

Universidad Autónoma de Guadalajara
 INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

6
 2ej

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



**" EFICACIA DEL MEDIO DE AGAR SANGRE AMPICILINA
 MODIFICADO PARA EL AISLAMIENTO DE AEROMONAS "**

Tesis Profesional

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIBEL FLORES MIRANDA

ASESOR: Q.F.B. MARIA DEL SOCORRO PULIDO GARCIA

GUADALAJARA, JAL.

1989

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGINA:
1. INTRODUCCION.	4
2. GENERALIDADES.	7
2.1 Taxonomía. Clasificación y Nomenclatura.	7
2.1.1 Taxonomía.	7
2.1.2 Clasificación y Nomenclatura.	7
2.2 Aspectos microbiológicos de <u>Aeromonas sp.</u>	13
2.2.1 Caracteres morfológicos y coloniales.	13
2.2.2 Requerimientos para su aislamiento y cultivo.	15
2.2.3 Características bioquímicas.	15
2.2.4 Producción de hemólisis.	19
2.2.5 Estructura antigénica y factores de patogenicidad.	21
2.3 Aspectos ecológicos y epidemiológicos de <u>Aeromonas sp.</u>	25
2.4 Aspectos clínicos de las infecciones causadas por <u>Aeromonas sp.</u>	28
3. MATERIAL Y METODO.	35
3.1 Procedencia de las muestras biológicas.	35
3.2 Metodología microbiológica.	35
3.3 Esquema del plan de trabajo.	38
4. RESULTADOS.	40
5. DISCUSION Y CONCLUSIONES.	44
6. BIBLIOGRAFIA.	47

CAPITULO 1

INTRODUCCION

La cepa original de *Aeromonas* fue aislada por Ernst, en 1890, de una zoonosis llamada enfermedad de la pata roja de las ranas y no fue sino hasta la década de los años sesentas cuando se empezaron a efectuar numerosos aislamientos particularmente de heces humanas. (1).

Recientes reportes en la literatura señalan la importancia de *Aeromonas* como posible agente etiológico de enfermedades infecciosas. Dichas infecciones van desde las más comunes como gastroenteritis, infecciones de la piel y tejido celular subcutáneo, otitis e infecciones urinarias, hasta algunas de carácter severo como septicemia, endocarditis, meningitis, peritonitis, etc.

Su distribución es cosmopolita y dado que sus habitats naturales son el agua y las heces de gran variedad de animales y del hombre, su relación en estos procesos infecciosos es de suma importancia.

Si bien no se conoce con exactitud su mecanismo de patogenicidad, se han descrito substancias tóxicas obtenidas de cultivos de *Aeromonas*, tales como una enterotoxina, dos hemolisinas, una leucocidina y algunas proteasas que quizá de una manera u otra intervengan en sus mecanismos de patogenicidad.

Conforme más se sabe de *Aeromonas*, su ecología, así como sus factores de patogenicidad, más énfasis y relevancia toma su aislamiento en el laboratorio, ya que ha sido incluido como agente etiológico de una importante variedad de enfermedades infecciosas.

La búsqueda de un medio más sensible para la recuperación de *Aeromonas* a partir de evacuaciones diarréicas ha motivado este estudio.

El medio de cultivo en estudio es agar sangre ampicilina modificado, esto significa que incluye otro antibiótico además de la ampicilina, dicho agente antimicrobiano es la carbenicilina; este antibiótico es una penicilina semisintética de amplio espectro y activa sobre bacterias gram positivas y gram negativas. La carbenicilina muestra niveles de actividad sobre numerosas cepas de *Proteus* que son típicamente resistentes a la ampicilina.

Los objetivos principales de este estudio son:

1. Disminución del swarming producido por *Proteus* y que dificulta el primoaislamiento de *Aeromonas*.

2. Hacer una evaluación cuantitativa del crecimiento microbiano, tanto en el medio de agar sangre ampicilina (medio rutinario) como en el de agar sangre ampicilina modificado (medio de prueba).

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1 TAXONOMIA, CLASIFICACION Y NOMENCLATURA.

2.1.1 TAXONOMIA.

BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS.

FAMILIA II. Vibrionaceae

Género I. Vibrio

Género II. Photobacterium

Género III. Aeromonas

Género IV. Plesiomonas.

2.1.2 CLASIFICACION Y NOMENCLATURA.

La familia Vibrionaceae se caracteriza por ser bacilos gram negativos, que pueden ser rectos y curvos; y su movilidad está identificada por un flagelo polar.

Son organismos quimiorganotróficos y anaerobios facultativos, por lo que son capaces de tener un metabolismo respiratorio y fermentativo.

Cuando la familia Vibrionaceae fue propuesta por Veron, en 1965, su primera intención fue de agrupar un número de géneros con sus especies, las cuales fueron la mayoría oxidasa positiva y móviles por el flagelo polar.

Esta agrupación fue necesariamente significativa, ya que se llevó a cabo con el propósito de diferenciar estos organismos de la familia Enterobacteriaceae, en la cual todas sus especies son oxidasa negativa y la mayoría son móviles pero por flagelos peritricos.

En base a las características morfológicas, fisiológicas de cultivo y bioquímicas, Smith en 1963, propuso un nuevo género: "Necromonas" para acomodar las cepas de Aeromonas salmonicida.

El nombre de "Necromonas salmonicida" fue sugerido como una alternativa para las cepas con pigmento café de A. salmonicida y "Necromonas achromogenes" como una alternativa a las cepas no pigmentadas de A. salmonicida. Sin embargo, los estudios homólogos del DNA no aceptan esta proposición, puesto que las cepas de A. salmonicida pigmentadas y no pigmentadas mostraron un alto grado de crecimiento homólogo con especies de Aeromonas móviles.

En los últimos tiempos, "N. salmonicida" y "N. achromogenes" son sinónimos de Aeromonas salmonicida y sus variantes no pigmentadas.

Schubert (1967-1969) (2,3) propuso la diferenciación de A. salmonicida en 3 sub-especies:

- A. salmonicida sub-especie salmonicida.
- A. salmonicida sub-especie achromogenes.
- A. salmonicida sub-especie masoucida.

Estas tres subespecies pueden distinguirse por sus características bioquímicas presentadas en la Tabla 1.

Pero *A. salmonicida* sub-especie *salmonicida* y *A. salmonicida* sub-especie *masoucida*, parecen ser grupos genéticamente homogéneos por estudios homólogos del DNA. Sin embargo, no hay evidencia de que *A. salmonicida* sub-especie *masoucida* y posiblemente otros aislamientos bioquímicamente atípicos de *A. salmonicida* garanticen el estado de las sub-especies presentes; el nombre de estas tres sub-especies fue incluido en las Listas Aprobatorias de los Hombres Bacterianos.

