

43
20J.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENOS DE QUIMICA
FAC. DE QUIMICA

**EL GENERO AEROMONAS Y SU
IMPORTANCIA CLINICA EN HUMANOS**

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION QUE PARA
OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
TERESA ELIZABETH DELGADO HERRERA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1993



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

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| OBJETIVOS | 2 |
| I. GENERALIDADES | |
| i. Taxonomía | 4 |
| i.i. Características microscópicas | 8 |
| i.i.i. Propiedades culturales | 8 |
| i.v. Pruebas de identificación | 11 |
| v. Aspectos microbiológicos asociados al diagnóstico de laboratorio | 37 |
| II. IMPORTANCIA CLINICA | |
| i. Factores de virulencia | 39 |
| ii. Patología y Epidemiología | 44 |
| iii. Aspectos generales de la terapéutica ... | 57 |
| CONCLUSIONES | 59 |
| BIBLIOGRAFIA | 61 |

INTRODUCCION

Las enfermedades diarreicas figuran entre las de mayor importancia dentro de la comunidad, particularmente cuando se trata de países en vías de desarrollo, en los cuales la falta de canales de comunicación impide la difusión de las sencillas -aunque determinantes- medidas higiénicas que impiden las elevadas frecuencias de esta clase de patologías.

Sin lugar a dudas, los padecimientos intestinales suelen afectar con mayor gravedad a los niños menores de 5 años, si bien los adultos presentan numerosos episodios que les impide sostener una productividad permanente durante su desempeño profesional.

En este sentido, buena parte de los trabajos de investigación se ha dedicado a establecer la etiología correspondiente en los casos en los que no se puede dilucidar el origen del trastorno mediante métodos convencionales, y ello se ha traducido en el descubrimiento de "nuevos enteropatógenos" cuya participación pasaba inadvertida hasta hace algunos años.

De esa manera, se ha logrado conocer al género Aeromonas, el cual pasaba por desapercibido porque, aunque desarrolla con cierta regularidad en los medios comunes empleados para efectuar el coprocultivo, su capacidad para fermentar lactosa provocaba que sus colonias fueran descartadas como posibles agentes causales, tal como se procede con las de los coliformes, a los que sólo se les considera como flora habitual del intestino.

El presente trabajo intenta mostrar los requerimientos necesarios para poder detectar a dicho género en las muestras fecales, ya que ello permitiría observar su frecuencia en nuestro medio. Asimismo, trata de subrayar su importancia clínica en el ser humano, dado que su amplia distribución en el medio ambiente y sus factores de virulencia lo habilitan como un microorganismo que, independientemente de su enteropatogenicidad, provoca afecciones a varios niveles del organismo.

OBJETIVOS

-Describir las principales propiedades microscópicas y culturales del género Aeromonas, así como las pruebas a través de las cuales se puede realizar su identificación en el laboratorio clínico.

-Señalar los aspectos de mayor relevancia sobre las enfermedades que Aeromonas ocasiona al ser humano, haciendo énfasis en los factores de virulencia que se han detectado en este género.

I. GENERALIDADES

i. Taxonomía

El genero Aeromonas ha estado sujeto a numerosas controversias en lo que se refiere a su clasificación taxonómica, debido principalmente a que comparte características con diversas familias; por este motivo, en un principio se le situó en la familia Pseudomonadaceae -dado que su morfología es bastante similar a la de ella- pero, posteriormente, la 9a. edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática lo ubicó dentro de la familia Vibrionaceae, en virtud de que se trata de bacilos Gram negativos, móviles y facultativos que dan positiva la prueba de las oxidasas. No obstante, en 1986 Colwell y cols propusieron su inclusión en una nueva familia: Aeromonadaceae, con base en el catálogo 5S RNA, en la secuencia de bases que conforman su RNA y en los datos de hibridización de RNA-DNA (15, 16, 49, 76, 80, 81, 83).

Los primeros reportes de especies pertenecientes a este genero datan del siglo pasado cuando, en 1890, en Chemnitz -Alemania oriental-, Zimmerman aisló de agua de grifo a un bacilo -al que denominó Bacillus punctatus-

cuyas colonias en agar gelatina eran puntiformes; en 1891, Sanarelli reportó una especie patógena para ranas, y la nombró Bacillus hydrophilus fuscus y, poco tiempo después, Emmerich y Weibel (1894) aislaron el agente causal de la furunculosis en peces de la familia Salmonidae y lo denominaron Bacillus der Forenllenseuche, aunque más tarde le asignaron el nombre de Bacterium salmonicida (80, 83).

Ya en el siglo XX (1936), Kluyver y van Niel sugirieron el término Aeromonas (que en griego significa unidad productora de gas) para referirse a estos microorganismos (76, 83) y, en 1953, Snieszko separó al género en dos grandes grupos: el de Aeromonas móviles y mesofílicas, clasificado en la actualidad como Aeromonas hydrophila y el de Aeromonas inmóviles y psicrófilas, llamadas hoy en día Aeromonas salmonicida (14, 80, 82).

Cabe mencionar que en la 9a. edición del Manual de Bergey -Bacteriología Sistemática-, este género está clasificado de la siguiente manera (76):

Familia: Vibrionaceae

Género: Aeromonas

Especies móviles: A. hydrophila

A. sobria

A. caviae

Especie inmóvil: A. salmonicida con 3 subespecies:
salmonicida, achromogenes y masoucida

Sin embargo, desde entonces se han descrito nuevas especies, basándose en estudios de hibridación de DNA y, hasta diciembre de 1991, el estado taxonómico del género Aeromonas era el siguiente (4, 8, 15, 16, 18, 19, 28, 29, 41, 47, 49, 55, 82):

| Grupo de hibridación de DNA | Especies |
|-----------------------------|--|
| 1* | <u>A. hydrophila</u> |
| 2 | <u>A. hydrophila</u> |
| 3 | <u>A. salmonicida</u> subespecies: <u>salmonicida</u> <u>achromogenes</u> <u>masoucida</u> <u>smithia</u> |
| 4* | <u>A. caviae</u> |
| 5 | <u>A. media</u> |
| 6 | <u>A. eucrenophila</u> |
| 7 | <u>A. sobria</u> |
| 8/10* | <u>A. veronii</u> subespecie <u>sobria</u> |
| 8/10* | <u>A. veronii</u> subespecie <u>veronii</u> |
| 9* | <u>A. jandaei</u> |

el de Aeromonas varía entre 57 a 63 %; por ello, Habs y Schubert crearon el nuevo género: Plesiomonas (9, 39, 69, 75, 76, 89, 90).

ii. Características microscópicas

Este género se constituye por bacilos Gram negativos rectos de extremos redondeados (excepto Aeromonas salmonicida que presenta forma de cocobacilo), cuyas dimensiones varían de 0.3 a 1 μ de diámetro por 1 a 3.5 μ de largo; estos microorganismos aparecen solos, en pares o cadenas cortas y generalmente son móviles por medio de un flagelo polar único que mide 1.7 μ de largo; aunque algunos autores han descrito la presencia de flagelos lofótricos, en los cultivos jóvenes se puede detectar un flagelo lateral más corto que el polar; no son esporulados y hasta el momento se les considera como no capsulados, si bien algunas publicaciones han reportado cepas mesofílicas capsuladas provenientes de pacientes con diarrea (49, 55, 76, 80).

iii. Propiedades culturales

a) Medios de cultivo

Las aeromonas mesofílicas, consideradas como las únicas que poseen importancia clínica en humanos, no son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales y, por ende, pueden desarrollar in vitro en medios de cultivo comunes tales como la gelosa sangre y el agar nutritivo. No obstante, ante la frecuencia con que la flora fecal inhibe o enmascara su desarrollo, se han diseñado y utilizado medios de enriquecimiento y selectivos: el medio de enriquecimiento más usado es el APW (agua peptonada alcalina, pH 8.6), ya que estos microorganismos desarrollan dentro de límites muy amplios de pH, mismos que van desde 5.5 a 9.0 (9, 62, 63, 90). Por su parte, los medios selectivos más empleados son: el BAA (Agar base CM55, adicionada de sangre de carnero desfibrinada al 5 % y 10 mg/l de ampicilina) (2, 49, 60, 63, 83), el CIN (Agar cefsulodin-irgasan-novobiocina), el cual también se utiliza para el aislamiento de Yersinia y contiene 4 mg/l de cefsulodin e irgasan y 2.5 mg/l de novobiocina) (8, 9, 63, 90), el SAA (Agar-Almidón-ampicilina), preparado con Agar base rojo de fenol, 10 g/l de almidón soluble de papa y 10 mg/l de ampicilina (63), el DC (Agar desoxicolato), el XLD (xilosa-lisina-desoxicolato) (23, 90), y el ASBA-30 (Agar sangre de carnero con 30 mg/l de ampicilina), este último en combinación con el DNIA (Agar DNasa-toluidina-azul-ampicilina 10 mg/l), para obtener

mejores porcentajes de recuperación (60, 81).

Cabe señalar que, aunque algunas cepas desarrollan en los agaros MacConkey y SS (Salmonella-Shigella), muchas otras no logran hacerlo, debido a que puede presentar una represión catabólica relacionada con los productos de la metabolización de los carbohidratos contenidos (23, 24, 60, 67).

b) Condiciones de incubación

Las aeromonas de interés en humanos pueden desarrollar en aerobiosis y anaerobiosis, ya que se trata de bacterias facultativas; empero, la mayoría de los autores recomienda su incubación en condiciones aerobias; su crecimiento óptimo se obtiene a 28 grados centígrados, si bien algunas cepas pueden desarrollar desde los 5 hasta los 38-41 grados centígrados. Adicionalmente, debe considerarse que no son halófilos y su rango de tolerancia a NaCl es de 0 a 4 % (76, 90).

