub>2</sub></b>	+	+	+	+	+
<b>CAMP- CO<sub>2</sub></b>	-	+	-	+	+
<b>ESCULINA</b>	-	+	-	+	+
<b>ARABINOSA</b>	-	-	-	-	-
<b>SALICINA</b>	-	-	-	-	-
<b>MANOSA</b>	-	+	+	+	+
<b>MANITOL</b>	+	+	+	+	+
<b>INOSITOL</b>	-	-	-	-	-
<b>LACTOSA</b>	-	-	-	-	-
<b>SORBITOL</b>	-	-	-	-	-
<b>SACAROSA</b>	+	-	+	-	-
<b>FERMENTACIÓN DE GLUCOSA</b>	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-
<b>Lys</b>	+	-	+	+	-
<b>Arg</b>	-	+	+	+	+
<b>TSI</b>	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas	A/A Gas
<b>LIA</b>	+	-	+	-	-
<b>C.SIMMONS</b>	+	+	+	+	+
<b>RM</b>	-	+	-	+	+
<b>VP</b>	-	+	-	-	+
<b>MOVILIDAD</b>	+	+	+	-	+
<b>INDOL</b>	-	+	-	+	+
<b>ORNITINA</b>	-	-	-	-	-
<b>OF-G c/s</b>	+	+	+	-	+
<b>OF-G s/s</b>	+	+	+	+	+
<b>ESPECIE IDENTIFICADA</b>	<i>sobria</i>	<i>hydrophila</i>	<i>sobria</i>	<i>hydrophila</i>	<i>hydrophila</i>

## II. DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES.

A las 37 cepas identificadas se les realizaron pruebas especiales para observar si existió la presencia de enzimas extracelulares, las cuales son importantes porque actúan como factores asociados a la virulencia en diversos patógenos.

### HEMOLISINAS

Los tipos de hemolisinas producidos por las 37 cepas del género *Aeromonas* identificadas fueron  $\alpha$ -hemolisinas y  $\beta$ -hemolisinas. Se sabe que la especie *A. hydrophila* y *A. veronii* *bt veronii* producen  $\beta$ -hemólisis en agar sangre de carnero al 5%, por su parte *A. caviae* es reportada como no hemolítica, sin embargo en éste y otros estudios realizados en México y otros países se reporta como  $\alpha$ -hemolítica.

TIPO DE HEMOLISIS	NO. DE CEPAS IDENTIFICADAS
$\alpha$ -HEMÓLISIS	7
$\beta$ -HEMÓLISIS	30
TOTAL	37

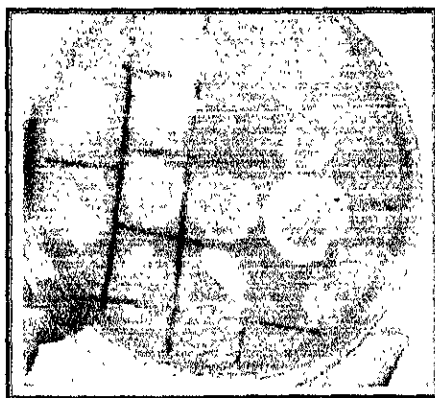


FIG. 7 ILUSTRACIÓN DE LA ZONA HEMOLÍTICA ALREDEDOR DE LA COLONIA DE *Aeromonas*, DEBIDO A LA PRODUCCIÓN DE  $\beta$ -HEMOLISINAS.

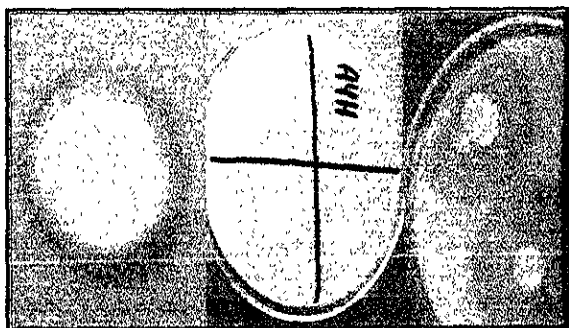


## LIPASAS

La determinación de la producción de enzimas que degradan los ácidos grasos: las lipasas, es un factor asociado a la virulencia de bacterias. Se realizó en el medio agar yema de huevo en donde se identificó una zona transparente que refiere a la actividad lipolítica del género *Aeromonas* (Fig. 8.)

## PROTEASAS

La prueba para observar la producción de proteasas: caseinasas y gelatinasas, se realizó en medio agar leche descremada al 10% (Fig. 8) y en gelatina bacteriológica 3% respectivamente, encontrándose que las cepas aisladas fueron positivas para caseinasas en un 78.37% y 56.75% para gelatinasas.



**FIG. 8 DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES: DE IZQUIERDA A DERECHA COLONIA DE *A. hydrophila* EN AGAR YEMA DE HUEVO (AYH), ACTIVIDAD LIPOLITICA EN AYH, PRODUCCIÓN DE CASEINASAS EN AGAR LECHE DESCREMADA 10%**

---

## PRUEBA PARA D-Nasa

El agar para la prueba de D-Nasa es un medio que permitió detectar uno de los factores asociados a la virulencia: la desoxirribonucleasas. Existen reportes que *A. hydrophila* es un microorganismo capaz de degradar por hidrólisis el ácido desoxirribonucleico (DNA), es decir, son D-Nasas positivas.



