

12 300627
20



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

IMPORTANCIA DE
Aeromonas hydrophila
COMO AGENTE ETILOGICO DE
ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ALEJANDRO MAÑON GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS
Q. B. P. QUADALUPE MORALES MEZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

CAPITULO I	OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS.....	1
CAPITULO II	INTRODUCCION.....	2
CAPITULO III	TAXONOMIA DE <u>A. Hydrophila</u>	8
CAPITULO IV	CARACTERISTICAS GENERALES.....	15
	1.- Habitat y ecología.....	15
	2.- Características de desarrollo.....	18
	a) Condiciones de temperatura.....	19
	b) Condiciones de pH.....	20
	c) Concentración de sal.....	21
	d) Condiciones de oxígeno.....	21
	3.- Morfología microscópica.....	22
	4.- Medios utilizados para su aislamiento	
	a) Identificación.....	23
	a) Medios utilizados para su aislamiento.....	25
	b) Medios utilizados para su identificación.....	27
CAPITULO V	TOXICOLOGIA Y PATOGENICIDAD.....	47
	1.- Toxinas producidas.....	47
	a) Toxinas citolíticas.....	48
	b) Enterotoxinas.....	52
	c) Otras toxinas.....	56
	2.- Daños causados al ser humano.....	57
	a) Gastroenteritis.....	60
	b) Heridas infectadas.....	63
	c) Septicemia.....	68

	d) Meningitis.....	70
	e) Tracto respiratorio.....	71
	f) Infecciones oculares.....	71
	g) Osteomielitis.....	71
CAPITULO VI	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73
CAPITULO VII	BIBLIOGRAFIA.....	76

CAPÍTULO I

OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS.

Realizar una investigación bibliográfica acerca de la taxonomía, morfología, métodos de aislamiento e identificación y patología de Aeromonas hydrophila como posible agente etiológico de infecciones humanas, con la finalidad de ofrecer una información amplia y actualizada a los laboratorios de diagnóstico y control de calidad, para mejorar sus técnicas referentes a este microorganismo.

CAPITULO II

INTRODUCCION.

La mayoría de los casos de envenenamiento alimenticio, generalmente son atribuidos a St. aureus, Cl. perfringens, o diferentes especies del género Salmonella. Si esto es cierto, es engañoso el hecho de que del 66 al 70 % de los brotes de envenenamiento alimenticio son clasificados como de origen desconocido.

Algunos de estos casos reflejan investigaciones incompletas que no han permitido la confirmación de alguna de las bacterias mencionadas anteriormente. Sin embargo ha sido supuesto que una gran parte de estos casos no identificados son causados por especies no buscadas en los ensayos preliminares de las investigaciones de estos brotes.

Durante los últimos diez años, se ha desarrollado un renovado interés por parte de los microbiólogos clínicos en la identificación de las causas de estas enfermedades, lo que ha originado a su vez, un crecimiento de la lista de las bacterias clasificadas como patógenas potenciales, incluyendo organismos como Campylobacter jejuni, E. coli enteropatógenos, Yersinia enterocolitica, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus anthracis, Listeria monocytogenes y más recientemente el organismo objeto de esta tesis: Aeromonas hydrophila.

Los primeros aislamientos de microorganismos con características

típicos de Aeromonas, fueron obtenidos en 1891 por Sanarelli, el cual demostró la patogenicidad de este organismo en ranas (80); aproximadamente 50 años después, fueron aislados grupos adicionales de bacterias (81) y en 1937 Hill y Haiman fueron los primeros en reportar el aislamiento de Aeromonas a partir de heces de un paciente; posteriormente en 1954 Hill, Cassella y Moody, aislaron copas post-mortem de una mujer con septicemia y miocarditis aguda (82). En 1961, King sugirió la adopción de las siguientes especies:

- a) A. hydrophila, el cual incluía organismos como A. liquefaciens y A. parvula.
- b) A. salmonicida y
- c) A. caviae (83).

Actualmente el género Aeromonas se divide en dos grupos bien diferenciados:

- 1.- Aeromonas psicrófilas, no móviles como la A. salmonicida y.
- 2.- Aeromonas mesófilas, móviles, entre las que se encuentran la A. hydrophila, A. caviae y A. sobria (3).

Originalmente este microorganismo fue considerado como patógeno oportunista de baja virulencia, que estaba únicamente en infecciones polimicrobianas; actualmente, es reconocido como patógeno primario o de primera importancia (1,47).

Hace mas de diez años las diferentes especies de Aeromonas fueron reportadas en diversos casos de gastroenteritis humana, causando desde suaves diarreas hasta enfermedades parecidas al cólera, en las cuales la vida del paciente estaba amenazada (11).

El originalmente reconocido como un patógeno de animales (23,45,69,82,87), ha demostrado tener mayor importancia de la que se creía, ya

que además de ser aislado de casos de gastroenteritis (3,11,61,14,55), ha sido encontrado en una variedad amplia de enfermedades, como lo son septicemia (39,61,61), en las cuales el paciente fué debilitado por otras enfermedades; infecciones del tracto urinario (61); otitis media (61); meningitis (61), y enfermedades parecidas al cólera (11). Esta amplia variedad de manifestaciones clínicas ha sido reportada tanto en huéspedes sanos como en aquellos inmunológicamente comprometidos (48) (estos últimos son aquellos que debido a tratamientos prolongados con antibióticos ven reducida la carga de su flora intestinal, lo cual conlleva una menor competencia para Sarcosina, facilitando así, que ésta sobreviva, causando la infección). Estos huéspedes inmunológicamente comprometidos están especialmente en riesgo de infectarse, incurriendo en infecciones progresivas o aún fatales (1).

Diversas estudios realizados con el fin de encontrar las causas de la patogenicidad de este microorganismo, han demostrado que Sarcosina spp. es capaz de producir hasta cuatro diferentes factores virulentes extracelulares entre los que están enzimas hemolíticas, enterotoxinas, lecitinasas y enzimas proteolíticas (16). Los cuales no están asociados a una cepa dada (7,33,67), es decir, que su enterotoxigenicidad varía de una cepa a otra (4,7,11,33,67).

Otro efecto coadyuvante en la virulencia de este microorganismo es la hidrofobicidad de su superficie celular; esto último es un factor determinante en la unión intestinal (11).

Existen una gran variedad de opiniones en cuanto a las necesidades metabólicas de este microorganismo, ya que mientras algunos autores afirman que no es necesario el uso de un medio de enriquecimiento para su aislamiento primario (61), otros afirman que los bajos niveles de aislamiento de este microorganismo en algunos laboratorios se deben a que no se han tomado medidas específicas para conseguirlo y que quizá las principales razones de un aumento en sus niveles de aislamiento sea el uso de una pareja óptima de medios de

enriquecimiento y selectivos en placa (34). Un gran número de investigadores en los últimos años, se han dado a la tarea, cada día, de desarrollar un gran número de métodos y esquemas para el aislamiento e identificación de este organismo, los cuales requieren desde unos pocos días hasta una semana completa para terminarse (35). Basados en los casos reportados en la literatura, se puede decir que debido a la ausencia de un medio de aislamiento apropiado, los datos relativos a su cuantificación en alimentos generalmente son inciertos (11).

Relacionado al problema del aislamiento de Aeromonas hydrophila, se tiene el problema de su identificación, esto es muy complicado debido al gran parecido que presenta este microorganismo con miembros de la familia Enterobacteriaceae (31,38), especialmente con los géneros Escherichia y Klebsiella. Así, por ejemplo, tenemos que en medios como el agar Salmonelelshigella o el agar de Ko Conkey, es imposible distinguir por simple inspección, las Aeromonas hydrophila de la Escherichia coli. Lo mismo sucede en otros medios, como en el agar sargre, en el cual se confunde con el género Proteus (31). Afortunadamente existe una propiedad que permite distinguir a la Aeromonas hydrophila de la enterobacterias esta es la reacción de oxidasa, la cual es positiva para Aeromonas hydrophila y negativa para los miembros de la familia Enterobacteriaceae (31). Seguido a esta identificación primaria, se utilizarían las pruebas bioquímicas, con las cuales se alcanza cierto grado de exactitud en la identificación.

Las Aeromonas, miembros de la familia Vibrionaceae, son bacilos rectos con extremos redondeados, son negativos a la tinción de Gram y facultativamente anaerobios. Aquellas que son móviles, lo son por la presencia de un flagelo polar (1); dentro de las características bioquímicas que ayudan a su diferenciación, se encuentra el fermentar la glucosa y otros

carbohidratos, ya sea por rutas de respiración o de fermentación; no desacetilala lisina ni ornitina, y como ya se mencionó, es oxidasa positiva (3,66).

Algunos investigadores han sugerido que la Aeromonas hydrophila es cosmopolita en distribución aunque ninguno de estos estudios presentan datos que los apoyen (22), sin embargo, en la mayoría de los estudios relacionados a la ecología de este microorganismo se ha encontrado su transmisión en suplementos de agua contaminada (11,55), siendo encontrados en agua no clorada y, aún en agua previamente clorada con tratamiento de potabilización (9,10). A su vez, también se ha estudiado su presencia en productos animales tales como pollo, res, puerco, cordero, pescado, setíneas, cangrejo y leche; aún a temperatura de refrigeración, observándose que la Aeromonas hydrophila está relacionada con su descomposición (23).

Hasta ahora se ha explicado la importancia de este microorganismo en base a su patogenicidad (la cual ha cobrado gran importancia en los últimos años), sin embargo, el estudio de este microorganismo es importante también desde otros puntos de vista diferente a los previamente tratados, por ejemplo: parte de la atención desviada actualmente hacia Aeromonas hydrophila se debe a que está siendo considerada como una bacteria indicadora de contaminación del agua. Así mismo, económicamente este microorganismo está llegando a ser un problema tanto para la industria de las carnes frías en las cuales se ha llegado a demostrar que se puede desarrollar aún a cero grados centígrados (62), como en la piscicultura ya que las pérdidas en la pesca comercial pueden incrementarse. Por ejemplo, en 1973, en un lago de Carolina del norte en los Estados Unidos, murieron 37,100 en un periodo de tan solo 13 días, esto originó investigaciones que sugirieron que la densidad de Aeromonas hydrophila puede ser un factor contribuyente de la epizootia en peces. Solo recientemente se encontró una relación significativa entre la densidad de este

microorganismo en depósitos refrigerados y una infección en una especie de lobina conocida como lobina boreal (21).

CAPITULO III

TAXONOMIA DE Aeromonas hydrophila.

Para la realización de un estudio acerca de cualquier microorganismo es necesario establecer que es ese microorganismo, a que otro se parece, o en que se distingue, es, en resumen, el establecer la clasificación de ese ser. En el caso particular de este estudio, la clasificación de Aeromonas hydrophila, es un punto muy complejo, a tal grado, que a la fecha los especialistas en la materia no han llegado a un acuerdo en su taxonomía.

Hasta hace unos años el género Aeromonas fué dividido en tres especies: A. hydrophila, A. punctata y A. salmonicida. Esta última siendo fácilmente diferenciable de las dos primeras por ser psicrofílica, inmóvil y ser indol negativa (8,39). No sucede lo mismo con las dos primeras, las cuales, siendo mesofílicas fueron consideradas por algunos investigadores como " Complejo A. hydrophila ", " grupo A. hydrophila ", " grupo A. hydrophila-A. punctata ", etc. Estos nombres son un indicio de la poca certeza taxonómica que se tenía a nivel especie de las cepas pertenecientes a este género (39).

Los estudios taxonómicos sobre el grupo A. hydrophila llevaron en 1969 a la clasificación de 2 especies y 5 subespecies (39), a saber, A. hydrophila subespecie hydrophila, A. hydrophila subespecie anaerogranis, A. hydrophila subespecie protosibirica, A. punctata subespecie varia y A. punctata subespecie punctata (8,39). En esta clasificación se propusieron 5

pruebas bioquímicas para la diferenciación a nivel subespecie de estas cepas (oxidación de gluconato, producción de acetoina a partir de glucosa, producción de 2,3-acetotartronaol a partir de glucosa, gas a partir de glicerol y gas a partir de glucosa) (81).

En 1936 se logró el mayor avance en la clasificación sistemática de las Aeromonas, cuando Popoff y Véron analizaron 68 Aeromonas mesofílicas (previamente designadas como A. hydrophila o A. punctata). En este estudio se muestra claramente la existencia de dos grupos taxonómicos principales "X" y "Y"; las características indicadas son mostradas en el siguiente cuadro:

TABLA No. 1

CARACTER	"X"	"Y"
Hidrólisis de caseína	+	-
Fermentación de salicina	+	-
Crecimiento en KCH	+	-
Crecimiento en L-arabina	+	-
Crecimiento en L-arginina	+	-
Crecimiento en L-histidina	+	-
Crecimiento en valicina	+	-

En la diferenciación de estas dos especies no se encontró un valor diagnóstico significativo en la producción de gas a partir de glicerol ni a partir de glucosa o en la producción de deshidrogenasa. Con esto, Popoff dijo que no era posible distinguir A. hydrophila de A. punctata y así, los dos nombres pueden ser considerados como sinónimos. Esto se reforzó con el hecho de que las cepas de A. hydrophila subespecie hydrophila, A. punctata

subespecie punctata, A. hydrophila subespecie anamogones y A. hydrophila subespecie cayias, se encontraron todas dentro del grupo "X", el cual, se puede subdividir en dos biotipos (X₁ y X₂) que se pueden diferenciar mediante los siguientes ensayos:

TABLA No.3

PRUEBA	X ₁	X ₂	Y
Producción de alantasa	+	-	-
Producción de acetoina de glucosa	+	-	+/-*
Producción de gas de glucosa	+	-	+
Producción de H ₂ S de cisteína	+	-	+

* Fué positivo el 10 % de las cepas.

El biotipo "X₁" fué nombrado A. hydrophila subespecie hydrophila y el biotipo "X₂" se nombró A. hydrophila subespecie anamogones que posteriormente pasó a ser A. hydrophila subespecie cayias (39,39).

La cepa que en la clasificación de 1969 aparecía como A. hydrophila subespecie proteolytica se excluyó del género Aeromonas debido a que no presentó las características del grupo "X" y difirió del grupo "Y" principalmente en el porcentaje mol del residuo citosina-guanina de su DNA (50.9 %). Las bacterias que integran el grupo "Y" son aquellas que cumpliendo con la definición original del género Aeromonas y teniendo el promedio de los porcentajes del residuo guanina-citosina de su DNA cercano a aquel presentado por las bacterias del grupo "X" ("X"¹=62.6 %, "Y"¹=47.8 %) presenta aquellas diferencias marcadas en los cuadros 1 y 2, por lo que para

este grupo prepusieron el nombre de A. sobria sp. novus (28).

Posteriormente, Popoff et. al. sometieron 25 cepas de Aeromonas sódicas a estudios de biología de DNA y determinaron que la complejidad genética del grupo mesófilico era mucho mayor que la mostrada por las pruebas bioquímicas. Así, los resultados de la secuencia de polinucleótidos indican que pueden ser diferenciadas 3 especies: A. hydrophila, A. sobria y A. caviae ; esta última considerada como un biotipo de A. hydrophila por el anterior estudio de este mismo autor (10). Además, dentro de estas tres, se encuentran por lo menos de dos a tres especies de diferente hibridación. Indicando así la presencia de dos o mas especies que no se distinguieron por las pruebas bioquímicas. Estudios posteriores confirmaron estos resultados encontrados por Popoff (29).