Recientemente, un estudio de multilaboratorios pudo establecer la mejor combinación de medios de cultivo y condiciones de incubación para lograr la detección de

Aeromonas a partir de las evacuaciones. Los datos más relevantes se resumen en el diagrama 1 (63).

c) Características macroscópicas

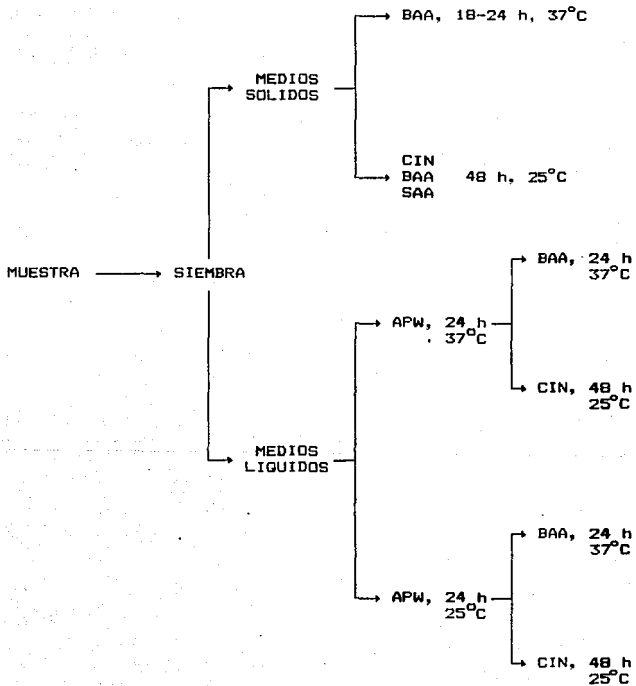
Las colonias de Aeromonas son redondas, translúcidas, planas y elevadas con bordes regulares (76). Dependiendo del medio empleado, presentan un diámetro de 1 a 3 mm y su color varía del crema al blanco (23) y, adicionalmente, algunas especies producen hemólisis parcial o total en medios preparados con 10 % de sangre de carnero (24, 49, 75, 90). De acuerdo a lo anterior, puede afirmarse que su morfología macroscópica es compartida por muchas otras bacterias presentes en las muestras y, por ende, que su identificación requiere de que un considerable número de colonias de cada placa sea analizado bioquímicamente.

iv. Pruebas de identificación

iv.1. Detección del género

Una vez efectuada la tinción de Gram y el aislamiento de colonias sospechosas de Aeromonas, es necesario contar

Diagrama 1. Aislamiento de Aeromonas a partir de evacuaciones humanas



con la seguridad de que se trata de este género, lo cual se logra realizando pruebas bioquímicas que diferencian a estos microorganismos de otros géneros similares en cuanto a características microscópicas y macroscópicas. En este sentido, destacan los siguientes: la de fermentación de glucosa, usando agar triple azúcar hierro, para descartar la presencia de Pseudomonas -que no fermentan carbohidrato alguno-; la de las oxidasas, para diferenciar a la familia Enterobacteriaceae, y la de resistencia al agente vibriostático O/129, para evitar confusiones con los demás miembros de la familia Vibrionaceae, los cuales también son oxidasa (+) (9, 17, 24, 49, 60, 90).

A continuación se describen los principales aspectos asociados a las pruebas mencionadas.

Pruebas efectuadas en el agar triple azúcar hierro (24, 44, 53)

Este medio diferencial en tubo es indispensable para la identificación de bacilos Gram negativos y, en particular, para diferenciar entre Pseudomonas -cuyo metabolismo de la glucosa es oxidativo- y Aeromonas -que es fermentativo-. El medio permite determinar si los

microorganismos fermentan o no glucosa y lactosa-sacarosa, así como su capacidad para producir gas (hidrógeno y dióxido de carbono) y/o ácido sulfhídrico. Los principios bioquímicos se asocian al hecho de que dicho medio se encuentra inclinado en "pico de flauta" y contiene varios compuestos en los que se incluyen al extracto de carne, extracto de levadura y peptona; la falta de inhibidores permite el desarrollo de numerosas especies bacterianas salvo las más exigentes. Por tal razón, se usa para analizar colonias puras previamente obtenidas en medios de aislamiento primarios.

Cabe señalar que la lactosa y la sacarosa están presentes en una concentración diez veces mayor que la glucosa; algunos microorganismos tienen la facultad de fermentar los tres hidratos de carbono, otros sólo actúan sobre la glucosa y, desde luego, existen los que no utilizan hidrato de carbono alguno. La fermentación puede ocurrir con producción o no de gases (hidrógeno y dióxido de carbono), siendo aerobia en el pico de flauta y anaerobia en la capa inferior del cultivo.

En el pico de flauta la glucosa es catabolizada por el sistema Embden-Meyerhof-Parnas originando como intermediario al ácido pirúvico, cuyos derivados se

incorporan al ciclo de Krebs por los aerobios y los facultativos, para dar como producto agua, dióxido de carbono y energía. La lactosa y la sacarosa son dos disacáridos formados por dos unidades de monosacáridos que son hidrolizados por los microorganismos que sintetizan galactosidasa y sacarasa respectivamente, para dar lugar a los monosacáridos glucosa + galactosa para la lactosa, o bien, glucosa + fructosa a partir de la sacarosa; éstos a su vez se metabolizan por los sistemas antes mencionados dando como productos: agua, dióxido de carbono y energía, en presencia de oxígeno.

En la capa profunda del cultivo, en donde prácticamente existen condiciones anaerobias, la glucosa es metabolizada por el ciclo Embden-Meyerhof-Parnas, redividiendo como productos finales a los ácidos láctico, fórmico, acético, butírico, propiónico, etc. conociéndosele a dicha mezcla como "ácidos mixtos". Estos productos glucolíticos poseen una acidez relativamente fuerte, fácil de identificar mediante el indicador rojo de fenol, el cual es de color rojo a pH de 7.4 y vira a amarillo a partir de 6.8.

Otro sistema de diferenciación es la producción de ácido sulfhídrico, cuyo fundamento correspondiente se asocia a

la capacidad de ciertas bacterias para liberar azufre a partir de aminoácidos azufrados tales como cisteína, metionina y cistina -por medio de la enzima cisteinasa- o bien de otra fuente adicional de azufre, el tiosulfato de sodio, a través de la enzima tiosulfato reductasa, generándose sulfito más ácido sulfhídrico. Este gas incoloro es detectado mediante sales de sulfato ferroso, ya que se produce un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso. Por lo general un microorganismo que produce ácido sulfhídrico también sintetiza los gases de dióxido de carbono e hidrógeno.

Los tubos de TSI se inoculan con un asa recta que toca el centro de la colonia pura, se siembra por estría ondulada sobre el "pico de flauta" y por picadura a no más de 3 a 5 mm del fondo del tubo, procediéndose a incubar durante 18 a 24 h a 35 grados centígrados, para realizar las lecturas correspondientes.

Los resultados pueden ser los siguientes:

- 1) Glucosa positiva y lactosa o sacarosa positiva, cuando todo el medio de cultivo manifiesta coloración amarilla.

- 2) Glucosa positiva y tanto lactosa como sacarosa negativa, cuando la capa profunda es amarilla y el "pico de flauta" aparece rojo intenso o lila.
- 3) Glucosa, lactosa y sacarosa negativa, si todo el medio permanece rojo o bien dicha coloración se intensifica.
- 4) Producción de gas, cuando el agar manifiesta ruptura, burbujas o desplazamiento hacia la parte superior del tubo.
- 5) Síntesis de ácido sulfhídrico, cuando aparece un precipitado negro distribuido por toda la capa profunda, que inclusive llega a enmascarar la acidez.

Prueba de las oxidasas (9, 24, 44, 51, 53, 90)

La enzima citocromo oxidasa es una hemoproteína que permite a los microorganismos utilizar aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria. El objetivo de esta prueba consiste en determinar si dicha enzima es capaz de habilitar a las aminas aromáticas primarias, tales como el diclorhidrato de p-fenilendiamina, para que actúen como aceptores artificiales de electrones. Es decir, en presencia de oxígeno, la citocromo oxidasa de ciertas bacterias oxida al reactivo utilizado como sustrato, transformándolo en indofenol o azul de

indofenol, los cuales son compuestos coloridos.

Los reactivos (sustratos) más empleados son: el diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % en agua (reactivo de Kovacs), el diclorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina al 1-1.5 % en agua (reactivo de Gordon y Mcleod) y el reactivo de Nadi, que corresponde a una mezcla -en partes iguales- de alfa-naftol al 1 % en alcohol etílico y aminodimetilanilina al 1 %.

La técnica se realiza directamente en la placa; se agregan 2 a 3 gotas de cualquiera de los reactivos señalados sobre la colonia sospechosa y la coloración respectiva aparecerá durante los siguientes 10 a 15 segundos.

También se puede realizar indirectamente de la siguiente manera: en un trozo de papel filtro Whatman se agregan unas gotas de reactivo de Kovacs y, posteriormente, con una asa, se extiende la colonia sobre él. La coloración esperada se observará 10 a 30 segundos después.

Las colonias que manifiestan resultado positivo desarrollan un color rosado, después marrón y finalmente negro. Empero, cuando se emplea la mezcla

dimetil-p-fenilendiamina/alfa-naftol, la positividad depende de que aparezca una coloración azul. Cabe señalar que las colonias oxidasa negativa no evidenciaran cambio de color alguno.

La prueba de las oxidasas, además de ser rápida y sencilla, es muy útil para descartar la probable presencia de la familia Enterobacteriaceae -cuyos miembros la dan negativa-, cuando se sospecha de Aeromonas -que la da positiva-. Es muy recomendable utilizar el reactivo de Kovacs, por ser menos tóxico y más sensible a la detección de la citocromo oxidasa.

Prueba de la resistencia al agente vibriostático O/129 (9, 24, 26, 34, 44, 79, 87)

Esta prueba tiene una importancia relevante en cuanto a la diferenciación entre Aeromonas y los demás miembros de la familia Vibrionaceae; se basa en que dicho género resiste la acción del agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil pteridina).

El procedimiento consiste en inocular masivamente -a partir de cultivo líquido y puro- la superficie de una placa de agar nutritivo + 0,5 % de NaCl; posteriormente

se colocan un disco con 10 microgramos y otro con 150 microgramos del agente vibriostático, separados uno de otro en por lo menos 22 mm y a 14 mm del borde de la caja. Finalmente se incuba a 37 grados centígrados, durante 24 h y se procede a observar las zonas de inhibición.