FIG. 9 PRUEBA DE D-Nasas POSITIVA PARA *Aeromonas hydrophila*  
(COLORACIÓN ROSA)

**TABLA 2-A DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y CARACTERIZADAS DEL GÉNERO *Aeromonas*.**

PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8
LIPASAS AYH	+	+	-	+	+	+	+	+
GELATINASAS	+	+	+	+	+	+	+	+
CASEINASAS ALD 10%	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Nasas FERMENTACIÓN	+	+	-	+	+	-	+	+
MANITOL	+	+	-	+	+	-	+	-

**TABLA 2-B. DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y CARACTERIZADAS DEL GÉNERO *Aeromonas*.**

PRUEBA	9	10	11	12	13	14	15	16
LIPASAS AYH	-	+	+	+	+	+	+	+
GELATINASAS	+	+	+	+	-	-	-	+
CASEINASAS ALD 10%	+	+	+	+	-	-	-	+
D-Nasas FERMENTACIÓN	-	+	+	-	-	-	-	+
MANITOL	-	-	+	-	-	+	+	+

**TABLA 2-C. DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y CARACTERIZADAS DEL GENERO *Aeromonas*.**

PRUEBA	17	18	19	20	21	22	23	24
LIPASAS AYH	-	+	+	-	-	+	+	+
GELATINASAS	-	+	-	-	+	-	+	-
CASIENASAS ALD 10%	-	+	-	+	-	+	+	+
D-Nasas FERMENTACIÓN MANITOL	-	+	-	-	+	-	+	+
	-	+	-	+	+	-	+	+

**TABLA 2-D. DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y CARACTERIZADAS DEL GENERO *Aeromonas*.**

PRUEBA	25	26	27	28	29	30	31	32
LIPASAS AYH	-	+	+	-	+	+	+	+
GELATINASAS	-	-	+	-	-	-	-	-
CASEINASAS ALD 10%	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Nasas FERMENTACIÓN MANITOL	-	-	+	-	+	+	+	+
	-	+	+	+	-	+	+	+

**TABLA 2-E. DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES DE LAS 37 CEPAS AISLADAS Y CARACTERIZADAS DEL GÉNERO *Aeromonas*.**

PRUEBA	33	34	35	36	37
LIPASAS AYH	+	-	+	+	+
GELATINASAS	+	+	-	+	+
CASEINASAS ALD 10%	+	+	+	+	+
D-Nasas FERMENTACIÓN MANITOL	+	+	+	+	+

la frecuencia obtenida del número de aislamientos del género *Aeromonas* de las 70 muestras de agua potable fue de 52.8%, con los siguientes porcentajes para cada especie:

*A. hydrophila* 45.9%

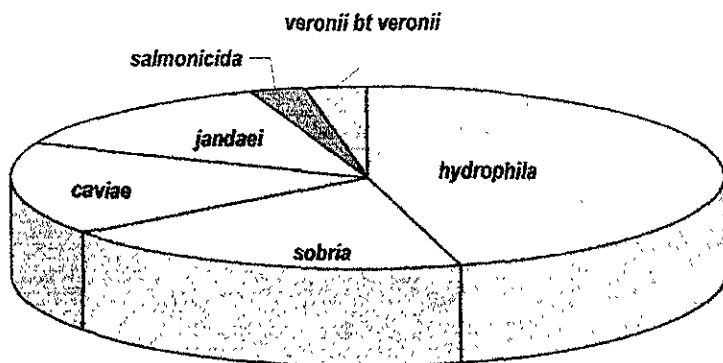
*A. sobria* 18.9%

*A. caviae* 16.2%

*A. jandaei* 13.5%

*A. salmonicida* 2.7%

*A. veronii* bt *veronii* 2.7%



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo a los datos que se encuentran en la literatura, principalmente el estudio de Janda J.M. y col., en el sentido de que *Aeromonas* se puede aislar de cualquier muestra clínica y otras fuentes, se justifica el impulsar la investigación sobre la influencia de las especies de *Aeromonas* aisladas de poblaciones con diversas patologías en nuestro país.

Todas las enfermedades requieren para su diseminación de un foco de infección, una ruta de transmisión como es el agua. Una característica del género es que su hábitat potencial es el agua, tanto en aguas residuales, cloradas y de consumo humano, algunas especies crecen en agua a un pH 5.2-9.8 y a una temperatura óptima de 28°-30°C, pueden crecer tanto en aguas con muy baja cantidad de materia orgánica, como en desechos con alto contenido de material orgánico.