Uno de estos estudios es el realizado por Jardi en 1984 en el que indica la ausencia de una taxonomía clara en las Aeromonas mesófilicas. Ya que de las especies clasificadas por Popoff se encuentra mas de un grupo de hibridación del DNA. Con estos estudios, el esquema taxonómico de Popoff, se expandió para incluir a la A. hydrophila subespecie caviae como una tercera especie denominada A. caviae (10).

La investigación realizada que confirma el sistema de Popoff, está basada en un esquema de 8 pruebas bioquímicas primarias y 9 suplementarias. Los datos obtenidos de este estudio, costando los perfiles bioquímicos primarios (hidrólisis caseína, KON. arabinosa, gelatina, goma de glucosa, Voges Proskauer, ácido sulfhídrico, alacasa) y las 9 rasgos adicionales utilizados (amoníaco, lecitinasa, ensima ataphylofítica, lisina descarboxilasa, hidrólisis de urea, producción de ácido a partir de estobiosa, producción de ácido a partir de manosa, ácido de 3,6-metil-alfa-D-glucopiranosido, lactosa (10 % base agar púrpura)) apoya la diferenciación

en tres especies realizada por Popoff.

Las cepas no tipificables por este sistema pueden ser representantes extraordinariamente raros de las especies dadas o bien, pueden ser especies nuevas (30).

Los resultados de este y otros estudios indican la existencia de un gran número de cepas que se encajan dentro de algunos de los grupos taxonómicos reconocidos actualmente (28,30).

Además del sistema de clasificación basado en pruebas bioquímicas y los datos de secuencia polinucleotídica existen otros dos sistemas de clasificación, los cuales confirman la existencia de 3 especies reconocidas hasta el momento. Estos son: El análisis del polisacárido principal de la pared celular, indican que grupos equivalentes a estas tres especies pueden ser distinguidos en base a la presencia de residuos de diacetil hexosa o heptosa; y el estudio de la movilidad electroforética de ciertas enzimas enzimáticas (lactato y malato deshidrogenasa), ha identificado dentro del " Complejo A. hydrophila ", 3 simotipos, que también parecen estar relacionados a los grupos de hibridación ya establecidos (28,29).

Existe otro sistema de tipificación totalmente diferente, que se basa en sus características de aglutinación; así, basado en las diferentes habilidades de las cepas para aglutinar eritrocitos de diferentes especies (caballo, rata, cerdo de guinea y humano) y su capacidad de aglutinar células de levadura, se obtiene un nivel de diferenciación primaria de las cepas y patrones específicos de inhibición de la aglutinación por diferentes azúcares (L-fucosa, D-mannosa, D-galactosa y mannan que es un polímero de la D-mannosa) que permiten la subdivisión de estos grupos primarios (3).

Así, este tipo de clasificación rinde 29 distintos tipos basados primero, en la aglutinación y segundo, en la inhibición por los azúcares específicos. Aquellas cepas que no aglutinan nada son no tipificables por este

sistema y pueden representar un grupo distinto del género Aeromonas (2).

En la edición de 1984 del manual Bergey's de bacteriología determinativa se reconocen cuatro especies del género Aeromonas: A. hydrophila, A. sobria, A. caviae (siendo estas mesófilicas) y A. salmonicida (siendo esta psicrófila) (1,2,25,27).

Sin embargo, recientemente, 2 o 3 especies han sido incluidas dentro de las Aeromonas mesófilicas utilizando métodos de hibridación del DNA, estas son A. riponii (que se considera como bacteria nueva tanto por sus diferencias en hibridación de DNA como por pruebas bioquímicas), A. media (nunca ha sido relacionada con enfermedades humanas) y A. schubertii, cuyo nombre es en honor de Ralph H. W. Schubert y sus trabajos en la tipificación de las Aeromonas y que se considera como una nueva especie por sus diferencias en valores de hibridación de DNA (24,25,29).

Pese a todo esto y a que la clasificación ya fue adoptada por la FEA (2) y por el manual Bergey's de bacteriología sistemática (26), esta clasificación no es clara todavía y algunos investigadores no la aceptan, utilizando aún la clasificación basada únicamente en dos especies: A. hydrophila y A. caviae (25,28).

Como se puede apreciar en lo anteriormente anotado, la serología no ha sido empleada con suficiente importancia en la taxonomía de este grupo, sin embargo, se han realizado algunos trabajos en los que se han delineado 12 antígenos termolábiles (29) y 7 antígenos termostables (30). Los primeros pudieron ser identificados cuando se utilizaron células enteras formalinizadas como antígeno y suero anti-W-O (suero preparado inyectando conejos 2 veces por semana durante tres semanas con el antígeno de células enteras formalinizadas al 1 % con formalina y ajustando a una densidad óptica de 0.3 a 0.6 na). Con esto, se clasificaron 12 grupos basados en sus antígenos lábiles

al calor.

Los antígenos termolábiles se identifican utilizando células hechas durante 1-2 horas a 100 grados centígrados, limpiadas con solución salina y ajustando a una densidad óptica de 1.8 a 540 mμ (el suero anti-O se consigue inyectando conejos 2 veces por semana durante 3 semanas con el antígeno O) se pueden detectar diferentes tipos de antígenos termolábiles por una prueba directa de hemaglutinación (42).

CAPITULO IV

CARACTERISTICAS GENERALES.

1.- HABITAT Y ECOLOGIA.

Aeromonas hydrophila es considerada como un microorganismo aeróbico (27,40,64,67,68,75,78) que se multiplica en el agua bajo ciertas condiciones (60). También se le ha encontrado en una gran variedad de fuentes, siendo siempre el agua la mejor conocida. La mayoría de los estudios relativos a la etiología de las infecciones gastrointestinales causadas por este microorganismo se han concentrado en su transmisión por suplementos de agua contaminada (11); de hecho, estudios realizados en Australia muestran que depósitos de agua potable contenían grandes cantidades de Aeromonas spp. (7).

Así, puede observarse en los estudios realizados por diferentes investigadores, que A. hydrophila ha sido aislada de agua potable, tanto de aquella que recibió un tratamiento de cloración como en aquella que no lo recibió (10); es necesario señalar que su número decreció temporalmente después de la cloración, pero el agua distribuida a los consumidores contenía A. hydrophila en cantidades similares al agua que no fué tratada con cloro (9).

Se ha demostrado que habitats de agua salada han tenido mayor cantidad de A. hydrophila que habitats de agua dulce. Esto es sorprendente, ya

que generalmente, A. hydrophila no era considerada como una bacteria marina; pero estudios realizados al respecto, indican que se encuentran naturalmente en sistemas salados. Estas observaciones han sido corroboradas por el hecho de que A. hydrophila fue implicada como causante de síncosis en una especie de perche (el bacalao) que es estrictamente marino (21).

La distribución cosmopolita de A. hydrophila en los diferentes medios acuáticos se debe a su habilidad para vivir bajo una amplia variedad de condiciones ambientales en el agua. La cantidad de este microorganismo en los diferentes sistemas acuáticos bajo una gran diversidad de condiciones se encuentra en un rango que va desde menos de una colonia por litro hasta varios miles de células por mililitro. Este amplio rango podría indicar el importante papel de esta bacteria en los procesos acuáticos naturales (22).

En los estudios realizados sobre el sistema ecológico habitado por A. hydrophila, los investigadores llegaron a la conclusión de que la población de esta bacteria decrece en los meses de clima frío (37); siendo en los meses calurosos su número muy alto en comparación con las concentraciones de otras bacterias de la flora propia del agua. La razón más lógica que explica el motivo de esta disminución es el hecho de que cuando la temperatura del medio es baja (temperatura menor a 15 grados centígrados) la velocidad del metabolismo de A. hydrophila será demasiado baja como para competir con la flora psicrófila del agua.

La cantidad de nutrientes utilizados por A. hydrophila es aún menor a temperaturas inferiores de cuatro grados centígrados. Esto dificulta al microorganismo el satisfacer su requerimiento de energía para el mantenimiento celular, razón por la que su número se ve reducido en el tiempo frío de los meses invernales (32).

Además de la temperatura y la salinidad, otro factor que pudiera convertir un sistema acuático en medio de desarrollo para A. hydrophila es el

contenido de materia orgánica del agua; en este aspecto, el drenaje podría convertirse en un sitio de multiplicación para este microorganismo; sin embargo, las cantidades de Sarcomonas hydrophila encontradas en ciertas aguas dulces, exceden aquellas encontradas en aguas que provienen de contaminación directa (es decir, que han tenido contacto con aguas negras) (60).

Existen por lo menos tres fuentes potenciales de contaminación de Sarcomonas hydrophila en aguas dulces:

- + Los peces.
- + Los efluentes de aguas negras.
- + El propio medio acuático.

La importancia de estos elementos es tal, que algunos investigadores han tratado de identificar la fuente del microorganismo dependiendo de los biotipos presentes; reportan que biotipos aeróbios predominan en aguas oligotróficas, es decir, pobres en sustancias asimilables. Una relación similar se encuentra con las Sarcomonas fermentadoras de lactosa; así, números significativamente mayores de Sarcomonas lactosa (+) se encontraron en los efluentes de plantas tratadoras de aguas negras (60).

Hasta ahora ha sido considerado únicamente el medio acuático como hábitat apropiado para el desarrollo de S. hydrophila; sin embargo, otro medio de desarrollo (de mucha importancia) son los alimentos. El estudio de este microorganismo en alimentos no ha llamado la atención de muchos investigadores, ya que sólo existen un limitado número de estudios en los que se ha evaluado su presencia en este medio, pero, parece ser que este género está muy relacionado con la descomposición de productos animales refrigerados (como pollo, puerco, res, cordero, estión, etc) (11).

Sarcomonas hydrophila ha sido reportado como contaminante común en carnes, aves y leche frescas; en el caso de las carnes, la composición de la

acidófila que rodea al producto parece influenciar la extensión de su crecimiento (por ejemplo, S. hydrophila se desarrolla mejor en ambientes con nitrógeno que en ambientes con hidrógeno de carbón).

Asimismo, reduciendo los niveles de oxígeno de las carnes refrigeradas se favorece su desarrollo, posiblemente por el retardo en el crecimiento de la flora competitiva como el género Escherichia en ambientes anaeróbicos (5).

Además del agua y de los alimentos, Aeromonas hydrophila ha sido aislada de material fecal de seres humanos y animales; parece ser que un pequeño grupo de humanos son portadores asintomáticos de esta bacteria (5).

Su presencia en humanos en forma asintomática adquiere mayor importancia al mencionar la relación que pueden tener estas personas en la manipulación de los alimentos, siendo así fuentes potenciales de contaminación (5).

Con estos datos, se puede observar la variedad de sistemas ecológicos en los que puede encontrarse este microorganismo.

2.- CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO.

El análisis de las características óptimas de crecimiento de un microorganismo debe incluir aquellos factores que afectan al desarrollo de ese microorganismo en forma general. Con la aclaración de "en forma general", se quiere decir que no se incluirán estudios referentes a la resistencia del microorganismo a agentes bactericidas o bacteriostáticos, como es el caso de los antibióticos u otros productos químicos. Mas bien, este capítulo abarca las condiciones óptimas de desarrollo de Aeromonas hydrophila como son: temperatura, pH, concentración de sal, condiciones de oxígeno, etc.

a) Condiciones de temperatura.

Si se busca la temperatura óptima de crecimiento de Aeromonas hydrophila en los manuales clásicos de bacteriología, como los manuales Bergay's, se encuentra que la temperatura óptima de esta bacteria es de 28 grados Centígrados y sus temperaturas límite, es decir, las máximas y las mínimas en las que existe desarrollo, es 38 a 41 grados Centígrados y 0 a 5 grados respectivamente (1,58,44). Estos datos se ven reforzados por la investigación de Bouf, según la cual de 13 cepas estudiadas, 6 fueron clasificadas psicrófilicas y 7 como mesófilicas, lo cual equivale a un 46 % de cepas psicrófilicas y un 54 % de cepas mesófilicas. Con estos resultados, el autor propone la conclusión general de que Aeromonas hydrophila crece bien a 20 grados Centígrados (62). Otros autores amplían el rango de temperatura óptima de este microorganismo diciendo que va de 20 a 35 grados Centígrados (64). Este rango se ve reducido por los datos reportados en otro trabajo en el que se afirma que la temperatura óptima es de 35 grados (23).

Con toda esta diversidad de información, se puede observar que la temperatura óptima de A. hydrophila no es necesariamente de 28 grados y que el mayor crecimiento puede ocurrir a 37 grados (71). Esto se puede confirmar con el hecho de que en un estudio realizado en los Estados Unidos, con cepas que nunca antes habían sido expuestas a la temperatura de 37 grados mostraron una fase lag o de adaptación muy corta y una muy alta tasa de crecimiento en la fase logarítmica de crecimiento a 37 grados (71).

Las cepas acostumbradas a temperaturas bajas, fácilmente se adaptan a la temperatura de 37 grados como resultado de diferentes pases a esta temperatura o bien durante la exposición a la temperatura del cuerpo durante

una infección (31).

A pesar de las diferentes opiniones acerca de la temperatura óptima de crecimiento, la mayoría de los trabajos están de acuerdo en que las diferentes cepas de este microorganismo se desarrollan en casi todas las temperaturas normales de desarrollo de otros microorganismos ya que se ha desarrollado a 4 y 5 grados Centígrados (temperaturas en las que alcanza su máxima población en un período que fluctúa entre 3 y 14 días) y sus temperaturas máximas son de hasta 45 grados (32), pero en general sus temperaturas máximas se encuentran en el rango que va de 38 a 41 grados (1,38,38).

b) Condiciones de pH.

El pH no parece jugar un papel muy importante en la distribución de Aeromonas hydrophila, ya que la bacteria se ha podido aislar en el rango de 6.2 a 9.8 (valor en el que coinciden la mayoría de los estudios) (1,23,63) y ha sido demostrado que es incapaz de crecer a pH's menores a 4.0 o bien en pH's mayores a 10 (33). El estudio hecho por Palumbo a pH de 4.5 todavía existe crecimiento, pero lo importante de este estudio radica en el efecto que tienen la temperatura y el pH al mismo tiempo sobre el microorganismo ya que a 38 grados Centígrados y pH de 4.5 sí hubo crecimiento, pero a ese mismo pH y a 4 grados ya no hubo crecimiento. Con esto concluyó que Aeromonas hydrophila tiende a ser más sensible a cambios en el pH a bajas temperaturas que a altas (34).

c) Concentración de sal.

