



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

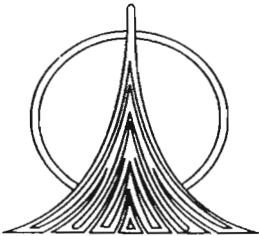
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO
HEMOLÍTICO DE DIFUSIÓN RADIAL SIMPLE
PARA DETERMINAR PRESENCIA DE
AEROLISINA EN CULTIVOS FILTRADOS DE
Aeromonas spp.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:

MARÍA MAGDALENA GONZÁLEZ MALVÁEZ

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
ASESOR: Q.B.P DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ



MEXICO, D.F.

2005

m 345417



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La libertad es la base de la dignidad humana y garantía de su desarrollo porque la libertad es la condición de la paz.

Juan Pablo II

DEDICADO A

Dios por permitir realizar el sueño de titularme

Mi esposo Victor por su amor, su compañía y su apoyo en cada momento de mi vida.

Mis hijas Cecilia y Laura por alentarme a seguir adelante y ser el motor de mi existencia.

Mi papá y a mi mamá (que siempre está en mi corazón) por trabajar arduamente para brindarme la oportunidad de estudiar una profesión, por enseñarme a ser una persona con valores y principios y darme tanto cariño.

Mis hermanos: Alejandro, Francisco, Fernando, Carmen, Alicia y Estela por su cariño, compañía y apoyo.

Mis sobrinos por su alegría aún en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Q.B.P. Dora Alicia Pérez González por sus conocimientos para la realización de mi tesis, además de su cariño, apoyo y paciencia.

Al profesor Dr. Rubén Marroquín Segura por sus conocimientos, apoyo y paciencia.

Al Profesor M. C. Mauricio Flores Pimentel por sus conocimientos, colaboración en el manejo de animales y proporcionarme todo lo necesario para la realización de éste trabajo

A mis sinodales Q. F. B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán y Q. F. B. Lilia Tequianes Bravo por su tiempo y sugerencias.

A la UNAM por darme la oportunidad de pertenecer a ésta institución donde he obtenido la mayoría de mis conocimientos de una manera integral, por permitirme disfrutar de sus servicios e instalaciones.

A los profesores de la carrera de Q. F. B. por sus enseñanzas.

A todos mis compañeros y amigos de la carrera.

A los profesores, compañeros y amigos del laboratorio de Inmunología L-313 de la FES Zaragoza campus II de la UNAM, Dolores, Fabiola, Raquel, Adriana, Gisela y Pablo, por su compañía y cariño.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	5
1. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO.....	5
1.1. IDENTIFICACIÓN.....	8
1.2. ECOLOGÍA.....	11
1.3. VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	12
1.4. FACTORES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA.....	13
1.5. TRATAMIENTO.....	17
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.....	17
2.1. DIFUSIÓN RADIAL SIMPLE.....	17
2.2. UNIDADES 50% HEMOLÍTICAS.....	20
2.3. NEUTRALIZACIÓN.....	23
NEUTRALIZACIÓN DE TOXINAS.....	23
2.4. CUANTIFICACIÓN DE ENTEROTOXINA POR EL MÉTODO DE ASA LIGADA DE CONEJO.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
OBJETIVOS.....	26
HIPÓTESIS.....	26
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	27
TIPO DE ESTUDIO.....	27
POBLACIÓN.....	27
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	27
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	27
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	27
VARIABLES INDEPENDIENTES.....	27
VARIABLES DEPENDIENTES.....	28
MATERIALES.....	28
MATERIAL.....	28

MATERIAL DE VIDRIO.....	28
MATERIAL DE PLASTICO.....	29
MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
ANIMALES DE LABORATORIO.....	29
MATERIAL ESTÉRIL.....	30
MATERIAL ESPECIAL.....	30
MATERIAL Y EQUIPO DE DISECCIÓN.....	30
REACTIVOS.....	31
METODOS.....	32
DIAGRAMA DE FLUJO.....	32
OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS FILTRADOS DE CEPAS DE AEROMONAS PREVIAMENTE PURIFICADAS.....	33
CUANTIFICACIÓN ENTEROTOXICA DE LOS CULTIVOS FILTRADOS DE AEROMONAS POR EL MÉTODO DE ASA LIGADA DE CONEJO.....	33
DETERMINACIÓN DEL TITULO DE HEMÓLISIS DE LOS CULTIVOS FILTRADOS DE AEROMONAS POR MICROENSAYO.....	34
DETERMINACIÓN DE LAS UNIDADES 50% HEMOLÍTICAS DEL CULTIVO FILTRADO DE <i>A. Hydrophila</i> ATCC 7966 POR MEDIO DE LA TÉCNICA MODIFICADA DE KENT Y FIFE.....	34
DETERMINACIÓN DE LAS UNIDADES 50% HEMOLÍTICAS DE CULTIVOS FILTRADOS DE DIFERENTES CEPAS DE AEROMONAS Y DEL CULTIVO DE REFERENCIA <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 POR DIFUSIÓN RADIAL SIMPLE.....	36
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL SUERO ANTIAEROLÍSINA POR MICROTITULACIÓN.....	37
DETECCIÓN DE AEROLISINA EN CULTIVOS FILTRADOS DE AEROMONAS POR DIFUSIÓN RADIAL SIMPLE.....	37
RESULTADOS.....	39
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
CONCLUSIONES.....	54
PROPUESTAS.....	55

BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	59
MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.....	59
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	60

RESUMEN

Los cultivos filtrados de 7 cepas de *Aeromonas hydrophila*, 2 de *Aeromonas caviae*, 2 de *Aeromonas sobria* y 1 de *Aeromonas jandaei* se obtuvieron inoculando cada una de las cepas en caldo BHI (infusión cerebro-corazón), incubando en condiciones específicas de tiempo (19 horas), temperatura (22° C) y agitación (150 rpm), y centrifugando (en refrigeración a 10,000 rpm/ 30 min), para separar el sobrenadante de la biomasa el cuál posteriormente se filtró. Se determinó la enterotoxigenicidad de los cultivos filtrados midiendo la acumulación de fluido en asa ligada de conejo y se realizó la técnica de microtitulación para obtener el título de lisis. Se cuantificaron las unidades 50% hemolíticas de los cultivos filtrados por una variante del método de Kent y Fife bajo las condiciones definidas por Berheimer, midiendo la lisis de 0.6 mL de una suspensión de eritrocitos al 0.8% de Absorbancia a 545 nm en un volumen total de 1.5 mL realizándose una curva estándar para determinar las unidades 50 % hemolíticas por difusión radial simple con un cultivo filtrado de referencia *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, productora de aerolisina. Se cuantificó título de neutralización del suero antiaerolisina como una prueba de especificidad detectándose aerolisina en cultivos filtrados de 3 cepas de *Aeromonas hydrophila*, 1 de *Aeromonas caviae* y 1 de *Aeromonas sobria* por difusión radial simple.

INTRODUCCIÓN

El género *Aeromonas* se encuentra en aguas fluidas y estancadas, en tuberías sanitarias y de desagüe e infectando peces, suelos y alimentos (vegetales verdes, leche, helados, carnes y mariscos).⁵

Las especies del género *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública para la población humana, ya que provocan infecciones intestinales y extraintestinales.^{9,30}

En las últimas tres décadas ha surgido un interés por estudiar *Aeromonas* debido a que algunas de sus especies se han aislado en cultivo puro de muestras clínicas, encontrándose en mayor frecuencia en pacientes con infección gastrointestinal.

La identificación correcta de los agentes etiológicos asociados con la infección gastrointestinal es importante, ya que tan solo en México se reportaron 460,543 casos nuevos de enfermedad diarreica aguda hasta la semana siete del 2003. Las bacterias son uno de los principales agentes etiológicos en casi todos los países del mundo. En las naciones en vías de desarrollo las condiciones socioeconómicas favorecen la incidencia y prevalencia de cuadros diarreicos pero, la preocupación de los microbiólogos clínicos se enfoca esencialmente a la identificación de los patógenos clásicos como son: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Yersinia*. No obstante, es importante que se den a conocer otros géneros como *Aeromonas* que en diferentes áreas geográficas se han documentado como de importancia epidemiológica. A continuación se presenta un cuadro de los estudios del género *Aeromonas* que se han hecho desde hace 20 años en México. Diversos autores han realizado estudios para su aislamiento e identificación a partir de muestras clínicas, agua y alimentos, etc., otros destinados a la descripción de los factores de virulencia y más recientemente a la caracterización de las cepas desde un punto de vista genético.¹⁶

Antecedentes del género *Aeromonas* en México

Año	Autor	Título del trabajo	Tipo de estudio
1981	Escamilla AE	Diarrea producida por especies de la familia <i>Vibrionaceae</i>	Comunicación de congreso
1984	Rebollo B/Escamilla AE	Aislamiento e identificación de <i>Aeromonas</i> spp. y <i>P. shigelloides</i> como causa de diarrea en México	Comunicación de congreso
1986	Ruiz SC/Escamilla AE	Detección de enterotoxina de <i>Aeromonas</i> spp.	Tesis de Licenciatura, ENCB IPN
1990	Espejel PG/Escamilla AE	Obtención del suero anti-enterotoxina de <i>A. hydrophila</i> en animales de laboratorio	Tesis de Licenciatura, ENCB IPN
1991	Díaz-Flores L/Escamilla AE	Investigación de la enterotoxigenicidad de <i>A. hydrophila</i> y su relación con otras bacterias asociadas al síndrome diarreico	Tesis de Licenciatura, ENCB IPN
1995	Ramírez GM/ Castro-Escarpullí G	Producción de enterotoxina, sensibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico en <i>Aeromonas</i> spp.	Tesis de Licenciatura, ENCB IPN
1996	Martínez SNP/Escamilla AE	Caracterización de <i>Aeromonas</i> ssp. Aisladas de pacientes con sintomatología de origen infeccioso en el Distrito Federal	UACH/ENCB IPN
1997	Villaruel LA/Mota de la Garza L/ Castro-Escarpullí G	Investigar el riesgo que presenta la sobrevivencia de <i>Aeromonas</i> spp. en agua tratada	Tesis de Maestría, ENCB IPN
1998	Castro-Escarpullí G/Aparicio OG	Determinación de algunos factores de virulencia en cepas de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de muestras clínicas y de agua	Tesis de Maestría, ENCB IPN
2000	Aguilera-Arreola MG/ Castro-Escarpullí G	Caracterización de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de pescado congelado	Tesis de Licenciatura, ENCB IPN
2001	Tequilanes BL/Pérez GD/ Castro-Escarpullí G	Aislamiento y caracterización de <i>Aeromonas</i> a partir de muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM	Tesis de Licenciatura UNAM/ ENCB IPN
2002	Aguilera-Arreola MG/ Aparicio OG/ Castro-Escarpullí G	Estudio de la diversidad genética de cepas de <i>A. hydrophila</i> aisladas de orígenes diferentes	Tesis de Maestría, ENCB IPN
2002	Arteaga GR/Ocaña NA/ Castro-Escarpullí G	Tipificación de cepas de <i>Aeromonas</i> aisladas en México	Tesis de Licenciatura UNAM/ ENCB IPN
2002	Castro-Escarpullí G/ Aguilera-Arreola MG/ Bravo-Farías L	Factores de virulencia en cepas de <i>Aeromonas caviae</i> aisladas de enfermedad diarreica agua de Cuba	Publicación. En prensa ENCB IPN/IPK
2002	Chacón MR/Figueras MJ/ Castro-Escarpullí G/ Soler L/Guarro J	Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of <i>Aeromonas</i> spp.	Enviado para publicación. ENCB IPN/URV
2002	Castro-Escarpullí G/ Figueras MJ/ Aguilera-Arreola MG/ Soler L/Fernández-Rendón E/ Chacón MR/Aparicio G/Guarro J	Characterization of <i>Aeromonas</i> spp. Isolated from frozen fish intended for human consumption in México	Enviado para publicación. ENCB/IPN/URV
2002	Chacón MR/ Castro-Escarpullí G/ Figueras MJ	A DNA probe specific for <i>Aeromonas</i> colonies	Publicación. En prensa ENCB/IPN/URV

INNSZ: Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"; UACH: Universidad Autónoma de Chiapas; IPK: Instituto Pedro Kouri, La Habana Cuba; URV: Universidad Rovira Virgili, Reus España; UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México; ENCB: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; IPN: Instituto Politécnico Nacional. Modificado*.