Debido a estas características del género *Aeromonas* y a datos registrados anteriormente; se pudo llegar a los objetivos de este trabajo, aislándose el género en un 52.8% de un total de 70 muestras de agua potable de los lugares antes citados y caracterizándose a 17 cepas de *A. hydrophila*, 6 de *A. caviae*, 5 de *A. jandaei*, 7 de *A. sobria*, 1 de *A. veronii* bi *veronii* y 1 de *A. salmonicida*

Este género estuvo considerado en dos grandes grupos de acuerdo a su temperatura de crecimiento y a la capacidad de movilidad: aquellas que crecían entre 35°-37°C (mesófilicas) *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* o *Aeromonas* móviles; y las cepas que crecían entre 22°-25°C o menos *A. salmonicida* o *Aeromonas* no móviles. Además, *A. hydrophila* crece en una gran variedad de medios entéricos pero con frecuencia es identificada erróneamente como "coliforme", puesto que algunas cepas son capaces de fermentar la lactosa. Al realizar las técnicas para el análisis microbiológico de agua potable: mesófilos aerobios, la cual señala la presencia de un número elevado de mesófilos aerobios e indica la existencia de materia orgánica y las condiciones favorables para la multiplicación de los microorganismos, estos resultados proporcionaron información sobre el grado de exposición ambiental del agua potable y las condiciones óptimas para el desarrollo de las *Aeromonas*. El NMP de organismos coliformes (prueba presuntiva y prueba confirmatoria) dieron información sobre las posibles fuentes de contaminación a que puede estar expuesta la fuente de abastecimientos del agua.

---

Aún cuando las *Aeromonas* se pueden confundir fácilmente con bacterias entéricas, pueden distinguirse de éstas por la reacción positiva a la oxidasa. Muchos de los bacilos Gram negativos, a parte de las enterobacterias tienen una actividad oxidasa variable, y la familia *Vibrionaceae* es oxidasa positiva. Esta prueba se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa, cuya reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo. El uso del medio basal OF-Glucosa (Hugh-Leifson) permitió aún más la separación de los bacilos Gram negativos, no fermentadores, oxidasa positivos, de las *Aeromonas*.

Una vez hecha la diferenciación de las familias se debe tener en cuenta que dentro de la misma familia *Vibrionacea* existe una similitud entre el género *Aeromonas* y *Vibrio*, por lo que fue necesario realizar las siguientes pruebas. observar la ausencia de crecimiento en el agar selectivo TCBS de las cepas aisladas, la producción de gas a partir de glucosa, la ausencia de crecimiento en el medio Muller Hinton con una concentración de NaCl 6%, y la descarboxilación de la ornitina (base de Moeller) negativa. Todas estas pruebas permitieron descartar una posible confusión entre los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*.

La caracterización de las cepas *Aeromonas* por métodos bioquímicos convencionales siempre se ha considerado difícil esto debido a la similitud en las vías metabólicas de las diferentes fenoespecies; sin embargo existen pruebas que permitieron establecer las diferentes fenoespecies y algunas nos permitieron llegar hasta la genoespecie en algunos grupos de hibridación (HG's). El método de factor de CAMP permitió determinar la habilidad del género para producir el factor CAMP como un acto de sinergismo con  $\beta$ -hemolisinas de *Staphylococcus aureus* en los eritrocitos de sangre de carnero, produciéndose un fenómeno lítico que se observó por la aparición de la forma de una cabeza de flecha. Figura y col., proponen que la prueba del factor de CAMP, puede ser utilizada como prueba de identificación rápida de las tres especies más importantes: *A. hydrophila* que da positiva en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, *A. caviae* da negativa en ambas condiciones y *A. veroni* bt *sobria* da positiva sólo en condiciones aeróbicas. Al emplear el método miniaturizado en microplaca determinó la producción de ácido de los carbohidratos propuestos según el criterio de Abbott para caracterizar a las *Aeromonas*, la ventaja de usar este método fue el poder analizar doce cepas a la vez, evitando el gasto excesivo de medios de cultivo e inóculo de las cepas, como la



---

disminución del uso de material y la innovación de un método rápido y eficaz para caracterizar bacterias de interés médico. Fue necesario realizar otras pruebas bioquímicas como: utilización de citrato, producción de ácido a partir de D-sorbitol, D-ramnosa, salicina y lactosa, que permitieron la separación de las fenoespecies *A. hydrophila* o complejo de *A. hydrophila* en los tres grupos de hibridación que comprende HG1 *A. hydrophila*, HG2 *A. bestiarum* y HG3 *A. salmonicida*. Para discriminar los grupos de hibridación HG4 *A. caviae*, HG5A *A. media* de las fenoespecies *A. caviae* fue necesario utilización de citrato, producción de ácido a partir de D-manosa, hemólisis de eritrocitos de carnero. El grupo de hibridación HG8 al que pertenece *A. veronii* bt sobria se distinguió de HG10 *A. veronii* bt *veronii*, por las pruebas descarboxilación de la ornitina, hidrólisis de la esclulina y producción de ácido de salicina.