La clasificación de especies de *Aeromonas* móviles es compleja y la controversia proviene de la discordancia que existe entre los puntos de vista de diferentes colaboradores. La opinión de Ewing, en 1961, Eddy y Carpenter, en 1964; y Mc Carthy, en 1975, favorecen una sólo especie de todas las *Aeromonas* móviles. (4, 5).

Schubert (1967-1969), (2,3), reconoce dos especies separadas con varias sub-especies y biotipos. Popoff y colaboradores, en 1981, (6), dividen las *Aeromonas* móviles en tres especies en base a evidencias fenotípicas y genéticas; estas tres especies son llamadas:

Aeromonas hydrophila, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas sobria*.

Las características diferenciales fenotípicas se indican en la Tabla 1.

En base a las varias combinaciones de los residuos de hexosa y heptosa, *Aeromonas* móviles están en tres grupos distintos, que corresponden a *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*.

De los estudios de hibridación del DNA, usando el método SI-nucleasa (Popoff y colaboradores, 1981), *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* muestran homología de inter-especies DNA/DNA, valuadas entre 35-50 % con 8-12 % de divergencia. Estos valores de hibridación del DNA son consistentes en el criterio requerido para definir grupos a niveles de especies, sostienen la diferenciación entre *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*, a niveles de especie más que a niveles de sub-especies.

Cada una de estas tres especies contienen más de un grupo de hibridación del DNA; 3 grupos de hibridación pueden ser delineados en *A. hydrophila*, 2 grupos en *A. caviae* y, al menos 2 grupos en *A. sobria*.

TABLA 1
 DIFERENCIAS ENTRE *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* y *A. salmonicida*.

CARACTERISTICAS	<i>A. hydro-</i> <i>phila.</i>	<i>A.</i> <i>caviae</i>	<i>A.</i> <i>sobria</i>	<i>A. salmo-</i> <i>nicida.</i>	<i>Salmoni-</i> <i>cida achro-</i> <i>mogenes.</i>	subesp. <i>masouci</i> <i>da.</i>
Movilidad.	+	+	+	-	-	-
Flagelos monotricos en medio liquido.	+	+	+	-	-	-
Flagelos bifotricos en medio liquido.	-	-	-	-	-	-
Cocobacilos en pares, cadenas y racimos.	-	-	-	+	+	+
Bacilos solos y pares.	+	+	+	-	-	-
Pigmento cafe soluble.	-	-	-	+	-	-
Crecimiento en caldo nutritivo a 37° C.	+	+	+	-	-	-
Producción de indol en 1 % de agua peptona.	+	+	+	-	+	+
Hidrólisis de esculina.	+	+	-	+	-	+
Crecimiento en caldo KCN.	+	+	-	-	-	-
Utiliza L-histidina y L-arginina.	+	+	-	-	-	-

Continuación Tabla 1.

CARACTERISTICAS.	<i>A. hydro-</i> <i>phila.</i>	<i>A.</i> <i>caviae</i>	<i>A.</i> <i>sobria</i>	<i>A. salmo-</i> <i>nicida.</i>	<i>salmoni-</i> <i>nicida</i> achro- <i>genes.</i>	subesp. <i>masouci-</i> <i>da.</i>
Utiliza L-arabinosa.	+	+	-	+	-	+
Fermentac. salicina.	+	+	-	d	d	d
Fermentac. manitol.	+	+	+	+	-	+
Fermentac. sacarosa.	+	+	+	-	+	+
Voges Proskauer.	+	-	d	-	-	+
Gas de glucosa.	+	-	+	+	-	+
H ₂ S de cisteína.	+	-	+	-	-	+

2.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE AEROMONAS SP.

2.2.1 Caracteres morfológicos y coloniales.

Los miembros del género *Aeromonas* son anaerobios facultativos, no producen esporas y son bacilos gram negativos, miden de 1.0-4.4 μm . de longitud y 0.4-1.0 μm . de diámetro. Poseen además un flagelo polar, usualmente monótrico. En cultivos viejos se pueden observar flagelos laterales cortos. Son organismos heterofílicos, producen oxidasa y catalasa; y fermentan glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácido o ácido y gas. Los nitratos se reducen a nitritos y se producen muchas exoenzimas como amilasa, DNasa, lipasa, fosfatasa, proteinasa, etc. La temperatura de crecimiento es de 0-41° C.; de las especies que se aislan en el humano la temperatura rango es de 10-41° C., *A. salmonicida* crece sólo abajo de 37° C. Algunas cepas son más activas a 22° C. que a 37° C. (7, 8, 9).

El rango de pH para su crecimiento es de 5.5-9.0. El contenido de guanina más citosina del DNA es de 57-63 mol % (9).

El género *Aeromonas* no es susceptible al compuesto 0/129 (2,4-diamino-6,7-díisopropilpteridina); en agar Mueller-Hinton, no se forma ninguna zona alrededor de los discos que contienen de 10 a 150 μg de 0/129 fosfato, y una zona 15 mm. aparece alrededor del disco que contenía 570 μg de 0/129 fosfato. (10).

El Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, (9), reconoce cuatro especies de *Aeromonas*: *A. hydrophila*,

A. caviae, *A. sobria* y *A. salmonicida* (con las sub-especies *salmonicida*, *achromogenes* y *masoucida*). Recientemente una nueva especie acuática, *A. media*, inmóvil como *A. salmonicida* ha sido propuesta pero ésta no se aísla de humanos. (11).

Taxonómicamente existen dos grupos de *Aeromonas*:

1. Grupo móvil, indol positivo, crecimiento óptimo de 35 a 37° C. y cuyas especies son: *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*.

2. Grupo inmóvil y de crecimiento óptimo a 20° C. (innábil para desarrollar a 37° C.) y que comprende solamente a la especie *salmonicida*. Esta no infecta al hombre y causa furunculosis en el pescado y es de importancia exclusivamente en la industria pesquera. (12).

Características morfológicas de las especies móviles de *Aeromonas*.

Son bacilos rectos, miden de 1.0-4.4 μ m de longitud y de 0.4 a 1.0 μ m. de diámetro, móviles por un flagelo único en medios líquidos; el flagelo peritrico puede aparecer en medios sólidos, son no capsulados.

En agar nutritivo las colonias son de blanco a color ante, circulares, convexas y con bordes enteros.

En agar sangre puede haber colonias beta-hemolíticas pequeñas (1 a 3 mm.) lisas, convexas, que toman un color verde obscuro después de 3 a 5 días. (13).

Características morfológicas de la especie inmóvil de *Aeromonas*.

Son cocobacilos gram negativos, en caldo nutritivo se forman pares, cadenas y racimos en preparaciones observadas en contraste de fases, no móviles, no capsulados, su temperatura máxima de crecimiento es de 22 a 25° C., las colonias son circulares, lisas y friables.

A. salmonicida sub-especie salmonicida: las cepas producen una pigmentación café soluble en agua, en un medio que contiene 0.1 % de tirosina o fenilalanina, no produce indol.