Fuente: Castro- Escarpullí y col. 2002.

A pesar de que se han explorado ya algunos campos sobresalientes de este género desde el punto de vista clínico y sanitario, hasta la fecha estos estudios han tenido una limitada difusión entre los microbiólogos clínicos e investigadores. Si bien se han realizado comunicaciones en diversos congresos temáticos, estos trabajos no se han publicado posteriormente en revistas de divulgación nacional e internacional, lo cual limita significativamente que la información llegue a los profesionales de estas áreas, e incluso a investigadores de otros países. Este aspecto disminuye la importancia o el impacto que estos estudios pudieran tener en nuestro país.

El género ha sido aislado de muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM.³² Posteriormente se obtuvo el suero antiaerolisina en conejo a partir de un cultivo de *Aeromonas hydrophila*.²¹ En el presente trabajo se desarrolló una técnica para retar el suero antiaerolisina con cultivos filtrados libres de células de diferentes cepas de *Aeromonas* spp. con el propósito de detectar aerolisina, uno de los principales productos extracelulares del género causantes de patogenicidad; con el objetivo de contribuir con una técnica que detecte cepas patógenas y cuantifique aerolisina.

MARCO TEÓRICO

1. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Aeromonas*

El género *Aeromonas* está clasificado en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey como miembro de la familia *Vibrionaceae*.²²

Sin embargo, los estudios realizados en 1986 por Colwell y cols. demostraron, con base al análisis de la secuencia de los genes 16S rRNA y 5S rRNA y en los resultados de la hibridación DNA-RNA, que el género *Aeromonas* presenta una evolución filogenética distinta al de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* y propusieron elevar al género *Aeromonas* a la categoría de familia *Aeromonadaceae* y como tal aparece ya en publicaciones recientes.¹⁶

Las características del género refieren que son bacilos cortos 0.3-1.0 x 1.0-3.5 μm , Gram negativos, todas las especies excepto *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas media* son móviles gracias a un flagelo polar, son aerobios facultativos, oxidasa y catalasa positivos, reducen nitrato a nitrito y fermentan la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía.⁶ Pueden crecer en medios que contienen 3% de NaCl, pero no en 6%. Los miembros de este género producen varias exoenzimas como: proteasas, Dnasa, Rnasa, elastasa, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras, muchas de ellas consideradas factores de virulencia.

La clasificación de las especies del género ha dependido de una mezcla compleja de datos fenotípicos y genéticos. Las especies bioquímicamente distintas se refieren como fenoespecies mientras que las especies genéticamente diferentes se denominan grupos de hibridación (HG) o geno-especies y se determinan mediante pruebas de hibridación de DNA total. Actualmente se tiende a nombrar sólo especies y abandonar la nomenclatura de HGs, derivada de los primeros estudios taxonómicos realizados para este género utilizando técnicas moleculares.¹

El género *Aeromonas* se puede dividir en 2 grandes grupos con base en la temperatura óptima de crecimiento y la capacidad de movimiento de las especies. El primer grupo es amplio y heterogéneo genéticamente y está formado por especies mesófilas móviles que crecen óptimamente a 28° C. El segundo es un grupo más reducido y homogéneo genéticamente, se designa como el grupo psicrófilo cuya

temperatura óptima de crecimiento se define entre 22-25° C, está constituido por una sola especie: *Aeromonas salmonicida* y de ésta se han reportado cinco subespecies: *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, *A. salmonicida* ssp. *masoucida*, *A. salmonicida* ssp. *achromogenes*, *A. salmonicida* ssp. *smithia* y *A. salmonicida* ssp. *pecnilytica*. Nuestros estudios y los de otros autores ponen de manifiesto que es muy difícil separar bioquímicamente las subespecies de *A. salmonicida*. El género incluye en la actualidad a 14 especies (cuadro 1): *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. madia*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. encheleia*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila* y *A. popoffi*. La especie *A. veronii* tiene dos biotipos *A. veronii* bt. *sobria* y *A. veronii* bt. *veronii*, siendo el primero el comúnmente asociado a cuadros diarreicos. Otras especies tales como *A. ichthiosmia* y *A. enteropelogenes* han sido consideradas con base en los perfiles de ácidos grasos, fenotipo y secuenciación del gen 16S RNA como sinónimos de *A. veronii* y *A. trota* respectivamente. A pesar de que se ha avanzado mucho en la taxonomía del género existen todavía algunos problemas terminológicos y la posición de algunas especies está en discusión.¹⁶

Cuadro 1. Cenopecies y fenopecies que constituyen el género *Aeromonas*

Genoespecie	Feno especie	Grupo DNA ^a	Cepa tipo	Sinónimo
<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1	ACTT 7966	
<i>A. besliarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	2	ATCC51108	
<i>A. popoffi</i>		NA	LMG17541	
<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>	3	ATCC33658	
<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	4	ATCC15468	<i>A. punctata</i>
<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>	5	ATCC33907	
<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. caviae</i>	6	ATCC23309	<i>A. punctata</i>
<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	7	ATCC43979	
<i>A. veroni</i> ^b	<i>A. sobria</i>	8	ATCC9071	<i>A. ichthiosmia</i>
<i>A. jandaei</i>	<i>A. sobria</i>	9	ATCC49568	
<i>A. veroni</i> ^d	<i>A. sobria</i>	10	ATCC35604	
<i>A. encheleia</i>	<i>A. caviae</i>	NA	ATCC51929	
<i>A. schubertii</i>	<i>A. hydrophila</i>	12	ATCC43700	
<i>A. trola</i>	<i>A. sobria</i>	NA	ATCC49657	<i>A. enteropelogenes</i>
<i>A. allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas</i> ssp	NA	ATCC51208	
<i>Aeromonas</i> grupo 501		NA	ATCC43946	
<i>Aeromonas</i> HG 11 ^c		NA	ATCC35941	

^a Grupos de hibridación (HGs) definidos por la CDC

^b Se definieron originalmente dos grupos de la hibridación dentro de esta especie, el HG8 *A. veroni* bi. *sobria*, y el HG10 *A. veroni* bi. *veroni*. La cepa tipo de la especie pertenece al biotipo *veroni* HG10.

^c Algunos autores consideran que este grupo se corresponde con *A. encheleia*.¹²

NA grupo de hibridación no asignado.

ATCC (American Type Culture Collection).

LMG (Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent).

Fuente: Castro-Escarpulli, 2002

1.1. IDENTIFICACIÓN

Las diferentes especies de *Aeromonas* pueden crecer en medios diferenciales y selectivos empleados para el aislamiento de las bacterias Gram negativas. Los medios selectivos de elección para su aislamiento son: agar sangre ampicilina ya que estas bacterias son resistentes a este antimicrobiano, excepción de *A. trota*, o bien el agar que contiene cefsulodina-irgasán-novobiocina denominado comercialmente como CIN. Para el caso de muestras de alimentos de origen diverso se recomienda emplear un caldo de preenriquecimiento, siendo el agua peptonada alcalina de pH 8.7 la mejor elección, y posteriormente la siembra en agar bilis-irgasán-verde brillante (BIVB), el cual ha demostrado ser más efectivo que otros medios de composición similar. Para muestras de agua la utilización de la técnica de filtración con membrana y posterior cultivo en medio agar dextrina ampicilina (ADA) sin preenriquecimiento es efectiva y permite aislar un elevado número de cepas de este género.¹⁶

La realización de 6 pruebas bioquímicas básicas empleadas para poder identificar a patógenos gastrointestinales, permite identificar el género. Estas pruebas incluyen tinción de Gram, citocromo oxidasa, crecimiento en caldo nutritivo adicionado con 3 o 6% de NaCl, crecimiento en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), producción de ácido de inositol y oxidación-fermentación en el medio Hugh Leifson (O/F) adicionado de glucosa con sello y sin sello de aceite mineral. La respuesta negativa a la prueba de oxidasa permite descartar a los géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Vibrio* se identifica al constatar su crecimiento en el medio TCBS a pH 8.0 y en caldo nutritivo adicionado de diferentes concentraciones de NaCl, donde el crecimiento de *Vibrio* es específico del 6%, mientras que algunas especies de *Aeromonas* sólo son capaces de crecer en 3% de NaCl. Adicionalmente, es recomendable realizar la prueba de crecimiento en presencia del agente vibriostático O/ 129 (2,4 diamino-6-7-diisopropilteridina) a dos concentraciones 10 y 150 µg. para las cuales *Aeromonas* son resistentes y las cepas de *Vibrio* sensibles²². El género *Plesiomonas* se distingue fácilmente de *Aeromonas* realizando la determinación de producción de ácido a partir de inositol, para la cual las especies de *Aeromonas* son negativas. Por último, el género *Pseudomonas* es

distinguible comprobando la fermentación de la glucosa, empleando la prueba O/F que en el caso de *Aeromonas* es fermentativa.

A pesar de la explosión de nuevas especies de *Aeromonas* sólo algunas se han aislado hasta la fecha en clínica. Las tres especies aisladas predominantemente de muestras clínicas son: *A. caviae*, *A. veronii* bt. *sobria* y *A. hydrophila* que representan el 91% de las cepas del género identificadas utilizando métodos genéticos, en estudios realizados en España (Figueras 2002 observaciones no publicadas), y el 89.5% de las cepas identificadas en México utilizando estos mismos métodos. Janda y Abbott han reportado valores superiores al 85% para estas especies, describiendo así mismo como especies menos frecuentes: *A. veronii* bt. *veronii*, *A. jandaei* y *A. schubertii*. Las especies que constituyeron el 9% restante de los aislamientos en los estudios españoles han sido: *A. media* (4.8%), *A. jandaei* (1.7%), *A. sobria* (1.3%), *A. trota* (0.8%) y *A. bestiarum* (0.4%). Mientras que el 10.5 % restante de las cepas clínicas que encontramos en México son: *A. bestiarum* (5.6%), *A. salmonicida* (3.3%), *A. media* (0.8%), *A. trota* (0.8%). El resto de las especies se han recuperado sólo de muestras ambientales o no se han asociado hasta la fecha a ninguna patología, y su aislamiento es en general mucho menos frecuente. Estos resultados demuestran que las especies que se encuentran con más frecuencia al identificar tanto con pruebas bioquímicas como con métodos genéticos son: "*A. caviae*", "*A. hydrophila*" y "*A. sobria*" (*A. veronii* bt. *sobria*). Sin embargo, la frecuencia de aislamiento en clínica de estas especies varía según el área geográfica estudiada, ya que en las cepas estudiadas (n = 68) aisladas en el estado de Hidalgo *A. caviae* (42.6%) fue la especie más prevalente seguida por *A. hydrophila* (36.8%) y finalmente *A. veronii* bt. *sobria* (19.1%), mientras que en las cepas estudiadas (n = 42) aisladas de la ciudad de México *A. veronii* bt. *sobria* (31%) ocupa el primer lugar, seguida de *A. hydrophila* (29%) y finalmente *A. caviae* (17%), contrariamente a lo encontrado en España, donde *A. hydrophila* es la menos aislada de entre estas tres especies.¹⁵

Para poder establecer cuál es la incidencia real de las especies patógenas es necesario realizar la correcta identificación hasta especie. Se ha propuesto la utilización de 12 pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de *Aeromonas* aisladas de muestras clínicas (cuadro 2) sin embargo, la experiencia

demuestra que la identificación correcta sólo puede realizarse utilizando métodos moleculares.¹⁶

En las cepas aisladas del estado de Hidalgo el porcentaje de error en la identificación bioquímica cuando se comparó con la identificación genética fue del 55.99% cuando se realizó con pruebas convencionales de laboratorio y del 32.4% cuando ésta se realizó con el sistema automatizado Vitek incluyendo las pruebas complementarias recomendadas por este sistema, hidrólisis de la esculina, producción de ácido a partir de glucosa, β -hemólisis en gelosa sangre y crecimiento en NaCl al 6%.¹⁶

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para identificar cepas de las especies de *Aeromonas* aisladas en clínica.