En este estudio se determinaron productos extracelulares como la actividad hemolítica en eritrocitos de sangre de carnero al 5%, encontrándose que el 81.08% de las cepas aisladas produjeron  $\beta$ -hemolisinas. En 1984 Asao T. notó que la hemolisina producida por las *Aeromonas* tiene múltiples actividades biológicas y dos grupos de trabajo Howard 1987 y Husslein en 1988 estudiaron simultáneamente la secuencia nucleotídica de una toxina citolítica: la aerolisina la cual es una  $\beta$ -hemolisina codificada por un gen aer A conocida desde 1974 cuando Bernheimer realizó una caracterización de esta aerolisina en cepas de *A. hydrophila*, para estos autores la aerolisina es por mucho el más importante contribuyente a la patogenicidad del género. La producción de proteasas extracelulares en las cepas aisladas y caracterizadas se obtuvieron los siguientes resultados: el 56.75% gelatinasas y el 78.37% caseinasas: en la literatura son consideradas al igual que las hemolisinas como un factor asociado a virulencia importante en la patogenicidad, los efectos propuestos para las proteasas incluyen daño directo a tejido, permiten invasividad, proveen de nutrientes y actividad proteolítica del precursor de la aerolisina. De hecho en 1981 Stevesnson y Ljungh correlacionaron la actividad de enzimas extracelulares y virulencia en cepas de *A. hydrophila*

Se ha observado que las lipasas extracelulares juegan un papel importante en la patogénesis del género, incluso se conoce que los miembros de la familia *Vibrionaceae* producen fosfolipasas algunas de las cuales actúan como hemolisinas y algunas como el glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa (GCTA), de las 37 cepas se determinó solo la

---

---

actividad lipolítica en el medio agar yema de huevo, resultando que el 75.67% la produjeron; se han descrito en la literatura varios genes que codifican para diferentes lipasas incluso Merino y col., en 1999 encontraron un gen llamado lip que codifica para una GCTA demostrando que tiene un 99.1% de identidad a nivel de proteína con una hemolisina, además de esto la GCTA es un importante factor de virulencia.

En México, se han realizado pocos estudios sobre la producción de la enzima ADNasa del género *Aeromonas*, la cual es una enzima que degrada las uniones del ADN (esta enzima se presenta entre las especies de Estafilococos con alta virulencia), en este estudio se obtuvo que el 70.20% de las cepas produjeron esta enzima. Por lo que se consideró un factor más de virulencia característico de este género.

Se trató de establecer una correlación entre algunas pruebas bioquímicas de *Aeromonas* y los factores de virulencia y se ha encontrado que la mayoría de los casos, las cepas consideradas toxigénicas aisladas y caracterizadas se asociaron a la no fermentación de la arabinosa, a una prueba de Voges-Proskauer positiva, a la descarboxilación de la lisina, así como a la producción de gas de la glucosa; esta correlación fue parecida a los resultados obtenidos por Burken en los aislamientos de Tasmania.

La determinación de proteasas, lipasas y menos frecuentemente las ADNasas son consideradas también como productos extracelulares que participan en la patogenicidad del género *Aeromonas*, tal y como lo consideró Villarruel y col., de cepas ambientales, considerando que la producción de las enzimas es una característica independiente de las especies de *Aeromonas*. Además se evidenció que el género *Aeromonas* está presente en el agua potable y su desarrollo se favoreció durante los meses de primavera-verano, y que aún siendo agua potable este es un medio de transmisión de esta bacteria y su caracterización es difícil sino se conocen las características morfológicas y fisiológicas del género, esto se pudo comprobar con lo sucedido aquí en nuestro país cuando se realizó un estudio en el que participaron 228 laboratorios del IMSS, ISSTE, SSA, PEMEX, estatales y particulares, dentro de un ciclo de evaluación de la calidad del programa de evaluación de la calidad entre laboratorios (PECEL ENCB) enviando una muestra de *A. hydrophila* para que fuera identificada, en este estudio sólo el 43% de los laboratorios fueron acreditados al menos con la identificación del género, el resto de los laboratorios no acreditados reportaron al menos 45 géneros bacterianos entre los cuales destacaron *Vibrio*.

---

*Pseudomonas*, *Pasteurella* y *Enterobacterias*, esto representa algunas de las dificultades que se tienen a nivel de laboratorio para la identificación de este género, ya que no se tienen los medios adecuados para su aislamiento y no se toma en cuenta en un examen de rutina. además es importante señalar que algunos laboratorios no aprobados emplearon sistemas automatizados como el Cristal BBL y Vitek.