La interpretación de los resultados se basa en los siguientes criterios:

| DISCO DE 150 µg | DISCO DE 10 µg | INTERPRETACION |
|--------------------|-------------------|----------------|
| halo aprox. 10 mm | halo aprox. 5 mm | sensible |
| halo menor a 10 mm | halo menor a 2 mm | intermedio |
| sin halo | sin halo | resistente |

En este sentido, Aeromonas no presenta halos de inhibición, a diferencia de los demás miembros de la familia Vibrionaceae, incluyendo al género Plesiomonas, ya que dichos microorganismos son sensibles a concentraciones de 2 microgramos.

iv.ii. Diferenciación de especie

Una vez que el aislamiento se ha identificado plenamente

como Aeromonas, puede procederse a determinar la especie, iniciando con la prueba de movilidad, ya que de resultar ésta negativa, debe interpretarse como que la cepa de Aeromonas carece de importancia clínica para el humano: Aeromonas salmonicida (14, 80, 82, 86).

El diagrama 2 y la tabla 1 muestran los patrones de identificación de las especies patógenas para el humano; los párrafos siguientes describen los fundamentos y las técnicas involucrados (9, 14, 29).

Diagrama 2. Principales pruebas involucradas en la diferenciación de las especies de Aeromonas relacionadas con afecciones humanas (14).

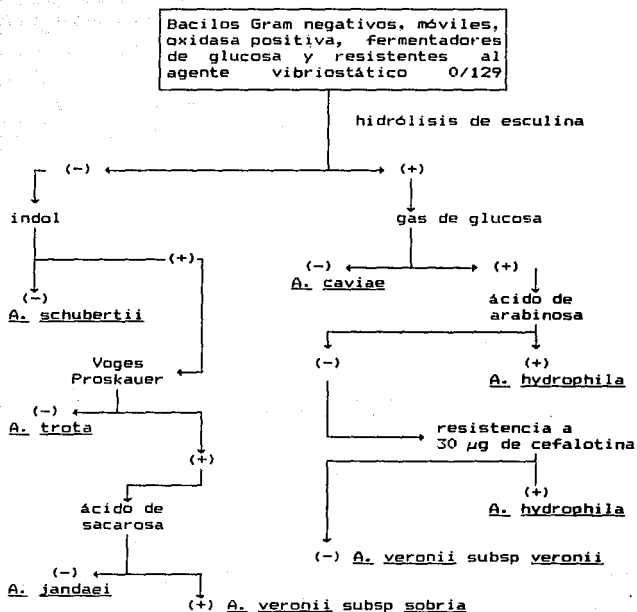


Tabla 1. Resultados de las principales pruebas bioquímicas asociadas a la identificación de Aeromonas de importancia clínica en humanos (p. 14).

| PRUEBA | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| OXIDADA | + | + | + | + | - | + | |
| MOVILIDAD | + | + | + | + | + | + | + |
| FERMENTACION DE GLUCOSA | + | + | + | + | + | + | + |
| SENSIBILIDAD A O/129 | R | R | R | R | R | R | R |
| HIDROLISIS DE ESCULINA | + | + | - | + | - | - | - |
| PRODUCCION DE INDOL | + | + | + | + | + | - | + |
| GAS DE GLUCOSA | + | - | + | + | + | - | + |
| VOGES-PROSKAUER | + | - | + | + | + | V | - |
| ACIDO DE ARABINOSA | V | + | - | - | - | - | - |
| ACIDO DE SACAROSA | + | + | + | + | - | - | - |
| RESISTENCIA A CEFALOTINA 30 µg. | R | R | S | S | R | R | R |

| CLAVES: número | Microorganismo | Grupo de hibridización de DNA. |
|----------------|---|--------------------------------|
| 1 | <u>A. hydrophila</u> | 1 |
| 2 | <u>A. caviae</u> | 4 |
| 3 | <u>A. veronii</u> subespecie <u>sobria</u> | 8/10 |
| 4 | <u>A. veronii</u> subespecie <u>veronii</u> | 8/10 |
| 5 | <u>A. jandaei</u> | 9 |
| 6 | <u>A. schubertii</u> | 12 |
| 7 | <u>A. trola</u> | 14 |

R=RESISTENTE, S=SENSIBLE, V=VARIABLE.

Prueba de movilidad (9, 44, 53, 55, 90)

La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación de numerosos microorganismos. Es importante hacer notar que bacterias con motilidad a veces llegan a producir variantes inmóviles estables, las cuales raramente se revierten en formas móviles.

Para realizar la prueba en forma directa se coloca una gota de un cultivo líquido de 24 h sobre un portaobjetos y se examina al microscopio de contraste de fase a 400x. Es preferible el uso de cámaras de gota pendiente para visualizar los preparados con mayor aumento, ya que ello evita el riesgo de introducir los objetivos en la suspensión bacteriana.

Por lo que toca a la prueba en agar semisólido, el medio contiene 3 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 4 g de agar y 1000 ml de agua destilada. Su pH final se ajusta a 7.3.

Una vez disueltos los ingredientes se procede a vaciar 3 ml de medio en tubos de 13 X 100 y se lleva a cabo su esterilización a 121 grados centígrados, 15 lb, durante 15 minutos.

La inoculación se realiza por punción, con una aguja estéril y hasta una profundidad de 1.2 cm. Finalmente se incuba a 35 grados centígrados, de 24 a 48 h y, cuando la lectura resulta negativa, se vuelve a incubar a 21-25 grados centígrados durante otros 5 días.

En general, la interpretación se realiza macroscópicamente, buscando observar lo siguiente: en una prueba positiva, los microorganismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad. En contraste, una prueba negativa manifiesta al crecimiento bacteriano sobre la línea de siembra y el medio circundante se mantiene claro.

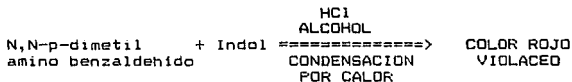
Prueba de hidrólisis de la esculina (14, 53, 63, 90)

La esculina es un glucósido que se hidroliza rápidamente por parte de los ácidos; la base de esta prueba se asocia a la facultad de un microorganismo para hidrolizar el glucósido esculina, por medio de la enzima esculinasa, reedituando esculina y glucosa en presencia de bilis.

La reacción se detecta con una sal de hierro para formar un complejo de hierro férbico color negro o castaño oscuro.

El indol se puede detectar mediante su reacción con el revelador N,N-p-dimetilaminobenzaldehído en HCl concentrado, que se encuentra tanto en el reactivo de Kovacs como en el de Ehrlich; el resultado es la formación de un complejo de color rojo en la capa de alcohol, que extrae al indol.

La reacción es la siguiente:



En esta prueba deben utilizarse medios ricos en triptofano, tales como el caldo de triptona o caldo con peptona y tripticasa, que contienen caldo triptofano al 1 % ó 2 g de digerido pancreático de caseína (tripteína), 0.5 g de NaCl y 100 ml de agua destilada. Su pH final se ajusta a 7.4.

Los reactivos se mezclan y se disuelven calentando suavemente; se distribuyen 4 ml en cada tubo y la esterilización se efectúa en autoclave, a 121 grados centigrados, 15 lb, 15 minutos.

Para realizar la técnica, se inocula el caldo con un cultivo puro y se incuba a 35 grados centígrados entre 24 y 48 h. Finalmente se agregan unas gotas del reactivo elegido.

El reactivo de Ehrlich, contiene 2 g de p-dimetilaminobenzaldehído, 190 ml de alcohol etílico al 95 % y 40 ml de HCl concentrado. Su preparación requiere de disolver el aldehído en alcohol y agregar lentamente el ácido.

El procedimiento de la prueba consiste en adicionar 1 ml de éter a un tubo del caldo incubado; se agita vigorosamente para extraer el indol, se deja reposar 1 ó 2 minutos para que el extracto quede por encima formando una capa y se agregan 0.5 ml de reactivo de Ehrlich al tubo, inclinándolo para que se deslicen por la pared y formen una capa entre el caldo y el éter. En presencia de indol, se forma un anillo rojo inmediatamente por debajo de la capa de éter.

Por lo que toca al reactivo de Kovacs, éste contiene 150 ml de alcohol amílico o isoamílico, 10 g de p-dimetilaminobenzaldehído y 50 ml de HCl concentrado. Su

preparación requiere de disolver el aldehído en el alcohol y de agregar lentamente el ácido. Una vez preparado, se agregan 0.5 ml de este reactivo al cultivo líquido de 24 a 48 h y se agita suavemente. Si algunos segundos después se forma un color rojo oscuro en la interfase del reactivo y el caldo, ello indicará la presencia de indol.

Una prueba negativa se detecta al observarse un color amarillo en la capa alcohólica, característico del reactivo de Ehrlich o el de Kovacs.

Cabe mencionar que la confiabilidad de los reactivos a utilizar, debe ser controlada con cultivos positivos y negativos. Los siguientes microorganismos constituyen buenos controles; control positivo: Escherichia coli y control negativo: Klebsiella pneumoniae.

Esta prueba es útil para diferenciar especies de Aeromonas de importancia clínica en humanos, ya que A. schubertii la da usualmente negativa, mientras que las Aeromonas que no hidrolizan esculina, tales como A. trota, A. jandaei y A. veronii subsp sobria, la dan positiva.

Prueba de Voges-Proskauer (9, 22, 44, 53)

La reacción de Voges-Proskauer tiene como principio el hecho de que el ácido pirúvico, componente fundamental formado durante la glucólisis, puede ser metabolizado a través de varias vías, de acuerdo con los sistemas enzimáticos que poseen las diferentes bacterias. Una de dichas vías lleva a la producción de acetilmetilcarbinol (acetoína), un precursor del 2,3-butadienol que es el producto final neutro de esta vía. La formación de acetoína y 2,3-butanediol depende de un sistema reversible de oxidación-reducción, en el que la acetoína se convierte por reducción en 2,3-butanediol o éste es oxidado en hasta acetoína.