Pruebas	A.				A. veronii				
	<i>A. hydrophila</i>	<i>salmonicida</i> ^a	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>bt. veronii</i>	<i>bt. sobria</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. trota</i>
Indol	+	+	+	+	+	+	+	V	+
LDC	+	V	-	-	+	+	+	V	+
ODC	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ADH	+	V	+	+	-	+	+	+	+
VP	+	V	-	-	+	+	+	V	-
Esculina	+	+	+	+	+	-	-	-	-
β -hemólisis	+	V	- ^b	V	+	+	+	V	V
Ácido de:									
L-arabinosa	V	+	+	+	-	V	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	-	V
D-sorbitol	-	V	-	-	-	-	-	-	-
Gas de glucosa	+	V	-	-	V	+	+	-	V

^a Las cepas de *A. salmonicida* de origen humano son móviles, indol positivo y no producen pigmento.

^b Recientemente de han descrito cepas de *A. caviae* β -hemolíticas.

ADH arginina hidrolasa, LDC lisina descarboxilasa, ODC ornitina descarboxilasa, UVP Voges Proskauer. La β -hemólisis se realiza en base de agar adicionado con sangre de carnero 5%. V=Variable.

Fuente: Castro Escarpullí. 2002.

Aunque las técnicas moleculares en la actualidad no están popularizadas entre los laboratorios de diagnóstico y estos métodos se reservan para su aplicación en la investigación y la enseñanza, es importante insistir sobre la utilidad, que para los microbiólogos clínicos representa el conocimiento de los métodos genotípicos para la identificación y/o tipificación de algunos géneros fastidiosos en términos de taxonomía y epidemiología, tal como es el caso de *Aeromonas*.¹⁶

1.2. ECOLOGÍA

El género *Aeromonas* se reconoce desde hace más de 100 años como patógeno de reptiles y de otros animales de sangre fría (poiquiloterms); sin embargo, en los años 70 los miembros de este género se consideraron enteropatógenos y causantes de infecciones cutáneas y diseminadas (infecciones de heridas, septicemia, mionecrosis, meningitis, peritonitis, endocarditis) principalmente en personas inmunodeprimidas pero también en pacientes con deficiencias inmunológicas aparentes. Estos microorganismos considerados autóctonos del medio acuático se encuentran ampliamente diseminados en hábitats naturales como suelo, agua potable, aguas negras, aguas contaminadas, ríos, lagos y mar. Este hecho es de gran significado, ya que se han descrito varios casos de infecciones primarias o secundarias de heridas superficiales o cutáneas después del contacto con agua contaminada con *Aeromonas*. Las manifestaciones clínicas de las infecciones cutáneas son muy variables desde una celulitis moderada a una mionecrosis masiva fulminante. Un hecho de trascendencia es que *Aeromonas* se ha aislado de aguas potables cloradas o no cloradas e incluso en aguas embotelladas. La mayoría de los sistemas de tratamiento de agua son capaces de reducir la concentración de *Aeromonas* por debajo de 1UFC/100 mL no obstante, cuando los niveles de materia orgánica aumentan se inactivan los niveles de cloro y estas bacterias pueden crecer e incluso colonizar los sistemas de abastecimiento, formando biofilms. En el agua tratada, pueden llegar a alcanzar concentraciones de 10^3 UFC/100 mL. El aislamiento del género *Aeromonas* de muestras de agua depende de diversos factores, algunos de ellos son: la estación del año, la concentración de materia orgánica, el oxígeno disponible, los niveles de cloro y la salinidad.

Los coliformes fecales son indicadores de contaminación fecal y se utilizan para evaluar la calidad sanitaria del agua, y poder determinar si es o no potable. *Aeromonas* se ha aislado en aguas en las que no se han detectado coliformes lo cual indica en consecuencia que su presencia no se correlaciona con la de estos indicadores. Algunos autores consideran que *Aeromonas* podría considerarse como un indicador del funcionamiento del sistema de tratamiento y potabilización del agua.

Estos microorganismos también se han aislado en una gran variedad de alimentos: productos cárnicos, pescado, mariscos, alimentos preparados, productos de pastelería, verdura, leche y derivados lácteos por lo que algunos autores consideran que *Aeromonas* debería incluirse en la lista de microorganismos que pueden actuar como agentes causantes de toxoinfecciones alimentarias.

Se han descrito diversas especies del género *Aeromonas* asociadas a numerosas patologías de peces de interés en acuicultura, provocando pérdidas significativas.

A. salmonicida es considerada el principal agente etiológico de furunculosis en diferentes especies de peces, entre las que se incluyen salmón, trucha, rodaballo, pez oro, pez blanco y otros, causando una importante mortalidad, *A. hydrophila* y *A. jandaei* son causantes de aeromoniasis en pez gato y anguilas. En un estudio realizado a partir de pescado congelado destinado a consumo humano en la ciudad de México las especies más frecuentes tras la identificación genética fueron *A. salmonicida* (69%) y *A. bestiarum* (14%), aunque es interesante recalcar que entre los demás aislamientos se encontraron cepas de *A. encheleia* (4.2%), especie reportada por primera vez en México.¹⁶

1.3. VÍAS DE TRANSMISIÓN

A pesar de que existen evidencias que asocian los alimentos como el vehículo de transmisión de las infecciones gastrointestinales causadas por los miembros del género *Aeromonas* son pocos los brotes alimentarios documentados. Altwegg en 1991, describió un brote de gastroenteritis por consumo de un "cocktail" de camarones y existen otros brotes documentados siendo el más notable el reportado por Abeyta y colaboradores en 1986, en donde hubo 472 casos asociados al consumo de ostras en Louisiana, USA. El consumo de agua y/o alimentos contaminados así como el contacto directo de agua con heridas han sido consideradas clásicamente las fuentes de infecciones cutáneas y gastrointestinales por *Aeromonas*. Se ha observado, que la concentración de estos microorganismos varía en las estaciones del año, obteniéndose los mayores recuentos cuando la temperatura ambiente supera los 20° C, esta frecuencia aumentada corresponde a la época del año en que hay mayor incidencia de cuadros diarreicos, lo que apoya la

hipótesis de considerar que el agua y los alimentos, en estos periodos, son los principales vehículos de transmisión de *Aeromonas*.¹⁶

1.4. FACTORES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA

Aunque se han realizado numerosos estudios para elucidar él o los mecanismos de patogenicidad en las infecciones causadas por *Aeromonas*, no se ha logrado la conciliación de los resultados para establecer dicho mecanismo de forma contundente. Sin embargo, se han identificado un gran número de estructuras y enzimas extracelulares que parecen tener un papel importante en la patogenicidad de las infecciones intestinales y sistémicas.

Algunos de los factores asociados a virulencia se han identificado y caracterizado en estudios *in vivo* e *in vitro*, lo que ha permitido conocer su función biológica y comparar la similitud genómica que pudiera existir con otros factores de virulencia descritos en otros agentes bacterianos. A continuación se realiza una descripción breve de las estructuras asociadas a la virulencia:

- Cápsula.** Algunos estudios han demostrado la presencia de cápsula en algunos serogrupos de *A. hydrophila* y aunque se cuenta con poca información sobre su composición y su posible relación con patogenicidad, existen trabajos preliminares que reportan que las cepas no capsuladas son menos virulentas para el ratón que las capsuladas.

- Capa S.** Esta estructura de naturaleza proteica, se involucra en la unión de la bacteria a los componentes celulares de la célula huésped y confiere resistencia a las propiedades bactericidas del complemento, por lo que se considera un importante factor de virulencia.

- Lipopolisacárido (LPS).** Se reconocen al menos 97 serogrupos distintos entre las *Aeromonas* con base en los antígenos presentes en la región O del LPS. Se ha demostrado que los serotipos O:34, O:11 y O:16 son los más prevalentes en diversas áreas geográficas y se relacionan particularmente con infecciones sistémicas y a algunos casos de gastroenteritis.

- Pili.** Se han descrito tres tipos de pili: los pili de tipo I, descritos en *A. hydrophila*, con una composición en aminoácidos muy similar a los pilis tipo I de *E. coli*; los pilis

tipo IV descritos en *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*, que pueden formar bucles (Bfp) y expresarse conjuntamente con pilis tipo I; y el tercer tipo se denomina mini-pili, y está constituido de una pilina que guarda gran semejanza con la pilina Cep de *V. cholerae*. La adherencia mediada por estos pilis se ha ensayado en conejos y en diferentes líneas celulares eucarióticas, describiéndose que la adhesión mediada por pilis favorece el proceso de colonización de estas bacterias.

•**Proteínas de membrana externa (OMP)**. La caracterización de las OMP de *Aeromonas* es limitada. La purificación y la caracterización parcial de éstas, revelan tres diferentes proteínas y se está investigando la posibilidad de que algunas tengan propiedades formadoras de canales. Se ha identificado una OMP de 45 Kda en *A. caviae* que está implicada en adherencia *in vitro* a células intestinales.

Las *Aeromonas* también producen una gran cantidad de enzimas extracelulares que degradan activamente complejos proteicos, polisacáridos, mucopolisacáridos y moléculas que contienen lípidos. Estas enzimas son útiles en la identificación de la bacteria, en sus funciones fisiológicas y son considerados frecuentemente factores asociados a la virulencia, en éste y en otros géneros bacterianos.¹⁶

•**Hemolisinas**. La caracterización de las hemolisinas se ha dificultado por la terminología múltiple con la que han sido descritas por los distintos autores.¹¹ La hemolisina originalmente denominada **aerolisina**⁸ es la β -hemolisina prototipo para el género, su secuencia de aminoácidos es parcialmente semejante a la de la toxina α de *Staphylococcus aureus* y con la enterotoxina A de *Clostridium perfringens* éstas son las toxinas de otros géneros que más se relacionan con la aerolisina², ésta se caracteriza por la formación de poros en la membrana de las células huésped (efecto citolítico) y por producir acumulación de fluidos en diversos modelos animales, por lo cual se asocia con la producción de cuadros de gastroenteritis. La aerolisina es un producto extracelular característico de *Aeromonas* spp, su principal propósito es matar células, primero para defenderse del hospedero y segundo para que su contenido empiece a estar disponible para su crecimiento. Bernheimer y colaboradores reportaron su purificación parcial a partir de un cultivo sobrenadante y son quienes le dan su nombre.⁸ Bucley describe la purificación de la proaerolisina secretada por *A. salmonicida* y clonó su gen *aerA* estructural.¹⁰ Chakraborty y colaboradores presentaron evidencias genéticas de que el gen estructural *aerA* se

encuentra en todos los miembros del género.¹⁹ La aerolisina es secretada por el género *Aeromonas* y tiene alta afinidad para adherirse a células blanco, recientemente se ha demostrado que es una glicosil-fosfatidil inositol anclada a una glicoproteína. De la adhesión se sigue una heptamerización para formar una estructura que proponen contiene un tubo con conformación β la cual puede insertarse en la membrana y producir un canal.²⁹

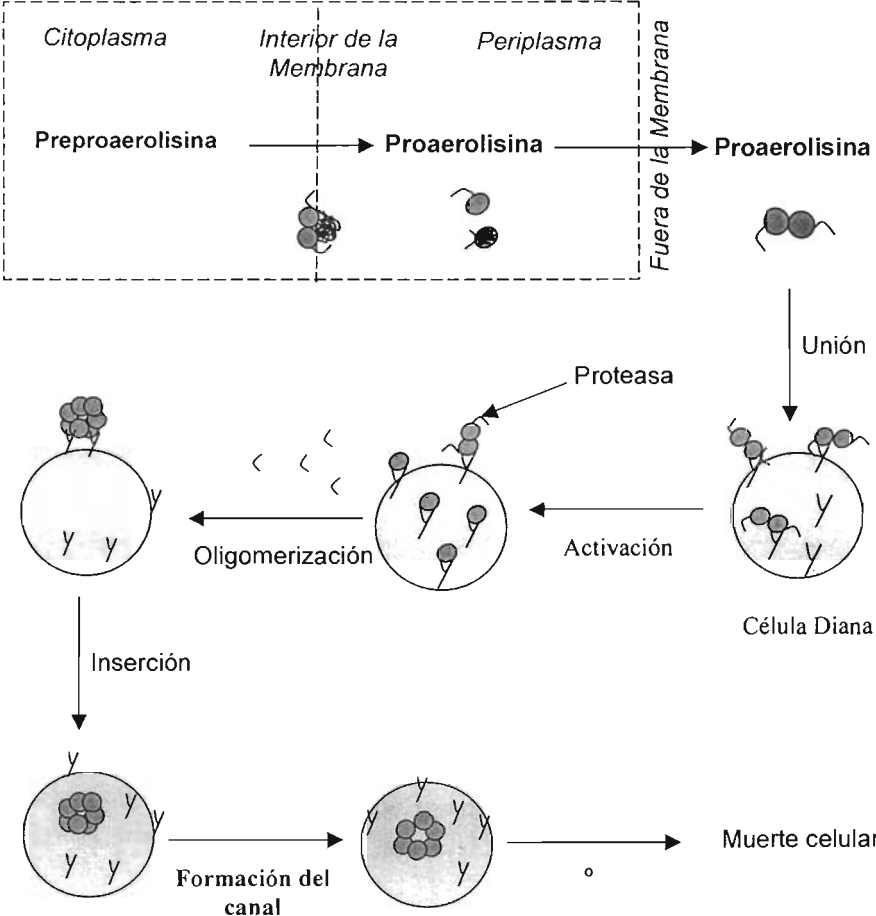


Figura No. 1 Mecanismo de acción de la aerolisina.