---

---

## CONCLUSIONES

- Se aisló el género *Aeromonas* de muestras de agua potable que han sido tratadas, confirmando que su frecuencia aumenta en los meses de primavera-verano, lo cual concuerda con los datos internacionales.
- Se logró aislar 37 cepas como *Aeromonas* lo que representó el 52.8% de las muestras analizadas; de las cuales se caracterizaron 17 cepas como *A. hydrophila*, 7 como *A. sobria*, 6 como *A. caviae*, 5 como *A. jandaei*, 1 como *A. veronii bt veronii* y 1 como *A. salmonicida*.
- La presencia del género *Aeromonas* en agua potable indicó que esta contaminada, aislándose de CENDI Zaragoza en mayor porcentaje, seguido en orden decreciente en las Clínicas Aurora, Tamaulipas, Benito Juárez y Zaragoza, FES Zaragoza Campus II, Clínicas Estado de México, Reforma y CCH Oriente, por lo cual es necesario vigilar y controlar rigurosamente la captación y almacenamiento de esta fuente, para así prevenir un posible brote de enfermedades diarreicas ya que en alguno de estos lugares se maneja infantes o se presta servicio odontológico a pacientes.
- *A. hydrophila* es la especie que se aisló con mayor frecuencia en las muestras de agua potable.
- La utilización de pruebas como la oxidasa, permitieron descartar rápidamente a la familia *Enterobacteriaceae* del género *Aeromonas*
- La utilización de los métodos: factor de CAMP, convencional y miniaturizados (en microplaca) facilitaron la caracterización del género.
- Se demostró que la mayor parte de las cepas de *Aeromonas* aisladas de agua potable producen factores de virulencia y que estos resultados se correlaciona con los datos obtenidos en investigaciones del género a nivel mundial.

---

## PROPUESTAS

- ❖ Determinar otros factores de virulencia asociados con la virulencia del género *Aeromonas* de las cepas aisladas, para aportar más información sobre la epidemiología de este género en México.
- ❖ Determinar la resistencia antimicrobiana de las cepas de *Aeromonas* aisladas de las muestras de agua potable.
- ❖ Continuar con el mantenimiento a largo plazo de las cepas aisladas por medio de los métodos de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y liofilización.

---

---

## APÉNDICE -A

### **MEDIOS DE CULTIVO**

#### **1. AGUA PEPTONADA ALCALINA IX**

Peptona	0.4 g
Cloruro de sodio	0.4 g
Agua destilada	40 mL

Ajustar el pH a 9.0 con NaOH y envasar 10 mL en tubos de vidrio de 16 x 150 con tapón de rosca.. Esterilizar 121°C por 15 minutos. Enfriar y tapar bien para evitar que el pH descienda, guardar en refrigeración hasta el momento de usarlos.

#### **2. AGUA PEPTONADA ALCALINA 10X**

Peptona	20 g
Cloruro de sodio	20 g
Agua destilada	200 mL

Ajustar el pH a 9.0 con NaOH y envasar 50 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar y guardar en refrigeración hasta el momento de usarlos.

#### **3. MEDIO TCBS (AGAR TIOSULFATO, CITRATO , BILIS, SACAROSA)**

Extracto de levadura	5 g
Proteasa peptona	10 g
Citrato de sodio	10 g
Tiosulfato de sodio	10 g
Bilis de buey	8 g
Sacarosa	20 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de bromotimol	0.04 g
Azul de timol	0.04 g

Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Prepararlo inmediatamente antes de usarse. Disolver todos los ingredientes por ebullición. Ajustar el pH a 8.6. Enfriar a 55<sup>0</sup>C y llenar las cajas de Petri estériles. NO DEBE TENER AGUA DE CONDENSACIÓN Y NO DEBE ESTERILIZARSE EN AUTOCLAVE. Debe prepararse el día que se va a emplear, máximo 24-48 horas almacenado a 4-6<sup>0</sup>C en bolsa de plástico fechada.

#### 4. AGAR SANGRE DE CARNERO AL 5% CON AMPICILINA

##### BASE

Infusión de músculo cardiaco	375 g
Peptona de carne	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar-agar	15 g

Rehidratar 40 g de cultivo en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición y completa dilución del medio. Esterilizar a 121<sup>0</sup>C durante 20 minutos. Enfriar a 45<sup>0</sup>C y agregar 5% de sangre desfibrinada de carnero estéril girando suavemente el matraz para evitar la formación de burbujas, adicionar 30 µg de ampicilina, homogenizar y vaciar en cajas de Petri estériles.

#### 5. MEDIO DE MOELLER

##### Medio basal

Peptona	5 g
Extracto de carne	5 g
Púrpura de bromocresol al 1.6%	0.625 mL
Rojo de cresol al 0.2%	2.5 mL
Glucosa	0.5 g
Piridoxal	5.0 g
Agua destilada	1000 mL

---

Disolver bien los ingredientes y agregar al medio basal el aminoácido a probar 1% de L-arginina, L-ornitina o L-lisina, si el aminoácido esta en la forma DL se deberá de usar a una concentración al 2%. Ajustar el pH a 6.0-6.5 vaciar 4 mL en tubos de vidrio de 13 x 100 con tapón de algodón previamente esterilizados. Esterilizar a 10 lb durante 10 minutos. Después de inocular se colocan 0.5 mL de vaselina líquida estéril.

#### 6. AGAR YEMA DE HUEVO

Tripticasa	20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> al 5% en agua	0.1 mL
Glucosa	1 g
Agar	12.5 g
Agua destilada	500 mL

Ajuste el pH a 7.3-7.4 y esterilizar a 121<sup>o</sup>C durante 15 minutos. Enfriar a 60<sup>o</sup> y agregar una yema de huevo Mezclar y vaciar en placas. Los huevos deben sumergirse en etanol absoluto por una hora.