A. salmonicida sub-especie achromogenes: las cepas no producen pigmento café soluble en agua, pueden producir indol.

A. salmonicida sub-especie masoucida: las cepas no producen pigmento café soluble en agua, producen indol.

2.2.2 Requerimientos para el aislamiento y cultivo.

Entre los medios con óptima sensibilidad y especificidad para *Aeromonas* se encuentran: agua peptona alcalina, agar inositol verde brillante-sales biliares, agar dextrina-fucsina sulfito, agar xilosa-desoxicolato sódico-citrato y agar ampicilina Pril-xilosa. También se ha usado agar sangre con α -p-nitrofenol glicerina.

2.2.3 Características bioquímicas.

En el laboratorio rutinario una de las característi-

cas importantes que nos lleva a presumir diagnóstico de Aeromonas es crecimiento en agar MacConkey, una reacción oxidasa positiva y la fermentación de carbohidratos. La prueba de oxidasa es positiva para Aeromonas si se realiza con cualquier reactivo en colonias de agar sangre, pero puede ser negativa si se realiza en colonias de medios entéricos que muestren signos de fermentación de la lactosa del medio y hacen descender el pH a menos de 5.2.

En TSi o Kligler se pueden producir picos ácidos o alcalinos y fondo ácido, formación de gas, pero nunca forman ácido sulfhídrico.

La separación de otros Vibrionaceae puede ser más difícil a la luz de una nueva multitud de Vibrio sp. la resistencia a O/129 no es característica de Vibrio sp.

Las Aeromonas móviles, por otro lado, no crecen en caldo de 6% de NaCl y no poseen una decarboxilasa de ornitina, características que los separan de especies de Vibrio halofílicas y no halofílicas, respectivamente.

La diferenciación de especies de Aeromonas de Plesiomonas envuelve pruebas de la decarboxilasa de ornitina, DNasa y resistencia a O/129.

Se produce indol a partir del triptófano, lo que permite diferencia las Aeromonas de Pseudomonas, (13).

De acuerdo a un estudio realizado en Perth, Australia (14), los datos sugieren que el enriquecimiento por medio de caldos nutritivos permite la detección de Aeromonas fecales presentes en bajas concentraciones que pueden

encontrarse en pacientes convalescientes, portadores y en casos de infección subclínica con ausencia de diarrea en el momento del muestreo. Es recomendable que las evacuaciones diarreicas se siembren directamente en agar para el aislamiento de *Aeromonas* sp.

Las cepas de las especies de *Aeromonas* móviles han sido aisladas en agar nutritivo o en agar tripticosa soya. Las *Aeromonas* móviles en algunos medios selectivos para enterobacterias crecen bien. Las colonias son generalmente lactosa negativa en estos medios, pero algunas cepas pueden desarrollar colonias con fermentación de la lactosa.

Las cepas de *Aeromonas salmonicida* pueden ser aisladas en agar tripticosa soya. Las cajas inoculadas son incubadas a una temperatura de 22 a 25° C. por 48 hrs. y son revisadas para observar el desarrollo de pequeñas colonias, producción de oxidasa y pigmentación café.

A. salmonicida crece aisladamente en medios selectivos para enterobacterias.

TABLA 2
PRUEBAS BIOQUIMICAS DE *Aeromonas* sp.

H ₂ S (Kligler o TSI)	-	Refinosa	-
Ureasa	-	Ramnosa	-
Indol	d	Maltosa	+
Rojo de metilo		Xilosa	-
37° C.	+	Trehalosa	+
26° C.	d	Celobiosa	d
Voges-Proskauer		Glicerol	+
37° C.	d	Esculina	d
26° C.	d	Manosa	+
Citrato (Simmons)	d	Malonato	-
Crecimiento en KCN	d	Lipasa	+
Motilidad	+	Nitrato	
Gelatina, 22° C	+	A nitrito	+
Lisina descarboxilasa	d	Oxidasa	+
Arginina dihidrolasa	d	Catalasa	+
Ornitina descarboxilasa	-	Desarrollo en:	
Fenilalanina desaminasa	d	MacConkey	+
Glucosa		SS	d
Acido	+	Caseinasa	+
Gas	d	Amilasa	+
Lactosa	d	DNasa	+
Sacarosa	d	Desarrollo en	
Arabinosa	d	NaCl 6.5 %	-
Manitol	+		
Dulcitol	-	Símbolos:	
Salicina	d	+ = positivo;	
Adonitol	-	- = negativo;	
Inositol	d	d = reacciones diferen	
Sorbitol	d	tes.	

Revisar la Tabla 2. Referente a pruebas bioquímicas de *Aeromonas*.

Las características bioquímicas de las *Aeromonas* han sido estudiadas por Ewing y Cols. (1961), Eddy (1960-1962), Smith (1963), Popoff (1969), Mc Carthy (1975) y Popoff y Veron (1976). (15).

El ácido es producido por todas las cepas de *Aeromonas*, poseen gelatinasa, desoxirribonucleasa, ribonucleasa y estearasa. El sulfuro de hidrógeno no es producido del tiosulfato.

Los siguientes carbohidratos son fermentados esencialmente por *A. salmonicida*: arabinosa, trihalosa, galactosa, manosa y dextrosa y los siguientes exámenes bioquímicos son negativos para *A. salmonicida*: crecimiento en KCN, crecimiento en caldo nutritivo que contiene 7.5 % de NaCl, ureasa, descarboxilasa ornitina (ODC), reductasa, tetracionato y acidificación del medio conteniendo ramnosa, sorbitol, lactosa, refinosa y celulosa.

La arginina es catabolizada por *A. salmonicida* en un sistema de arginina-dihidrolasa (ADH).

Cepas de *A. salmonicida* pueden crecer en el medio químicamente definido por O'Leary (1956).

2.2.4 Producción de hemólisis.

En agar sangre muchas cepas de *Aeromonas* muestran una gran zona de beta-hemólisis, pero hay cepas no hemolíticas. (8, 9, 16).

Se recomienda para su primoaislamiento la utilización de agar sangre ampicilina (1 mg/100 ml), ya que esta bacteria produce habitualmente beta-hemólisis en sangre humana o en sangre de borrego.

En un suburbio de Lima, Perú, se realizó un estudio para aislar *Aeromonas* sp. en evacuaciones de individuos sintomáticos y asintomáticos, (17). Los métodos iniciales de aislamiento incluyeron medios como MacConkey, SS, XLD, Hektoen, agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sucrosa y la prueba de oxidasa en las colonias sospechosas. Aunque estos medios no fueron diseñados específicamente para el aislamiento de *Aeromonas* sp. encontramos un modesto número de aislamientos, por ejemplo, 19 (1.5 %) de 1248 especímenes examinados en seis meses.

Se consideró insatisfactorio el uso exclusivo de estos medios para aislamiento exclusivo de *Aeromonas* sp. por tres razones principales:

1) *Aeromonas* sp. es variable en su habilidad para fermentar carbohidratos por lo cual puede existir error.