Como se informó en el inciso de "hábitat y ecología" de Aeromonas hydrophila, la concentración de sal parece ser un factor muy importante para el desarrollo de estos microorganismos. Estudios reportados indican que a concentraciones de sal de 4.5 % la tasa de crecimiento se ve disminuida, además, conforme se incrementa el contenido de sal de 1.5 al 3.5 % existe un incremento en la duración de la fase lag siendo así, el crecimiento más lento; de hecho, algunas cepas de esta especie, requieren para su crecimiento un nivel mínimo de concentración de sal. Las concentraciones extremas (máxima y mínima) de sal así como la concentración para el desarrollo óptimo dependen de la temperatura a la que el microorganismo está siendo incubado. Ya que, por ejemplo, a temperaturas bajas suceden ambas cosas: con una concentración reducida de sal (0.5 %) el crecimiento es muy lento, pero con un 4 % de sal el crecimiento es más.

Con temperaturas más altas (28 grados Centígrados) algunas cepas llegan a crecer hasta con un 5 % de sal en los medios de cultivo (5M en este caso) (54). Se puede observar que estos valores serán muy importantes cuando se considera que las condiciones de conservación de algunos alimentos como son los métodos de conservación por baja temperatura y el salado, porque pueden presentar condiciones óptimas para que Aeromonas hydrophila pueda desarrollarse.

d) Condiciones de oxígeno.

En el estudio realizado por Gross (71), se puede observar que la

facilidad de Aeromonas hydrophila para desarrollarse en un medio aeróbico o en un medio anaeróbico, se ven afectados por la composición del medio, el pH y otros factores.

Esta reportó que en tejido adiposo a 5 grados Centígrados y un pH entre 5.4 y 5.8 a Aeromonas hydrophila le era posible desarrollarse tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, pero, no se capaz de crecer en tejido muscular en esas mismas condiciones.

La razón por la cual Aeromonas hydrophila puede crecer en tejido adiposo, pero no en tejido muscular parece ser el efecto inhibitorio que ejerce la concentración de lactato contenida en el músculo (21).

En medios ambientales naturales, Aeromonas hydrophila se mantiene mejor e incrementa aún mas su densidad en aguas profundas con un bajo contenido de oxígeno que en aguas con mayores contenidos de oxígeno (18).

Este hecho se confirma con lo reportado por el manual Bergey's en el cual este microorganismo se clasifica como anaerobio facultativo (65).

3.- MORFOLOGIA MICROSCOPICA.

Las Aeromonas hydrophila son bacilos rectos de 0.3 a 1.0 micrómetros (μ) de ancho y de 1.0 a 3.8 micrómetros de largo, que pueden presentar diversos tipos de agrupación: como pares o cadenas cortas o bien, presentarse aisladas (88).

En el caso de las cadenas cortas, pueden formar filamentos de hasta 8 micrómetros. Son móviles gracias a la presencia de un flagelo polar, generalmente del tipo monotrico (65), el cual puede alcanzar una longitud de hasta 1.7 micrómetros. Además, la mayoría de las cepas flageladas desarrolla un flagelo lateral (peritricio) en los cultivos jóvenes y tiene la misma

longitud que el flagelo polar.

Esta pequeña flagela lateral desaparece una vez pasada la fase logarítmica de crecimiento celular, exhibiendo a partir de ese momento sólo el flagelo monótrico. Estas células son sensibles a la acción de ceras (88).

4.- MEDIOS UTILIZADOS PARA SU AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

La efectividad en el aislamiento e identificación de un microorganismo se ve afectada principalmente por 3 factores:

- + Medios de cultivo elegidos para su aislamiento e identificación.
- + Condiciones de incubación.
- + Manipulaciones del investigador.

El efecto negativo que pudiera tener la inexperiencia del investigador se ve disminuida conforme este adquiere mayor experiencia en el trabajo con el microorganismo objeto de su investigación hasta llegar a un punto en que este factor no afecta negativamente el aislamiento del organismo.

Las condiciones de incubación fueron estudiadas en el punto anterior observándose que la bibliografía puede ofrecer la información necesaria para su elección. Sin embargo, la selección de los medios de cultivo apropiados presenta mayores dificultades ya que el investigador se ve en la necesidad de elegir entre una amplia variedad de medios "apropiados" para una determinada bacteria, existiendo gran diferencia de opiniones sobre la eficacia de uno u otro. En este punto se hace una revisión de los principales medios publicados en la literatura especializada para el aislamiento e identificación de Aeromonas hydrophila.

La metodología general utilizada para el aislamiento e identificación de un microorganismo se puede resumir en los siguientes pasos:

- 1.- Medios enriquecidos.
- 2.- Medios selectivos.
- 3.- Identificación presuntiva.
- 4.- Confirmación.
- 5.- Diferenciación entre especies (1).

Este proceso general es aplicable a cualquier bacteria que vaya a ser analizada y cada autor lo varía de acuerdo a sus investigaciones, así, por ejemplo, como se verá más adelante, algunos consideran necesaria la utilización de un medio de enriquecimiento mientras que otros no.

Normalmente son requeridos medios selectivos y diferenciales para la detección y/o cuantificación de bacterias importantes en la salud pública.

El principio de tales medios es el eliminar especies de interés secundario y seleccionar microorganismos específicos. Desafortunadamente la mayoría de los medios no son suficientemente selectivos para especies individuales y es necesario efectuar pruebas bioquímicas después de la selección y purificación de aislamiento antes de hacer posible la identificación presuntiva. Esta determinación bioquímica es laboriosa y quita mucho tiempo.

En la solución de este problema es posible conseguir kits miniaturizados (como los sistemas API 1, que aceleran las determinaciones, sin embargo estos son demasiado caros para análisis rutinarios y, en algunos casos, inefectivos (2)).

Como se indicó anteriormente, una de las dificultades que se presentan en la identificación de Aeromonas hydrophila es que tiene muchas características bioquímicas similares a algunos géneros de la familia Enterobacteriaceae (3), sin embargo, una propiedad que la distingue de este grupo es la reacción de oxidasa que es positiva en Aeromonas hydrophila (4).

y negativa en las antrobacteriazas permitiendo así una diferenciación rápida entre A. hydrophila y este género.

Como ya se mencionó, A. hydrophila ha sido identificada como parte de la microflora de productos alimenticios, sin embargo, los datos sobre su incidencia y cantidad en alimentos generalmente no son confiables. Esto se debe a que los medios disponibles para el aislamiento de A. hydrophila de muestras clínicas no permiten que esta especie sea recuperada cuantitativamente y que sea diferenciada de otros microorganismos relacionados con alimentos (particularmente coliformes y Enterobacterias) (25).

En la búsqueda de los medios adecuados para el aislamiento de A. hydrophila, se ha encontrado que es general los medios que se han utilizado con más éxito para este fin son: el agar sangre (con o sin ampicilina) y diferentes medios selectivos y diferenciales diseñados para tomar ventaja de la resistencia que tiene este microorganismo a ciertos detergentes e inhibidores y su habilidad para fermentar o no algunos carbohidratos simples como almidón y dextrinas (29).

A.- Medios utilizados para su aislamiento.

A continuación, a partir de los datos encontrados en la literatura, se exponen diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento de A. hydrophila, se incluyen las formulaciones de los medios explicatedos, en algunos casos, el porqué de la presencia de determinados ingredientes.

a) Agar almidón ampicilina:

su composición es la siguiente:

+ Agar base rojo de fenol	31 gr
+ Almidón soluble	10 gr
+ Agua destilada	1 lit
+ Ampicilina	10 ug/ml (se agrega después de esterilizar 121/15).

El medio así preparado es distribuido en placas y se siembra por superficie, se incuba a 30 grados Centígrados por 24 horas. Después de la incubación se agrega a la placa solución de Iogal; las colonias que presentan hidrólisis de almidón (+) son aquellas que tienen un halo claro rodeando a la colonia y son consideradas A. hydrophila. Estas colonias son de 2 a 3 mm, de color amarillo o miel.

En este medio, la hidrólisis de almidón fue seleccionada, para diferenciar las colonias de A. hydrophila, debido a que en las especies Gram (-) relacionadas con alimentos esta enzima está restringida a los géneros Aeromonas y Vibrío.

El almidón y la ampicilina se probaron en 2 medios: agar nutritivo y agar base rojo de fenol (se cogliéndose este último debido a una mayor consistencia en las recuperaciones de A. hydrophila). El almidón y la ampicilina fueron añadidos como agentes diferencial y selectivo respectivamente.

Para lograr una diferenciación entre Aeromonas y Vibrío, el autor probó el antibiótico novobiocina como inhibidor, sin embargo fue rechazado debido a la existencia de cepas de Aeromonas sensibles a este antibiótico. La diferencia final entre Aeromonas y Vibrío debe hacerse mediante pruebas bioquímicas (55).

Originalmente este agar fue diseñado para su utilización en productos de origen animal, sin embargo, otros autores observaron el buen

desarrollo de este medio en muestras de origen vegetal, en las cuales no se aisló ninguna cepa que causara falcos negativos (ii).

b) Agar Simpler-Smetts.

Este medio es una modificación de diferentes medios empleados para el aislamiento de Enterobacterias. Su composición es la siguiente:

+ Hidrocloruro de L-lisina	5 gr
+ Hidrocloruro de L-ornitina	4.5 gr
+ Hidrocloruro de L-cisteína	0.3 gr
+ Maltosa	1.5 gr
+ Tiosulfato de sodio	6.8 gr
+ Azul de bromotimol	0.03 gr
+ Citrato férrico de amonio	0.8 gr
+ Desoxicolato de sodio	1 gr
+ Novobiocina	0.005 gr
+ Extracto de levadura	3 gr
+ Cloruro de sodio	5 gr
+ Agar	13.5 gr
+ Agua destilada	c.b.p 1 lt
+ pH 7	

El medio no se esteriliza en autoclave, se hierve 1 minuto y se distribuye en placas. El inóculo se siembra en superficie y se distribuye con varilla de vidrio. Se incuba a 37 grados Centígrados por 24 horas.

Los ingredientes del medio se seleccionan para permitir una reacción ácida (fermentación de maltosa) o básica (decarboxilación de L-lisina, L-ornitina o ambas). La producción de ácido sulfhídrico depende de

La utilización de tiosulfato de sodio o de la cisteína o ambas, el citrato férrico de sodio ayuda a visualizar esta reacción. Los inhibidores desoxicolato de sodio y novobiocina se agregan para eliminar la flora Gram (+) y Vibrio que pueden causar reacciones falsas. El balance de los ingredientes provee al medio de una base nutritiva y de estabilidad fisicoquímica. Las colonias de A. hydrophila se presentan de color amarillo (68).

Otros estudios realizados sobre la funcionalidad de este medio en aguas provenientes de estuarios (salados) indican que de 30 colonias con esta morfología colonial (amarillo) ninguna demostró ser A. hydrophila (13).

c) Agar Rippey-Cabelli.

Los autores de este medio S.E. Rippey & V.J. Cabelli, idearon toda una metodología para la identificación de A. hydrophila en aguas dulces, por el método de filtración, con la cámara del filtro es un medio diferencial y selectivo cuya composición es la siguiente:

+ Triptona	0.5 gr/100 ml
+ Trealosa	0.5 gr/100 ml
+ Extracto de levadura	0.2 gr/100 ml
+ Cloruro de sodio	0.3 gr/100 ml
+ Cloruro de potasio	0.2 gr/100 ml
+ Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 gr/100 ml
+ Cloruro férrico hexahidratado	0.01 gr/100 ml
+ Anil de bromotol	0.004 gr/100 ml
+ Agar	1.5 gr/100 ml
pH= 8.0	

Se esteriliza a 121 grados por 15 minutos. Después de esterilizar, se añade 1 ml de alcohol etílico, se enfría a 50 grados y se agregan 2 mg de ampicilina y 10 mg de desoxicolato de sodio. Se distribuye en placas.

Los filtros (poro 0.7 μ m; diámetro 47 mm) se colocan en el agar y se incuban a 37 grados por 20 a 25 horas. En este medio, las colonias características de A. hydrophila son circulares, convexas, amarillas y de 1 a 3 mm de diámetro.

La ampicilina se prefirió a la neomicina por las mismas razones anteriormente mencionadas, la trealosa se incluye como fuente de carbono, ya que todas las cepas de A. hydrophila la fermentan. El desoxicolato de sodio a la vez de inhibir a las bacterias Gram (+), aumentan el color de las colonias de trealosa distinguiéndose estas mas claramente de aquellas que no la fermentan y que tienen un color azul verdoso.

El etanol evita el desarrollo de Micobacteria en el filtro. Los demás ingredientes se utilizan como factores de crecimiento para Aeromonas hydrophila o indicadores de acidez. Rippey & Cabelli para la identificación de las colonias presuntivas de A. hydrophila después del aislamiento proponen dos pruebas in situ, que son las siguientes:

+ Manitol: Diferencia entre A. hydrophila y microorganismos manitol negativos como el Chromobacterium. Se utiliza un medio que contiene:

+ Triptona	0.5 gr/100 ml
+ Manitol	0.5 gr/100 ml
+ Extracto de levadura	0.2 gr/100 ml
+ Cloruro de sodio	0.3 gr/100 ml
+ Cloruro de potasio	0.2 gr/100 ml
+ Sulfato de magnesio heptahidratado	0.02 gr/100 ml
+ Cloruro férrico heptahidratado	0.01 gr/100 ml

+ Azul de bromotimol	0.008 gr/100 ml
+ Agar	1.5 gr/100 ml
pH= 6.0	

Esterilizar a 121 grados por 15 minutos, enfriar y agregar 100 mg de desoxicolato de sodio. Se distribuye en placas, los filtros se pasan a este medio (previa identificación de las colonias de A. hydrophila) y se incuba a la misma temperatura por 2 a 3 horas. Las colonias que permanezcan amarillas pueden ser A. hydrophila.

+ Cuidado: Se neutralizan los ácidos formados poniendo el filtro en amortiguador de fosfatos y se transfieren a cojincillas saturadas con N-N'-N"-tetrametil-p-fenilén diamina. Las colonias que en 10 a 15 seg presentan un halo púrpura son positivas.

Estas dos pruebas ayudan a aumentar la especificidad del medio de aislamiento. Es un recurso de 100 colonias productivas solo el 2 % de falsos (+) y el 11 % falsos (-).

Un problema de este aislamiento es la selectividad, ya que cuando se trata de aislar un microorganismo que se encuentra en una cantidad desproporcionadamente baja en relación al total de la población bacteriana, es necesario la utilización de inhibidores ya que aquellos contenidos en el medio (especialmente para Escherichia y Pseudomonas) son poco efectivos en las concentraciones elevadas de estos microorganismos (42).

d) Agar Fril-Xilosa-Ampicilina.

Con la utilización de este medio, no es necesario el empleo de ácidos de enriquecimiento. Los componentes del medio son:

+ Agar nutritivo conteniendo 1 % de xilosa (p/v).	
+ Rojo de fenol	25 mg/lit.
+ Ampicilina	30 mg/lit.
+ Pril	0.02 % (p/v).
+ Agua destilada	1 lit.

Al igual que en los casos anteriores, la ampicilina fungió como agente selectivo, eliminando la mayor parte de Enterobacteriaceae; la xilosa se emplea como agente diferencial ya que las enterobacterias si la fermentan, pero E. hydrophila no. Pril es un detergente cationario de amonio que consiste de una mezcla de sulfato primario de alquilo, sulfonato bencil alquílico y sales. Su función primordial es la eliminación del "swarming" causado por el género Proteus. El rojo de fenol se utiliza como indicador.