#### 7. AGAR BILIS ESCULINA

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Esculina	1.0 g
Agar	15.0 g
pH final	6.8

Disolver por separado el extracto, la peptona y el agar en 400 mL de agua, el citrato férrico en 100 mL de agua. Combinar las soluciones y adicionar 400 mL de agua, hervir durante 10 minutos, esterilizar a 121<sup>o</sup>C durante 15 minutos, colocar la esculina en 100mL de agua y



---

calentar para disolverla; esterilizarla por filtración. Adicionarla al preparado anterior en condiciones de esterilidad. Mezclar y envasar en cajas de Petri estériles.

### 8. AGAR LECHE DESCREMADA AL 10%

Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Leche descremada reconstituída al 10%	100 mL
pH final	7.0

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada mediante ebullición con agitación continua. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Por otra parte la leche descremada esterilizarla a 121°C durante 10 minutos. El medio final se prepara mezclando el medio base y la leche, homogenizar perfectamente y distribuir en cajas de Petri estériles.

### 9. AGAR MULLER HINTON (AMH)

Infusión de carne de res	300 g
Peptona de caseína ácida	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g
pH final	7.4

Disolver 38g de los ingredientes en un litro de agua destilada mediante ebullición con agitación continua. A 500 mL agregar 3% y a los otro 500 mL 6% respectivamente de cloruro de sodio. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri estériles.

---

### 10. AGAR SOYA TRIPTICASEINA

Peptona de soya	3.0 g
Peptona de caseína	17.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	2.5 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Agar	15 g
pH final 7.3	

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada mediante ebullición con agitación continua. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, distribuir en cajas de Petri estériles o en tubos de 18 x 150 con tapón de algodón en condiciones estériles.

### 11. CALDO MULLER HINTON

Infusión de carne de res	300 g
Peptona de caseína ácida	17.5 g
Almidón	1.5 g
pH final 7.4	

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, mezclar, si es necesario calentar un poco hasta disolución, distribuir 3 mL en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar y guardar en refrigeración hasta utilizarlos.

---

---

## MEDIOS DE CONSERVACIÓN

### 12. SOPORTE PARA CONGELACIÓN

Caldo Todd-Hewitt	100 mL
Glicerol	40 mL

Esterilizar el caldo a 121°C durante 15 minutos , adicionar el glicerol estéril en condiciones asépticas.

### 13. SOPORTE PARA LIOFILIZAR

Suero de caballo estéril	100 mL
Glucosa anhidra	7.5 g

---

---

## APÉNDICE -B

### REACTIVOS

#### 1. OXIDASA

N,N,N,N Tetrametil p-fenilendiamina	1 g
Agua destilada	100 mL

#### 2. CATALASA

Peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada.

#### 3. KOVACS PARA INDOL

p-dimetilamino benzaldehído	5 g
alcohol amílico	75 mL
HCl concentrado	25 mL

Disolver el aldehído en el alcohol por calentamiento suave en baño maría (55°C). enfriar y agregar el ácido. Proteger de la luz y refrigerar.

#### 4. ROJO DE METILO (RM)

Rojo de metilo	0.04 g
Alcohol etílico	40 mL
Agua destilada	100 mL

Disolver el rojo de metilo en etanol y aforar a 100 mL con agua destilada.

#### 5. VOGES-PROSKAUER (VP)

Alfa naftol	5g
Alcohol etílico	100mL

La solución resultante es de color paja, si es más oscura no sirve. Para la prueba se colocan 0.2 mL de NaOH al 40% (sol. acuosa) y 0.6 mL de alfa naftol.

## APÉNDICE-C

### **COLORACIÓN DE GRAM MODIFICADO POR HUCKER**

#### **A. Cristal violeta (solución concentrada)**

Cristal violeta	20 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

#### **B. Solución concentrada de oxalato**

oxalato de amonio	1 mL
agua destilada	100 mL

Mezclar la solución A con la solución B.

#### **C. Solución de yodo (lugol)**

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 mL

Disolver completamente en 5 mL de agua destilada y agregar 240 mL de agua destilada.

Bicarbonato de sodio al 5% en solución acuosa 60 mL  
Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

#### **D. Alcohol acetona para decolorar**

Alcohol etílico absoluto	250 mL
Acetona	250 mL

Mezclar y conservar en frasco con tapón esmerilado

#### **E. Solución de safranina concentrada.**

Safranina O	2.5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

Solución de trabajo: diluir safranina 1:5 ó 1:10 con tapón esmerilado.