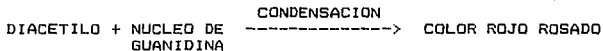
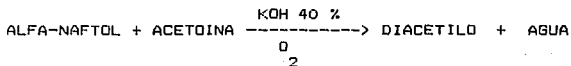
La acetoína así formada es oxidada en presencia de oxígeno atmosférico por el hidróxido de potasio al 40 %, para convertirse en diacetilo; ésta es la sustancia que confiere la coloración roja que indica positividad en la reacción de Voges-Proskauer.

El medio más comúnmente utilizado es el caldo rojo de metilo-Voges-Proskauer (RM/VP), según la fórmula de Clark y Lubs; contiene 7 g de polipeptona o una peptona

tamponada, 5 g de dextrosa (glucosa), 5 g de fosfato de potasio (amortiguador) y 1,000 ml de agua destilada. Su pH se ajusta a 6.9.

El caldo se inocula con un cultivo puro, se incuba a 35 grados centígrados durante 24 a 48 h y, al finalizar este periodo, se transfiere 1 ml de la suspensión a un tubo de ensayo limpio y se añaden 0.6 ml de O-naftol al 5 % y 0.2 ml de KOH al 40 %. Es esencial adicionar los reactivos en ese orden; finalmente, se agita el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y se deja reposar durante 10 ó 15 minutos.

La reacción efectuada es la siguiente:



(presente en la peptona)

Una prueba Voges-Proskauer positiva se observa mediante la formación de un color rosado en la superficie del

medio (presencia de la acetoina). Una prueba negativa se advertirá por una coloración amarilla en la superficie del medio -el mismo color del reactivo-. Puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción debe considerarse negativa.

La reacción de Voges-Proskauer es utilizada en el diagrama 2 para identificar a A. trota que la da negativa, a diferencia de A. jandaei y A. veronii subsp sobria que sí producen acetoina.

Producción de ácido a partir de Arabinosa y Sacarosa (5, 24, 44, 53)

El objetivo de esta prueba consiste en determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico produciendo ácido, o ácido con gas visible.

Los hidratos de carbono se clasifican como:

- 1) monosacáridos, aldehídos polihidroxílicos o cetonas;
- 2) polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos (polímeros de los monosacáridos), o
- 3) alcoholes polihídricos y ciclitolos

(inositales), productos de la reducción de los monosacáridos.

Los monosacáridos tienen por lo general la fórmula empírica $(C_n H_{2n} O_n)$, en donde $n=3$ o un número mayor. Los monosacáridos que poseen 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono en sus esqueletos reciben respectivamente el nombre de tetrasas, pentosas, hexosas y heptosas. Entre las pentosas se encuentra la arabinosa, que es una aldosa.

Los disacáridos $(C_{12} H_{22} O_{11})$ son polisacáridos (oligosacáridos) compuestos por dos unidades de monosacáridos. Un ejemplo de éstos es la sacarosa, conformada por glucosa y fructosa.

La producción de ácidos a partir de carbohidratos -vía Embden-Meyerhof, puede ser detectada fácilmente mediante cultivos en placa. El agar para carbohidratos se prepara adicionando una cantidad adecuada de solución stock del carbohidrato -esterilizada por filtración-, en un medio de agar base con indicador rojo de fenol, púrpura de bromocresol u otro, esterilizado en autoclave a una temperatura de 121 grados centígrados, 15 lb de presión, por 5 minutos; no se aconseja someter a autoclave por 15 minutos, ya que algunos hidratos de carbono, entre ellos

la sacarosa, pueden descomponerse o resultar con algunas alteraciones.

En el medio, la concentración final del carbohidrato debe ser cercana al 1 %. El cultivo se incubaba a 35-37 grados centígrados en condiciones aerobias y se examina a las 24 h, para observar si existe acidez, lo cual es detectable mediante el virre del indicador que, respecto a los antes mencionados, es hacia amarillo.

Cabe señalar que la prueba también puede realizarse en medios líquidos y que de ambas formas se puede diferenciar en base al diagrama 2 a A. hydrophila que es arabinosa positiva y a A. jandaei que es sacarosa negativa.

Por lo general, en los medios líquidos se coloca un tubo de Durham en posición invertida -sobre todo en el tubo con glucosa- y, de esta manera, es posible detectar la producción de gas. Ello ayuda en la detección de A. caviae, que no produce gas de glucosa.

Resistencia a 30 microgramos de cefalotina (9, 24, 26, 34, 44, 79, 87)

Esta prueba es indispensable en la última etapa del diagrama 2, ya que ayuda a diferenciar a A. veronii de A. hydrophila.

Para realizar la prueba se recomienda el método de difusión en agar, denominado también prueba de susceptibilidad de Bauer-Kirby; el medio seleccionado es el agar de Mueller-Hinton que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos; es importante que el medio tenga un espesor uniforme de 4 mm para que la difusión en el agar sea siempre la misma y no varíen las dimensiones de los halos de inhibición. Se recomienda que el inóculo corresponda a una suspensión de microorganismos equivalente al estándar No. 5 de MacFarland, cuya preparación consiste en añadir 99.5 ml de ác. sulfúrico 0.36 N a 0.5 ml de sulfato de Bario. Se compara la turbidez de este estándar con el del cultivo del microorganismo, observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales. Si la suspensión es menos turbia se incuba más tiempo y, en caso contrario se añade solución salina a esta última hasta que se igualen.

Una vez logrado lo anterior, se sumerge un hisopo estéril en la suspensión, rotando el mismo contra la pared del

tubo para eliminar el exceso de líquido. Se siembra en forma masiva en agar Mueller-Hinton y dicha placa se deja entreabierta para que se evapore el exceso de humedad; se procede a colocar con una pinza esteril el disco que contiene los 30 microgramos de cefalotina. se procede a incubar a 35 grados centigrados durante 18 h y, al cabo de este tiempo, se hacen las medidas correspondientes. Un halo de inhibición menor o igual a 14 mm se considera resistencia, el de 15 a 17 mm como intermedio, y los halos mayores a 17 mm se leen como sensibilidad, en cuyo caso se establece la presencia de A. veronii subsp veronii.

v. Aspectos microbiológicos asociados al diagnostico de laboratorio

Dado que la enfermedad entérica por Aeromonas suele ser de corta duración, el aislamiento e identificación se consideran de especial utilidad para efectuar estudios epidemiológicos.

La muestra puede tomarse mediante hisopos rectales que se insertan más allá del esfinter rectal -aproximadamente 2 centímetros- y se rotan suavemente; no obstante, tambien se puede recurrir a la forma tradicional que consiste en

recolectar la materia fecal recién excretada en frascos estériles bien sellados y etiquetados (44).

En cuanto al procesamiento microbiológico se recomienda sembrar la muestra en los medios sólidos BAA y CIN, y en el medio de enriquecimiento APW, de acuerdo a lo señalado en el diagrama número 1. La morfología macroscópica es compartida por muchas bacterias, por lo que se procede a realizar diferentes pruebas. En este sentido, todas las colonias integradas por bacilos Gram negativos, móviles, oxidasa positivos, fermentadores de glucosa y resistentes al agente vibriostático O/129, sugieren la presencia del género Aeromonas y deben someterse a otros estudios, destacando la realización de las pruebas de hidrólisis de esculina, producción de indol, Voges-Proskauer, ácido de sacarosa, gas de glucosa, ácido de arabinosa y resistencia a cefalotina, cuya descripción se encuentra en el inciso inmediato anterior (11, 41, 44, 88).

II IMPORTANCIA CLINICA

i. Factores de virulencia

Debido a la importancia que ha adquirido el género Aeromonas en los últimos años, se han realizado varios estudios que reportan diversos factores de virulencia. Sin embargo, la investigación no ha comprendido a todas las especies, sino a las de mayor relevancia: A. hydrophila, A. sobria y A. caviae; en general los factores de virulencia permiten a la bacteria establecerse en el hospedero y, posteriormente, provocarle la enfermedad (32, 36, 42, 68, 71, 85).

En este sentido, una clara ventaja del patógeno consiste en producir más de un tipo de adhesinas, especialmente durante la etapa temprana del proceso de colonización, cuando la máxima capacidad de adherencia es necesaria para lograr el establecimiento en los tejidos "blanco". De hecho, A. hydrophila produce varias lectinas y adhesinas las cuales le facilitan el reconocimiento de diferentes carbohidratos presentes en eritrocitos, células del epitelio bucal, receptores para colágeno tipo I y IV, fibronectina, laminina, lactoferrina y mucina (7).

Adicionalmente, en A. sobria se ha demostrado que los pili Ael, cuyo peso molecular es de 23,000 Daltons, se adhiere eficazmente al intestino humano y al de conejos. En cuanto a A. hydrophila, se han descrito cinco clases diferentes de pili, aunque sólo una de ellas ha demostrado tener afinidad por el intestino humano (7, 31).

Dentro de los factores restantes que le confieren patogenicidad a este género se encuentran diversas enzimas extracelulares, algunas de las cuales aun no se han relacionado con la patogenia -amilasas, lipasas, nucleasas y DNAasas- (24, 30, 71, 92).

Por otra parte, se han detectado proteasas que se han reconocido como activadoras de la exotoxina "aerolisina" -estudiada ampliamente-. Entre dichas proteasas destacan las siguientes:

a) Serina proteasa, cuyo peso molecular es de 70,000 Daltons, requiere iones divalentes de calcio y magnesio, y su pH óptimo es de 8 a 9.

b) Tripsina, lisina y arginina proteasa, que además de

activar a la mencionada "aerolisina". incrementan la capacidad de A. schubertii para infectar heridas.

c) Metaloproteasa, cuya importancia radica en que provee de nutrientes al microorganismo, para su proliferación en los tejidos (35, 46, 71, 77).