En estudios realizados para la evaluación del medio, se observó que el medio sí permitió el desarrollo de algunas enterobacterias, pero su diferenciación se pudo realizar gracias a que son xilosa positivas; sin embargo, algunas enterobacterias demostraron ser xilosa negativas (E. coli, Shigella sonnei, Salmonella, Enterobacter agglomerans, Proteus vulgaris, etc.), pero estos se diferenciaron por ser oxidasas negativas.

Uno de los mayores problemas es el aislamiento de E. hydrophila es al diferenciarla de los miembros de su misma familia, es decir, Vibrion; en este medio es posible hacerlo gracias a que los vibriones son xilosa positivos. Al mismo tiempo no se observó diferencia significativa entre las E. hydrophila recuperadas en el agar pril-xilosa+ampicilina y aquellas recuperadas en agar nutritivo, lo que habla de la buena recuperabilidad de este medio (61).

e) Agar Frit-Xilosa-Ampicilina modificado.

Como su nombre lo indica este medio es una modificación de aquel propuesto por Fogel. Sus componentes son:

+ Base nutritiva	25 gr.
+ Agar	10 gr.
+ Xilosa	1 % (p/v)
+ Suero de fero	25 mg.
+ P-nitrofenil glicerina	25 mg.
+ Ampicilina	20 mg.
+ Agua destilada	1 lit.

pH= 7.2 a 7.4

El medio es esterilizado, se incuba 18 horas, obteniéndose colonias bien separadas; A. hydrophila aparece como colonias rosas que no fermentan la xilosa. Debido a que el pH del medio no es excesivamente ácido la prueba de oxidasa puede ser realizada directamente en placa (43).

f) Agar sales biliares-verde brillante-almidón.

Su composición es la siguiente:

+ Peptona	10 gr.
+ Polvo lab-leuco	5 gr.
+ Sales biliares	5 gr.
+ Cloruro de sodio	5 gr.
+ Almidón soluble	10 gr.

- + Agar 15 gr.
- + Verde brillante (0.05 %) 1 ml.
- + Agua destilada 1 lt.

pH= 7.2

En este medio es recomendado el empleo de un medio de enriquecimiento que es el agua peptonada alcalina (pH= 8.8). El sistema diferencial empleado en este medio es la hidrólisis del almidón, la cual se detecta mediante la adición de lugol, las colonias amilasa positivas (aquellas que presentan un halo de decoloración) se consideran A. hydrophila pudiendo ser inoculadas en el medio propuesto por Sapor (13) para ser identificadas presuntivamente. Aquellas que se comportan como la Aeromonas pueden ser confirmadas con diferentes pruebas bioquímicas.

En pruebas de recuperación realizadas a este medio en comparación con agar soya tripticasa se encontró que no fué inhibitorio para el género Aeromonas. Este medio a probado ser un medio adecuado para la recuperación cuantitativa de las Aeromonas, ya que en el estudio evaluatorio del medio, la mayoría de las colonias amilasa positivas se mostraron ser Aeromonas al realizarse las pruebas de identificación (13).

g) Agar Dextrina-Aglicolina.

Esto es una modificación del medio utilizado por Rippey-Cabelli (6) y se basa en la alta especificidad de la fermentación de la dextrina para la detección de Aeromonas en medios ambientales. Su composición es la siguiente:

- + Triptosa 5 gr.
- + Dextrina 15 gr.

+ Extracto de levadura	2 gr.
+ Cloruro de sodio	1 gr.
+ Cloruro de potasio	2 gr.
+ Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 gr.
+ Cloruro férrico hexahidratado	0.1 gr.
+ Agar de bromotimol	0.05 gr.
+ Agua destilada	1 lit.
+ Agar	15 gr.

pH= 8.0

Esterilizar a 121 grados por 15 minutos, agregar 10 ml de una solución de 1 mg/ml de ampicilina y 10 ml de una solución que contenga 10 mg/ml de desoxicolato de sodio.

Las colonias de Aeromonas hydrophila son aquellas que después de 24 horas de incubación a 35 grados Centígrados presentan una coloración amarilla. La confirmación se puede realizar con pruebas bioquímicas después de purificar la cepa en agar rojo tripticasa. Al igual que en el anterior, en este medio se aconseja el uso de enriquecimiento; en este caso agua peptonada tamponada (pH= 7.2).

Este medio permite una enumeración rápida y confiable de Aeromonas spp. La fermentación de dextrina demostró ser altamente específica, asimismo, la eliminación de la flora asociada que ocasiona este medio demostró ser suficientemente efectiva (22).

h) Agar sangre de borrego-ampicilina.

Al agar sangre de borrego se le adicionan 10 ug de ampicilina por ml. Se utiliza precaldo de agua peptonada alcalina.

El enriquecimiento se inocula e incuba 16-18 horas a 35 grados, posteriormente se siembra en placa incubadosela a 35 grados durante 18-24 horas. En este medio se consideran Aeromonas aquellas colonias húmedas, grises, con o sin presencia de hemólisis. A cada colonia que parezca sospechosa se le realiza la prueba de coagulasa, se pueden identificar con sistemas miniaturoides desarrollados para este fin (API-300) y con su sensibilidad al agente víbricoestático O/129.

A partir de la introducción de este medio en un estudio, los aislamientos se incrementaron marcadamente (en un 13.8 %) (34).

Además de estos medios, se han utilizado para aislar Aeromonas hydrophila otros medios que son específicos para el aislamiento de otros microorganismos. Ejemplos de estos medios son, el agar selectivo Buxier Campylobacter, el agar selectivo para Yersinia enterocolitica (Adicionado con 4 ug de sulfalidina por ml) etc., y por otro lado, se utilizan medios selectivos comunes (Mc. Conkey) con alguna pequeña variación; esta es una razón por la que es imposible hacer una relación detallada de todos los medios que pueden ser utilizados para aislar a este microorganismo.

Así como se han desarrollado una amplia gama de medios para el aislamiento selectivo de esta bacteria, existen diversos estudios en los que se realizan evaluaciones de los medios desarrollados, comparándose unos con otros y, en algunos casos, los autores recomiendan el uso de alguno de los medios comparados.

Los medios que han sido considerados como los mejores son: el agar sangre de borrego con 10 ug de ampicilina por litro de medio (45), agar Fril-Nilona-Ampicilina (37), agar Dextrina-Fucina-Sulfato (35) y el medio Buxier Campylobacter (47).

El agar sangre de borrego con ampicilina ha sido recomendado en mas ocasiones que los anteriores ya que ha mostrado superioridad ante medios como

el agar SMAa, Xilosa-Dioxicolato-Citrato, agar azul de Toluidina-Ampicilina, agar Verde Brillante-Sales Biliures, No. Cooky, agar Ampicilina-Tween 80 y agar selectivo de Yersinia con 4 ug de cefotaxidina por ml.

Sin embargo, dentro de las desventajas que presenta este medio se encuentra el hecho de que la alta concentración de ampicilina que contiene podría inhibir a algunas especies de Aeromonas susceptibles a este antibiótico. Por esta razón se ha llegado a la conclusión de que lo mejor es utilizar este medio en combinación con algún otro ya que el otro medio (que podría ser azul de toluidina-ampicilina o el agar selectivo para Yersinia) sería capaz de detectar ; así lo han demostrado las investigaciones ; aquellas cepas de Aeromonas que podrían verse inhibidas por la alta concentración de ampicilina en este agar (38,48).

El agar dextrina-fucsina-sulfito es un medio desarrollado por una firma comercial (77) ; MERCO ; específicamente para el aislamiento de Aeromonas spp. Dado el prestigio de este fabricante, la calidad de este medio es muy aceptada y se puede considerar como uno de los mejores medios para este fin (77), mientras que el agar Burtier Campylobacter es un medio que por circunstancias fortuitas se ha utilizado para el aislamiento de Aeromonas hydrophila. Este último se ha comparado con el agar sangre de borrego, siendo este encontrado un poco superior al Burtier ; sin embargo, el 39.5 % de las cepas aisladas solo creció en el Burtier (fueron sembradas posteriormente en el agar sangre de borrego ampicilina y se encontró que no fueron inhibidas). Por todo esto este medio se puede considerar como otra opción para utilizarse en conjunto con el agar sangre de borrego con 30 ug de ampicilina (47).

B.- Medios utilizados para su identificación.

Hasta ahora, únicamente ha sido tratado el tema del aislamiento del microorganismo; para hablar de los sistemas de identificación, y siendo que todos se basan en las propiedades bioquímicas de esta bacteria, es necesario hacer una revisión de las características bioquímicas de Aeromonas hydrophila:

+ Crecimiento a 42 grados Centígrados	-
+ Producción de Indol	+
+ Hidrólisis de urea	+
+ Producción de gas de glucosa a 42 grados	-
+ Producción de gas de glucosa a 37 grados	+
+ Citrato de simons	+
+ Crecimiento en RCH	+
+ Producción de H ₂ a partir de tiosulfato	+
3	
+ Fenilalanina desaminasa	-
+ Movilidad	+
+ L-lisina descarboxilasa	+
+ L-ornitina descarboxilasa	-
+ Utilización de malonato	+
+ Reducción de nitrato	+
+ Voges Proskauer	+
+ Rojo de metilo	+
+ Hidrólisis de esculina	+
+ Producción de ácido a partir de:	
+ D-glucosa	+
+ Lactosa	-
+ Sacarosa	+

+ Maltosa	+
+ L-arabinosa	+
+ Rafinosa	-
+ Hye-Insositol	-
+ Dulsitol	-
+ Galactosa	+
+ Trealosa	+
+ Celobiosa	Variable
+ D-sorbitol	-
+ Salicina	+
+ Producción de hemolisina	+
+ Producción de citotoxina	+
+ Oxidasa	+
+ Catalasa	+
+ Sensibilidad a G/129 (%)	-
+ Lecitinas	Variable
+ Hidrólisis de caseína	+
+ Liquefacción de gelatina	+
+ Producción de H ₂ S de cisteína	Variable
+ Fermentación de lactosa	Variable
+ L-arginina deshidrolasa	+
+ Crecimiento sin cloruro de sodio	+
+ Crecimiento en 7.5 % de cloruro de sodio	-
+ Triptofano desaminasa	"
+ Hidrólisis de DNA	+
+ Hidrólisis de RNA	+
+ Hidrólisis de almidón	+

+ Esteerases Tween 80	+
+ Citrato de Christensen	Variable
+ Crecimiento en agua peptonada sin NaCl	+
+ O-nitrofenil-beta-D-galactosidasa (ONPG)	+
+ Fermentación cárnica	-
+ Fermentación alcohólica	-
+ Fermentación adonitol	-
+ Acompilento del malonato	-
+ Acompilento succato	-
+ Acompilento D-tartrato	-
+ Descarboxilación:	
+ L-arginina	+
+ L-histidina	+
+ L-ácido glutámico	+
+ L-serina	+
+ L-alanina	Variable
+ Crecimiento en caldo nutritivo con 7.5 % NaCl	-
+ Deshidrogenasa butanodiol	+
+ Producción de gas de glicerol	+
+ Ácido sulfhídrico de AP 2.5 %	+

(*) O/129= fosfato de 2,4-diamino-6,7-diacetopropil pteridina.

Los valores asentados como positivos son aquellas pruebas donde mas del 50 % de las cepas se comportaron de esa forma (40, 43, 58, 63).

Teniendo como base esta tabla de pruebas bioquímicas, ahora es posible tratar el tema de aquellas medicas o sistemas desecrollados con el fin de identificar o confirmar la identificación de Aeromonas hydrophila. Algunos de estos son:

a) Medio Acetomas Hydrophila:

su composición es la siguiente:

+ Proteosa-peptona	1 gr/lit.
+ Extracto de levadura	1 gr/lit.
+ Triptona	10 gr/lit.
+ Dihidroxiantra de L-cornitina	1 gr/lit.
+ Manitol	1 gr/lit.
+ Inositol	10 gr/lit.
+ Timosalato de sodio	0.4 gr/lit.
+ Citrato férrico de sodio	0.5 gr/lit.
+ Púrpura de bromocresol	0.02 gr/lit.
+ Agar	3 gr/lit.

pH= 6.7

Se distribuye en tubos de 5 ml cada uno y se esteriliza a 121 grados durante 15 minutos. Las colonias se inoculan directamente de las placas o filtros de aislamiento por picadura en el medio. Se incuban a 35 grados de 18 a 24 horas. Para detectar la producción de indol se agregan 3 ó 4 gotas de reactivo de Kovacs directamente en cada tubo.

El principio de funcionamiento del medio es el siguiente: Aquellas bacterias que fermentan el manitol y no descarboxilan la ornitina, producen reacción ácida (amarillo) en el fondo del tubo, con una banda púrpura en la superficie. Aquellos microorganismos ornitina (+) y manitol (+) ó (-), dan reacción alcalina (púrpura) en todo el tubo, debido a que la reacción alcalina de descarboxilación enmascara cualquier producción de ácido via fermentación del manitol. El inositol está presente en 10 gr/lit, la pequeña

cantidad de ácido que puede ser producida por 1 gr/10 de manitol permite a la parte superior del medio cambiar a púrpura mientras que la fermentación de 10 gr de inositol cambia todo el tubo a amarillo.

La pequeña concentración de agar incluida en la formulación permite que la movilidad pueda ser detectada fácilmente observando crecimientos fuera de la línea de inoculación o a través de todo el medio.

La incorporación de proteínas-peptona y extracto de levadura mejora la producción de ácido sulfhídrico, que es detectado empleando tiosulfato de sodio y citrato férrico de amonio como sistema indicador. La producción de ácido sulfhídrico a partir de tiosulfato es observado por la presencia de color negro en el fondo del tubo. La producción de ácido sulfhídrico a partir de cisteína (y no de tiosulfato) es indicada por el ensaprecimiento de la parte superior del tubo pero no del inferior. Para una mejor detección de la producción de ácido sulfhídrico a partir de cisteína se puede alargar la incubación a 48 hrs.

La triptona es incluida en el medio para la prueba de indol. Color rojo o rosa después de agregar el reactivo de Kovacs es (+), color amarillo es (-).

Tabla No.3

ESPECIE	SUPERFICIE	FONDO	MOVILIDAD	H ₂ S	INDOL
<u>A. hydrophila</u>	K	A	+	-	+
<u>E. coli</u>	K	K & A	+ & -	-	+
<u>Salmoneila</u>	K & A	K & A	+	+	-
<u>E. aerogenes</u>	A	A	-	-	-

K: Reacción alcalina.

A: Reacción Ácida.

Se puede observar que E. coli y A. hydrophila pueden dar reacciones idénticas, pero es posible diferenciarlas por el ensayo de oxidasa. Esto es válido ya que este medio es para la identificación presuntiva de A. hydrophila.

Debido a la ausencia de cloruro de sodio en el medio, es posible eliminar la interferencia mas importante en la identificación de A. hydrophila, la presencia de Vibrio parahaemolyticus y otros miembros de la familia Vibrionaceae (5,33).

b) Sistema API.

Estos sistemas consisten de una tira plástica que contiene 10 compartimientos miniaturizados (cápsulas) conteniendo cada uno un sustrato deshidratado para una prueba diferente.