#### **METODO:**

1. Fijar el frote con calor
2. Cubrir el frote con cristal violeta y dejar durante 10 segundos
3. Escurrir el colorante y lavar el resto con lugol
4. Cubrir la preparación con lugol y dejar 10 segundos
5. Lavar con agua de la llave
6. Decolorar con alcohol-acetona durante 10 segundos e inmediatamente enjuagar
7. Cubrir la preparación con safranina durante 10 segundos. lavar y dejar secar al aire.
8. Examinar al microscopio con aceite de inmersión.(100X)

---

## REFERENCIAS

1. Abeyta A, Kaysner. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in a outbreak of food borne illness. J Food Prot. 1986; 49: 643-646.
2. Abott S. Hans & Janda. Case of *Aeromonas veronii* (DNA group 10) bacteremia. J Clin Microbiol 1994, 32(2): 3091-3092.
3. Abbott S L, Cheung W K, Janda J M. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 1992; 30:1262-1266.
4. Akan M, Aysel & Serdar. Motile *Aeromonas* in the feces and carcasses of broiler chickens in turkey. J Food Prot. 1998; 61(1): 113-115.
5. Alan J & Stevenson. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. Can J Microbiol. 1981; 27: 1114-1122.
6. Altewegg M, Steigerwalt, Luthy-Hattennstein. Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. J Clin Microbiol. 1990, 28(2): 258-264.
7. Altewegg M. In manual of clinical microbiology. 7<sup>a</sup>. Washington D C. ed. American Society for Microbiology, 1990: 507-516.
8. Arbeith R. In manual of clinical microbiology 7<sup>a</sup>. USA: ed. ASM, 1999 190-208.
9. Asao T, Kinoshita S. Uemura. Purification some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. Infect Immun. 1984; 46(1): 122-127.
10. Austin B, Austin I. Powell R. Characterization of strains atypical of *Aeromonas salmonicida* for different methods. System Appl Microbiol. 1998; 21: 50-64.

- 
11. Baloda S B, Krovacek, Ericksson D. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1995, 18:17-26.
  12. Baron E J and Fineold. Bailey & Scott's diagnostic and microbiology. 8ª. Ed. St Louis Missouri, USA: the C.V. Mosby Co; 1990: 100-126.
  13. Barron G I and Feltham. Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria 3ª. Ed London, England: Cambrige University Press, 1993: 51-55
  14. Baumann P, Shubert R. Bergey's manual of systematic bacteriology. Ed. Baltimore: N.R. Krieg, J.G. Holt Williams & Wilkins Co, 1984: vol I: 516-550.
  15. Bemheirmer , Abigad L. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 1974; 9(6): 1016-1021.
  16. Borrego J, Moriñigo E. Plasmid associated virulence properties of enviromental isolated of *Aeromonas hydrophila*. J Med Microbiol. 1991; 35:264-269.
  17. Bravo F, German S, Monte R. Marcadores fenotípicos en cepas de *Aeromonas* aisladas en cuba de niños con enfermedad diarreica aguda. Rev Cub Med Tropical. 1995; 9:95-99.
  18. Burke B, Robinson H, Atkinson & Gracey. Biochemical caracterización of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. J Clin Microbiol. 1982, 15(1): 48-52.
  19. Burke B, Gracey D, Peterson K. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitana water supla. seasonal correlación with clínica isolated. 1984; 48(2): 361-366.

- 
20. Burckley T, Howard P. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect Immun.* 1990; 69: 1-16.
  21. Cahill M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *J Appl Bacteriol.* 1990; 69: 1-16.
  22. Carnahan A M, Joseph S W. *Aeromonas* update: new species and global distribution. *Experimentia* 1991; 47:402-403.
  23. Castro-Escarpullí G. Determinación de algunos factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp. Aisladas de muestras clínicas y de agua. Tesis (maestría). IPN. ENCB. México D.F. 1998
  24. Chaudhury A, Nath G, Shukla BN. Biochemical characterisation, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolated. *J Med Microbiol* 1996; 44:434-437.
  25. Dorsch M, Ashbolt N M Cox P T. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers a molecular approach based on screening of environmental isolated. *J Appl Bacteriol* 1994; 77:722-726.
  26. Escartín E F *Microbiología sanitaria de agua y alimentos.* 2ª. ed. Guadalajara, Jalisco Universidad de Guadalajara, 1981: 75-79.
  27. Koneman M D. *Diagnóstico microbiológico.* 3ª ed México: Ed. Médica Panamericana, 1992: 317-325.
  28. Hanninen M L, Siitonen A. Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiol Infect* 1995; 115:39-50



- 
29. Happa-wwa-wpce. Standard methods for the examination of water and wastewater 14<sup>th</sup>. ed. Washington D.C.: Ed. American public health association, 1975: 875-880.
30. Janda J M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infections syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Rev 1991; 4:397-410.
31. Mac Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clinica. 2ª. ed. México· Ed. Médica Panamericana, 1995: 236-239, 275.
32. Mandell D y Bennet. Enfermedades infecciosas (principios y prácticas). 4ª. ed. México· Ed. Médica Panamericana, 1995: 275-300.
33. Havelaar A H, Toorop-Bouma. The occurrence and significance of *Aeromonas* in water with special reference to mineral water. Riv Ital Igiene 1990; 50:349-356.
34. Hazen T C. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. Appl Environ Microbiol 1978, 36:731-738.
35. Knochel S, Jeppesen C. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. In J Food Microbiol 1990;10:317-322.
- 36 LeChevallier M W, Evans T M. *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supplies. Microb Ecol 1982; 8:325-333.
37. Palumbo S A, Morgan D R. Influence of temperature, NaCl and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. J Food Sci 1985; 50: 1417-1421.
- 38 Pathak SP, Bhattacharjee. Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. J Appl Bacteriol 1988; 65:347-352.