Por lo que toca a sustancias estructurales, recientemente se ha descrito una proteína siderófora independiente, llamada Amonabactin, que funciona como receptor del hierro unido a la transferrina; se encuentra en la superficie de varias especies del género Aeromonas y su actividad central consiste en atrapar el hierro, retirándolo de la transferrina, restándole disponibilidad a la célula hospedera. Los grupos de hibridación de DNA que poseen esta proteína son el 1 y el 2, correspondientes a la ubicación de A. hydrophila, el 3 de A. salmonicida, el 4 de A. caviae, el 5 de A. media y el 12, representado por A. schubertii (10, 13, 93).

Otra propiedad de virulencia muy estudiada es la capacidad del género para sintetizar toxinas y, en particular, lo referente a 2 de ellas: la aerolisina y la exotoxina citotónica (6, 30, 33, 59, 64, 65).

En cuanto a la aerolisina, ésta también es conocida como enterotoxina citotóxica, toxina Asao o beta hemolisina; el gene aerolisina se ha detectado en todas las cepas de A. hydrophila, A. sobria, A. veronii subsp sobria y A. trota, además del 50 % de A. caviae -dado que la mitad restante de esta especie es sólo invasiva- (3, 66, 84).

La enterotoxina es secretada como precursor inactivo -preprotoxina- y su activación se produce a través de una hendidura proteolítica, liberando 25 aminoácidos. Dicha hendidura es formada por la acción de proteasas que la propia bacteria excreta; una vez activada la aerolisina, ésta se une a las células eucariotes, en el receptor de glucoforina, formando canales en la membrana y, a partir de ese momento, es capaz de causar la lisis de los enterocitos y eritrocitos. Las principales propiedades fisicoquímicas de esta citotoxina son: es soluble en agua, su peso molecular es de 54,000 Daltons, es lábil al calor y, una vez purificada, exhibe letalidad para ratones, induce acumulación de fluidos en el ileon de conejo, provoca que las células cebadas y los neutrófilos liberen mediadores de la inflamación y manifiesta citotoxicidad in vitro en una gran variedad de líneas celulares (12, 21, 24, 35, 40, 46, 50, 52, 56, 59, 65, 68, 75, 92).

Por lo que respecta a la enterotoxina citotónica, Lungh y cols fueron quienes la describieron por primera vez; es producida por A. hydrophila, es estable al calentamiento -100 grados centígrados durante 20 minutos-, su peso molecular es de 44,000 Daltons, es capaz de estimular a la adenilciclase -de lo cual resulta un incremento en los niveles de AMPc intracelular de las células del epitelio intestinal-, produciendo al inicio del proceso una diarrea de tipo secretorio que conduce a la exudación y a la disminución de la absorción de agua y electrolitos (20, 24, 33, 65, 68, 72, 75).

Cabe mencionar que una proteína de superficie de A. hydrophila y A. veronii subsp sobria, denominada capa S, es citada como otro factor de virulencia que juega un papel importante en la diseminación sistémica -metástasis- posterior a la invasión sanguínea a través de la mucosa gastrointestinal. Ello se debe a que cuando hay bacteremia, se manifiesta como una sustancia inmunodominante; sin embargo, las funciones que se le han demostrado aún no explican una clara virulencia: 1)Facilita la asociación de la bacteria a los macrófagos, 2)Une porfirinas -cuya unión con el hierro origina el grupo prostético hemo de la hemoglobina-, 3)Enlaza inmunoglobulinas y 4)Protege a los microorganismos de la actividad bactericida del suero. Como se puede deducir de

lo anterior, sólo el inciso 4 se refiere a una característica neta de virulencia (25, 33, 36, 38, 43, 45, 50, 56).

ii. Patología y Epidemiología

El hábitat natural de las especies de Aeromonas es el agua; se les ha aislado a partir de agua estancada o circulante incluyendo a la de las alcantarillas, estanques de peces, abastecimientos de agua no tratada y clorinada, lodo, sifones de tuberías sanitarias y suministros de agua destilada; no obstante, no se le considera como bacteria marina ni como halófila dado que su tolerancia al NaCl es sólo de 0 a 4 %. Otras fuentes de aislamiento son alimentos tales como vegetales verdes, leche cruda, helado, carne de res, puerco, peces, mariscos, pollo y frutas. El padecimiento natural debido a Aeromonas se ha encontrado en anfibios, siendo el más conocido la "enfermedad de patas rojas" de las ranas. Adicionalmente, los reptiles y peces también pueden infectarse o ser portadores (9, 24, 44, 49, 54, 62).

Las infecciones humanas con especies de Aeromonas ocurren predominantemente en el verano, habiendo una disminución notable de su incidencia durante los meses de invierno,

debido probablemente al origen acuático de estas bacterias (9, 44, 48, 62, 78).

Las afecciones humanas de mayor frecuencia se encuentran incluidas en 4 categorías (9, 44, 70, 90):

i. Enfermedad diarreica aguda de corta duración; en este caso, la diarrea es a menudo acuosa y acompaña a un síndrome que semeja mucho al colera. Esta enfermedad no se limita a ninguna zona geográfica y afecta a cualquier edad, siendo particularmente frecuente en pacientes con diarrea del viajero, en adultos mayores de 50 años y, principalmente, en niños menores de 5 años.

ii. Septicemia; a este respecto, los pacientes con enfermedades hepatobiliares, pancreáticas o con malignidad (leucemia aguda) resultan particularmente susceptibles a invasiones hematógenas por A. hydrophila.

iii. Celulitis e infecciones de heridas, adquiridas principalmente luego de exposición a agua, suelo o alimentos contaminados.

iv. Otras infecciones.

i. Enfermedad diarreica aguda de corta duración

Las diarreas agudas constituyen un serio problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, en donde afectan frecuentemente a los infantes cuyas familias se encuentran bajo condiciones socioeconómicas desfavorables, lo cual condiciona estados precarios de nutrición; la diarrea es la causa más frecuente de muerte en menores de 5 años de edad en nuestro país, principalmente por la deshidratación que provoca, y es la séptima causa más frecuente de muerte en la población mexicana. De acuerdo a estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), del 50 al 70 % de los pacientes menores de 5 años de edad que fallecen, la causa directa de muerte es la deshidratación secundaria a la pérdida exagerada de líquidos y electrolitos. La mayoría de los pacientes con enfermedad diarreica que sobreviven, quedan con algún grado de desnutrición (40, 72, 73, 74, 77).

Se define a la diarrea, enfermedad diarreica, síndrome diarreico, infección intestinal o gastroenteritis aguda, como la presencia de heces líquidas o acuosas, que se observan generalmente en un número mayor de 3 en 24 horas (11, 77).

Desde el punto de vista fisiológico, el síndrome diarreico suele derivar en consecuencias más graves entre los pacientes pediátricos que en el adulto. Por lo que se refiere a estos últimos, es importante considerar que el individuo promedio ingiere al día 1.5 litros de agua (en bebidas y alimentos), cantidad a la que se le adicionan otros 6 litros de líquidos en forma de saliva, contenido gástrico, bilis y los jugos pancreático e intestinal. No obstante lo anterior, el organismo elimina vía heces fecales 0.1 litro de líquido al día, lo cual implica que en el intestino se adsorben al menos 7.4 litros diarios de líquidos. Por tal motivo una alteración en este sistema de absorción se traduciría en diarrea; una sobrecarga de sustancias potencialmente absorbibles por el intestino, puede conducir a la hipersecreción de agua y moco y al aumento en la pérdida de sodio y agua. El mecanismo es el que alude a la acumulación de solutos en el lumen intestinal, pues debido a su elevada osmolaridad atraen agua de los enterocitos para restablecer la isotonicidad global del intestino.

En cuanto a los menores de 5 años -y principalmente en los lactantes-, su escasa flora intestinal, su menor capacidad funcional intestinal -acorde con sus particulares necesidades-, y su sistema inmunológico

inmaduro, los hace más susceptibles a los agentes infecciosos patógenos (11, 58, 61, 66, 77).

Estudios relacionados con la enteropatogenicidad de A. hydrophila, han demostrado en voluntarios americanos que los pacientes suelen presentar 3 o más evacuaciones acuosas en 24 h, acompañadas por náuseas, vómito, calambres abdominales, fiebre y postración. Además se ha logrado establecer que los tenesmos y la anorexia figuran entre los síntomas más comunes entre quienes son colonizados por A. hydrophila -como único patógeno enterico potencial- (48, 58).

Por lo que se refiere a la duración de la diarrea, ésta es variable, ya que algunos casos curan dentro de los 2 primeros días, otros duran alrededor de 7 y otros hasta 2 semanas o más (7).

Por otra parte, todo parece indicar que ciertos síntomas dependen de la especie involucrada (62, 65).

| SINTOMAS | <u>A. caviae</u> | <u>A. hydrophila</u> | <u>A. sobria</u> |
|------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | % | % | % |
| DIARREA | 76 | 76 | 75 |
| acuosa | 56 | 44 | 75 |
| sangre | 11 | 5 | 25 |
| moco | 23 | 5 | 5 |
| FRECUENCIA | 6 al día | 4 al día | 7 al día |
| DURACION | 3 días a 6 meses | 7 días a 1 mes | 7 días a 3 meses |
| CALAMBRE | 70 | 76 | 50 |
| NAUSEA | 30 | 35 | 50 |
| VOMITO | 20 | 22 | 50 |
| FIEBRE | 28 | 5 | 5 |

Otros datos interesantes son:

A. sobria se encuentra por igual en hombres y en mujeres y A. caviae se localiza más en varones adultos que en mujeres, aunque es notablemente más común en niños menores de 3 años, sobre todo en aquellos que se han sometido a tratamientos previos (2, 14, 17, 23, 62, 75).

De hecho, se considera que la antibioticoterapia con medicamentos a los cuales Aeromonas resiste, también contribuye a la colonización del tracto gastrointestinal

por A. caviae (62).

Por otra parte, es importante mencionar que numerosos pacientes afectados por Aeromonas han declarado contacto con aguas no tratadas, ya sea mediante la ingesta de mariscos, por pescar, nadar en ellas o hasta por beberlas (62).

Cabe subrayar que, por lo general, la diarrea causada por A. sobria y A. hydrophila tiende a ser aguda, en tanto que la debida a A. caviae manifiesta características de cronicidad, con una duración de 4 a 6 semanas, en pacientes sin tratamiento (72, 73, 74).