Este sistema no es únicamente utilizado en la detección de A. hydrophila sino que, se emplea para diferenciar bacterias de diferentes grupos taxonómicos (Lactobacillus, Enterobacteriaceae, etc.). Estudios realizados por Washington (79) demuestran que este sistema tiene un 90 % de exactitud en la identificación durante la pruebas iniciales y un 93 % en las repeticiones.

Las pruebas que incluye son las siguientes:

- + O-nitrofenil-beta-D-galactosidasa (ONPG).
- + Arginina deshidrolasa.
- + Lisina descarboxilasa.
- + Ornitina descarboxilasa.
- + Utilización de citrato.

- * Producción de ácido sulfhídrico.
- * Ureasa.
- * Demaminasa de triptófano.
- * Producción de indol.
- * Producción de acetina.
- * Gelatinasa.
- * Fermentación de:
 - Glucosa.
 - Manitol.
 - Inositol.
 - Sorbitol.
 - Sacarosa.
 - Sucrosa.
 - Melibiosasa.
 - Amigdalina.
 - Arabinosa.

La inoculación de estos sistemas es sencilla, simplemente la colonia a estudiar se suspende en agua destilada estéril (pH 7.0) en una cantidad tal que sea suficiente para lograr una densidad de aproximadamente 10^8 células por mililitro (utilizando recuento de Mc. Farland). Las células del API son llenadas con pipeta Pasteur y se incuban a 37 grados durante 18 a 24 horas dejando una pequeña cantidad de agua para evitar la desecación. Pasado este tiempo, se puede realizar la identificación (55).

Estos dos sistemas (medio A. hydrophila y API 30E) fueron sometidos a un estudio comparativo junto con las pruebas bioquímicas simples que los forman. En dicho estudio, se compararon producción de gas, fermentación de manitol e inositol, producción de indol, arginina deshidrolasa y ornitina descarboxilasa.

Existió una alta correlación entre los resultados de los tres sistemas: en la fermentación de ambos alcohólicos, así como en las pruebas de arginina y ornitina. Sin embargo, se detectaron falsos negativos en reacciones como producción de gas en el medio A. hydrophila (74). (es necesario aclarar que, como se observó en el inciso referente el medio A. hydrophila, en algún momento se menciona que este necesita producción de gas).

La perfecta concordancia entre el sistema API y el medio A. hydrophila es el resultado del énfasis que pone ambas técnicas en la identificación basada en el metabolismo de los aminoácidos (15).

Con el fin de diferenciar los diferentes biotipos de A. hydrophila algunos autores realizaron un estudio de las enzimas de Sarcomonas hydrophila para el cual utilizaron el sistema API-27E.

Esto es, precisamente, un sistema para detectar la presencia de enzimas en los microorganismos que se estudian y se képes de detectar y medir la presencia de 19 enzimas, las cuales son:

- + Valina aminopeptidasa.
- + Cistina aminopeptidasa.
- + Quimotripsina.
- + Beta-galactosidasa.
- + Alfa-glucosidasa.
- + Beta-glucosidasa.
- + Beta-glucuronidasa.
- + Fosfatasa alcalina.
- + Butirato esterasa.
- + Miristato lipasa.
- + Tripsina.

+ Quimotripsina.	0 %	
+ Beta-galactosidasa.	88 %	
+ Alfa-glucosidasa.	21 %	
+ Beta-glucosidasa.	88 %	
+ Beta-glucosaminidasa.	2 %	
+ Fosfatasa alcalina.	88 %	
+ Butirato esterasa.	48 %	
+ Nitrato lipasa.	44 %	
+ Tripsina.	79 %	
+ Alfa-amacidasa.	0 %	
+ Alfa-fucosidasa.	0 %	
+ Alfa-galactosidasa.	88 %	
+ Caprilato esterasa-lipasa.	100 %	
+ Leucina aminopeptidasa.	100 %	
+ Fosfatasa Ácida.	100 %	
+ Fosfogamidasa.	100 %	
+ N-acetil-beta-glucosaminidasa.	100 %	{78}.

Existen diferentes medios de siembra directa que han sido designados o adoptados para detectar A. hydrophila, algunos de los cuales fueron estudiados anteriormente.

Von Graevenitz evaluó 9 diferentes medios sólidos y caldos de enriquecimiento en su habilidad para detectar Aeromonas hydrophila y diferenciarla de Enterobacteriaceae y Plesiomonas. Ellos recomendaron el uso de agua peptonada alcalina como un enriquecimiento y varios medios sólidos (Pril-silona ampicilina, dextrina-fucsina-sulfito, etc.) [77].

Después de su aislamiento, la mayoría de los investigadores han empleado API 20E y API 20R para la identificación de Aeromonas hydrophila.

CAPÍTULO V.

TOXICOLOGIA Y PATOGENESICIDAD.

El principal objetivo que se busca en la investigación clínica de un microorganismo, es el saber cuáles son los daños causados por este al ser humano. Así, se puede hablar de efectos causados por invasividad o por la producción y secreción de factores tóxicos.

A continuación se presentan las características de los principales factores tóxicos encontrados en Aeromonas hydrophila, así como algunos de los daños causados por esta bacteria.

1.- TOXINAS PRODUCIDAS.

Aeromonas hydrophila produce diversas enzimas extracelulares como son factores citotóxicos, hemolíticos, lecitinasas, proteasas y enterotoxinas (4,14,16,36,48,49). La producción de estas sustancias sirve de indicador del potencial patológico de esta bacteria, pero sus papeles en las enfermedades humanas no ha sido claramente determinado (13).

El número y la naturaleza de estos factores tóxicos en productos extracelulares de Aeromonas hydrophila no ha sido aclarado, ya que mientras unos investigadores reportan que la fracción tóxica está asociada con la actividad hemolítica, otros consideran que las proteasas son los principales

factores virulentos y otro indica que un factor secretorio es el responsable de la muerte en peces (83).

Se han realizado diversos estudios para la identificación o caracterización de los factores virulentos producidos por esta bacteria. A continuación se presenta una recopilación de información sobre este tema.

Para el análisis de este problema, es necesario el conocimiento de algunos términos de uso común en el lenguaje utilizado en los estudios clínicos sobre toxicología de una bacteria. Así, toxinas citotóxicas (o citotoxicidad) son aquellas que producen un redondeamiento en las células de prueba ; generalmente células adrenales Y , células de ovario de hamster chino, etc.), y generan una esteroidénesis en estas células; también estimulan el AMP cíclico (cAMP) mediante así las secuencias de estímulo en las células (31,42); mientras que las toxinas citotónicas son aquellas que se aferran al morfología al esteroidogénicamente a las células, pero causan secreción y acumulación de fluido en los sistemas intestinales. Una enterotoxina es definida por su habilidad para causar esta secreción de fluido en el lumen intestinal y puede tener características tanto citotónicas como citotóxicas (14,31).

El estudio de los factores tóxicos de A. hydrophila se dividirá en tres partes:

- a) Toxinas citotóxicas.
- b) Enterotoxinas.
- c) Otras toxinas.

a) Toxinas citotóxicas.

El hecho de que la hemorragia sea uno de los principales síntomas inducidos por A. hydrophila y de que la mayoría de las cepas sean hemolíticas

en agar sangre indica que la hemolisina puede ser un factor importante en la patogénesis de la infecciones de A. hydrophila.

Se ha sugerido la producción por parte de A. hydrophila de dos hemolisinas. La primera es producida al final de la fase estacionaria de crecimiento (48 a 60 hrs. de incubación) que es referida como alfa-hemolisina. La segunda es producida al final de la fase de crecimiento logarítmico. Esta última es muy parecida a la toxina citolítica "aerolisina" investigada por Bernheimer, con la diferencia de que la aerolisina se mostró estable en presencia de papaína y esta toxina, denominada, beta-hemolisina no lo fué (48,48,49,50).

+ Alfa-hemolisina.

Como ya se indicó, esta toxina es producida entre las 48 y las 60 horas de incubación, en la parte estacionaria de la fase estacionaria de desarrollo (48). Sin embargo, se cree que el factor hemolítico es sintetizado intracelularmente como precursor en la fase logarítmica de crecimiento, este es activado posteriormente en la fase estacionaria (60). Su producción es mayor a 22 grados Centígrados que a 30 grados, mientras que es reprimida a 37 grados, y es estimuló con la presencia de iones Zinc, inhibiéndose con iones Hierro.

Se inactiva por calentamiento a 56 grados durante 10 minutos. Sus puntos isoeléctricos son 5.3 y 4.3 (+/- 0.1). Entre los efectos patológicos causados por esta toxina se encuentra el ser dermonecrótica para la piel del conejo y fatal para ratones y conejos. Destruye también eritrocitos, siendo los de la rata los mas sensibles y los de la oveja los menos.

Presenta un peso molecular de 30,000 y tiene actividad de fosfolipasa; sin embargo, la caracterización del tipo de enzima del que se

trata se encuentra aún bajo investigación. Produce coag de hemólisis en agar sangre de buey.

En citostáticos a células HeLa (células de tumor humano) y a fibroblastos embrionarios de pulmón humano causando reblandamiento de la célula y desalinamiento del núcleo. El daño causado a las membranas de los fibroblastos de pulmón humano son medidos en base al escape de marcadores intracelulares de diferente tamaño. La alfa hemolisina permite el escape de marcadores de alto peso molecular. Los daños ocasionados en la morfología de las células y su permeabilidad fueron describibles (45,46).

+ Beta-hemolisina.

En 1974 Bernheimer descubrió una toxina, a la que llamó "sequestrina". Esta es producida durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano (aproximadamente a las 30 horas de incubación). El producto purificado es un polvo blanco inabsluamente en agua tamponada a pH 5.0 y poco soluble a pH 7.0 que presenta máxima absorción a 290 m μ y posee un peso molecular entre 50,000 y 51,000.

Su producción es estimulada por la presencia de RNA. Es termolábil ya que su actividad hemolítica es más después de ser calentada a 50 grados Centígrados por una hora a pH 7.0 y es afectada también por el pH ya que a pH 8.3 y a 37 grados tampoco muestra actividad hemolítica alguna. Su actividad se reduce en un 10 a 15 % en presencia de iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ y en un 25 % en presencia de EDTA. Se resiste al ataque por enzimas en muy discutida, ya que mientras Bernheimer observó que altas concentraciones de papaína la protegen contra la inactivación, Ljungh aclaró que es inactivada por esta enzima; estos autores están de acuerdo en que la beta-hemolisina (sequestrina de Bernheimer) es estable al ataque de la pepsina, tripsina y esterase, pero difieren de opinión respecto a la quimotripsina (estable

para Barthelmer e inestables para Ljungb (3.45.46).

En los ratones, ratas y conejos, desarrollamos a estos dos ácidos, indurizado sanguíneo capilar, endurecimiento y necrosis. En pruebas de sus ligadas en conejos, altas dosis de toxina (75 ug) causan acumulación de pequeñas cantidades de fluido sanguíneo cuyo contenido electrolitico difiere mucho del causado por la toxina del cólera (ver tabla No. 4).

TABLA No. 4

TOXINA	Electrolitos				ALBUMINA (g/lit)
	Na	Ca	K ₂ O	Cl	
Cólera	138	1.5	42	84	10
Enterotoxina de <i>E. hydrophila</i>	138	1.6	36	82	10
Beta-hemolisina	122	2.1	3	88	47

Los eritrocitos mas sensibles al ataque de esta toxina fueron los de rata y los menos los de coneja; desarrollándose una clara zona de hemólisis en agar sangre a las 7 hrs. de incubación a temperatura ambiente.

Es citotóxica a una amplia variedad de tejidos, no encontrándose hasta ahora ninguna variedad de célula resistente a su ataque. En fibroblastos de pulmón permite el escape de marcadores de bajo peso molecular (E) a diferencia de la alfa-hemolisina que permite el escape de aquellos de alto peso molecular (C). esto indica que los orificios causados por la alfa-hemolisina son mayores que aquellos causados por la beta-hemolisina (45.46).

Las dos hemolisinas son sensibles a los anticuerpos de ambas, es decir, la alfa-hemolisina es sensible a su anticuerpo y al de la beta-

hemolítica siendo igual en el caso de la beta-hemolisina (43).

b) enterotoxinas.

Esta enterotoxina se considera que es una proteína con peso molecular entre 15,000 y 20,000, se produce al final de la fase logarítmica de desarrollo. Parcialmente purificada es estable aún en tratamiento de 51 grados Centígrados por 30 min., pero es lábil a 60 grados por 20 min. Es destruida por papaína pero conserva más del 75 % de su actividad al ser incubada con tripsina o pronasa (18,45,75).

Aquellas cepas de E. hydrophila que han perdido su enteropatógenicidad, o que originalmente no la presentaron, al ser pasadas dos o mas veces por el intestino de conejo, son capaces de recuperarla. Debido a la susceptibilidad de plásmidos en las células de las diferentes cepas de E. hydrophila, se cree que la regulación de su producción es debida al control cromosómico ; como en el caso de V. cholerae (45).

El hecho de que la toxina sea citotóxica o citotóxica aún está en discusión, la citotoxicidad de la toxina ha sido probada en varios estudios, en uno de los cuales de 31 cepas probadas, 19 mostraron actividad citotóxica variando los tiempos de respuesta desde 30 minutos hasta 3 horas, en relación a la concentración de enzima. La citotoxicidad en esta investigación se comprobó por un pequeño redondeamiento de las células, pero en ningún caso se produjo esteroidogénesis; de hecho, reportan que la toxina ocasionó una depresión en la producción de esteroides (14).

Camberbatch concluyó que existe una correlación importante entre la producción de los factores citotóxicos y hemolíticos ya que estas dos

actividades siempre fueron juntas en los ensayos realizados y sugirió que, o son expresiones de la misma molécula, o están sujetos al mismo control genético. Pero estudios de fraccionamiento, reportaron que A. hydrophila produce la citotoxina y 3 hemolisinas por separado, pero se requiere más investigación para saber si son o no subunidades de la misma molécula (14).

Así, mientras unos investigadores consideran esta toxina como citocidal, basados en el despreciable redondeamiento de las células y el aumento de la producción de esteroides; otros indican que es citocidal, ya que una vez inactivadas las hemolisinas, la toxina sigue causando redondeamiento en más del 50 % de las células, aún cuando esta se encontraba diluida 50 veces; además de inducir esteroidogénesis en células adrenales y con una fase logarítmica menor a la de la toxina del cólera (21,43,46).

La detección de esta esterotoxina es posible, calentando las preparaciones de todas las toxinas a 56 grados Centígrados por 10 minutos para eliminar la interferencia de hemolisinas (44).

Los métodos más usados para la detección de la enteropatógenidad son el método de ratones lactantes y el de sea ligada en conejos, mientras que la prueba de piel en conejos, usada para la detección del colerígeno (enterotoxina del cólera) no se puede utilizar ya que esta actividad es debida a las hemolisinas y no a la esterotoxina (79). El parecido existente entre la enterotoxina de A. hydrophila y el colerígeno, se confirma con las composiciones electrolíticas de los fluidos secretados en el intestino de conejo (ver tabla No. 4) pero es posible diferenciarla, por un lado con la prueba de piel en conejos y por otro debido a que inhibidores de prostaglandinas (como indometacina y fensilbatona) evitan la acumulación de fluido en el lumen intestinal de sistemas experimentales, mientras que estos factores no afectan la actividad enterotóxica de Aeromonas hydrophila (43,46).