•**Enterotoxinas citotónicas.** Este tipo de toxinas se distinguen *in vitro* de las aerolisinas y β - hemolisinas por su capacidad de producir elongación de las células pero no lisis. Se han descrito dos tipos de actividad citotónica, una asociada al incremento de adenosil monofosfato cíclico (AMPc) pero que no se parece estructuralmente a la toxina colérica y el segundo tipo que tiene un mayor grado de homología con la toxina colérica. Estas toxinas se asocian con la producción de diarrea acuosa.

•**Proteasas.** Éstas son capaces de degradar diferentes compuestos como albúmina, fibrina, gelatina y elastina. Una misma cepa puede producir diferentes proteasas. Sin embargo, sólo algunas actividades enzimáticas se han caracterizado y la mayoría de estos estudios se han realizado en *A. hydrophila*. Los dos principales tipos de proteasas son las metaloproteasas y las serina proteasas. Las proteasas pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de las infecciones en heridas de humanos y en las lesiones de piel de peces.

•**Lipasas.** Éstas actúan como hidrolasas sobre los lípidos de membrana, y se han descrito cuatro lipasas diferentes, sin embargo sólo dos, la glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa (GCAT) y la lecitinasa-fosfolipasa C (Plc) se han asociado con patogenicidad en peces, líneas celulares y ratones, aunque aún no se ha descrito el papel que éstas tienen en las infecciones en humanos.

•**Desoxirribonucleasas.** Se han descrito al menos tres de estas proteínas, se desconoce la posible función que pueden desempeñar en la patogenia de *Aeromonas*. Sin embargo en otros géneros como *Streptococcus*, las nucleasas extracelulares son consideradas de gran importancia para el establecimiento y desarrollo de la infección.

•**Sideróforos.** Son compuestos con una alta afinidad por el hierro y que son sintetizados bajo condiciones de estrés por las bacterias, para competir por este crítico elemento, cuando su concentración está limitada. Algunas cepas de *A. hydrophila* y *A. caviae* sintetizan un sideróforo denominado amonobactina, sin embargo no se ha corroborado si lo producen durante el desarrollo de la infección.

1.5. TRATAMIENTO

Las *Aeromonas* producen metalobetalactamasas (grupo 3), betalactamasas que hidrolizan cefalosporinas (grupo1) y betalactamasas que hidrolizan carbenicilina (grupo 2c) según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Por lo tanto son resistentes a antibióticos betalactámicos como la penicilina, ampicilina y cefalotina. Los estudios realizados en México con 151 cepas aisladas de muestras clínicas, agua y pescado mostraron que la mayoría de las cepas eran sensibles a cefalosporinas de segunda y tercera generación así como las quinolonas, presentando una resistencia variable a los aminoglucósidos y a los macrólidos. Estos resultados evidenciaron que las cefalosporinas y quinolonas pueden utilizarse de manera segura para el tratamiento de las infecciones causadas por las *Aeromonas* y en caso de requerirse por infección de larga evolución o crónica, así como en individuos inmunocomprometidos. En general los cuadros diarreicos en individuos sanos son autolimitantes y curan en pocos días con dieta y rehidratación en niños.¹⁶

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

2.1. DIFUSIÓN RADIAL SIMPLE

En 1965, Mancini introdujo una nueva técnica que empleaba inmunodifusión sencilla para la determinación cuantitativa precisa de los antígenos. Esta técnica provino de la técnica de difusión lineal simple de Oudin, por medio de la incorporación de anticuerpo específico en la placa de agar. La difusión radial se basa en el principio de que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de antígeno colocado en un pozo cortado en la placa de agar con anticuerpo y el anillo de precipitación resultante.³¹

En este trabajo modificaremos el método haciéndolo hemolítico, colocando en la caja de agar eritrocitos de rata y en los pozos cultivos filtrados de *Aeromonas*, en los cuales podría estar presente aerolisina.

La técnica se lleva a cabo según se describe en la figura No 2:

1.5. TRATAMIENTO

Las *Aeromonas* producen metalobetalactamasas (grupo 3), betalactamasas que hidrolizan cefalosporinas (grupo1) y betalactamasas que hidrolizan carbenicilina (grupo 2c) según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Por lo tanto son resistentes a antibióticos betalactámicos como la penicilina, ampicilina y cefalotina. Los estudios realizados en México con 151 cepas aisladas de muestras clínicas, agua y pescado mostraron que la mayoría de las cepas eran sensibles a cefalosporinas de segunda y tercera generación así como las quinolonas, presentando una resistencia variable a los aminoglucósidos y a los macrólidos. Estos resultados evidenciaron que las cefalosporinas y quinolonas pueden utilizarse de manera segura para el tratamiento de las infecciones causadas por las *Aeromonas* y en caso de requerirse por infección de larga evolución o crónica, así como en individuos inmunocomprometidos. En general los cuadros diarreicos en individuos sanos son autolimitantes y curan en pocos días con dieta y rehidratación en niños.¹⁶

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

2.1. DIFUSIÓN RADIAL SIMPLE

En 1965, Mancini introdujo una nueva técnica que empleaba inmunodifusión sencilla para la determinación cuantitativa precisa de los antígenos. Esta técnica provino de la técnica de difusión lineal simple de Oudin, por medio de la incorporación de anticuerpo específico en la placa de agar. La difusión radial se basa en el principio de que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de antígeno colocado en un pozo cortado en la placa de agar con anticuerpo y el anillo de precipitación resultante.³¹

En este trabajo modificaremos el método haciéndolo hemolítico, colocando en la caja de agar eritrocitos de rata y en los pozos cultivos filtrados de *Aeromonas*, en los cuales podría estar presente aerolisina.

La técnica se lleva a cabo según se describe en la figura No 2:

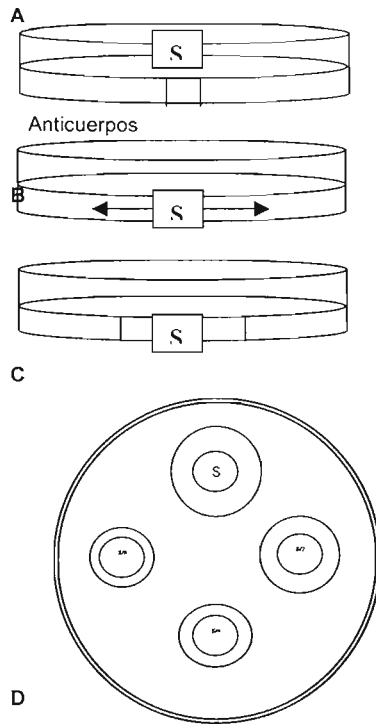


Figura No. 2. Difusión radial simple

Difusión radial simple

- La caja de Petri se llena con una solución semisólida de agar que contiene eritrocitos de rata. Después de que el agar se endurece, los pozos se llenan con una determinada cantidad de material que contiene el cultivo filtrado que provocará la lisis.

- B. Se permite que el cultivo filtrado difunda desde los pozos por un lapso de tiempo.
- C. En el sitio en el que los cultivos filtrados se encuentran con los eritrocitos se presenta la hemólisis formando un anillo de bordes nítidos.
- D. Mediante la dilución seriada de una cantidad conocida de hemolisina S, S/2, S/4, S/8 se forman anillos de magnitud decreciente progresiva. Se puede calcular la cantidad de hemolisinas en especímenes desconocidos comparándolos con un cultivo de referencia.

En el método descrito originalmente por Mancini, el área delimitada por el anillo de precipitación era proporcional a la concentración del antígeno. El punto final de este método requiere que los anillos de precipitación alcancen el máximo tamaño posible, lo que a menudo requiere de 48-72 horas de difusión. De manera alterna, el método de difusión radial simple de J. Fahey permite la medición de los anillos antes de su desarrollo total. En esta modificación, el logaritmo de la concentración del antígeno es proporcional al diámetro del anillo.

Se determina la curva estándar experimentalmente con estándares conocidos de antígeno, en nuestro caso con un cultivo filtrado de referencia de *A. hydrophila* ATCC 7966 y la ecuación que describe la curva puede entonces utilizarse para determinar la concentración de hemolisinas de especímenes desconocidos.

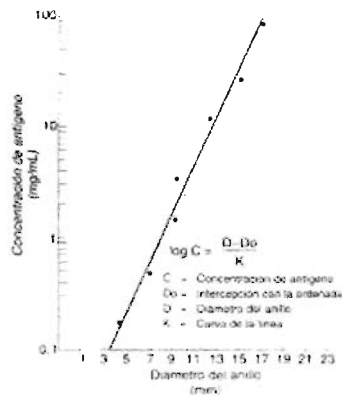


Figura No. 3. Curva estándar para difusión radial simple

En la curva estándar para difusión radial simple la relación entre el diámetro de anillo y la concentración de antígeno se describe por la línea construida mediante cantidades conocidas de antígeno.

2.2. UNIDADES 50% HEMOLÍTICAS

En este trabajo se empleó la técnica de Kent y Fife que se usa para la determinación de complemento pero en esta ocasión se empleó para calcular las unidades 50% hemolíticas de cultivos filtrados de *Aeromonas*, una técnica similar fue empleada por Bernheimer.⁸

La concentración del complemento en suero puede ser determinada usando su capacidad hemolítica. En un principio esto se hacía determinando la mínima cantidad de complemento que era capaz de producir la lisis total (100%) de un número determinado de eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina; sin embargo se sabe que la relación entre cantidad de complemento adicionado y el grado de hemólisis producido no es lineal, sino que se trata de una curva sigmoide.

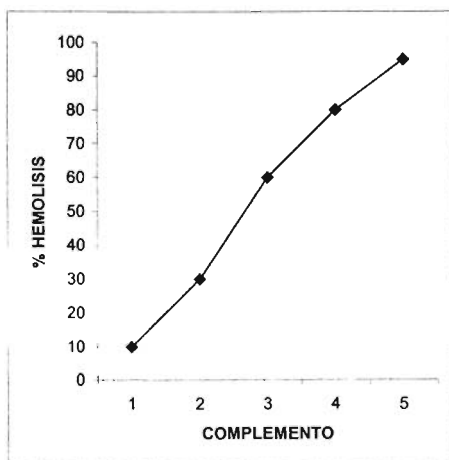


Figura 4. Curva hemólisis causada por el complemento.

Por la forma de la curva resulta evidente que la hemólisis completa (100%) sólo se alcanza gradualmente, y que por lo mismo se requiere de una cantidad mayor de complemento para producir la lisis del último 5-10% de los eritrocitos. La parte central de la curva es prácticamente lineal y cambios pequeños en la cantidad de complemento adicionado se reflejan en un grado proporcional a la hemólisis.

Actualmente para hacer una determinación más precisa del complemento se elige como punto final de la titulación el 50% de hemólisis, localizado en el punto de inflexión de la curva sigmoide.