Otros trabajos han originado informes epidemiológicos interesantes:

De 34,311 muestras fecales obtenidas durante un periodo de 5 años, se aislaron 208 cepas de Aeromonas, para una frecuencia global de 0.61 %.

Aproximadamente la mitad de las cepas enteropatógenas pertenece al grupo de hibridación 4 -en el que se

encuentra A. caviae-, el 26 % corresponde al grupo B/10 -A. veronii subsp sobria- y el 11 % se ubica en el 1 -A. hydrophila- (48, 58).

No obstante, las frecuencias de cada cepa dependen de las diferentes regiones: En E.U.A. y Europa, la especie de Aeromonas que se aísla con mayor regularidad es A. caviae. Contrastando con ello, en Australia, Tailandia y Bangladesh predominan A. hydrophila y A. sobria (2, 17, 73, 75).

ii. Septicemia

Dado que la tasa de mortalidad por septicemia puede ser de 40 % o más en pacientes internos, la recuperación a tiempo de bacterias en la sangre del enfermo puede tener un gran valor diagnóstico y de pronóstico (11).

La septicemia es un síndrome clínico caracterizado por fiebre, escalofríos, malestar general, taquicardia, hiperventilación, toxicidad o postración, lo cual ocurre cuando las bacterias circulantes se multiplican con una tasa que excede a la de su eliminación por fagocitos (3).

La bacteremia puede ser transitoria, intermitente o continua, reflejando diversos mecanismos de entrada de bacterias en el torrente circulatorio. Es posible una bacteremia transitoria, cuando se introducen en la sangre los microorganismos de la flora normal luego de cepillarse los dientes, al hacer fuerza al defecar o después de algún procedimiento médico. A menudo se produce bacteremia intermitente cuando bacterias de un sitio afectado son liberadas espasmódicamente hacia la sangre, a partir de abscesos extravasculares, cavidades empiémicas o infecciones difusas (celulitis, peritonitis, artritis séptica). La bacteremia continua es habitual en casos de endocarditis bacteriana subaguda o a partir de fistulas arteriovenosas infectadas, catéteres intraarteriales o cánulas in situ. Sin embargo en un tercio de las bacteremias puede o no determinarse el origen de los microorganismos (11, 44).

Diversos mecanismos desempeñan un papel en la eliminación de microorganismos del torrente circulatorio. En hospedadores sanos e inmunocompetentes, un súbito flujo de bacterias es habitualmente depurado de la sangre en 30 a 45 minutos. El hígado y el bazo desempeñan un papel importante en esta acción, junto con los neutrófilos intravasculares. Las bacterias capsuladas son más difíciles de eliminar, puesto que se requiere de la

presencia de anticuerpos específicos. Los pacientes con enfermedades debilitantes o inmunodeficiencias tienen mayores riesgos porque las bacterias circulantes pueden persistir en la sangre durante horas (44).

De acuerdo a su etiología, casi todas las bacterias Gram negativas pueden producir esta clase de patología; no obstante, el término bacteremia gramnegativa se reserva generalmente para los casos provocados por miembros de la familia Enterobacteriaceae y el género Pseudomonas. De hecho, aunque las septicemias causadas por otras bacterias gramnegativas originan manifestaciones clínicas similares, se acepta considerarlas como entidades clínicas discretas no agrupables dentro del término bacteremia gramnegativa (11, 43, 44).

Precisamente, este último es el caso de la sepsis debidas al género Aeromonas el cual se asocia, aunque con menor frecuencia que las Enterobacteriaceae y Pseudomonas, a enfermedades diseminadas vía hematógena, principalmente después de ocasionar enfermedades diarreicas, celulitis o infecciones de heridas (43).

En este sentido, es preciso señalar que la septicemia por

Aeromonas sp suele presentarse con mayor regularidad en pacientes afectados previamente por enfermedades hepatobiliares, pancreáticas o malignas (2, 8, 9, 14, 78, 90).

111. Celulitis e infecciones de heridas

Se asigna el nombre de celulitis a las infecciones que afectan principalmente los tejidos subcutáneos, con algún compromiso secundario de la dermis. Clínicamente, la celulitis se manifiesta como un área de edema, eritema, calor e hipersensibilidad. Aunque la zona afectada se encuentra en el tejido subcutáneo, el edema y eritema suelen abarcar el área circundante (11, 44).

Gran variedad de microorganismos pueden causar celulitis, particularmente después de un trauma; si bien los estreptococos del grupo A y Staphylococcus aureus son con mucho los agentes causales más comunes, varios bacilos gramnegativos, entre ellos Aeromonas, ocasionan dicha patología sobre todo cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos (8, 78, 91).

Por lo que respecta a las infecciones de heridas, cabe

mencionar que estas se originan comunmente cuando la barrera protectora de la piel se interrumpe por invasion traumática o quirurgica (11, 84).

Los principales agentes causales de esta clase de infecciones son los estafilococos coagulasa positiva y los estreptococos del grupo A, pero muchos otros microorganismos pueden introducirse en condiciones ambientales especificas (11).

Por lo que se refiere a Aeromonas, este genero suele provocar infecciones de heridas contaminadas por suelo o agua, si bien predomina este último caso, principalmente cuando se trata de agua dulce estancada, en la que suelen encontrarse A. hydrophila, A. veronii y A. jandaei, que provocan infecciones necrosantes de progresión sumamente rápida (8, 11, 37, 91).

Cabe hacer mención de un reporte de infeccion de heridas, el cual se generó debido al uso de sanguijuelas medicinales Hirudo medicinalis para efectuar el tratamiento de venas congestionadas asociadas a una cirugía plástica; la paciente presentó infeccion de la herida después de habersele aplicado la sanguiuela durante una hora; los cultivos de la muestra manifestaron

la presencia de A. hydrophila, lo cual condujo al estudio de las sanguijuelas, estableciéndose que Aeromonas es flora intestinal de dichos artrópodos, en los cuales desempeña un papel de simbiote, al producir enzimas proteolíticas necesarias para la digestión de la sangre que ingiere la sanguijuela (84).

iv. Otras infecciones

Si bien las principales enfermedades asociadas al género Aeromonas son la enteritis aguda o crónica, la septicemia, la celulitis y las infecciones de heridas, también se han reportado algunas otras entidades clínicas en las que participa dicha bacteria como probable agente etiológico.

Entre ellas deben considerarse las infecciones urinarias -puesto que algunos medios utilizados para urocultivo han permitido su detección- y, de manera más eventual, la osteomielitis, endocarditis y meningitis, aunque estas 3 últimas como consecuencias raras de los casos en los que ocurre una previa septicemia (8, 37, 43, 54, 70, 78, 91).

iii. Aspectos generales de la terapéutica

Prácticamente puede establecerse que la diarrea es una de las principales enfermedades asociadas al género Aeromonas (22, 26, 40).

Durante el proceso diarreico las pérdidas de agua y electrolitos causan deshidratación, misma condición que destaca como una de las principales causas de muerte en la población infantil. Por tal motivo, la OMS ha efectuado estudios en los cuales encontró varios conceptos erróneos que prevalecen en el tratamiento del síndrome diarreico, e implementó durante los últimos años su manejo adecuado, basado en 4 estrategias: 1) El uso adecuado de la hidratación oral, cuya fórmula consiste de 3.5 g/l de cloruro de sodio, 2.9 g/l de citrato trisódico dihidratado, 1.5 g/l de cloruro de potasio y 20 g/l de glucosa, con la cual se logra una osmolaridad total de 311 mOsm/l, semejante a la del plasma; su función reside en conservar la absorción intestinal de agua y electrolitos, y de mantener la capacidad de absorción de otros nutrientes en más del 50%. 2) La necesidad de continuar con la alimentación del paciente durante la enfermedad. 3) La conveniencia de emplear líquidos intravenosos cuando la gravedad del cuadro lo requiera.

4) El empleo de antibióticos en los casos que lo ameritan (77).

Generalmente, la diarrea producida por Aeromonas es autolimitada y, por lo común, no requiere de antibioterapia..

Sin embargo, cuando ocurre diarrea prolongada (crónica) o se presentan infecciones más severas, tales como septicemia, celulitis, infección de heridas, etc., es necesario recurrir a los medicamentos que han demostrado su eficacia, siendo generalmente el trimetoprim-sulfametoxazol el antibiótico de elección, si bien existen algunos otros muy confiables, como la gentamicina, las cefalosporinas de segunda y tercera generación y la tetraciclina (22, 26, 29).

En cuanto a la duración de la terapia, la basada en el uso de trimetoprim sulfametoxazol suele ser de 5 días; su vía de administración es la oral, requiriéndose en los niños de 10 mg/Kg/día de trimetoprim y de 50 mg/Kg/día de sulfametoxazol, en tanto que en los adultos dicha proporción es de 160 y 800 mg, respectivamente, considerando 2 dosis diarias (2, 3, 9, 62, 75, 90).

CONCLUSIONES

1. El género Aeromonas presenta una morfología microscópica que lo hace prácticamente indiferenciable, mediante frotis al Gram, de la familia Enterobacteriaceae.
2. La búsqueda de Aeromonas en muestras fecales requiere de un previo enriquecimiento en caldo peptonado alcalino, antes de intentar su aislamiento en gelosa sangre adicionada de ampicilina.
3. La identificación de las especies de Aeromonas de interés en salud pública se basa en pruebas tales como la de la citocromo oxidasa, movilidad, fermentación de glucosa, sensibilidad al agente vibriostático O/129, hidrólisis de la esculina, producción de indol, gas de glucosa, ácido de arabinosa y sacarosa, la resistencia a 30 microgramos de cefalotina y Voges-Proskauer.
4. Las principales enfermedades que ocasiona Aeromonas al ser humano son: enteritis aguda o crónica, septicemia e infecciones de heridas. No obstante, en los individuos inmunocomprometidos, también pueden presentarse infecciones urinarias, endocarditis, meningitis y osteomielitis.