2) Ciertos carbohidratos pueden tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Aeromonas* sp., por ejemplo, xilosa y lactosa se han reportado como inhibitorias para algunas cepas de *Aeromonas* sp. debido a los productos del metabolismo de carbohidratos.

3) La producción de ácidos puede provocar un resultado falso en la prueba de oxidasa negativa.

Gracey y cols. recomendaron el uso de agar sangre

de oveja con 10 ug de ampicilina por ml. (ASBA) (18). En el estudio en Perú se usó este medio precedido por enriquecimiento con agua peptona alcalina. (pH = 8.4) y se obtuvo un marcado incremento en la tasa de aislamiento. Se examinaron las colonias húmedas, pardas y bajas, con o sin hemólisis y se realizó la prueba de oxidasa.

Durante un año de experimentación con este método se examinaron 2,386 evacuaciones. La tasa de aislamiento de *Aeromonas* con agua peptona alcalina-agar sangre ampicilina (314 de 2,386 (13.2 %)) fue 2.6 veces que con medios entéricos convencionales. (119 de 2,386 (5.0 %)).

Casi todas las muestras desarrollaron sobre el medio probado con la excepción de tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa.

2.2.5 Estructura antigénica y factores de patogenicidad.

En el caso de *Aeromonas* existen tres tipos de exotoxinas: enterotoxinas, hemolisinas y citotoxinas, no siempre presentes en la misma cepa.

Para detectar cambios en la función intestinal producidos por enterotoxinas, se han utilizado diversos modelos como el ratón lactante, asa ileal del conejo y perfusión de yeyuno de rata in vivo.

Se ha demostrado que existen al menos dos tipos de hemolisinas.

La citotoxicidad no coincide con la enterotoxigeni-

cidad, existe mayor relación entre hemolisinas y enterotoxinas.

Algunos investigadores afirman la existencia de una enterotoxina citotónica relativamente estable al calor y otros no han detectado alguna actividad específica al calor estable en cultivos celulares, aunque fueron encontrados cambios alrededor de células no específicas, pero no hay duda sobre la existencia de citotoxina termolábil. (56° C.).

En Londres, (19), se realizó un estudio en 111 aislamientos de *Aeromonas* sp. de los cuales: 24 fueron aislamientos ambientales de grifos, albercas y otros suministros clorados, 8 fueron de albercas no tratadas y arroyos, 79 fueron aislamientos humanos, todos de heces menos 3.

Los estudios de toxinas fueron hechos en cultivos preparados según el método de Barer y la actividad citotóxica se estudió en células Vero.

De acuerdo a los resultados, *A. sobria* fue rara en muestras de agua, pero el 28 % de los aislamientos de heces pertenecían a esta especie. La especie predominante en muestras de agua fue *A. caviae*. Sin embargo, hubo una pequeña diferencia entre las proporciones de productores de citotoxina en aislamientos del medio ambiente (28 %) y de fuentes humanas (29 %). Todas menos 4 muestras clínicas productoras de citotoxina dieron títulos de por lo menos 400 y arriba de 10,000.

Dado el exceso de *A. caviae* en muestras ambientales

se sugiere que A. sobria tiene un potencial más grande para invadir el tracto gastrointestinal.

Watson encontró que de un grupo de aislamientos de Aeromonas la mayoría de muestras invasoras "in vitro" fueron A. sobria.

Se ha notado que la citotoxina tiene actividad de enterotoxina.

Unas pocas muestras citotoxigénicas de Aeromonas se encontraron en gente sana, pero la mayoría eran de personas con síntomas gastrointestinales, particularmente aquellos que eran previamente sanos.

La mucosa intestinal ya dañada puede ser predispuesta para la colonización de Aeromonas no necesariamente patógenas.

Se han purificado dos hemolisinas que son biológicamente similares pero inmunológicamente distintas. (20).

Ya que ambas hemolisinas causan acúmulos de fluidos en el intestino de animales de laboratorio como conejos y ratones, se consideran enterotoxinas citotóxicas.

La acción enteropatogénica de las hemolisinas parece correlacionarse con la lisis de glóbulos rojos, pero su modo de acción no se entiende claramente. Algunos investigadores han reportado que la toxina (hemolisina, Aerolysina) unida a glicoproteínas en la membrana de los eritrocitos, forman huecos funcionales que destruyen dicha membrana. Esto resultó cierto en glóbulos rojos de ratas.

Al reevaluar la sensibilidad de los glóbulos rojos de diferentes especies de animales a las dos hemolisinas, se demostró que *A. hydrophila*, o sea, sus hemolisinas forman oligómeros en la membrana de los eritrocitos.

La actividad de la hemolisina en glóbulos rojos de ratas a 37° C. se encontró entre 7 y 60 veces mayor que en glóbulos rojos de conejo y de oveja, respectivamente. La sensibilidad entre 10 y 37° C. fue similar para glóbulos rojos de ratas y conejos.

Por análisis inmunológico se determinó la forma de las hemolisinas que se unen a glóbulos rojos y se determinó que podían ser heptámeros u octámeros. No se pudo explicar cómo la hemolisina cambia a dos formas diferentes.

Su acción por formación de oligómeros con la membrana del glóbulo rojo, lisándolos o formando los mencionados poros intramembrana. La oligomerización es independiente de la temperatura.

El significado de *Aeromonas* sp. como patógeno entérico de origen acuático en Tasmania, Australia, (un área con clima suave y con temperaturas de agua bajas durante todo el año), fue investigado en vista de los reportes de *Aeromonas* sp. asociados a gastroenteritis en el verano. (21).

Las características bioquímicas y las propiedades asociadas a la virulencia-producción de exotoxina (hemolisina, enterotoxina), habilidad para crecer a 43° C. y posesión de pili fueron determinadas en 105 aislamientos

de *Aeromonas* sp. en Tasmania; 43 de ellos fueron de especímenes clínicos (75 % asociados a diarrea); y 62 fueron de aislamientos ambientales (agua). *A. sobria* comprendió el 35 % de los aislamientos clínicos y el 16 % de los ambientales. *A. hydrophila* comprendió el 56 y 79 % respectivamente, y *A. caviae* comprendió el 9 y 5 %.

El 42 % de los aislamientos clínicos y 15 % de aislamientos ambientales, fueron enterotoxigénicos (ensayo del ratón lactante); estos resultados fueron significativamente más bajos que los encontrados en ambientes más cálidos. La mayoría (74 %) de los aislamientos enterotoxigénicos fueron *A. sobria*. Los aislamientos productores de enterotoxinas poseían tres o más de las siguientes propiedades: Voges-Proskauer positiva, no hidrólisis de arabinosa, positivo para lisina descarboxilasa, capaces de crecer a 43° C., y produjeron grandes cantidades de hemolisina (títulos > 128); los aislamientos enterotoxigénicos ambientales poseían numerosos pili, pero estos se perdían una vez que la infección era demostrada, así como en aislamientos similares de pacientes con diarrea hubo una marcada ausencia de pili.