La unidad 50% hemolítica de complemento o en nuestro caso de los cultivos filtrados se define como la cantidad de cultivo filtrado necesario para la lisis del 50% de eritrocitos presentes en un sistema dado. Ésta es una definición arbitraria, ya que su magnitud dependerá del número de eritrocitos utilizados, la fragilidad de los eritrocitos, la cantidad de hemolisina utilizada para la sensibilización, la clase de hemolisina utilizada, la fuerza iónica del medio de reacción, la concentración de Ca^{++} y Mg^{++} , el pH, la temperatura y el tiempo. Para establecer un sistema de titulación completa todos estos factores deberán ser controlados cuidadosamente. Von Krogh propuso que la relación entre concentración de complemento, que en nuestro estudio son los cultivos filtrados y el grado de hemólisis observado experimentalmente podría representarse en forma muy aproximada mediante la siguiente ecuación.

$$Y = \frac{X^n}{X^n + K} \quad (1)$$

Donde

Y = grado de hemólisis

X = concentración del complemento o cultivo filtrado

n y K = ctes.

Para aplicar la ecuación anterior a la titulación del complemento deberá despejarse a X quedando:

$$X = K \frac{Y^{1/n}}{1-n} \quad (2)$$

La ecuación 2 es la descripción matemática de una curva sigmoide. La transformación logarítmica de la ecuación de Von Krogh da una ecuación que representa una línea recta:

$$\log X = \log K + 1/n \log \frac{Y}{1-n} \quad (3)$$

Considerando que la ecuación general de una recta es:

$$y = mx + b$$

tenemos:

$$y = \log x$$

$$b = \log K$$

$$m = 1/n$$

$$x = \log \frac{Y}{1-n}$$

Con datos experimentales y aplicando la ecuación 3 podemos determinar la concentración de complemento o en nuestro caso cultivo filtrado expresada como número de unidades 50% hemolíticas por mL de suero o cultivo filtrado.²³

2.3. NEUTRALIZACIÓN

El principio de la prueba de neutralización se basa en la capacidad de un antisuero apropiado para disminuir o abolir alguna propiedad biológica del antígeno que no sea su antigenicidad, su toxicidad, su infectividad para células o animales de laboratorio, o su actividad enzimática. La prueba de antiestreptolisina O (ASO) es una prueba de neutralización. La estreptolisina es un agente hemolítico producido por estreptococos del grupo A y también es antigénica. Los anticuerpos que aparecen en el suero de una persona por una infección de estreptococos del grupo A neutralizarán esta propiedad hemolítica.⁶

Neutralización de las toxinas

Los anticuerpos antitoxinas neutralizan de manera específica los efectos biológicos de las toxinas. De esta manera se puede neutralizar la inflamación o el efecto letal de las toxinas en el animal mediante inyección de un suero antitoxinas. La neutralización de las toxinas también puede observarse *in vivo* en el hombre.

Así los sujetos que tienen antitoxinas no presentan la reacción inflamatoria comúnmente observada después de la inyección intradérmica de una baja dosis de toxina. Éste es el principio de las reacciones de Schick (para la difteria) y de Dick (para la escarlatina).³³

2.4. CUANTIFICACIÓN DE ENTEROTOXINA POR EL MÉTODO DE ASA LIGADA DE CONEJO

Las enterotoxinas causan una alteración de la actividad metabólica de las células del epitelio intestinal que provoca una liberación de electrolitos y líquido en el lumen, actúan principalmente en el yeyuno y primera porción del íleon donde se produce la mayor parte del transporte del líquido. Las heces de los pacientes causadas por una enterotoxina que compromete al intestino delgado son profusas y acuosas y la presencia de neutrófilos polimorfonucleares y la sangre son características prominentes.³

El asa ligada de conejo es una prueba clásica para la detección de enterotoxina, para esta prueba se anestesia un conejo y se extrae a través de una incisión de la pared abdominal una sección larga del íleon. Con hilo de sutura se ligan diversos segmentos de íleon de unos 10 cm de longitud, de manera que parezca una ristra de chorizos. Mediante una jeringa y aguja se inyectan en el lumen de distintas secciones volúmenes iguales de filtrado de cultivo en estudio, un filtrado positivo conocido y un control negativo solo con el medio de cultivo. El íleon es reintroducido en el abdomen del conejo y se cierra la incisión.³

Luego de un periodo de 18 horas se sacrifica el conejo y se examinan las asas intestinales. Aquellas que reciben enterotoxinas se encuentran distendidas con líquido que ha sido secretado al interior del asa, mientras que las que no han recibido enterotoxina, se mantienen como los controles, sin presentar ninguna distensión. En un mismo conejo pueden probarse varios materiales diferentes.

Una unidad asa (loop) por mL (Lu/mL) se define como la dilución recíproca de toxina causante de la acumulación de fluido de al menos 1 mL/cm de intestino.³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La patogenicidad de *Aeromonas* es debido principalmente a las toxinas extracelulares que producen durante su crecimiento; debido a que no se cuenta con un método comercial para saber si la cepa de *Aeromonas* es o no toxigénica y el grado de toxigenicidad de ésta, se propone un método hemolítico de difusión radial simple para determinar si está presente o no la toxina aerolisina en un cultivo filtrado de *Aeromonas* aislada de una muestra de agua potable.

OBJETIVOS

1. Obtener los cultivos filtrados de las cepas de *Aeromonas* cultivados en caldo BHI con condiciones específicas de temperatura, tiempo y agitación.
2. Cuantificar por microtitulación la capacidad de hemólisis de los cultivos filtrados de *Aeromonas* sobre eritrocitos de rata.
3. Determinar las unidades 50% hemolíticas del cultivo filtrado de *A. hydrophila* ATCC 7966 según la técnica de Kent y Fife para la determinación de complemento.
4. Realizar una curva estándar de unidades 50% hemolíticas vs. halos de inhibición con el cultivo filtrado de *A. hydrophila* ATCC 7966 por el método de difusión radial simple.
5. Determinar las unidades 50% hemolíticas de los cultivos filtrados de *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. jandaei* y *A. caviae* por difusión radial simple.
6. Cuantificar el título de neutralización del antisuero aerolisina por medio de microtitulación en placa.
7. Detectar aerolisina en cultivos filtrados de *Aeromonas* por difusión radial simple.
8. Evaluar el efecto enterotoxigénico de los cultivos filtrados de *Aeromonas* en conejos de Nueva Zelanda por medio de la prueba asa ileal ligada de conejo, midiendo la cantidad de edema producido.

HIPÓTESIS

La determinación de la actividad de aerolisina por el método hemolítico de difusión radial simple debe ser similar a la actividad encontrada por la técnica convencional de unidades 50% hemolíticas.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

Prospectivo, descriptivo, transversal y observacional.

POBLACIÓN

Para aplicar a cultivos de *Aeromonas* aisladas de muestras de agua.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Cultivos filtrados de cepas puras de *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* y *A. jandaei* caracterizados previamente y aisladas de muestras de agua.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Cepas que no posean las características fenotípicas, la morfología colonial y microscópica de *Aeromonas*.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Todo cultivo contaminado de *Aeromonas*.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Purificación y caracterización de las cepas de *Aeromonas*

Condiciones de incubación de los cultivos de *Aeromonas*

Obtención de los cultivos filtrados libre de células de *Aeromonas*

Suspensiones de eritrocitos de rata no hemolisados

Preparación de cajas de agarosa con eritrocitos

Diluciones

Manejo de pipetas

VARIABLES DEPENDIENTES

Número de ensayos

Lisis de los eritrocitos de rata que cada cultivo filtrado de las diferentes cepas de *Aeromonas* provoca.

Cepas productoras de aerolisina

MATERIALES

EQUIPO

MARCA

Agitador Vortex-Genie

Scientific Industries, NC.

Balanza analítica máx 160 g. d=0.1

Mettler H80

Balanza granataria Triple Beam Balance de 2610 g. de capacidad

OHAUS

Centrífuga

Solbat. Aparatos científicos

Incubadora con agitación y temperatura controladas

New-Brunswick scientific

Centrífuga IEC B-20

Damon IEC division

Incubadora

RIOSSA

Microscopio óptico

Zeizzer

Placa de agitación

Bellco Glass Inc.

Incubadora con sistema de circulación 253

Precisión

MATERIAL DE VIDRIO

MARCA

Cajas petri de vidrio

Pyrex y Kimax

Matraces Erlenmeyer de 500 mL

Pyrex

Probetas de 2000 mL.

Pirex

Matraces volumétricos de 50, 100 y 1000 mL.	Pirex
Pipetas graduadas de vidrio de 1, 5 y 19 mL	Pirex
Portaobjetos	Corning
Tubos de ensayo de 12X75, 13X100 y 18X150 mm.	Pyrex y Kimax
Vasos de precipitado de 20,100,250,500 y1000 mL.	Pirex

MATERIAL DE PLÁSTICO

MARCA

Camisas para IEC B-20 A centrifuge	
Placas de poliestireno y de polivinilo de alta adherencia de 96 pocillos con fondo en U	Inter-Med Nunc y Corning
Puntas eppendorf para carga de muestra en geles	Sigma-Eppendorf
Puntas desechables de 200 y 1000 microlitros	Sigma-Eppendorf

MATERIAL BIOLÓGICO

Aeromonas hydrophila ATCC 7966

6 cepas de *Aeromonas hydrophila*

2 cepas de *Aeromonas sobria*

2 cepas de *Aeromonas caviae*

1 cepas de *Aeromonas jandaei*

ANIMALES DE LABORATORIO

ESPECIE

Ratas	Winstar
Conejos	Nueva Zelanda blanco

MATERIAL ESTÉRIL

MARCA

Filtros estériles de plástico	Nalgene
Membranas celulares de 0.22 micras	Millipore
frascos de plástico estéril para cultivo celular de 30 y 250 mL.	Nunclon
Jeringas de plástico desechables de 1, 3 y 10 mL.	Plastipack
Tubos de plástico estériles de 12X75 con tapón	Qfalcon. Becton Dickinson

MATERIAL ESPECIAL

Pipeta automática tipo Eppendorf de 5-40 microlitros	Finnpipette
Pipetas automáticas tipo eppendorf de 50 microlitros para 8 puntas	Costar

MATERIAL Y EQUIPO DE DISECCIÓN

Hojas de bisturí estéril y desechable	Mango para bisturí No. 4
Tijeras porta aguja Mayo-Hegar de 18 cm	Tabla de disección
Tijeras de disección con punta roma	Pinzas de disección de 14.5 cm
Pinza de disección con dientes de ratón de 14 cm	

AGUJA ATRAUMÁTICA 1/2 CÍRCULO REDONDA CON HILO

Características del hilo:	Tipo
B-5 26mm-Hilo seda american negra trenzada tratada con silicón, estéril no absorbible calibre 00 75cm	Seda American
T-5 Hilo quirúrgico estéril crómico calibre 00 67 cm	CatGut Davis& Geck
3/8 19 mm Hilo monofilamento azul 3-0 nylon estéril no absorbible calibre 00 45	Atramat

REACTIVOS

Ácido clorhídrico HCl

Ácido cítrico $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Citrato de sodio $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Cloruro de sodio NaCl

Dextrosa $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

Gelatina U.S.P.

Hidróxido de sodio NaOH

Tris-hidroxi-amino-metano $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

MARCA

EM Science

J.T. Baker Analyzed

Técnica Química S.A.

Técnica Química S.A.