5. En el laboratorio clínico, el aislamiento e identificación de Aeromonas sp a partir de muestras fecales, puede ser de mayor utilidad para realizar estudios epidemiológicos que para establecer el diagnóstico de enfermedades entéricas.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott S.L., Cheung W.K.W., Kroske-Bystrom S., Malekzadeh T. and Janda J.M.: Identification of Aeromonas strains to the genospecies level in the clinical laboratory, J. Clin. Microbiol., 1992; 30(5): 1262-1266.
2. Agger W.A., McCormick, J.D. and Gurwith M.J.: Clinical and microbiological features of Aeromonas hydrophila associated diarrhea, J. Clin. Microb., 1985; 21(6): 909-913.
3. Albert M.J., Qadri F., Ansaruzzaman M., Kibriya A.K.M.G., Haider K., Neogi P.K.B., Alam K. and Alam A.N.: Characterization of Aeromonas caviae antigens which cross-react with Shigella boydii 5, J. Clin. Microb., 1992; 30(5): 1341-1343.
4. Altwegg M. and Luthy-Hottenstein J.: Methods for the identification of DNA hybridization groups in the genus Aeromonas, Experientia, 1991; 47: 403-406.
5. Altwegg M., Steigerwalt, A.G., Altwegg-Bissig R.,

- Luthy-Hottenstein J. and Brenner D.J.: Biochemical identification of Aeromonas genospecies isolated from humans. J. Clin. Microb., 1990; 28(2): 258-264.
6. Asao I., Kinoshita Y., Kosaki S., Uemura T. and Sakaguchi G. : Purification and some properties of Aeromonas hydrophila hemolysin. Infect. Immun., 1984; 46(1): 122-127.
 7. Ascencio F., Ljungh A. and Wadstrom T: New lectins and other putative adhesins in Aeromonas hydrophila, Experientia, 1991: 47: 414-416.
 8. Baddour L.M.: Extraintestinal Aeromonas infections, Mayo Clin. Proc., 1992; 67: 496-498.
 9. Balows A., Hausler W.J., Herrmann K.L., Isenberg H.D. and Shadomy H.J.:
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
American Society for Microbiology, 5th ed.
Washington D.C.; 1991.
 10. Barghouthi S., Payne S.M., Arceneaux J.E.L. and Byers

B.R.: Cloning, mutagenesis and nucleotide sequence of a siderophore biosynthetic gene (amo A) from Aeromonas hydrophila, J. Bacteriology, 1991; 173(16): 5121-5129.

11. Braude A.I., Davis C.E. and Fierer J.
MICROBIOLOGIA CLINICA
Ed. Médica Panamericana
Buenos aires 1984.
12. Buckley J.T.: Secretion and mechanism of action of the hole-forming toxin aerolysin, *Experientia*, 1991; 47: 418-419.
13. Byers B.R., Massad G., Barghouthi S. and Arceneaux J.E.L.: Iron acquisition and virulence in the motile aeromonads: Siderophore-dependent and independent systems, *Experientia*, 1991; 47: 416-418.
14. Carnahan A.M., Behram S. and Joseph W.: Aerokey II: a flexible key for identifying clinical Aeromonas species, *J. Clin Microb.*, 1991; 29(12): 2843-2849.
15. Carnahan A.M., Chakraborty T., Fannig G.R., Verma D.,

- Ali A., Janda J.M. and Joseph S.W.: Aeromonas trota sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens, J. Clin. Microb., 1991; 29(6): 1206-1210.
16. Carnahan A., Fanning G.R. and Joseph S.W.: Aeromonas jandaei (formerly genospecies DNA group 9 A. sobria), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens, J. Clin. Microb., 1991; 29(3): 560-564.
17. Carnahan A., Hammontree L., Bourgeois L. and Joseph S.W. : Pyrazinamidase activity as a phenotypic marker for several Aeromonas spp isolated from clinical specimens, J. Clin. Microb., 1990; 28(2): 391-392.
18. Carnahan A.M. and Joseph S.W.: Aeromonas update: New species and global distribution, Experientia, 1991; 47: 402-403.
19. Carnahan A.M., Marii M.A., Fanning G.R., Pass M.A. and Joseph S.W.: Characterization of Aeromonas schubertii strains recently isolated from traumatic wound infections, J. Clin. Microb., 1989; 27(8): 1826-1830.

20. Chakraborty T., Montenegro M.A., Sanyal S.C., Helmuth R., Bulling E, and Timmins K.N.: Cloning of enterotoxin gene from Aeromonas hydrophila provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin, *Infect. Immun.*, 1984; 46(2): 435-441.
21. Chakraborty T., Schmid A., Notermans S and Benz R.: Aerolysin of Aeromonas sobria: evidence for formation of ion-permeable channels and comparison with alpha-toxin of Staphylococcus aureus, *Infect. Immun.*, 1990; 58(7): 2127-2132.
22. Deodhar L.P., Saraswathi K. and Varudka A.: Aeromonas spp. and their association with human diarrheal disease, *J. Clin. Microb.*, 1991; 29(5): 853-856.
23. Desmond E. and Janda J.M.: Growth of Aeromonas species on enteric agars, *J. Clin. Microb.*, 1986; 23(6): 1065-1067.
24. Finegold S.M. and Baron E.J.:
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO BAILEY/SCOTT
Ed.Médica Panamericana, 7a. ed.
Buenos Aires, 1989.

25. Garduño R.A., Lee E.J.Y. and Kay W.W.: S-Layer-mediated association of Aeromonas salmonicida with murine macrophages, *Infect. Immun.*, 1993; 60(10): 4373-4382.
26. Frankel S., Stanley R. and Sonnenwirth A.C.:
CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS GRADWOHL'S
The C.V. Mosby company, 7a. ed.
U.S.A., 1970.
27. Haberberger R.L., Yonushonis W.P., Daise R.L., Mikhail I.A. and Ishak E.A.: Re-examination of Rattus norvegicus as an animal model for Aeromonas associates enteritis in man, *Experientia*, 1991; 47: 426-429.
28. Hickman-Brenner F.W., Fanning G.R., Arduino M.J., Brenner D.J. and Farmer III J.J.: Aeromonas schubertii, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens, *J. Clin. Microb.*, 1988; 26(8): 1561-1564.
29. Hickman-Brenner F.W., MacDonald K.L., Steigerwalt A.G., Fanning G.R., Brenner D.J. and Farmer III J.J.: Aeromonas veronii, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea, *J. Clin. Microb.*, 1987; 25(5): 900-906.

30. Hirst T.R. and Leece R.: The phenomenon of toxin secretion by Vibrios and Aeromonads, *Experientia*, 1991; 47: 429-431.
31. Hokama A. And Iwanaga M.: Purification and characterization of Aeromonas sobria pili, a possible colonization factor, *Infect. Immun.*, 1993; 61(6): 1878-1883.
32. Honda T., Sato M., Nishimura T., Higashitsutsumi M., Fukai K. and Miwatani T.: demonstration of cholera toxin-related factor in cultures of Aeromonas species by enzyme-linked immunosorbent assay, *Infect. Immun.*, 1985; 50(1): 322-323.
33. Houston C.W., Chopra A.K., Rose J.M. and Kurosky A.: Review of Aeromonas enterotoxins, *Experientia*, 1991; 47: 424-426.
34. Howard B.J.:
- CLINICAL AND PATHOGENIC MICROBIOLOGY
- The C.V. Mosby Company, 1st ed.
- Missouri, 1987.

35. Husslein V., Bergbauer H. and Chakraborty T.: Studies on aerolysin and serine protease of A. trota ssp. nov., *Experientia*, 1991; 47: 420-421.
36. Janda J.M., Oshiro L.S. and Duffey P.S.: Virulence markers of mesophilic Aeromonads: association of the autoagglutination phenomenon with mouse pathogenicity and the presence of a peripheral cell associated layer, *Infect. Immun.*, 1987; 55(12): 3070-3077.
37. Joseph S.W., Carnahan A.M., Brayton P.R., Fanning G.R., Almazan R., Drabick C., Trudo E.W. and Colwell R.R.: Aeromonas jandaei and Aeromonas veronii dual infection of a human wound following aquatic exposure, *J. Clin. Microb.*, 1993; 31(4): 645-649.
38. Kay W.W. and Trust T.J.: Form and functions of regular surface array (S-Layer) of Aeromonas salmonicida, *Experientia*, 1991; 47: 412-414.
39. Kelly M.T. and Kain K.C.: Biochemical characteristics and plasmid of clinical and environmental Plesiomonas shigelloides, *Experientia*, 1991; 47: 439-441.

40. Kindschum M., Pickering L.k., Cleary T.G. and Ruiz-Palacios G.: Clinical and biochemical significance of toxin production by Aeromonas hydrophila, J. Clin. Microb., 1987; 25(5): 916-921.

41. Kokka R.P. and Janda J.M.: Isolation and identification of autoagglutinating serogroup O:11 Aeromonas strains in the clinical laboratory, J. Clin. Microb., 1990; 28(6): 1297-1299.

42. Kokka R.P., Lindquist D., Abbott S.L. and Janda J.M.: Structural and pathogenic properties of Aeromonas schubertii, Infect. Immun., 1992; 60(5): 2075-2082.

43. Kokka R.P., Vedros N.A. and Janda J.M.: Immunochemical analysis and possible biological role of an Aeromonas hydrophila surface array protein in septicemia, J. Gen. Microb., 1991; 138: 1229-1236.

44. Koneman E.W.

DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

Ed. Médica Panamericana, 1a. ed.

México, 1985.

45. Kostrzynska M., Dooley J.S.G., Shimojo T., Sakata T. and Trust T.J.: Antigenic diversity of the S-Layer proteins from pathogenic strains of Aeromonas hydrophila and Aeromonas veronii biotype sobria, J. Bacter., 1992; 174(1): 40-47.
46. Kosaki S., Asao T., Kamata Y. and Sakaguchi G.: Characterization of Aeromonas sobria hemolysin by use of monoclonal antibodies against Aeromonas hydrophila hemolysins, J. Clin. Microb., 1993; 31(2): 316-321.
47. Kuijper E.D., Loek van Alphen, Leenders E. and Zanen H.C.: Typing of Aeromonas strains by DNA restriction endonuclease analysis and polyacrilamide gel electrophoresis of cell envelopes, J. Clin. Microb., 1989; 27(6): 1280-1285.
48. Kuijper E.J. and Peeters M.F.: Bacteriological and clinical Aspects of Aeromonas associated diarrhea in Netherlands, Experientia, 1991; 47: 432-434.
49. Kuijper E.D., Steigerwalt A.G., Schoenmakers B.S.C.I.M., Peeters M.F., Zanen H.C. and Brenner D.J.: Phenotypic

characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of Aeromonas spp., J. Clin. Microb., 1999; 27(1): 132-138.