Independientemente de la citotoxicidad o citotonicidad de A. hydrophila algunos autores indican que no existe correlación aparente entre la enterotoxigenicidad y los síntomas clínicos ya que el 41 % de las cepas aisladas de muestras fecales diarréicas fueron enterotoxinas negativas (5). Otro trabajo de investigación confirma esto ya que solo en dos casos de 57 voluntarios inoculados con cepas enterotoxigénicas se produjo diarrea (37). Contrariamente a esta opinión, otros autores indican una fuerte asociación entre la enterotoxigenicidad y las cepas aisladas de gastroenteritis. Esta clara divergencia de opiniones solo indica la necesidad de investigaciones adicionales para aclarar la importancia en la síntesis de enterotoxina en relación a la virulencia de cepas aisladas de A. hydrophila (6).

Ha sido reportada una importante relación, rebatida por algunos autores (37,44), entre la habilidad de producir la enterotoxina, los agrupamientos taxonómicos (ver tabla No. 5) y los resultados en 5 pruebas bioquímicas (ver tabla No. 6).

TABLA No. 5

EXAMEN	<u>A. hydrophila</u>	<u>A. caviae</u>	<u>A. sobria</u>
Lisis	100	6	100
V.P.	100	0	88
Gas de glucosa	88	6	82
Oxidación gluconato	95	6	88
Hemólisis eritrocitos			
Numerosa	95	0	100
Producción enterotoxina	95	11	94

TABLE NO. 4

ENSAYO	ENTEROTOXIGENICAS	NO ENTEROTOXIGENICAS
Lisis	93	24
V.F.	85	28
Co. gluconato	83	28
Hemólisis eritrocitos	87	17
Gas de glucosa	77	31
Hidrólisis de xantina	74	23

Los valores de ambas tablas se están dando en porcentajes de cepas positivas.

Basado en estos resultados, Turnbull considera que un laboratorio no equipado especialmente puede asegurar, con alto grado de confianza, si una cepa puede ser enterotoxigénica o no (17).

Algunos autores han demostrado que las características enterotoxigénicas, citotóxicas y hemolíticas, están determinadas por tres diferentes genes, localizados en tres diferentes sectores cromosómicos, esto puede explicar la existencia de cepas con diferentes propiedades de virulencia.

Como se puede observar, existe una gran diferencia de opiniones en lo que se refiere a la enterotoxigenicidad de S. hydrophila. Estas discrepancias pueden explicarse refiriéndose a la sensibilidad de los sistemas de ensayo y a la estabilidad o expresión de los sistemas genéticos codificadores de la toxina (18). La enterotoxigenicidad ha sido aserita a una

enterotoxina citotóxica por unos autores, otros consideran que la beta-hemolisina es el factor patogénico mas importante; sin embargo, la falta de cepas hemolíticas en causar diarreas en voluntarios humanos, sugiere que la hemolisina no es el único determinante de la enterotoxigenicidad, confirmando así la presencia de una enterotoxina (32).

c) otras toxinas.

Además de los dos principales factores virulentos anteriormente estudiados, se consideró que A. hydrophila presenta otros, como son la leucocidina, fibrinolisisina y algunos inhibidores del canal de sodio. Sin embargo, estos no han sido completamente caracterizados y, por ejemplo, muchos de los datos reportados para la leucocidina coinciden con los de la hemolisina (45).

Se ha detectado una actividad de esfingomielinasa y lecitinasa en cepas de A. hydrophila. La primera aparece en la fase estacionaria y depende de la presencia de iones magnesio (42). La segunda, mostró una producción con mayor rendimiento en la fase tardía del crecimiento logarítmico. Este tipo de toxinas se encuentran en espera de una mayor caracterización así como de una clara definición de su papel patológico (45). Estas toxinas, al ser proteínas, forman parte del perfil proteínico del microorganismo; ha sido estudiado el efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de estas proteínas. Sin embargo, la importancia de la alteración causada por la temperatura de incubación en la cinética de crecimiento y los perfiles proteínicos es incierta (71).

La estructura química de los inhibidores del canal de sodio no está totalmente identificada, pero la evidencia cromatográfica indica que el compuesto activo es la tetrodotoxina o un grupo de compuestos relacionados a

ella, y el papel de estos inhibidores en enfermedades, se encuentra actualmente bajo investigación (73).

Después de haber revisado este tema, es posible observar la confusión que existe en la identificación de las toxinas producidas por A. hydrophila. La mayoría de las cepas aisladas son citotóxicas a cultivos celulares, efecto que se considera causado por las hemolisinas; por otro lado, algunos investigadores han reportado la producción de una enterotoxina citotóxica por algunas cepas (5).

La mayor parte de las investigaciones concernientes a la toxicología del género Aeromonas, se refiere a la especie A. hydrophila; sin embargo, otra especie de importancia toxicológica es la A. salmonicida, cuya principal toxina se conoce como salmonicinas y tiene un peso molecular de aproximadamente 200,000; muestra máxima absorción a una longitud de onda de 275 nm. Se encuentra clasificada en el grupo de las glicoproteínas ácidas ya que presenta una gran cantidad de carbohidratos, es termolábil y estable a pH's neutros. Su actividad se ve inhibida por iones metálicos como Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , así como por agentes reductores como la cisteína y el glutatión y se ve estimulada por la presencia de detergentes aniónicos como el desoxicolato de sodio a bajas concentraciones. Las enzimas que inhiben su actividad son subtilisina y tripsina (82). Además de esta proteasa, A. salmonicida presenta una hemolisina y una leucocitolisina (20).

3.- DAÑOS CAUSADOS AL SER HUMANO.

Al considerar la patogenicidad de este microorganismo, además de analizar los diferentes factores de virulencia que se han detectado en él, es muy importante el establecer equívocos datos que esos factores tóxicos

ocasionan.

A. hydrophila es un patógeno que ha empezado a cobrar importancia desde hace aproximadamente unos 10 años; en la mayoría de los estudios involucrados con la patogenicidad de esta bacteria, esta se ha asociado con diarreas y daños gastrointestinales principalmente, lo que ha llevado a considerarla como agente etiológico de gastroenteritis (25). Sin embargo, las enfermedades ocasionadas por Aeromonas ocupan una amplia gama que va desde daños gastrointestinales leves hasta meningitis y otros padecimientos fatales. En la tabla No. 7 se puede apreciar la distribución anatómica de las infecciones producidas por Aeromonas hydrophila:

TABLA No. 7

SITIO	PORCENTAJE
Tracto gastrointestinal	60
Abcesos/heridas	18
Tracto respiratorio	10
Sangre	11
Otros Fluidos	20

Esta tabla confirma que el sitio más común de aislamiento es el tracto gastrointestinal, mientras que su aislamiento es menos común en cultivos de sangre y otros fluidos (bilia, fluido peritoneal y afluentes de dialisis) (26).

En una investigación general sobre la patogenicidad de este microorganismo se recuperaron Aeromonas de diferentes partes del organismo de personas con diversas enfermedades. El resumen de lo encontrado en dicho estudio se encuentra en la tabla No. 8.

En esta tabla, se pueden observar, tanto la variedad de tipos de infección de Aeromonas como la predominancia de A. sobria; esto apoya la hipótesis relacionada con el potencial patológico de Aeromonas.

También es importante recalcar la presencia de enfermedades secundarias presentes durante la infección (las cuales pudieran ayudar al desarrollo de Aeromonas debilitando inmunológicamente al paciente) y la aplicación de diversos agentes antibióticos. (18).

A continuación se presenta una revisión bibliográfica de los principales daños causados por Aeromonas al ser humano.

4) Gastroenteritis.

Desde principios de los años 60's, el género Aeromonas ha sido sospechoso de causar gastroenteritis bacterial aguda. La incidencia de la diarrea causada por Aeromonas puede ser la causa más común de gastroenteritis en algunas regiones, o por lo menos, ser en rival de los patógenos entéricos tradicionales como Campylobacter, Salmonella y Shigella (29).

A pesar de esto, las especies de Aeromonas no han llegado a ser generalmente aceptadas como patógenos entéricos; la razón de esto puede ser una incorrecta identificación en el laboratorio que ha llevado a errores y fallos en el aislamiento de Aeromonas en pacientes con diarrea, mientras que iguales aislamientos en pacientes sin diarrea no han sido probados en su enteropatógenicidad (8).

Se ha encontrado una asociación estadística entre la recuperación de las especies de Aeromonas y la presencia de sintomatología. En uno de estos trabajos se estudió la recuperación de patógenos entéricos en niños. Los resultados indican que el 30.8 % de los niños que mostraban síntomas de

gastroenteritis presentaron Sarcosina en sus muestras mientras que solo el 0.6 % de los niños asintomáticos las presentaron (19).

Otro hecho que habla del papel de este microorganismo en la gastroenteritis radica en que la evidencia serológica de de estas infecciones respeta la presencia, durante la enfermedad o mas tarde durante la convalecencia, de anticuerpos contra de los productos celulares de Sarcosina hydrophila (enterotoxinas, hemolisinas, etc.) (27).

Un estudio realizado en Australia demostró que cepas enteropatógenicas de Sarcosina son causas de gastroenteritis en niños, en mas del 10 % de los pacientes, pero en solo el 0.7 % de los individuos control (pacientes sin diarrea) se aisló Sarcosina hydrophila enteropatógena, mientras que en el aislamiento de cepas enteropatógenicas se se detectó una diferencia significativa entre los dos grupos. De todos los pacientes con diarrea, el 14 % tenía una o mas de las bacterias reconocidas como patógenas entéricas en sus muestras, mientras que en el grupo control la tasa de aislamiento de todas estas bacterias fue menor del 2 % (6). Toda esta evidencia apoya la asociación de Sarcosina con diarrea. Otras investigaciones han concluido que la tasa de aislamiento de Sarcosina en individuos sin evidencia de gastroenteritis es tan alta como del 3.2 %. Más mas, se ha fracasado en encontrar una diferencia significativa entre la tasa de aislamiento de Sarcosina en pacientes asintomáticos de aquellos que si presentaron la sintomatología típica. Estas discrepancias de información pueden encontrar una explicación en la utilización de diferentes métodos de aislamiento o bien, estar relacionadas con los biotipos de las cepas aisladas (28).

A pesar de todas estas limitaciones, se ha propuesto aceptar a Sarcosina hydrophila como un neopatógeno enterotoxigénico (29).

La presencia de distonias gastrointestinales en personas que llevaban

un tratamiento con antibióticos a los cuales Aeromonas era resistente (ampicilina, carbenicilina, cefalotina) y la desaparición de los síntomas en aquellos que tomaron antibióticos efectivos en contra de Aeromonas (trimetoprim-sulfametoxazol) indican que algunas especies pueden ser patógenas para huéspedes sanos (27).

La gastroenteritis producida por Aeromonas ha sido reportada de tan diversos lugares como Australia, Estados Unidos, Gran Bretaña, Dinamarca, Canadá, Francia, Nigeria, Tailandia, India, Bali, Singapur, China e Italia. La máxima incidencia se ha reportado durante los meses cálidos del año probablemente debido a un aumento de Aeromonas en el ambiente. Afecta a grupos de cualquier edad, sin embargo, los casos más reportados son en niños menores de 2 años, esto puede indicar, por un lado una alta susceptibilidad a la infección en esta edad o bien, que en los adultos es menos común el buscar atención médica por ataques de gastroenteritis (29,30).

Se han investigado las fuentes de contaminación por Aeromonas indicando, algunos autores, que la ocurrencia de infecciones por Aeromonas estaba fuertemente asociada con el hecho de haber bebido agua sin tratamiento de potabilización, mientras que no existía ninguna relación significativa entre la infección y el consumo de pescado o mariscos (16,30).

La mayoría de los investigadores coinciden en que el principal síntoma de esta infección es la diarrea, que varía desde la diarrea líquida fulminante (3 a 20 veces por día) hasta la sanguinolenta, cuya duración puede ser corta o prolongada (mas de dos semanas) que cesa espontáneamente (24,26,27,41,44,55,35), es decir, puede ser diarrea crónica o aguda.

Moayer indica que los síntomas provocados por Aeromonas son diarrea y dolores abdominales, y añade que es aguda cuando es provocada por Aeromonas hydrophila y por Aeromonas sobria, mientras que es crónica (de hasta 4 a 5

semanas] cuando es provocada por Aeromonas caviae. Esta variedad de síntomas sugiere una etiología compleja en la cual las cepas posean diversos factores virulentes en diferentes combinaciones (50).

En la tabla No. 9 se establecen las diferentes presentaciones de la diarrea mostrada en la gastroenteritis provocada por Aeromonas.

TABLA No. 9

TIPO DE DIARREA	CARACTERÍSTICAS	FRECUENCIA
Secretora.	Diarrea líquida aguda, usualmente con vómito.	Muy común.
Disentérica.	Diarrea líquida con sangre y moco.	Muy común.
Crónica.	Diarrea persistente por más de 10 días.	Común.
Coleráica.	Diarrea "rice-water".	Rara.
"De viajeros".	Varía su presentación.	Desconocida.

La primera es la mas común, se ve diarrea líquida de varios días de duración; otros síntomas que se pueden presentar son temperaturas de hasta 40 grados y dolores epigástricos. El vómito está asociado frecuentemente con los niños mas pequeños pudiendo estar ausente en individuos mayores (29,50).

La forma disentérica es caracterizada por calambres abdominales [retortijones] acompañados de partículas macroscópicas de sangre y moco en la muestra. Debido a la severidad de los síntomas, estos pacientes requieren de hospitalización y de terapia antimicrobiana antes de que desaparezcan de los síntomas (29).

Una manifestación menos común es la forma crónica de la

gastroenteritis de Aeromonas, en este, la diarrea excede los 10 días de duración pudiendo persistir en periodos que van desde 6 semanas hasta varios meses. En algunas ocasiones otros síntomas que acompañan a la diarrea son pérdida de peso, deshidratación, ausencia de leucocitos, mientras que el dolor abdominal y la diarrea sanguinolenta normalmente están ausentes (26,27).

Ocasionalmente han sido reportadas enfermedades parecidas al cólera atribuidas a Aeromonas; el cólera es una enfermedad causada por el Vibrio cholerae y se caracteriza por una diarrea líquida y una pérdida de electrolitos potencialmente letal. Todos los efectos fisiopatológicos del cólera son debidos a una enterotoxina que estimula la secreción de un fluido secretórico por los enterocitos del íleon terminal delgado. Las muestras obtenidas de pacientes con enfermedad parecida al cólera atribuida a Aeromonas consistieron de muestras diarreicas típicas formadas de un líquido turbio opalescente que contenía gránulos blancos. Los anticuerpos generados durante la convalecencia de esta enfermedad fueron neutralizados por la enterotoxina y la hemolisina de las cepas de Aeromonas aisladas del paciente.