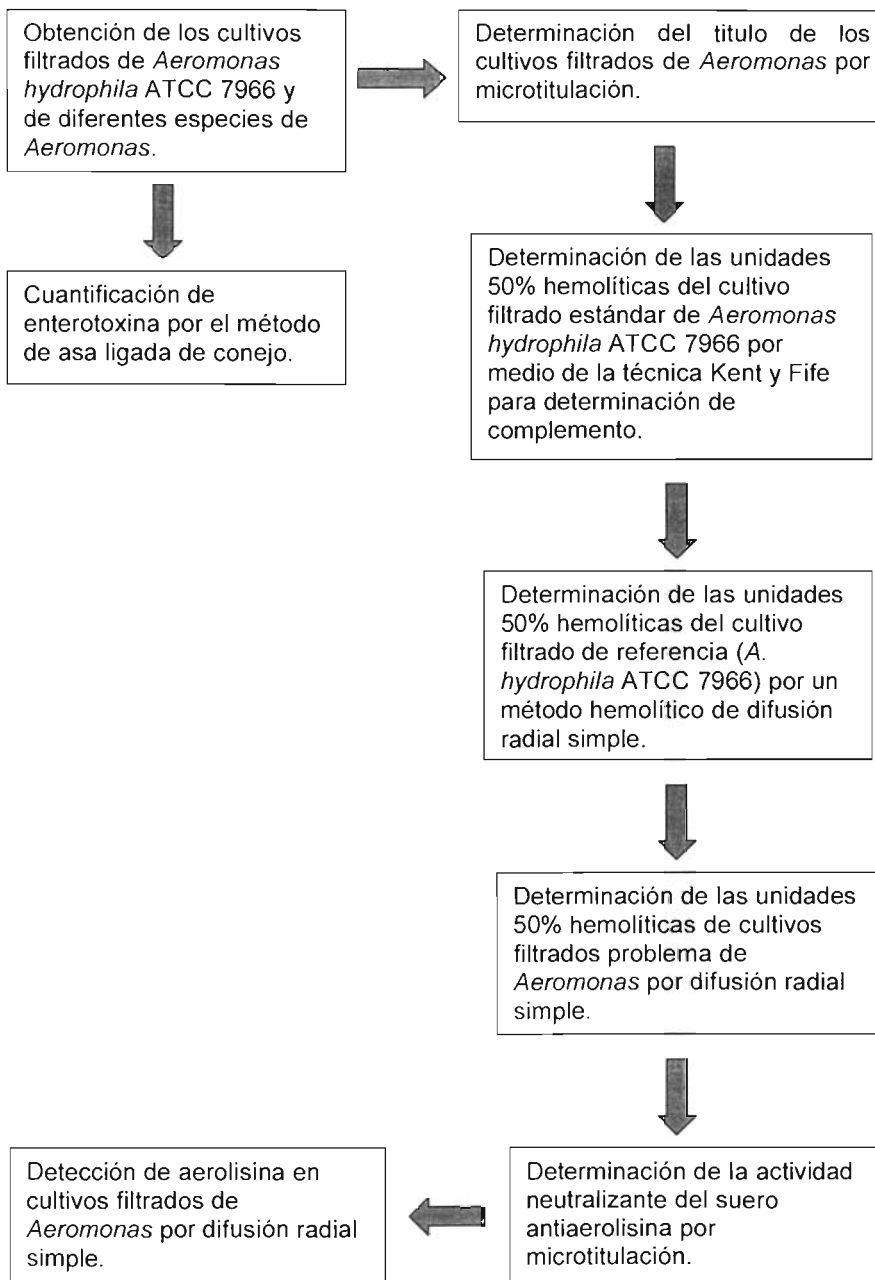
J.T. Baker Analyzed

J.T.. Baker Analyzed

Merck

Sigma grado reactivo

DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODOS

Obtención de los cultivos filtrados de cepas de *Aeromonas* previamente purificadas.

1. Sembrar por estría las cepas de *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. jandae* y *A. hydrophila* ATCC 7966 en tubos inclinados de AST. Incubar a 35° C por 24 h.
2. Cosechar los cultivos e inocular en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de Caldo BHI. Incubar a 22° C con agitación de 150 rpm durante 19 h.
3. Ajustar las suspensiones al 1.0 de absorbancia a 650 nm utilizando solución salina como blanco.
4. Separar el sobrenadante de la biomasa de los cultivos, centrifugando a 10,000 rpm durante 30 min en una centrifuga refrigerada.
5. Filtrar los sobrenadantes con membranas estériles de 0.22 µm.

Cuantificación enterotóxica de los cultivos filtrados de *Aeromonas* por el método de asa ligada de conejo.

1. Se realiza en un conejo Nueva Zelanda blanco que tenga un peso corporal entre 1.3 – 2.3 kg.
2. Aplicar como anestésico general pentobarbital sódico (anestosal Pfizer) a una dosis de 1 mL por cada 2.5 kg de peso por vía intravenosa abrir cavidad peritoneal y extraer intestino delgado para localizar íleon.
3. Del tramo que se va a ligar se hacen 9 segmentos. Inocular alternando un segmento con cultivo filtrado y otro con caldo BHI estéril.
4. Una vez terminada la inoculación se procede a suturar la región abdominal. Desinfectar la región y dejar el conejo en recuperación.
5. Sacrificar el conejo después de 16-18 h aplicando una sobredosis de anestésico (2 mL/2.5 kg de peso). Proceder a retirar todos los puntos de sutura, extraer el intestino delgado y localizar el asa ligada.

6. Medir el volumen del líquido acumulado, una acumulación de 0.5 mL / cm o más se reporta como prueba positiva, un fluido sanguinolento indica probable destrucción de la mucosa.

Determinación del título de hemólisis de los cultivos filtrados de *Aeromonas* por microensayo.

1. Colocar 50 μ L de amortiguador (Tris-gelatina-cloruro de sodio) en cada uno de los pozos de la placa de microtitulación.
2. Adicionar 50 μ L del cultivo filtrado (concentrado) al primer pozo de las filas y hacer diluciones mezclando bien 5 veces hasta llegar al pozo 11.
3. Adicionar 50 μ L de una suspensión de glóbulos rojos de rata en amortiguador (Tris-gelatina-cloruro de sodio) ajustados a 0.8 de densidad óptica a todos los pozos incluyendo los testigos que son los pozos No. 12 de cada fila.
4. Incubar a 35° C por 10 min y leer el título de hemólisis.

Determinación de las unidades 50% hemolíticas del cultivo filtrado de *A. hydrophila* ATCC 7966 por medio de la técnica modificada de Kent y Fife.

1. Lavar los glóbulos rojos de rata por centrifugación a 2000 rpm por 5 min con solución salina.
2. Ajustar la suspensión de glóbulos rojos de rata, colocando en un tubo de 13X100, 0.6 mL de la suspensión de eritrocitos en amortiguador (Tris-gelatina-cloruro de sodio) y adicionar 1.4 mL de agua destilada, la densidad óptica a 545 nm deberá ser de 0.8, usando como blanco agua destilada.
3. Preparar las siguientes diluciones de los cultivos filtrados de *Aeromonas*.

- Dilución 1:25 0.2 mL del cultivo filtrado + 4.8 mL de TRIS
 Dilución 1:50 2.5 mL de la dilución 1:25 + 2.5 mL de TRIS
 Dilución 1:100 2.5 mL de la dilución 1:50 + 2.5 mL de TRIS

4. Colocar en una gradilla 12 tubos de 13X100, 4 para cada dilución más 2 tubos (tubo negativo y tubo positivo). Realizar una serie para cada dilución.

Tubo	1	2	3	4	Testigo (+)	Testigo (-)
Cultivo filtrado	0.5 mL	0.35 mL	0.25 mL	0.15 mL	0 mL	0 mL
amortiguador	0.4 mL	0.55 mL	0.65 mL	0.75 mL	0 mL	0 mL
GRR 0.8 abs.	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL

5. Mezclar perfectamente e incubar a baño María 30 min a 37° C con agitación constante.
6. Transcurrido el tiempo de incubación retirar los tubos del baño y adicionar 0.5 mL de TRIS frío para detener la reacción, excepto al tubo testigo positivo que se le adiciona 1.4 mL de agua destilada.
7. Centrifugar los tubos a 2000 rpm 5 min y decantar el sobrenadante sobre un tubo limpio y leer la densidad óptica a 545 nm usando como blanco el testigo negativo y como 100% de lisis la lectura del testigo positivo.
8. Graficar sobre un papel semilogarítmico de probitas.

Determinación de las unidades 50% hemolíticas de cultivos filtrados de diferentes cepas de *Aeromonas* y del cultivo de referencia *Aeromonas hydrophila* .ATCC 7966 por difusión radial simple.

1. Preparar placas para difusión radial simple con 1.4 mL de agarosa al 0.8% y 600 μ L de una suspensión de eritrocitos de rata al 0.8 de absorbancia y hacer 6 pozos en cada placa.
2. Preparar las diluciones de la curva estándar.
3. Colocar 100 μ L del cultivo filtrado de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 en el primer pozo de la fila A de una placa de microtitulación.
4. Adicionar 50 μ L de amortiguador (Tris-gelatina-cloruro de sodio) a los siguientes 3 pozos.
5. Agregar 50 μ L del cultivo filtrado sin diluir al pozo no. 2 y hacer diluciones mezclando bien 5 veces hasta llegar al pozo 4, quedando así las siguientes concentraciones: sin diluir, 1:2, 1:4 y 1:8.
6. Hacer diluciones 1:4 del cultivo estándar (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966) y de los cultivos filtrados problema.
7. Usar 9 placas para la curva estándar, 3 para cada concentración, excepto para la concentración 1:4 con la cuál se llenan 3 pozos de cada placa. De esta manera en las 9 placas habrá 27 zonas de hemólisis para la concentración 1:4 y 9 zonas de hemólisis para cada una de las otras 3 concentraciones tipo, cada pozo se llena con 3 μ L.
8. Usar 3 placas para cada muestra problema cada una tiene 6 pozos los cuales se llenan alternando 3 con la dilución 1:4 del cultivo filtrado estándar y 3 con la dilución 1:4 del cultivo filtrado problema. De esta manera habrá 9 zonas de hemólisis tanto para la dilución estándar como para la muestra problema. Cada pozo se llena con 3 μ L.
9. Incubar todas las placas a 35° C por 30 min.
10. Medir los diámetros de hemólisis por medio de una regla con divisiones de milímetros.

Determinación de la actividad neutralizante del suero antiaerolisina por microtitulación.

1. Colocar 50 μL de amortiguador (Tris-gelatina-cloruro de sodio) en cada uno de los pozos de la placa de microtitulación de la fila A.
2. Adicionar 50 μL del suero antiaerolisina al primer pozo de la fila A y se va diluyendo, mezclando bien 5 veces hasta llegar al pozo 11.
3. Adicionar 50 μL de la dilución 1:4 del cultivo filtrado y agitar suavemente.
4. Incubar a 35° C por 30 min.
5. Adicionar 50 μL de una suspensión de glóbulos rojos de rata en amortiguador al 0.8 de absorbancia a 545 nm.
6. Incubar a 35° C por 60 minutos.

Detección de aerolisina en cultivos filtrados de *Aeromonas* por difusión radial simple.

1. Preparar un juego de 3 placas con 1.4 mL de agarosa al 0.8% y 0.6 mL de una suspensión de eritrocitos de rata al 0.8 de absorbancia por cada muestra problema a analizar.
2. Hacer 6 perforaciones a cada placa con un horador metálico.
3. Preparar las mezclas de suero antiaerolisina con cultivos filtrados problema de diferentes géneros de *Aeromonas* y la cepa de referencia (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966).
4. Adicionar 50 μL de la dilución del suero antiaerolisina (una menos que el título de neutralización) a cada pozo de la fila A de una placa de microtitulación.
5. Adicionar 50 μL de la dilución correspondiente a 4UH de cada cultivo filtrado de *Aeromonas* a cada uno de los pozos de la fila A.
6. Mezclar suavemente e incubar a 35° C por 30 min.

7. Por cada cultivo filtrado problema emplear 3 placas de difusión radial simple, llenando 3 pozos con 3 μL del cultivo filtrado problema y 3 con 3 μL del cultivo estándar de manera alterna.
8. Incubar a 35° C por 30 min.
9. Leer los halos de hemólisis.

RESULTADOS

Tabla 1. Título de hemólisis por aglutinación de los cultivos filtrados de *Aeromonas* spp. por microensayo

Clave	Nombre	título de hemolisis
1	<i>A. hydrophila</i>	9
2	<i>A. caviae</i>	9
3	<i>A. sobria</i>	7
4	<i>A. hydrophila</i>	7
5	<i>A. caviae</i>	6
6	<i>A. hydrophila</i>	9
7	<i>A. hydrophila</i>	0
8	<i>A. hydrophila</i>	6
9	<i>A. jandai</i>	0
17	<i>A. sobria</i>	6
18	<i>A. hydrophila</i>	9
24	<i>A. hydrophila</i>	9
R.	<i>A. hydrophila</i>	9

Tabla 2. Determinación de las unidades 50% hemolíticas del cultivo filtrado de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 por medio de la técnica modificada de Kent y Fife.