50. Lee K.K. and Ellis E.: Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of Aeromonas salmonicida: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme, J. Bacteriology, 1990; 172(9) : 5382-5393.

51. Lehninger A.:

BIOQUIMICA LEHNINGER

Ed. Omega, 2a. ed.

Barcelona, 1990.

52. Lior, H. and Johnson W.M.: Application of the polymerase chain reaction (PCR) to detection of the aerolysin gene in whole cell cultures of hemolytic Aeromonas hydrophila, Experientia, 1991; 47: 421-424.

53. Mac Faddin J.F.:

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA.

Ed. Médica Panamericana, 1a. ed.

Mexico, 1990.

54. McGarey D.J., Milanese L., Foley D.P., Reyes B., Frye L.C. and Lim D.: The role of motile Aeromonads in the fish disease, ulcerative disease syndrome (UDS), *Experientia*, 1991; 47: 441-444.
55. McIntosh D. and Austin B.: Atypical Characteristics of the salmonid pathogen Aeromonas salmonicida, *J. Gen. Microb.*, 1991; 137(6): 1341-1343.
56. Merino S., Camprubi S. and Tomás J.M.: Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of Aeromonas hydrophila strains of serotype O:34, *Infect. Immun.*, 1992; 60(10): 4343-4349.
57. Merino S., Camprubi S. and Tomás J.M.: The role of lipopolysaccharide in complement-killing of Aeromonas hydrophila strains of serotype O:34, *J. Gen. Microb.*, 1991; 137(7): 1583-1590.
58. Mikhail I.A., Fox E., Haberberger R.L.J., Ahmed M.H. and

Abbate E.A.: Epidemiology of bacterial pathogens associated with infectious diarrhea in Djibouti, J. Clin. Microb., 1993; 30(5): 956-961.

59. Millership S.E., Barer M.R., Mullan R.J. and Maneck S.: Enterotoxic effects of Aeromonas sobria haemolysin in a rat jejunal perfusion system identified by specific neutralization with a monoclonal antibody, J. Gen. Microb., 1992; 138(2): 261-267.

60. Mishra S., Nair G.B., Bhadra S.K., Sikder S.M. and Pal S.C.: Comparison of selective media for primary isolation of Aeromonas species from human and animal feces, J. Clin. Microb., 1987; 25(11): 2040-2043.

61. Morgan D.R., Johnson P.C., Dupont H.L. Satterwhite T.K. and Wood L.V.: Lack of correlation between known virulence properties of Aeromonas hydrophila and enteropathogenicity for humans, Infect. Immun., 1985; 50(1): 63-65.

62. Moyer N.P.: Clinical significance of Aeromonas species isolated from patients with diarrhea, J. Clin. Microb., 1987; 25(11): 2044-2048.

63. Moyer N.P., Geiss H.K., Marinescu M., Rigby A., Robinson J. and Altwegg M.: Media and methods for isolation of aeromonads from fecal specimens. A multilaboratory study, *Experientia*, 1991; 47: 409-412.
64. Namdari H. and Bottone E.J.: Aeromonas caviae: Ecologic adaptation in the intestinal tract of infante coupled to adherence and enterotoxin production as factors in enteropathogenicity, *Experientia*, 1991; 47: 434-436.
65. Namdari H. and Bottone E.J.: Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of Aeromonas caviae, *J. Clin. Microb.*, 1990; 28(8): 1796-1798.
66. Namdari H. and Bottone E.J. : Microbiologic and clinical evidence supporting the role of Aeromonas caviae as a pediatric enteric pathogen, *J. Clin. Microb.*, 1993; 31(5) : 837-840.
67. Namdari H. and Cabelli V.J.: Glucose-mediated catabolite repression of the tricarboxylic acid cycle as an explanation for increased acetic acid production in suicidal Aeromonas strains, *J. Bacteriology*, 1990; 17(8): 4721-4724.

68. Notermans S., Havelaar A., Jansen W., Kozaki S. and Guinee P.: Production of "Asao Toxin" by Aeromonas strains isolated from feces and drinking water, J. Clin. Microb., 1986; 23(6): 1140-1142.
69. Olsvik O., Wachsmuth K., Kay B., Birkness K.A. and Sack B.: Laboratory observations on Pleisomonas shigelloides strains isolated from children with diarrhea in Peru, J. Clin. Microb., 1990; 28(5): 886-889.
70. Ong K.R., Sordillo E. and Frankel E.: Unusual case of Aeromonas hydrophila endocarditis, J. Clin. Microb., 1991; 29(5): 1056-1057.
71. Paniagua C., Rivero O., Anguita J. and Naharro G.: Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (Salmo gairdneri) of motile Aeromonas ssp. isolated from a river, J. Clin. Microb., 1990; 28(2): 350-355.
72. Pazzaglia G., Escalante J.R., Sack R.B., Rocca C. and Benavides V.: Transient intestinal colonization by multiple phenotypes of Aeromonas species during the first week of life, J. Clin. Microb., 1992; 30(8): 1842-1846.

73. Pazzaglia G., Sack R.B., Bourgeois A.L., Froehlich J. and Eckstein J.: Diarrhea and intestinal invasiveness of Aeromonas strains in the removable intestinal tie rabbit model, *Infect. Immun.*, 1990; 58(6): 1924-1931.
74. Pazzaglia G., Sack R.B., Salazar E., Yi A., Chea E., Leon-Barua R., Guerrero C.E. and Palomino J.: High frequency of coinfecting enteropathogens in Aeromonas associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants, *J. Clin. Microb.*, 1991; 29(6): 1151-1156.
75. Pitarangsi C., Echeverria P., Whitmore R., Tirapá C., Formai S., Dammin G.J. and Tingtalapong M.: Enteropathogenicity of Aeromonas hydrophila and Plesiomonas shigelloides: Prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand, *Infect. Immun.*, 1982; 35(2): 666-673.
76. Popoff M.: Genus III. Aeromonas Kluyver and Van Niel, in:
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY
Krieg N.R. and Holt J.G.
The Williams and Wilkins Co., 8th ed.
Baltimore.

77. Rivero O., Anguita J., Paniagua C. and Naharro G.:
Molecular cloning and characterization of an
extracellular protease gene from Aeromonas hydrophila.
J. Bacteriology, 1990; 172(7): 3905-3908.
78. Rolston K.V.I., Zandvilet S.E., Rodriguez S., Nguyen
H.T. and Bodey G.P.: Spectrum of Aeromonas and
Plesiomonas infections in patients with cancer and AIDS,
Experientia, 1991; 47: 437-439.
79. Sanford T.
DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CLINICOS POR EL LABORATORIO
TODD-SANFORD-DAVISON
Ed. Salvat, 8a. ed.
Barcelona, 1991.
80. Schubert R.H.W.: Genus II Aeromonas Kluver and van Niel
1936, in:
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY
The Williams and Wilkins Co.
Baltimore, 1974.
81. Schubert R.H.W.: Genus IV. Plesiomonas Habs and
Schubert, in:
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY

Williams and Wilkins Co., 1st ed.
Baltimore, 1984.

82. Schubert R.H.W.: The taxonomy and nomenclature of the psychrotrophic Aeromonads, *Experientia*, 1991: 47: 406-409.
83. Snieszko S.F.: Genus IV. Aeromonas kluyster and van Niel, 1936, in:
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY
Williams and Wilkins Co., 7th ed., 1957.
84. Snower D.P., Ruef C., Kuritza A.P. and Edberg S.C. Aeromonas hydrophila infection associated with the use of medicinal leeches, *J. Clin. Microb.*, 1989; 27(6): 1421-1422.
85. Statner B. and George L.W.: congo red uptake by motile Aeromonas species, *J. Clin. Microb.*, 1987; 25(5): 876-878.
86. Thomas L.V., Gross R.J., Cheasty T. and Rowe B.: Extend serogrouping scheme for motile, mesophilic Aeromonas species. *J. Clin. Microb.*, 1990; 28(5): 980-984.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

87. Tortora G.J., Funke B.R., and Case C.L.:
MICROBIOLOGY AN INTRODUCTION
The Benjamin and Cummings Publishing Co. Inc., 4th ed.
U.S.A., 1992.
88. Van der Kooij D.: Nutricional requirements of Aeromonas
and their multiplication in drinking water, *Experientia*,
1991; 47: 444-446.
89. Van Loon F.P.L., Rahim Z.R., Chowdhury K.A., Kay B.A. and
Rahman S.A.: Case report of Plesiomonas shigelloides
associated persistent dysentery and pseudomembranous
colitis, *J. Clin. Microb.*, 1989; 27(8): 1913-1915.
90. Von Graevenitz A.: Aeromonas y Plesiomonas, in:
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J. and Shadomy H.J.
American Society for Microbiology, 5th ed.
Washington D.C., 1985.
91. Voss L.M., Rhodes K.H. and Johnson K.A.:
Musculoskeletal and soft tissue Aeromonas infection: an
enviromental disease, *Mayo Clin. Proc.*, 1992; 422-427.

92. Wong K.R., Mclean D.M. and Buckley J.T.: Cloned aerolysin of Aeromonas hydrophila is exported by wild-type marine Vibrio strains but remains periplasmic in pleiotropic export mutants, J. Bacteriology, 1990; 172(1): 372-376.

93. Zywno S.R., Arceneaux J.E.L., Altwegg M. and Byers B.R.: Siderophore production and DNA hybridization groups of Aeromonas spp, J. Clin. Microb., 1992; 30(3): 619-622.