- 
39. Rhodes M W, Kator H. Seasonal occurrence of mesophilic *Aeromonas* spp. As a function of biotype and water quality in temperate freshwater lakes. *Water Res* 1994; 28:2241-2251.
  40. Poffe R, Op de Beeck. Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. *J Appl Bacteriol* 1991; 71:366-370.
  41. Martin A, Harakeh. Effect of starvation on bacterial resistance to disinfectants. 2a. ed. In McFeters, New York: Ed. Wiley, 1990:88-103.
  42. Shubert RHW. The relationship of aerogenic to anaerogenic *Aeromonads* of the *hydrophila-punctata* group in river water depending on the load of waste. *Zentralbl Bakteriol Hyg Abt Orig* 1975; 160: 237-245.
  43. Stechini M L. Incidence of *Aeromonas* species in influent and effluent of urban wastewater purification plants. *Lett Appl Microbiol* 1994; 19 237-279.
  44. Seidler R J, Allen D A. Isolation enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl Environ Microbiol* 1980; 39:1010-1018.
  45. Soul Janda. The pathogenicity of *Aeromonas* strains relative to genospecies and phenospecies identifications. *Fems Microbiol Lett* 1991;69:29-33.
  46. Sakasaki R, Shimada T. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Japan J Medic Sci Biol* 1984;37:247-255.
  47. Stelzer W, Jacob J. A study of the prevalence of *Aeromonads* in drinking water supply *Zentralbl Mikrobiol* 1992, 147. 231-235

- 
48. Thatcher F y Clark. Análisis microbiológico de los alimentos. 3ª. ed. Buenos Aires, Argentina: Ed. Acribia, 1973: 31-35.
49. Thomas L V, Gross R J. Extended serogrouping scheme for motile mesophilic *Aeromonas* species. J Clin Microbiol 1990; 28:980-1004.
50. Tonolla M, Demarta A. Multilocus genetic relationships between clinical and environmental *Aeromonas* strains. FEMS Microbiol Lett 1991; 81: 193-200
51. Romero C Microbiología y parasitología humana. 1ª. ed Zaragoza: Ed. Médica Panamericana, 1981: 44,67-100.
52. Ronal M. Microbial ecology fundamentals and aplicaciones. 3ª. ed. Reading Massachusetts: Cummings Publishing Company, 1993: 516, 322.
53. Rouf M A, Rigney M M. Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. Appl Microbiol 1971; 22:503-506.
54. Ridgeway H F, Olsen B H. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. Appl Environ microbiol 1982; 44: 972-987.
55. Walter W W. Use of hypolimnetic oxygen depletion rate as a trophic state index for lakes. Water Res Res 1979; 15: 463-470.
56. Williams J. Miniaturized methods for the characterization of bacterial isolated. J Appl Bacterial 1975; 38: 305-309.
57. Krovacek K, Peterz M Enterotoxigenicity and drug sensitivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from well water in Sweden: a case study. Int J Food Microbiol 1989; 8:149-154.

- 
58. Ribas F, Perramon J, Terradillos A. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. *J Appl Microbiol* 2000; 88(4): 704-710.
59. Moyer N P, Luccini G M. Application of ribotyping for differentiating *Aeromonads* isolated from clinical and environmental source. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:1940-1944.
60. Hunter P R, Burge S H. The bacteriological quality of bottled natural mineral waters. *Epidemiol Infect* 1987; 99:439-443.
61. Slade P J, Falah M A. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from bottled waters and domestic water supplies in Saudi Arabia. *J Food Protect* 1986; 49: 471-486.
62. Warburton D W, McCormick. Survival and recovery of *Aeromonas hydrophila* in water . development and methodology for testing bottled water in Canada. *Can J Microbiol* 1994, 40:145-148.
63. Warburton D W, Dodds K L. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada between 1981 and 1989. *Can J Microbiol* 1992, 38:12-19.
64. Roszak D B, Colwell R R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 1987, 51:365-379.
65. Krovacek K, Dumontet J. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas hydrophila* implicated in an outbreak of food poisoning suspected due to *Aeromonas* and characteristics of the isolated strains *Nippon Koshu Eisei Zasshi* 1992; 39:707-713
66. Waltman II W D, Shotts E B. Enzymatic characterization of *Aeromonas hydrophila* complex by the API ZYM system *J Clin Microbiol* 1982, 16:692-696

- 
- 67 Tsai W C, Chu S H. The effects of defferent brands of MacConkey and xylose lysine deoxycholate agar on the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Chung Hua Min Kuo Wei* 1987;20:257-261.
68. Versteegh J F, Havelaar A H. Complexing of copper in drinking water samples to enhance recovery of *Aeromonas* and other bacteria. *J Appl Bacteriol*;67:571-576.
- 69 Austin B, Alwegg M. The genus *Aeromonas*. 1<sup>a</sup> ed. England: Wiley, 1996.