1. Absorbancia de la suspensión de eritrocitos 0.791

2. Dilución 1:25 del cultivo filtrado

mL de Dilución	Absorbancia	% de Hemólisis
0.50	0.874	110.49
0.35	0.828	104.67
0.25	0.800	101.13
0.15	0.687	86.85

3. Dilución 1:50 del cultivo filtrado

mL de Dilución	Absorbancia	% de Hemólisis
0.50	0.815	103.03
0.35	0.808	102.14
0.25	0.747	94.43
0.15	0.406	51.32

4. Dilución 1:100 del cultivo filtrado

mL de Dilución	Absorbancia	% de Hemólisis
0.50	0.750	94.81
0.35	0.684	86.47
0.25	0.520	65.73
0.15	0.180	22.75

5. La construcción de la curva se hizo con los resultados de la dilución 1:100 (mL del cultivo filtrado de referencia vs. Absorbancia).

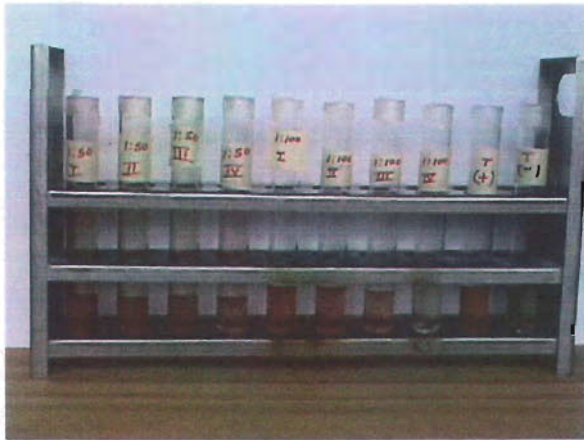
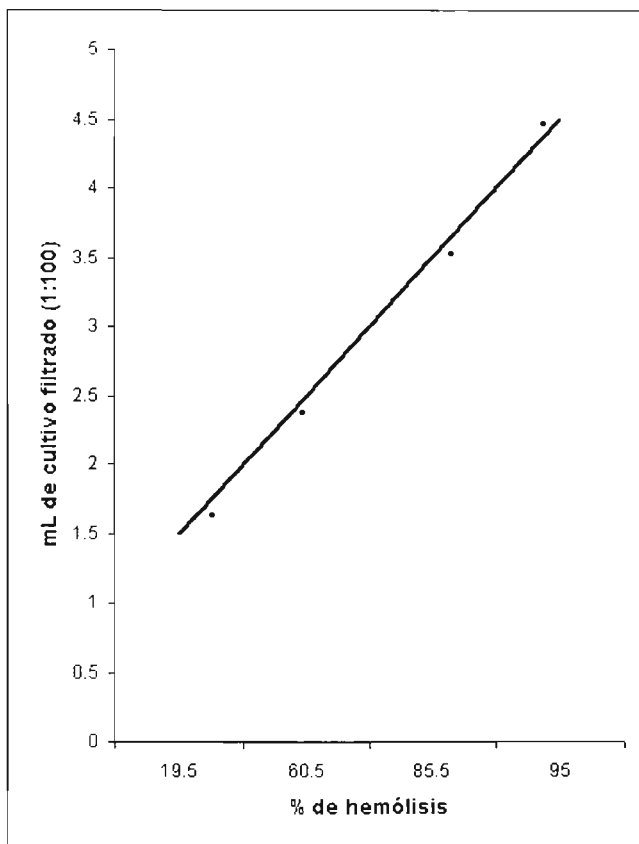


Figura 1. Muestra las hemólisis de las diferentes diluciones del cultivo filtrado de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 determinada por medio de la técnica modificada de Kent y Fife.



Gráfica 1. % de hemólisis de las diferentes diluciones del cultivo filtrado de referencia *A. hydrophila* ATCC 7966 por el método de Kent y Fife.

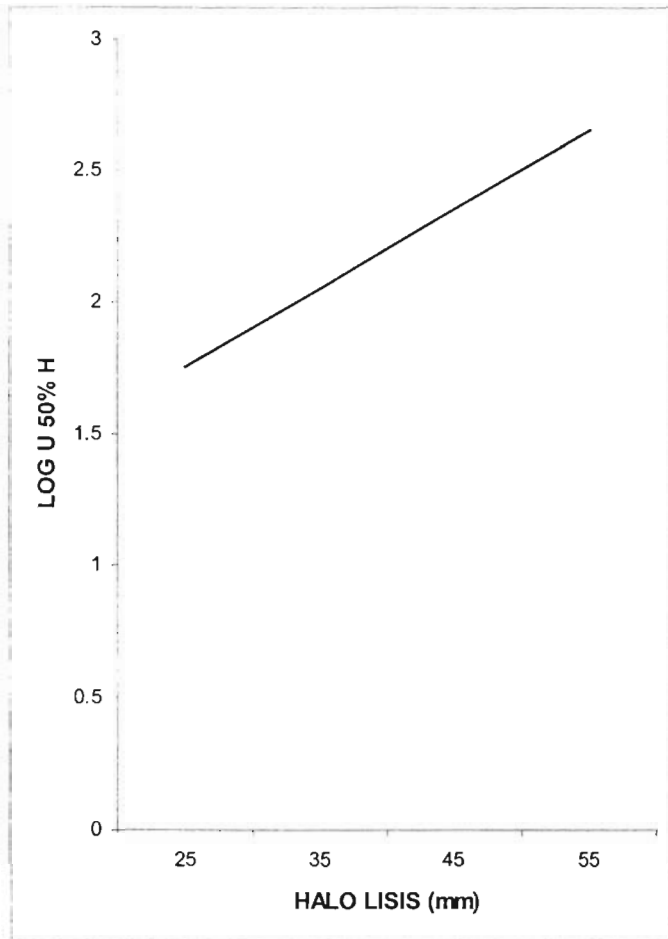
Tabla 3. Unidades 50% hemolíticas de cultivos filtrados de *Aeromonas* por difusión radial simple.

CULTIVO REFERENCIA DE <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966						
Dilución	1:8	1:4	1:2	1:4	s/d	1:4
U50%H	56.75	227	113.5	227	454	227
LOG	1.753	2.054	2.356	2.054	2.657	2.054
U50%H						
CAJA 1	25	35	40	35	55	35
	20	35	45	35	55	35
	30	35	45	35	55	35
CAJA 2	25	35	50	35	60	35
	25	35	45	35	55	35
	25	35	45	35	55	35
CAJA 3	25	35	45	35	50	35
	25	30	45	30	55	35
	25	35	45	40	55	35
X	25	40	45	35	55	35

	CEPA 2		CEPA 3		CEPA 4		CEPA 5	
	<i>A. caviae</i>		<i>A. sobria</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. caviae</i>	
	Pb	St	Pb	St	Pb	St	Pb	St
CAJA 1	35	35	30	35	30	35	25	35
	40	35	30	35	30	35	25	35
	30	35	30	35	30	35	25	35
CAJA 2	35	30	35	35	30	35	25	35
	35	35	30	35	30	35	25	35
	35	35	35	35	30	35	25	35
CAJA 3	35	35	30	35	30	35	25	35
	35	35	30	35	30	35	30	40
	35	40	30	35	30	35	20	30
X	35	35	30	35	30	35	25	35

	CEPA 6		CEPA 7		CEPA 8		CEPA 9	
	<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. caviae</i>	
	Pb	St	Pb	St	Pb	St	Pb	St
CAJA 1	25	35	0	35	25	35	25	35
	25	35	0	35	30	30	25	35
	25	35	0	35	20	40	25	35
CAJA 2	25	35	0	35	25	35	25	35
	25	35	0	35	25	35	25	35
	25	35	0	35	25	35	25	35
CAJA 3	25	35	0	35	25	35	25	35
	25	35	0	35	25	35	30	40
	25	35	0	35	25	35	20	30
X	25	35	0	35	25	35	25	35

	CEPA17		CEPA 18		CEPA 24		CEPA R	
	<i>A. sobria</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i>	
	Pb	St	Pb	St	Pb	St	Pb	St
CAJA 1	25	35	35	35	35	35	35	35
	25	5	35	35	35	35	35	35
	25	35	35	35	35	35	35	35
CAJA 2	25	35	35	35	35	35	35	35
	25	35	35	35	35	35	35	35
	25	35	35	35	35	35	35	35
CAJA 3	25	35	35	35	35	35	35	35
	25	35	35	35	35	35	35	35
	25	35	35	35	35	35	35	35
X	25	35	35	35	35	35	35	35



Gráfica 2. Unidades 50% hemolíticas del cultivo filtrado de referencia de *A. hydrophila* ATCC 7966 por difusión radial simple.

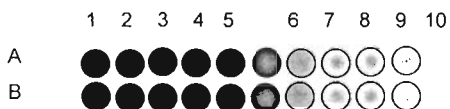
Tabla 4. Unidades 50% hemolíticas de los cultivos filtrados

Número de cepa	Cepa	Título de Hemólisis por hemaglutinación	Dilución 1:4 mm de lisis	log U50% H	U50% H
1	<i>A. hydrophila</i>	9	35	2.05	448.8
2	<i>A. caviae</i>	9	35	2.05	448.8
3	<i>A. sobria</i>	7	30	1.88	303.9
4	<i>A. hydrophila</i>	7	30	1.88	303.9
5	<i>A. caviae</i>	6	25	1.74	219.8
6	<i>A. hydrophila</i>	9	35	1.74	448.8
7	<i>A. hydrophila</i>	0	-	-	-
8	<i>A. hydrophila</i>	6	25	1.74	219.8
9	<i>A. jandaei</i>	0	-	-	-
17	<i>A. sobria</i>	6	25	1.74	219.8
18	<i>A. hydrophila</i>	9	35	2.05	448.8
24	<i>A. hydrophila</i>	9	35	2.05	448.8
R	<i>A. hydrophila</i>	9	35	2.05	448.8

Tabla 5. Actividad neutralizante del suero antiaerolisina

Dilución del cultivo filtrado de *A. hydrophila* ATCC 7966: 0.1 mL en 5.6 mL.

Testigo negativo: buffer + cultivo filtrado + susp. de eritrocitos



Título del suero antiaerolisina 1:32

Tabla 6. Detección de Aerolisina en cultivos filtrados de *Aeromonas* spp. por difusión radial simple

Dilución del suero Antiaerolisina 1:32

Dilución de los cultivos filtrados 4UH

	cepa 2		cepa 3		cepa 4		Cepa 5	
	<i>A. caviae</i>		<i>A. sobria</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. caviae</i>	
	Pb	St	Pb	St	Pb	St	Pb	St
Caja 1	0	35	30	35	0	35	25	35
	0	35	30	35	0	35	25	35
	0	35	30	35	0	35	25	35
Caja 2	0	35	30	35	0	35	25	35
	0	35	30	35	0	35	25	35
	0	35	30	35	0	35	25	35

	cepa 6		cepa 8		cepa 17		cepa 18	
	<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. sobria</i>		<i>A. hydrophila</i>	
	Pb	0	Pb	St	Pb	St	Pb	St
Caja 1	25	35	25	35	0	35	0	35
	-	-	25	35	0	35	0	35
	25	35	-	-	0	35	0	35
Caja 2	25	35	25	35	0	35	0	35
	25	35	25	35	0	35	0	35
	25	35	25	35	0	35	0	35

	cepa 24		cepa R		Tres cepas de <i>A. hydrophila</i> una cepa de <i>A. sobria</i> y una de <i>A. caviae</i> producen Aerolisina que es neutralizada por el antisuero.
	<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i>		
	Pb	St	Pb	St	
Caja 1	35	35	0	35	
	35	35	0	35	
	35	35	0	35	
Caja 2	35	35	0	35	
	35	35	0	35	
	35	35	0	35	

Tabla 7. Actividad de aerolisina reportada como unidades 50% hemolíticas usando glóbulos rojos de rata.

Cepa	Media error estándar de las unidades 50% H	Porcentaje de cepas que Presentaron actividad
<i>A. hydrophila</i> n= 10	366.5+/- 47.97	9/10 = 90%
<i>A. caviae</i> n= 2	334.3+/-114.5	2/2 = 100%
<i>A. sobria</i> n= 2	261.85+/- 42.05	2/2 = 100%
<i>A. jandaei</i> n= 1	no mostró actividad	0/1 = 0%

Tabla 8. Los mililitros de líquido infiltrado en los segmentos, se presentan corregidos, se les restó el fondo desarrollado por los testigos.