En este caso, existen factores que indican que el posible causante sea Aeromonas sobria, uno de esos factores son:

- + La facilidad en su aislamiento en las muestras del paciente.
- + Resultados negativos para Vibrio cholerae, E. coli y otros patógenos.
- + La presencia de sustancias tóxicas en el filtrado libre de células de esta cepa.
- + El ya mencionado sustrato, es el suero del paciente, de anticuerpos neutralizantes de enterotoxina y hemolisina de esta cepa.

Esta enfermedad ha sido tratada con cloranfenicol; sin embargo, se ha reportado un caso fatal debido a la implacable naturaleza de la diarrea (13,28).

Se ha sugerido a Aeromonas como causa potencial de la llamada "diarrea de viajeros"; cuya frecuencia es desconocida. Se han reportado casos de sujetos que han viajado por el sureste asiático e Italia, así mismo, unos trabajadores de Tallandia desarrollaron una diarrea causada por Aeromonas dentro de las primeras 8 semanas de su llegada a ese país, los síntomas persistieron entre 2 y 12 meses antes de que los sujetos recibieran atención médica. Se ha propuesto un tratamiento a base de tripotoprima y fampetoxacoil para este tipo de diarrea (29,30).

Debido a que la mayoría de los estudios de la diarrea asociada con Aeromonas han fallado en provocar un análisis fecalítico de las cepas estudiadas o en relacionarlas con la taxonomía actual, es difícil determinar cuales especies de Aeromonas están relacionadas con las diferentes presentaciones diarreicas. Sin embargo, la mayoría de los estudios a la fecha indican a Aeromonas hydrophila y a Aeromonas sobria como las principales especies enteropatógenicas, mientras que Aeromonas parvum es considerada como la especie menos virulenta (18,29).

b) Heridas infectadas.

Esta es el segundo daño mas importante causado por Aeromonas. Una diferencia entre estas infecciones y la gastroenteritis es que en las heridas infectadas la fuente de la cepa causante de la infección normalmente es conocida y casi invariablemente es ambiental. En éstos casos, la infección es comúnmente precedida por un evento traumático en el cual la persona es lacerada por Aeromonas debido a que tiene contacto con aguas contaminadas u objetos sucios. Entre los eventos traumáticos que preceden una infección por Aeromonas se encuentran accidentes automovilísticos, de buceo en aguas dulces o saladas, mordidas de escorpiones, cortadas con vidrios rotos, etc. (13,29,33).

Este tipo de infecciones pocas veces se han observado en individuos inmunológicamente competentes, siendo más común su presencia en individuos inmunológicamente comprometidos (30).

Estas infecciones pueden ocurrir en cualquier superficie cutánea o mucocutánea, pero los sitios más comunes incluyen extremidades (manos y piernas). Las manifestaciones clínicas son muy variadas, desde celulitis ligera hasta hasta mionecrosis fulminante. Estas diferencias en las variaciones clínicas se han relacionado con distintos elementos como son el sitio de inoculación, el estado inmunológico del hospedador, la concentración del microorganismo infectante, etc. Las manifestaciones clínicas de estas infecciones se encuentran resumidas en la tabla No. 10.

TABLA No. 10

TIPO DE INFECCIÓN	FRECUENCIA	PAATOLOGÍA	RECUPERACION DEL PACIENTE
Celulitis	Común	Inflamación tejido conectivo tiene parecido a celulitis de <u>Str. beta-hemolítico</u> . Visto como úlcera granulomatosa.	Normalmente completa
Mionecrosis con o sin gangrena.	Rara.	Hemorragia, necrosis, lisis y separación de fibras musculares, formación subcutánea de gas, licuefacción de músculo.	Normalmente requiere amputación (*).
Ecthyma gangrenosum.	Poco común.	Asociado con sepsis bacteriana lesiones típicas de ecthyma con borde eritematoso y centro necrótico.	A menudo fatal.

(*) Alta mortalidad asociada con cultivos de sangre positivos. A menudo fatal; requiere tratamiento antimicrobiano.

El tipo más común de infecciones en heridas ocasionadas por Aeromonas es la celulitis, la cual sin el tratamiento adecuado puede convertirse en una enfermedad progresiva involucrando tejido suave. El curso progresivo de la mionecrosis ocasionada por Aeromonas por daño muscular normalmente resulta en la amputación del miembro; en este tipo de infección se han reportado casos de aislamiento de cepas de Aeromonas con cultivos en sangre positivos, que resultaron fatales; mientras que aquellos con cultivos en sangre negativos sobrevivieron. Ocasionalmente la mionecrosis aeromonal va acompañada de gangrena con gas (parecida a la mionecrosis del Clostridio). En la autopsia de uno de estos casos, se encontró necrosis del tejido muscular y fascia profunda (aponeurosis) con formación subcutánea de gas detectándose Aeromonas hydrophila en la sangre y el músculo del paciente. En estos casos se logra la recuperación mediante un tratamiento antimicrobiano (gentamicina) o mediante la amputación, eliminado así una enfermedad que normalmente es mortal. Las lesiones de ecthyma gangrenoso ocasionadas por Aeromonas aparecen durante el curso de un enfermedad bacterémica. Las lesiones presentadas durante la infección parecen ser una forma más avanzada del ecthyma gangrenoso causado por Pseudomonas aeruginosa; el tratamiento más adecuado parece ser un tratamiento antimicrobiano y el uso de injertos de piel en el área afectada.

En el reporte de otras heridas infectadas por Aeromonas, se utilizaron exitosamente fresas de tetraciclina (tratamiento de 10 días con 4 dosis de 100 mg por día) (19,22).

c) Septicemia.

La enfermedad mas invasiva provocada por Serratia hydrophila originalmente fué detectada solo en pacientes inmunocomprometidos, pero ya se ha reportado en pacientes no inmunodeficientes y, en grupos de todas las edades, las manifestaciones clinicas son similares a aquellas observadas en bacteremias causadas por otras bacterias gram (-) como son: fiebres, escalofríos, hipotensión y, menos común, males gastrointestinales y pulmonares. Un resultado de las características presentadas por los pacientes con bacteremia aerobica se encuentra listado en la tabla No. 11.

Se puede observar que este tipo de bacteremia es mas común en hombres que en mujeres así como que es mas frecuente su adquisición en la comunidad que en hospitales. En la mayoría de estos estudios no existe un evento identificado como causante de la infección. Un pequeño porcentaje (10-15 %) presenta lesiones de ecthyma gangrenosum que macroscópicamente parecen idénticas a las observadas en la infección causada por Pseudomonas aeruginosa (29).

Algunas condiciones clinicas que predisponen a sufrir de bacteremia aerobica incluyen males hematológicos, tumores, malfuncionamiento hepático, desórdenes hepatobiliares y daños traumáticos. Está reportado un estudio en el cual pacientes en tratamiento contra enfermedades neoplásicas desarrollaron este tipo de septicemia. La mayoría de ellos tenía serias sus defensas como efecto secundario de la neoplasia (normalmente leucemia) o de enfermedades hepáticas. Entre los pacientes se destaca 3 casos que pueden ser considerados como representativos de los diferentes estados de alteración. El primero era un paciente con un tumor que presentaba una depresión cuantitativa de leucocitos polimorfonucleares (que morfológicamente estaban normales) como

TABLE NO. 11
continued

Institución	AÑO/PERÍODO DE ANÁLISIS		N.º de personas que están o estuvieron en la institución, pertenecientes al grupo étnico/indígena/grandino				Mujeres en la institución, pertenecientes al grupo étnico/indígena/grandino	
	Tasa	Total	Grupo de edad	Sexo	Estado civil	Total	%	
01	1.5	59	20-30	40	7	20	34	
02	2.3	8	18-24	40	0	10	25	
03	6.7	66	10-20	60	71	0	0	
04	2.2	31	1-75	31	3	21	68	
05	1.4	43	20-30	23	20	11	26	
TOTAL								
104	2.1	20	18-24	40	9	14	70	

efecto secundario de la quimioterapia. Al ser eliminada esta terapia y volver su cuenta de glóbulos blancos al nivel normal, el paciente se recuperó normal mente; el segundo es un paciente con defectos cualitativos y cuantitativos de leucocitos polimorfonucleares debido a una leucemia blastica aguda. éste murió después de una quimioterapia infructuosa; el tercero tuvo una alta cuenta de granulocitos periféricos con una muy poca común disproteinemia, esto puede ocurrir en pacientes con niveles de glóbulos blancos normales o elevados.

Los principales focos de infección por Aeromonas se cree que son heridas infectadas o infecciones del tracto gastrointestinal y, menos comunente, del tracto respiratorio y biliar. La frecuencia de la bacteremia aeromonal es desconocida, los escasos reportes en la literatura lo sugieren como un evento poco común (29,36,44).

d) Meningitis.

Solo se ha reportado un caso, en el cual la enfermedad se desarrolló a los 4 días de una escotoma craseotomía frontal. El aislamiento de Aeromonas y su desaparición del fluido espinal después de la quimioterapia acompañado de un decremento en la cuenta de leucocitos, estableció a Aeromonas hydrophila como causante de la meningitis, cuyos síntomas fueron, cultivo de A. hydrophila positivo en agar sangre, baja concentración de glucosa en fluido espinal, fiebre alta, confusión mental y rigidez de la nuca. El paciente se recuperó después de un tratamiento severo con diversos antibióticos como gentamicina y carbenicilina; como se detectó que la cepa era resistente a carbenicilina se cambió a cloranfenicol, después de dos semanas con este tratamiento quimioterapéutico, se recuperó el estado mental; la concentración de glucosa en fluido espinal se normalizó y disminuyó la cuenta de leucocitos en el fluido espinal con lo cual se dió de alta al paciente. Es necesario

señalar que en este caso el paciente no se encontraba inmunológicamente comprometido (27,27).

e) Tracto respiratorio.

Los aislamientos de Aeromonas hydrophila del tracto respiratorio carecen de importancia clínica debido a lo esporádico de estos reportes, al bajo número de bacterias encontradas y a la presencia de otras patógenas potenciales. De los diez aislamientos reportados en la tabla No. 7 todos menos 1 (del pezón) fueron considerados como insignificantes clínicamente (27,29).

f) Infecciones oculares.

Varían desde una simple conjuntivitis hasta una endoftalmitis. Se han reportado casos de úlcera corneal en los cuales se indica que la infección fué el resultado de un trauma causado por un cuerpo extraño en el ojo, dichas infecciones se corrigieron con la aplicación de gentamicina. Otras fuentes de contaminación se cree que pueden ser los lentes de contacto o las soluciones para los ojos (gotas) (29,37).

g) Otitis.

En ocasiones las lagrimas pueden estar involucradas en infecciones raras, que pueden llegar a convertirse en otitis, la cual requiere de un prolongado tratamiento antimicrobiano para su recuperación. En los casos reportados el origen de la infección fueron heridas con objetos sumergidos en

agua dulce. El tratamiento consistió de la administración de antibióticos de amplio espectro (28,37).

Además de estas infecciones se han reportado casos de peritonitis, infecciones ginecológicas (carcinoma de los ovarios) y otras en las cuales las cepas de Aeromonas se encuentran involucradas. A pesar de todos estos estudios es necesario ahondar más en la investigación clínica de las patologías causadas por Aeromonas para así poder definir claramente la etiología de la infección, su desarrollo y el tratamiento más adecuado para lograr la completa recuperación de los huéspedes infectados (27,38,39).

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

El objetivo de la tesis fué el realizar una investigación bibliográfica, tan profunda como fuera posible, sobre los diferentes aspectos de Aeromonas hydrophila, así como el presentar a este microorganismo como un posible agente etiológico de enfermedades humanas, despertando así el interés de los microbiólogos sanitarios para que este microorganismo sea considerado como un patógeno potencial dentro del campo microbiológico de los alimentos.

La investigación cubrió los aspectos taxonómicos, morfológicos, analíticos y patológicos de este microorganismo; observando que esta bacteria ha sido poco estudiada si se compara con otros patógenos mas comunes como Salmonella, E. coli o incluso V. cholerae. Esto deja campo abierto a los investigadores del área de la microbiología, sea clínica o alimenticia, para la búsqueda de respuestas a preguntas que incluyen desde el aspecto taxonómico hasta el aspecto patológico del microorganismo.

A lo largo de toda esta investigación es posible observar las diferencias de opiniones que existen en casi todas las áreas relativas a Aeromonas. Así, se tiene, en el aspecto taxonómico, los avances logrados en 1976 por Pappof al establecer un sistema taxonómico ampliamente aceptado pero que, sin embargo, dejó inconformes a diversos investigadores como Janda y Ljaneq ya que sus estudios indican la existencia de numerosas Aeromonas que no encajan en ninguno de los grupos reconocidos, y esta intipificación de cepas,

es posiblemente la que ha llevado al descubrimiento de "nuevas" especies como A. yersonii, A. schubertii y A. media. Por esta razón, se debe establecer un sistema taxonómico unificado basado en pruebas bioquímicas, serológicas, de composición de DNA, de la pared celular, o una mezcla de estos; pero que este sistema sea constante y así adaptar las actuales clasificaciones a este nuevo sistema "universal".

En lo que respecta al hábitat y ecología se acepta por todos los especialistas el que este microorganismo sea predominantemente acuático, ya sea de agua salada o dulce, pero son necesarias las investigaciones en el área de los alimentos debido a que no se les ha dado la suficiente importancia como vehículo de Aeromonas hydrophila a pesar de que se ha relacionado a Aeromonas hydrophila con la descomposición de alimentos y ha sido aislada de productos como pollo, carne, leche, mariscos, etc.

A. hydrophila ha demostrado ser un microorganismo mesófilo que se desarrolla mejor en un medio que contenga una determinada cantidad de sal [que dependerá de la temperatura de incubación, pero que se puede establecer entre 1 y 1.5 %]; es aeróbico, pero bajo determinadas condiciones puede desarrollarse en sistemas anaeróbicos o microaeróbicos.

Para el aislamiento de este microorganismo se han utilizado diferentes medios de cultivo. Con base en los conocimientos adquiridos durante el desarrollo de este trabajo, y en lo reportado en los artículos afines al tema, se recomienda el siguiente sistema de aislamiento:

- + Medio de enriquecimiento: Agua peptonada alcalina.
- + Medio selectivo: Agar dextrina-fucina-sulfito o agar sangre de borrego con ampicilina.
- + Identificación Medio Kaper, sistema API 20E o las pruebas bioquímicas específicas de éstos.

Esta bacteria es generalmente reconocida como un agente patógeno

cesante de diversos tipos de daños al ser humano, así como el hecho de que la causa de su patología sea la secreción de factores tóxicos; sin embargo, no existe un acuerdo en la determinación del factor tóxico más dañino, ya que en los ensayos realizados para cada uno de ellos se demostró que todos pueden ser causa de la enfermedad. A pesar de esto, se aceptado el hecho de que una enterotoxina es la causa principal de la enfermedad, que puede ir desde una simple diarrea hasta una meningitis.