2.3 ASPECTOS ECOLOGICOS Y EPIDEMIOLOGICOS.

En lo que se refiere a su epidemiología, *Aeromonas* tiene una distribución cosmopolita y como su nombre lo indica (hydro-agua, philo-atracción) tiene su habitat natural en el agua. Se ha aislado de agua corriente o estancada, en agua salada y aun en aguas negras. Reside en desagües de piletas y se puede recuperar de tuberías, consideradas fuentes potenciales de infecciones nosoco-

miales. También se ha aislado del suelo y alimentos y su sobrevivencia parece depender de la humedad y la presencia de materia orgánica. (11, 22). Las especies de *Aeromonas* se han encontrado en valores de pH que varían desde 5.2 a 9.8 y temperaturas que van desde 4 a 45° C. y no son consideradas halofílicas, ya que su tolerancia a NaCl va sólo de 0-4 %.

Se han reportado infecciones por *Aeromonas* en anfibios, como el sapo, reptiles y peces, si no se infectan pueden ser transportadores de *Aeromonas*.

La infección en humanos ocurre mayormente entre los meses de mayo a noviembre, probablemente debido al origen acuático del organismo. (23).

Habitualmente la transmisión suele ocurrir a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, o bien a través de traumas.

Aeromonas se ha aislado en heces de sujetos sin enfermedad gastrointestinal. En algunos casos se han encontrado toxinas de *Aeromonas* aisladas de aguas contaminadas. De este modo, *Aeromonas* puede utilizarse como indicador de aguas contaminadas.

Agger y cols. (24) realizaron estudios de infecciones intestinales diarreicas ocasionadas por *Aeromonas* sp. en el área rural de Wisconsin, demostrando que el mayor porcentaje de estas infecciones son causadas por la ingesta de agua contaminada sin tratamiento adecuado. Los depósitos de agua no tratada fueron las principales fuentes de *Aeromonas*, aunque no los únicos ya que también

fueron encontrados en cantidades considerables en carne y productos vegetales.

Aeromonas sp. ha sido implicada recientemente como una causa mayor de gastroenteritis, particularmente en niños menores de tres años. A pesar de que la mayoría de los pacientes demostraron diarrea, tanto toxigénica como coleriforme, también hubo circunstancias de diarrea tipo disentérica reportadas. (25).

Durante un período de 20 meses se realizó un estudio de 2,147 niños con diarrea. (27); 55 cepas de *Aeromonas* fueron aisladas de 53 niños, el % de aislamiento de 2.5 % (53 niños) se compara con 4.5 % de *Shigella*, 3.3 % de *Salmonella*, 2.7 % de *Campylobacter* y 0.05 % de *Yersinia*. En 45 de los niños, *Aeromonas* fue la única bacteria enteropatógena identificada. *A. caviae* fue la más prevalente de las especies con un total de 69 % de cepas aisladas. Ninguna de las cepas de *A. caviae* produjo citotoxinas; esta prueba se hizo por el método de liberación de $51Cr$, y 12.5 % fueron débilmente enterotoxigénicas por el ensayo del ratón lactante. Todas las *A. sobria* y 71 % de *A. hydrophila* produjeron resultados positivos para las dos toxinas, 92 % de los niños con diarrea asociada a *Aeromonas* eran menores de tres años; 84 % de los casos se presentaron entre mayo y octubre.

La distribución de la diarrea, de acuerdo a la población étnica, fue en proporción a la distribución racial dentro del Hospital Infantil de Oklahoma.

En este estudio se demostró que *A. caviae*, que hasta entonces no se había considerado por muchos inves-

tigadores como un enteropatógeno, puede estar asociado con diarrea con más frecuencia que *A. hydrophila* o *A. sobria*.

Revisar la Tabla 3.

TABLA 3
EDAD DE NIÑOS CON *Aeromonas* ASOCIADA A DIARREA.

EDAD.	NUMERO DE CASOS.
<1 mes.	7 (13 %)
1 - 6 meses.	23 (43 %)
7 - 12 meses	10 (19 %)
1 - 2 años	9 (17 %)
3 - 5 años	1 (2 %)
6 - 10 años	0 (0 %)
>10 años	3 (6 %)

2.4 ASPECTOS CLINICOS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *Aeromonas* sp.

Se han descrito cuatro categorías de infecciones:

1) Celulitis o infección de heridas relacionadas con la exposición a tierra o agua. (28).

2) Enfermedad diarreica de corta duración, algunas veces sanguinolenta o coleriforme, con distribución universal y afecta cualquier edad (aunque parece más frecuente en turistas y pacientes menores de cinco años de edad). (23).

3) Enfermedad biliar o pancreática, con o sin malign-

nidad, como leucemia aguda, (29).

4) Otras infecciones: de tejido blando, infecciones de tracto urinario, meningitis, peritonitis, otitis y endocarditis. (22, 28).

Se presentó el caso de un recién nacido con enteritis asociada a *Aeromonas hydrophila*, (26). El neonato en el segundo día luego de su nacimiento a pre-término, fue varón con peso apropiado, demostró letargia, desbalances de temperatura, ictericia, distensión abdominal y poca ingesta. Presentó diarrea con moco y sangre y con una frecuencia de 5 y 6/día, sin deshidratación, fiebre u otras características clínicas relevantes. Después de recolectar muestra fecal se comenzó con tratamiento de gentamicina y ampicilina parenteralmente. El laboratorio demostró un gran número de leucocitos polimorfonucleares y eritrocitos; no se encontró *Campylobacter* ni *Cryptosporidium*. Luego de 24 hs. se realizó reporte preliminar de enteritis asociada a *Aeromonas* basado en la morfología de las colonias y una reacción oxidasa. A las 48 hs. se aisló *Aeromonas* confirmando el diagnóstico. El hemocultivo fue negativo.

El infante mejoró rápidamente luego de iniciada la terapia con antibióticos, después de 48 hrs. cedió la diarrea, a pesar de que aún se demostraba *Aeromonas* en las heces fecales. Un cultivo vaginal del exudado de la madre reveló *A. hydrophila*. Al cuarto día de instituida la terapia se comenzó a amamantar al niño y con buena tolerancia. Ocho días después de la terapia ya no demostraba *Aeromonas* y se suspendió la terapia.

El agente etiológico fue adquirido probablemente de la madre en el trabajo de parto.

La terapia antimicrobiana para diarrea por *Aeromonas* fue: trimetropin-sulfametoxazole y los aminoglucósidos han sido muy efectivos tanto "in vivo" como "in vitro"; otros también efectivos como cloranfenicol y tetraciclinas no deben usarse en un neonato.