La presencia de enfermedades tan graves como la meningitis, septicemias, gangrenas, trastornos gastrointestinales, en los que se ha aislado a Aeromonas hydrophila habla por sí mismo de la importancia clínica de este microorganismo que debe ser considerado ya como un patógeno de primera importancia, olvidándose ya de Aeromonas como un patógeno secundario. Esto debería llevar a un interés renovado por parte de los investigadores del área en el estudio de esta bacteria, del cual se ha visto que es obvia su necesidad.

BIBLIOGRAPHIA.

1.- Abayta Jr., Carlos; Steina, Geard W. Isolation and identification of motile Aeromonas species. FDA Bacteriological Analytical Manual. Chapter 39. 8 th edition, 1984.

2.- Adams, D.; Atkinson, H. M. Aeromonas hydrophila typing scheme based on patterns of agglutination with erythrocytes and yeast cells. J. of clinical microbiology 17 (3). 422-427. 1981.

3.- Bernheimer, Alan W.; Avigad, Lois. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from Aeromonas hydrophila. Infection and Immunity 9 (6). 1016-1021. 1974.

4.- Boulanger, Y.; Lallier, M. Isolation of enterotoxigenic Aeromonas from fish. Canadian J. of microbiology 23. 1161-1166. 1977.

5.- Buchanan, Robert L.; Palumbo, Samuel A. Aeromonas hydrophila and Aeromonas sobria as potential food poisoning species: a review. J. of food safety 3. 12-29. 1980.

6.- Burke, V.; Gracey, M. The microbiology of childhood gastroenteritis: Aeromonas species and other infective agents. J. of infectious diseases 149 (1). 48-74. 1983.

7.- Burke, V.; Robinson, J. Biochemical characteristics of enterotoxigenic Aeromonas spp. J. of clinical microbiology 15 (1). 48-52. 1983.

8.- Burke, V.; Robinson, J. Typing and virulence factors in clinical and environmental isolates of Aeromonas species. Applied and environmental microbiology 47 (6). 1146-1149. 1984.

9.- Burke, V.; Robinson, J. Isolation of Aeromonas from a metropolitan

water supply: seasonal correlation with clinical isolates. Applied and environmental microbiology 40 (2). 161-166. 1984.

10.- Burke, V.; Robinson, J. Isolation of Aeromonas spp. from an unchlorinated domestic water supply. Applied and environmental microbiology 40 (2). 167-170. 1984.

11.- Callister, S.; Apper, W. A. Enumeration and characterization of Aeromonas hydrophila and Aeromonas caviae isolated from spacer store products. Applied and environmental microbiology 33 (2). 249-253. 1987.

12.- Cavari, A. I.; Allen, B. A. Effect of temperature and activity of Aeromonas spp. and mixed bacteria populations in the Anzania river. Applied and environmental microbiology 41 (4). 1082-1084. 1981.

13.- Champseur, H.; Andreouet, A. Cholera-like illness due to Aeromonas sobria. J. of infectious diseases 145 (2). 248-254. 1982.

14.- Chamberbatch, H.; Garwith, M. J. Cytotoxic enterotoxin produced by Aeromonas hydrophila: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. Infection and Immunity 23 (3). 829-837. 1979.

15.- Davis, J. M.; Sizemore, B. E. Nonselectivity of Simlar-Shotts medium for Aeromonas hydrophila in estuarine environments. Applied and environmental microbiology 42 (2). 344-345. 1981.

16.- Donta, S.; Hedrow, A. D. Cytotoxic activity of Aeromonas hydrophila. Infection and Immunity 21 (3). 989-993. 1976.

17.- Dooley, J.; Lallier, R. Surface antigens of virulent strains of Aeromonas hydrophila. Veterinary Immunology and Immunopathology 13. 319-344. 1984.

18.- Figura, N.; Marri, E. Prevalence, species differentiation and toxigenicity of Aeromonas strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. J. clinical microbiology 33 (3). 595-599. 1995.

19.- Fillemans, C. B.; Gordon, S. W. Aeromonas distribution and survival in thermally altered lakes. Applied and environmental microbiology 33 (1). 114-123. 1977.

20.- Pyfe, L.; Coleasa, G. A comparative study of the formation of extracellular proteins by Aeromonas salmonicida at two different temperatures. J. of applied bacteriology 62. 167-170. 1987.

21.- Green, F. W. Role of lactate and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative Gram negative bacteria on beef. Applied and environmental microbiology 42 (4). 1043-1050. 1981

22.- Weaver, A. M.; Durang, J. F. Ampicillin-kanamycin agar medium for the enumeration of Aeromonas species in water by membrane filtration. J. of applied bacteriology 63. 379-387. 1987.

23.- Hansen, T. C.; Fillemans, C. B. Prevalence and distribution of Aeromonas hydrophila in the United States. Applied and environmental microbiology 34 (4). 711-730. 1978.

24.- Nickman-Grosser, F. W.; Pansing, G. S. Aeromonas schubertii, a new animal negative species found in human clinical specimens. J. of clinical microbiology 26 (8). 1561-1564. 1988.

25.- Nickman-Grosser, F. W.; Mc. Donald, A. G. Aeromonas veronii, a new pathogenic Shewanellaceae-like species that may cause diarrhea. J. of clinical microbiology 25 (5). 900-906. 1987.

26.- Holmberg, S. G.; Schell, M. L. Aeromonas intestinal infections in the United States. Annals of Internal medicine 106. 683-689. 1986.

27.- Nassain, S. W.; Gordon, L. P. Meningitis due to Aeromonas hydrophila. J. of clinical microbiology 3 (2). 102-104. 1976.

28.- Jarda, J. M.; Bredes, R. Importance of Aeromonas sobria in Aeromonas bacteremia. J. of Infectious diseases 155 (2). 589-593. 1987.

29.- Janda, J. M.; Deffey, P. S. Acetophilic Aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. Reviews of infectious diseases 10 (5): 980-997, 1988.

30.- Janda, J. M.; Neittaw, M. Biotyping of Aeromonas isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum. J. of clinical microbiology 19 (3): 44-47, 1984.

31.- Jims, S. F. E. Enterotoxigenicity, hemagglutination and cell-surface hydrophobicity in Aeromonas hydrophila, Aeromonas sobria and Aeromonas salmonicida. Veterinary microbiology 8: 17-34, 1983.

32.- Joseph, S. W.; Kelly, M. P. Aeromonas primary infections of a diver in polluted waters. J. of clinical microbiology 16 (1): 44-49, 1979.

33.- Kaper, J.; Seidler, S. J. Medium for the presumptive identification of Aeromonas hydrophila and Enterobacteriaceae. Applied and environmental bacteriology 36 (5): 1011-1024, 1979.

34.- Kay, S. A.; Guerrero, S. E. Media for the isolation of Aeromonas hydrophila. J. of clinical microbiology 22 (3): 688-690, 1965.

35.- Kelly, M. T.; Dan Stron, E. H. Comparison of blood agar, penicillin-blood agar, Mc Conkey-ampicillin-tetracycline agar and modified selenite-ferruginose-novobiocin agar for isolation of Aeromonas spp. from stool specimens. J. of clinical microbiology 26 (9): 1738-1740, 1984.

36.- Kistover, S. P.; Young, L. S. Sepsisemia due to Aeromonas hydrophila: clinical and immunologic aspects. J. of infectious diseases 127 (3): 284-290, 1973.

37.- Kirschbach, M.; Pickering, L. K. Clinical and biochemical significance of toxin production by Aeromonas hydrophila. J. of clinical microbiology 26 (4): 916-921, 1987.

38.- Kolbain, M. The purification and some properties of 2 Aeromonas

proteinases. Acta path. microbiol. scand. Section B. 79, 726-738. 1971.

39.- Koski, S.; Koike, K. Activities of Aeromonas hydrophila hemolysins and their interaction with erythrocyte membranes. Infection and immunity 25 (7). 1534-1539. 1987.

40.- Kujper, E. J.; Weigerwalt, A. G. Phenotypic Characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of Aeromonas spp. J. of clinical microbiology 27 (1). 132-138. 1989.

41.- Kujper, E. J.; Jansen, H. G. Aeromonas associated diarrhea in the Netherlands. Annals of internal medicine 106 (4). 640-641. 1987.

42.- Leblanc, G. Mittal, K. R. Serogrouping of motile Aeromonas species isolated from healthy and moribund fish. Applied and environmental microbiology 42 (1). 58-60. 1981.

43.- Liu, P. F. Observations on the specificities of extracellular antigens of the genera Aeromonas and Serratia. J. of general microbiology 24. 145-148. 1961.

44.- Ljareth, A.; Popoff, H. Aeromonas hydrophila in acute diarrheal diseases: detection of enterotoxin and histology of strains. J. of clinical microbiology 6 (2). 94-100. 1977.

45.- Ljareth, A.; Madencom, T. Aeromonas toxina. Pharmacological therapeutics 15. 339-344. 1982.

46.- Ljareth, A.; Westlid, S. Separation and characterization of enterotoxin and haemolysin from Aeromonas hydrophila. Acta path. microbiol. scand. section B. 89. 387-397. 1981.

47.- Miera, S.; Whedra, S. G. Growth of Aeromonas spp. on Enteric Campylobacter selective agar and evaluation of the agar for the primary isolation of Aeromonas spp. from clinical specimens. J. of clinical microbiology 27 (2). 346-347. 1989.

48.- Mishra, S.; Balakrish, C. Comparisons of selective media for primary isolation of Aeromonas species from human and animal faeces. J. of clinical microbiology 25 (11). 2040-2043. 1987.

49.- Howland, M. T. Isolation of Aeromonas from faeces. The Lancet, Feb. 12, 1983.

50.- Meyer, M. Clinical significance of Aeromonas species isolated from patients with diarrhea. J. of clinical microbiology 25 (5). 876-878. 1987.

51.- Shishikawa, Y.; Kishi, T. A modification of bile salts brilliant green agar for isolation of motile Aeromonas from food and environmental specimens. Epidemiological infectiology 90. 331-336. 1987.

52.- Shishikawa, Y.; Kishi, T. Isolation and characterization of motile Aeromonas from human, food and environmental specimens. Epidemiological infectiology 101. 313-323. 1988.

53.- Somers, S.; Fujino, M. Purification and characterization of aelolysin, an extracellular, hemolytic toxin from Aeromonas salmonicida. J. of bacteriology 170 (8). 3694-3702. 1988.

54.- Palumbo, S. A.; Hocgan, D. B. Influence of temperature, NaCl and pH, on the growth of Aeromonas hydrophila. J. of food science 50. 1417-1421. 1985.

55.- Palumbo, S. A.; Masino, F. Starch ampicillin agar for the quantitative detection of Aeromonas hydrophila. Applied and environmental microbiology 50 (4). 1027-1030. 1985.

56.- Pothak, S. P.; Bhattacharjee, J. N. Seasonal distribution of Aeromonas hydrophila in river water and isolation from river fish. J. of applied bacteriology 55. 347-352. 1983.

57.- Swala, S. J.; Ruffey, P. S. Surface properties of autoagglutinating mesophilic aeromonads. Infection and Immunity. 56 (10). 2668-2665. 1988.

58.- Popoff, H. Genus III Aeromonas, p. 546-548. In H.R. Kreig and J. C. Holt (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 1. 9th. ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

59.- Popoff, H.; Veron, H. A taxonomic study of the Aeromonas hydrophila -Aeromonas punctata group. J. gen microbiology. 94 11-12. 1976.

60.- Rippey, S. R; Cabelli, W. J. Membrane filter procedure for enumeration of Aeromonas hydrophila in fresh waters. Applied and environmental microbiology. 38 (1). 108-113. 1979.

61.- Popoff, H; Sechter, I. Pril xloraz ampicillin agar, a new selective medium for the isolation of Aeromonas hydrophila. J. medical microbiology 12. 229-231. 1977.

62.- Neuf.M. A.; Rippey, S.M. Growth temperature characteristics of Aeromonas. Applied Microbiology 22 (4). 503-506. 1971.

63.- Santos Y. A. E. Toranzo. Virulence properties and enterotoxic production of Aeromonas strains isolated from fish. Infection and Immunity 36 (12). 3288-3293. 1982.

64.- Sanyal, S. K.; Singh, S. J. Enteropathogenicity of Aeromonas hydrophila and Fleximonas shigelloides. J. medical microbiology 12. 195-198. 1975.

65.- Schubert H. W. Genus II Aeromonas. Kiewyer and Van Nieu. 1966. 398. In Buchanan N.E., Gibbons N.E., eds. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore, Md: The Williams and Wilkins Co., 1974.: 324. 348-9.

66.- Steider, H. J.; Allen, S. A. Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States. Applied and environmental microbiology 40 (4). 715-728. 1980.

67.- Soldier, S. J.; Allen, S. A. Isolation, enumeration and characterization of Aeromonas from polluted waters encountered in diving

operations, Applied and environmental microbiology 38 (5), 1010-1018, 1980.

68.- Stotter, E.; Simler, W. Medium for the isolation of Aeromonas hydrophila, Applied microbiology 28 (7), 850-853, 1973.

69.- Smith, P. S.; Tomotake, K. N. API system: a multiple micromethod for identification of Enterobacteriaceae, Applied microbiology 24 (3), 449-452, 1972.

70.- Statner, E.; Leese, M. Uptake and uptake by motile Aeromonas species, J. of clinical microbiology 38 (5), 874-878, 1987.

71.- Statner, E.; Jones, M. J. Effect of incubation temperature on growth and soluble protein profiles of motile Aeromonas strains, J. of clinical microbiology 26 (2), 392-393, 1988.

72.- Stokes, G. N.; Johnson, C. N. Experimental evidence for enteropathogenicity in Aeromonas veronii, Canadian J. of microbiology 24 (7), 871-880, 1988.

73.- Tamplin, M. L. Sodium channel inhibitors produced by enteropathogenic Vibrio cholerae and Aeromonas hydrophila, The Lancet April 26, 1987, 975.

74.- Toranzo, A.; Santos, Y. Evaluation of different assay systems for identification of environmental Aeromonas strains, Applied and environmental microbiology 51 (3), 653-656, 1986.

75.- Turnbull, P. S.; Lee, J. V. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of Aeromonas species, J. clinical microbiology 19 (2), 175-180, 1984.

76.- Van der Kooy; Nijzen, W. A. Nutritional versatility and growth kinetics of 40 Aeromonas hydrophila strains isolated from drinking water, Applied and environmental microbiology 54 (11), 2842-2851, 1988.

77.- Von Graevenitz, A.; Beeber, C. Evaluation of differential and

selective media for isolation of Aeromonas and Plesiomonas spp. from human faeces. J. of clinical microbiology 17 (1), 16-21. 1981.

78.- Maitman, M., Shostk, E. Enzymatic characterization of Aeromonas hydrophila complex by the API EYM system. J. of clinical microbiology 16 (4), 692-696. 1982.

79.- Washington II, J. Aeromonas hydrophila in clinical bacteriologic specimens. Annals of internal medicine 76, 611-614. 1972.

80.- Westlund, S., Norder, L. Formation of extracellular haemolysin by Aeromonas hydrophila in relation to proteases and Staphylococcal enzymes. J. of medical microbiology 78, 27-35. 1973.

81.- Taje-Satler, J. Morphological and biochemical studies of 21 strains belonging to the genus Aeromonas isolated from clinical sources. J. of medical microbiology 8, 263-265. 1972.