En el estudio realizado en el Hospital Infantil de Oklahoma, (27), se encontró que la mayoría de los 53 niños con *Aeromonas* tuvieron un cuadro agudo de diarrea acuosa. Fiebre y vómito estuvieron comúnmente asociados con el aislamiento de *A. sobria*. Ocho niños tenían diarrea crónica o intermitente que había durado de semanas a meses antes de la consulta médica; *A. caviae* fue aislada en todos estos casos. Varias complicaciones posibles relacionadas a infecciones intestinales por *Aeromonas* fueron observadas: bacteremia por gram negativos, intusus cepción, estrangulación de hernia interna, síndrome uremico-hemolítico y falta de crecimiento en pacientes con diarrea crónica.

De acuerdo a las historias clínicas, la frecuencia de evacuaciones era de 5 a 20 por día, la mayoría tenía de 5-12 veces por día.

De los niños, 33 fueron a consulta en los 5 días después de que empezó el cuadro diarreico, 8 presentaron diarrea crónica de más de 2 semanas o intermitente de hasta 6 meses.

En los niños con infección por *A. sobria* generalmen-

te tenían manifestaciones sistémicas asociadas, todas con vómito y sólo uno no tuvo fiebre. Los ocho pacientes con diarrea crónica o intermitente tenían *A. caviae* como único enteropatógeno en heces.

De los 53 niños solamente había uno con problemas de inmunosupresión y presentó las tres especies de *Aeromonas* en el curso de diferentes evacuaciones diarréicas.

A. caviae fue la especie más frecuente en heces diarréicas. Se presentaron dos diferentes formas de enfermedad según el curso de la diarrea.

1) Enfermedad aguda limitante de 1-12 días. Fueron notables los pacientes con *A. sobria* porque aparentemente eran los que tenían más fiebre y vómito asociados a la diarrea.

2) Enfermedad crónica o intermitente de diarrea que dura de semanas a meses; todos los pacientes en este grupo tenían *A. caviae*, 3 de los pacientes con diarrea crónica eran tratados por gastroenterólogos por falta de crecimiento secundario a la intolerancia a la leche para lactantes. El mejoramiento a la diarrea ocurrió después de la administración de trimetoprim-sulfametoxazole a estos pacientes.

Se sugiere que los casos donde se presentó septicemia por gram negativos, se debe a que *Aeromonas* causa rompimiento en la mucosa intestinal y así existe una puerta de entrada para los organismos a la sangre.

A. hydrophila en un paciente con bacteremia fue

positiva para citotoxina, pero *A. caviae* en otro paciente fue negativa.

Finalmente, el síndrome urémico hemolítico en un paciente con *A. sobria* se suma a la lista de enteropatógenos asociados con bacteremia.

En un estudio presentado por Janda y Brenden, (39), en el cual se menciona que en 5 años, 13 pacientes presentaron bacteremia por *Aeromonas*. Once de los individuos tenían serias enfermedades (cáncer, $n = 8$; cirrosis, $n = 3$). La edad promedio fue de 65 años (rango 34-96), y hubo más hombres que mujeres.

Ocho pacientes tenían síntomas de sepsis, 4 presentaban complicaciones de dolor abdominal con ascitis o edema, peritonitis o celulitis. Siete pacientes recibían quimioterapia para cáncer, drogas inmunosupresoras o antibióticos. Todos adquirieron la infección en la comunidad, excepto uno que se sospecha la adquirió en el hospital. Nueve pacientes tenían fiebre y cinco, signos clínicos de hipotensión. Todos los pacientes negaron haber hecho viajes, salidas al campo o comido mariscos.

De los 13 aislamientos, 6 (46 %) fueron *A. sobria*, 4 (30 %) *A. caviae* y el resto 3 (25 %) *A. hydrophila*. La bacteremia duró en promedio dos días.

En cuatro individuos se recobró *aeromonas* sp. de otras partes del organismo.

La diarrea había precedido a la bacteremia en seis individuos, uno de ellos había tenido sangrado rectal.

En ocho casos se pensó que *Aeromonas* provenía del tubo gastrointestinal y en otros tres casos del sistema hepatobiliar, en dos casos se pensó en heridas.

Fallecieron 31 % de los pacientes, pero en dos casos no se pudo culpar a la bacteremia por *Aeromonas* como la causa de muerte.

A. caviae fue asociada con sepsis polimicrobiana en cuatro ocasiones: *A. caviae* asociada con *Klebsiella* en dos casos, en otro caso con *E. coli* y *Streptococcus viridans* y en el último caso sólo con *Streptococcus viridans*.

En tres casos de bacteremia por *A. caviae* los pacientes tenían infección hepatobiliar. En contraste la septicemia por *A. sobria* y *A. hydrophila* eran monobacterianas y dos de las muertes resultaron directamente de la sepsis por *A. sobria*.

A. sobria fue la más frecuente, patogénica y con más capacidad de invasión, por lo tanto los pacientes que tienen esta infección y predisposición a infecciones sistémicas, tienen un riesgo más alto de desarrollar enfermedad diseminada en contraste con la bacteremia por *A. caviae* que era siempre polimicrobiana, sugiriendo menos patogenicidad.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO

3.1 PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.

Para la realizaci3n del presente estudio, se utilizaron 100 evacuaciones diarr3icas de adultos, remitidas a la Cl3nica de Diarreas en el Hospital Dr. Angel Leaño.

No se tom3 en cuenta ning3n par3metro cl3nico (moco, sangre) como requisito para la selecci3n de dichas muestras, s3lo la caracter3stica de ser evacuaciones diarr3icas.

3.2 METODOLOGIA MICROBIOL3GICA.

1. Para realizar el primoaislamiento, las muestras se tomaron con un hisopo est3ril.

2. Se pasaron a tubos conteniendo el medio de Stuart (medio de transporte) para su posterior proceso en el laboratorio.

3. Se sembraron dos placas: 1) agar sangre ampicilina (medio rutinario) y 2) agar sangre ampicilina modificado (medio de prueba).

4. Una vez sembradas las placas se incubaron a 37° C. por 24 horas.

5. Despu3s de 24 horas de incubarse, se revisaron las placas para llevar a cabo la evaluaci3n cuantitativa del crecimiento microbiano. Los est3ndares usados para dicha evaluaci3n se presentan en la Tabla 4.

6. La evaluación cuantitativa del crecimiento microbiano, se llevó a cabo en cada una de las dos placas y se reportó también el crecimiento de la flora normal, el desarrollo de las colonias sospechosas (beta-hemolíticas) así como del swarming producido por *Proteus*.

7. Se midió el diámetro de la colonia sospechosa y de la hemólisis en el medio de prueba (agar sangre ampicilina modificado).

8. Transcurrido el tiempo de incubación se escogieron las colonias sospechosas y se usaron los siguientes medios bioquímicos: Kliger (fermentación de azúcares), MIO (motilidad, producción de indol y descarboxilación de la ornitina), LIA (descarboxilación o desaminación de la lisina) y Urea de Christensen.

9. Si el perfil bioquímico corresponde a *Aeromonas* se practica la prueba de oxidasa, debiendo resultar positiva.

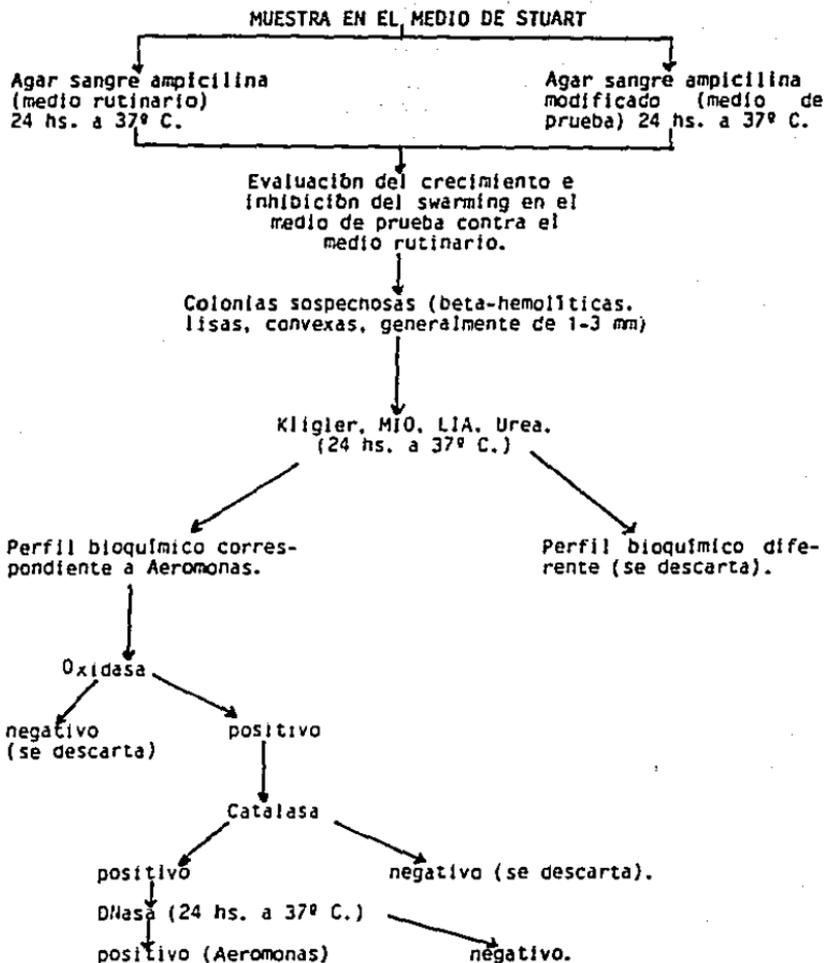
10. Para confirmar se realizó una siembra en el medio de DNasa y se incubó a 37° C. por 24 hs., siendo positiva para *Aeromonas*.

TABLA 4
ESTANDARES PARA EVALUACION CUANTITATIVA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

CRECIMIENTO	SECTOR I	SECTOR II	SECTOR III
Negativo	No crecimiento.	No crecimiento.	No crecimiento.
Escasa cantidad (1+)	Colonias aisladas (3-30)	No crecimiento.	No crecimiento.
Moderada cantidad (2+)	Crecimiento confluyente (abund. col.).	Colonias aisladas.	No crecimiento.
Abundante cantidad (3+)	Crecimiento confluyente (abund. col.).	Crecimiento confluyente	Colonias aisladas.
Muy abundante cantidad. (4+)	Crecimiento confluyente.	Crecimiento confluyente.	Crecimiento confluyente.

3.3 ESQUEMA DEL PLAN DE TRABAJO.

38



CAPITULO IV

RESULTADOS

Se procesaron 100 muestras de evacuaciones diarréicas de adultos, remitidas a la Clínica de Diarreas en el Hospital Dr. Ángel Leño.

En las muestras procesadas no se tomó en cuenta ningún parámetro como sangre, moco, etc., sólo el hecho de ser evacuaciones diarréicas.

Dichas muestras se sembraron en agar sangre ampicilina, así como en agar sangre ampicilina modificado, para realizar una comparación en cuanto al crecimiento de la flora microbiana, colonias beta-hemolíticas y desarrollo de swarming. Los resultados obtenidos de la comparación entre ambos medios, se presentan como promedios de hemólisis, flora microbiana y swarming en la Tabla 5.

TABLA 5
PROMEDIOS DE HEMOLISIS, FLORA MICROBIANA Y SWARMING
EN AGAR SANGRE AMPICILINA Y AGAR SANGRE AMPICILINA
MODIFICADO

	AGAR SANGRE AMPICILINA	AGAR SANGRE AMP. MODIF.
Hemólisis.	2+	3+
Flora microbiana.	4+	3+
Swarming.	1+	negativo

Respecto a los aislamientos de Aeromonas logrados en el curso del estudio, al sembrarse las muestras, tanto en agar sangre ampicilina como en agar sangre ampicilina modificado, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

TABLA 6

AISLAMIENTO DE Aeromonas EN AGAR SANGRE E
AMPICILINA Y AGAR SANGRE AMPICILINA MODIFICADO

No. CEPA.	AGAR SANGRE AMPICILINA	AGAR SANGRE AMPICILINA MODIFICADO
1	(+)	(+)
2	(+)	(+)
3	(+)	(+)
4	(+)	(-)
5	(+)	(+)
6	(+)	(+)
7	(+)	(-)
8	(+)	(+)
9	(+)	(+)
10	(-)	(+)
11	(+)	(+)
12	(+)	(-)
13	(+)	(-)
14	(-)	(+)
15	(+)	(+)
16	(+)	(-)

Total = 16 cepas Total = 14 cepas.

Total = 11 cepas

(+) = Aeromonas recuperada.

(-) = No se aisló Aeromonas.

De las 16 cepas de Aeromonas recuperadas, 14 cepas se aislaron en agar sangre ampicilina y 11 cepas se recuperaron de agar sangre ampicilina modificado, del total de las 16 cepas, 2 de ellas se aislaron sólo en agar sangre ampicilina modificado.

El diámetro de la colonia de Aeromonas fue de 2-3 mm. y el diámetro de la hemólisis fue de 5-1.5 mm.

CAPITULO V

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Después de observar los resultados obtenidos de este estudio, se concluye:

1) En este trabajo se encontró que con el medio de prueba, la flora se vio disminuida en un 25 % en promedio en relación al medio de rutina.

2) Que la disminución de la flora favoreció el desarrollo de hemólisis en un 25 %, lo cual es de utilidad para el aislamiento de Aeromonas.

3) Respecto a la relación flora-hemólisis se pudo observar que el medio agar sangre ampicilina modificado inhibió en un 25 % el desarrollo de la flora, favoreciendo con ello el aumento de 25 % más de hemólisis en promedio.

4) En los casos en que se aisló Aeromonas y conjuntamente hubo desarrollo de Proteus en el medio de agar sangre ampicilina, se encontró que el swarming se inhibió en el agar sangre ampicilina modificado, porque las cepas de éste, presentes en el inóculo, eran sensibles y así la carbenicilina logró actuar eficazmente, inhibiendo este fenómeno.

5) En el curso del estudio hubo muestras fecales negativas para Aeromonas pero con presencia de swarming, y en todos los casos siempre fue menor en el medio de agar sangre ampicilina modificado (medio de prueba) que en el medio rutinario.

Los resultados obtenidos en cuanto al número de

aislamientos de *Aeromonas* logrados en el medio de prueba, no fueron los esperados; tal vez porque las concentraciones de ampicilina y carbenicilina no fueron las adecuadas para lograr un crecimiento óptimo; o por la presencia de otros gérmenes que aprovecharon mejor el medio que *Aeromonas*.

De acuerdo a estas conclusiones, se piensa que de una forma u otra, se deberá continuar en el estudio y diseño de nuevos medios de cultivo selectivos de primoaislamiento para *Aeromonas*, ya que, como se pudo observar, la recuperación de ésta en comparación con el medio de rutina, no fue lo esperado. Quizá con la implementación y el análisis de otros agentes antimicrobianos que ayuden a su aislamiento selectivo.

Finalmente es importante señalar que, aunque no se logró aislar un mayor número de *Aeromonas* con el medio de prueba, sí se logró disminuir el swarming y esto es de valiosa ayuda para el primoaislamiento de la bacteria en estudio.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Von Graevenitz, A., Mensch A.H. THE GENUS AEROMONAS IN HUMAN BACTERIOLOGY. *N Engl J Med.* 278 (5): 245-9. 1968.
2. Schubert, R.H. TAXONOMY AND NOMENCLATURE OF GENUS AEROMONAS (PART I). *Internat J Syst Bact* 17 (1): 23-38. 1967.
3. Schubert, R.H. TAXONOMY AND NOMENCLATURE OF GENUS AEROMONAS (PART II). *Internat. J Syst Bact* 17 (2): 273-9. 1967.
4. Ewing, W.H. STUDIES ON AEROMONAS GROUP. *Current Microbiology* 10 (4): 122-6. 1961.
5. Eddy, P.B. and Carpenter, K.P. FURTHER STUDIES ON AEROMONAS. *J. Appl. bact.* 27 (3): 96-109. 1964.
6. Popoff, M.Y. POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE RELATEDNESS AMONG MOTILE AEROMONAS SPECIES. *Current Microbiology* 5 (2): 109-14. 1981.
7. Ewing, W.H. NEW STUDIES ON AEROMONAS GROUP. *Current Microbiology* 12 (3): 80-6. 1962.
8. McCarthy, D.H. FISH FURUNCULOSIS CAUSED BY AEROMONAS SALMONICIDA VAR. ACHROMOGENES. *J Wildl Dis* 11 (4): 489-93. 1975.

9. Krieg and J.G. Holt BERGEY'S MANUAL OF SISTEMATIC BACTERIOLOGY. 14th ed. Vol 1 tomo 1 Baltimore, Williams and Wilkins. 1984.
10. Richard, C. AEROMONAS: UNE VIBRIONACEE ENTEROPATHOGENE EXOTIQUE. Bull. Inst. Pasteur 76(5): 187-200. 1987.
11. Allen, D.A. AEROMONAS MEDIA, A NEW SPECIES ISOLATED FROM RIVER WATER. Int. J. Syst. Bact. 33(6):599-604. 1983.
12. Janda, J.M. BIOTYPING OF AEROMONAS ISOLATES AS A CORRELATE TO DELINEATING A SPECIES ASSOCIATED DISEASE SPECTRUM J. Clin Microbiol 19 (1): 44-7. 1984.
13. Bailey-Scott DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. Sexta ed. Argentina. Ed. Médica Panamericana. 1978.
14. Robinson, J. COMPARASION OF DIRECT PLATING WITH THE USE OF ENRICHMENT CULTURE FOR ISOLATION OF AEROMONAS SP. FROM FAECES. J Med Microbiol 22(4): 315-7. 1986.
15. Popoff M. and Veron A TAXONOMIC STUDY OF THE AEROMONAS HYDROPHILA. J Gen Microbiol 94 (1): 11-22. 1976.
16. Ljungh, A., M. Popoff AEROMONAS HYDROPHILA IN ACUTE DIARRHEAL DISEASE DETECTION OF ENTEROTOXIN AND BIOTYPING OF STRAINS. J Clin Microbiol 6(2): 96-100. 1977.
17. Bradford, A., C. Guerrero. MEDIA FOR THE ISOLATION OF AEROMONAS HYDROPHILA J. Clin Microbiol 22(5):888-890. 1985.

18. Gracey, M. AEROMONAS SPECIES AS ENTERIC PATHOGENS
Lancet. 1 (8265):1304-6. 1982.
19. Millership, S.E. TOXIN PRODUCTION BY AEROMONAS SP.
FROM DIFFERENT SOURCES. J Med Microbiol. 22(4):311-4.
1986.
20. Kosaki, S. ACTIVITIES OF AEROMONAS HYDROPHILA HEMOLYSINS
AND THEIR INTERACTION WITH ERITHROCYTE MEMBRANES.
Infection and Immunity 55(7):1594-9. 1987.
21. Kirov, S.M. VIRULENCE CHARACTERISTICS OF AEROMONAS IN
RELATION TO SOURCE AND BIOTYPE. J. Clin Microbiol
24(5):827-834. 1986.
22. Agger, W.A. CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL FEATURES OF
AEROMONAS HYDROPHILA ASSOCIATED DIARRHEA.
J Clin Microbiol 21(6): 909-13. 1985.
23. Janda, J.M. AEROMONAS SPECIES IN CLINICAL MICROBIOLOGY
SIGNIFICANCE, EPIDEMIOLOGY, AND SPECIATION.
Diag. Microbiol Infec Dis 1(3):221-228. 1983.
24. Agger, W.A. INTESTINAL INFECTIONS WITH AEROMONAS.
Ann Inter Med. 106(3):479. 1987.
25. Rahman, A.F. DYSENTERY-LIKE SYNDROME ASSOCIATED WITH
AEROMONAS HYDROPHILA. Br Med J. 281-(1278):976. 1980.
26. Hawkins, F., A. Diaz. AEROMONAS HYDROPHILA ASSOCIATED
DIARRHEA IN A NEONATE. Pediatric Infectious Disease.
5(6):704. 1986.

27. San Joaquín, V.H. AEROMONAS ASSOCIATED GASTROENTERITIS IN CHILDREN. *Pediatr Infec Dis J.* 7(1): 53-7. 1988.
28. Dally, O.P. ASSOCIATIONS OF AEROMONAS SOBRIA WITH HUMAN INFECTION. *J. Clin Microbiol* 13(1): 769-777. 1981.
29. Janda, J.M. R. Brenden. IMPORTANCE OF AEROMONAS SOBRIA IN AEROMONAS BACTEREMIA. *The Journal of Infectious Dis.* 155(3): 589-591. 1987.