Cepa	Media error estándar de los mililitros de infiltrados	Porcentaje de enterotoxigenidad
<i>A. hydrophila</i> n= 10	3.25+/-0.58	9/10 = 90%
<i>A. sobria</i> n= 2	2.65+/-1.35	2/2 = 100%
<i>A. caviae</i> n= 2	1.10+/- 0.50	2/2 = 100%
<i>A. jandaei</i> n= 1	2.5	1/1 = 100%



Figura 2. Líquido acumulado extraído de las asas de ileon ligado de conejo después de 18 horas de inoculado con cultivos filtrados de *Aeromonas*. Conejo 1.

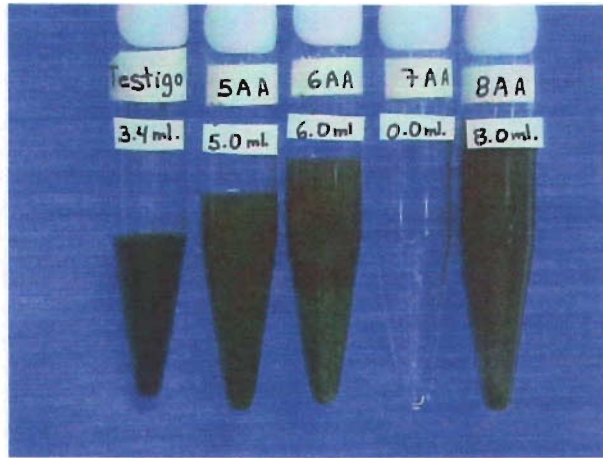


Figura 3. Líquido acumulado extraído de las asas de íleon ligado de conejo después de 18 horas de inoculado con cultivos filtrados de *Aeromonas*. Conejo 2.

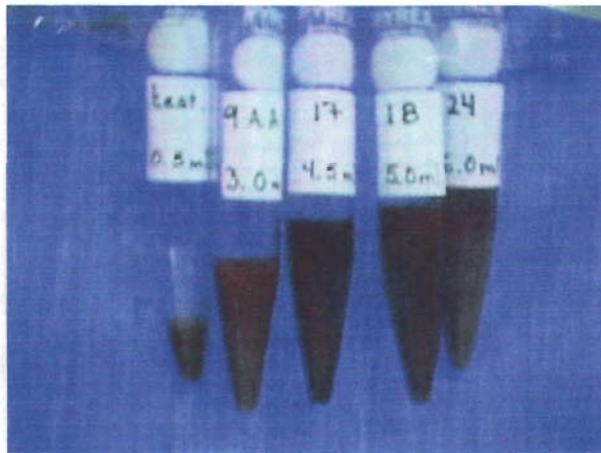


Figura 4. Líquido acumulado extraído de las asas de íleon ligado de conejo después de 18 horas de inoculado con cultivos filtrados de *Aeromonas*. Conejo 3.

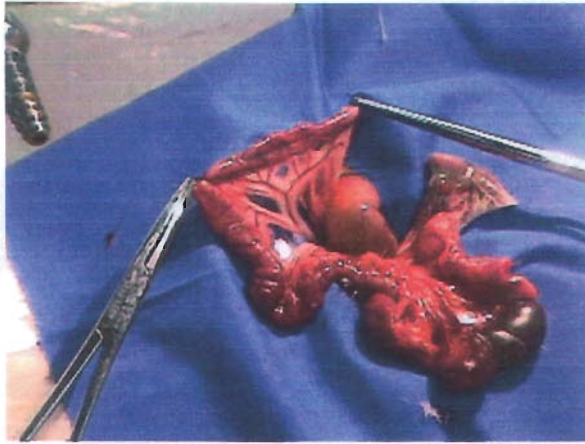


Figura 5. Muestra los diferentes segmentos de íleon de conejo ligado después de 18 horas de haber sido inoculado. Conejo 1.



Figura 6. Muestra los diferentes segmentos de íleon de conejo ligado después de 18 horas de haber sido inoculado. Conejo 2.

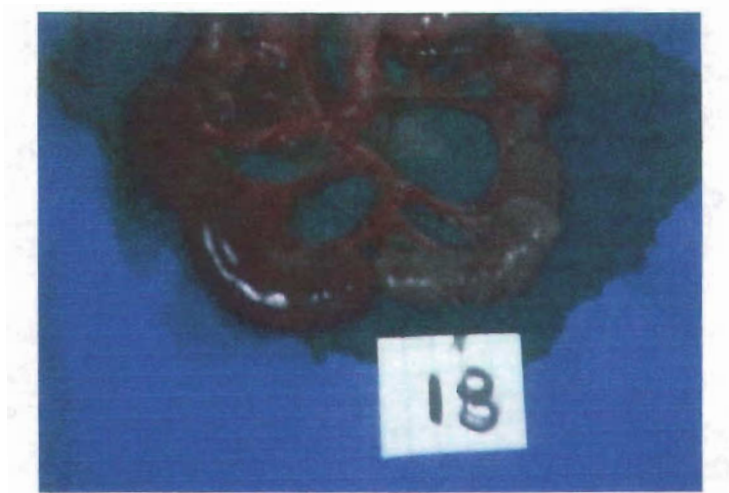


Figura 7. Muestra el daño de la mucosa causada por *Aeromonas* productoras de terolisina.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El presente trabajo se basó principalmente en determinar presencia de aerolisina en cultivos sobrenadantes de *Aeromonas* spp. porque es uno de los principales indicativos de patogenicidad, esto de acuerdo con los datos que se encuentran en la literatura, principalmente los de Chakraborty y col.¹⁹ quienes estudiaron el papel de la aerolisina en infecciones sistémicas, y usaron cepas de *Aeromonas hydrophila* con marcadores mutagénicos que no produjeron aerolisina y son mucho menos toxigénicas que las cepas originales, ellos también detectaron que a los ratones que se les suministró antisuero aerolisina sobrevivieron a la infección. En estudios posteriores, Vadivelu y col.³³ encontraron que la toxina fue producida por todas las cepas que fueron empleadas de pacientes con bacteremia y ninguna de las cepas produjo enterotoxina.

Se identificó aerolisina en cultivos sobrenadantes de tres cepas de *Aeromonas hydrophila*, (30% del total de las muestras), una de *Aeromona sobria* (50%) y una de *Aeromona caviae* (50%) con la técnica de difusión simple para contribuir con una técnica que determine aerolisina, ya que muchos de los estudios experimentales no han sido lo bastante específicos para diferenciar las sustancias que producen *Aeromonas*. Los ensayos basados en la hemólisis, citotoxicidad o acumulación de fluidos pueden o no detectar aerolisina y muchos estudios no pueden distinguir la toxina de otras proteínas existentes debido a que la aerolisina no es el único producto extracelular que produce *Aeromonas* spp, los ensayos que proceden de la hemólisis pueden dar resultados equívocos, por ejemplo la lipasa también causa hemólisis.²

Al emplear el método de difusión radial simple para determinar la presencia de aerolisina disminuimos el tiempo y costo de análisis, ya que se analizamos 12

cultivos a la vez, construyendo una curva de referencia con un cultivo sobrenadante de *Aeromonas* con unidades 50% hemolíticas conocidas y productora de aerolisina.

La aerolisina es una de las más potentes toxinas citolíticas, se requieren concentraciones bajas para lisar células sensibles. Se empleó eritrocitos de rata, ya que esta especie es la más sensible a la toxina, así lo demostraron Bernheimer y col.⁸, al darse cuenta que concentraciones por debajo de 10^{-10} M son necesarios para lisar eritrocitos de rata en 1 h, las células humanas son las que le siguen en sensibilidad ya que se requieren concentraciones de 10^{-8} M.

La aerolisina y la GCTA (enterotoxina) son liberadas como protoxinas, la proaerolisina es incapaz de formar canales, sin embargo la proaerolisina y la aerolisina pueden llegar a matar células. Howard y Buckley²³ demostraron que los eritrocitos de rata son los más sensibles a la aerolisina porque contienen un receptor glicoproteína que es altamente afín a la toxina y a la protoxina.

La prueba de enterotoxicidad en asa ligada de conejo nos dio una idea del grado de toxicidad de las cepas, aunque desafortunadamente la presencia de aerolisina en la mayoría de los cultivos sobrenadantes de *Aeromonas* continúan causando confusión en estudios de la presencia y/o propiedades de enterotoxinas citotóxicas. Ljungh y col.²⁷ quienes obtuvieron una preparación parcialmente purificada de *A. hydrophila* que está libre de la actividad citolítica (aerolisina) y la cuál causa secreción del fluido intestinal sin daño en la mucosa en la prueba de asa ligada de conejo y rata.

Experimentalmente encontramos que las cepas que causaron daño a la mucosa son productoras de aerolisina, el fluido intestinal producido después de administrar el cultivo sobrenadante fué sanguinolento y hubo inflamación de la mucosa.

CONCLUSIONES

Se alcanzaron los objetivos planteados al detectar aerolisina en cultivos filtrados de *Aeromonas* por el método de difusión radial simple permitiéndonos conocer el grado de patogenicidad de las cepas.

Se determinaron las unidades 50% H de un cultivo filtrado de *Aeromonas hydrophila* productora de aerolisina con la técnica de Kent y Fife para construir una curva estándar y determinar las U50% H de los cultivos filtrados problema.

Con el método de difusión radial simple se analizaron 12 muestras a la vez, reduciendo así costo y tiempo de análisis; así como contribuir con un método alternativo para determinar grado de patogenicidad en *Aeromonas* spp.

Los resultados de la prueba de enterotoxinas por el método de asa ligada de conejo corresponden con los de las U50%H siendo las más patógenas

A. hydrophila con una media de 366.5 U50%H/mL y un volumen de líquido infiltrado de 3.25 mL; *A. caviae* con 334.3 U50%H y 2.65 mL; *A. sobria* con 261.8 U50%H y 1.1 mL.

PROPUESTAS

1. Identificar el género en especies aisladas de muestras clínicas de diarrea acuosa.
2. Identificar el cuadro clínico de enfermedades causadas por *Aeromonas* spp. durante los meses de verano, que es cuando las infecciones causadas por este microorganismo se incrementan.³⁴

BIBLIOGRAFÍA

1. Altewgg M. *Aeromonas y Plesiomonas*, in: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press. 1999: 507-16.
2. Austin B, Alwegg M. The genus *Aeromonas*. England: Wiley; 1996, p. 245-259, 267-279.
3. Bailey & Scott's. Diagnostic Microbiology. 8^a. ed. Toronto: The C.V. Mosby Company; 1990. p. 242.
4. Bach JF. Inmunología. 19^a. ed. México: Limusa; 1989. vol 2. p. 282-293.
5. Balow SA, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 5^a. ed. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1990. p. 396-399.
6. Barret JT. Inmunología Médica. México: Interamericana•Mc Graw Hill; 1993.p.294.
7. Barron GI & Feltham. Cowan and steel's Manual for the identification of medical bacteria. 3^a. ed. London: Cambridge University Press 1993: 51-55.
8. Bernheimer AW, Avigad LS. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun 1974; 9: 1016-21.
9. Bravo F, German S, Monte R. Marcadores fenotípicos en cepas de *Aeromonas* aisladas en Cuba de niños con enfermedades diarreicas agudas. Rev Cub Med Tropical 1995; 9: 95-99.
10. Buckley JT. Purification of cloned proaerolysin released by a low protease mutant of *Aeromonas salmonicida*. Biochem Cell Biol 1990; 68: 221-4.
11. Buckley JT, Howard SP. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. Infect Immun 1999;67:466-7
12. Burke B, Robinson H, Atkinson & Gracey. Biochemical characterization of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. J Clin Microbiol 1982; 15(1): 48-52.
13. Burke V, Robinson J, Berry RJ & Gracey M. Detection of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by a suckling-mouse test. J Med Microbiol 1981; 14:401-408.

14. Caren LD, Arquette D. Fundamental Immunology. 2^a. ed. USA: Wn Brown Publishers; 1992.p.24-27.
15. Castro EG. Identificación de cepas de *Aeromonas* spp aisladas de muestras clínicas y aguas residuales en México por métodos tradicionales automatizados. DF. (MEX): IPN. ENCB; 1998.
16. Castro-Escarpulli G y col. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México?. *Enf Infec y Micro* 2002; 22(4): 206-216.
17. Castro-Escarpulli G y col. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímica* 2003; 28(4): 11-18.
18. Chapel H, Haeney M, Misbahs & Snowden N. Essentials of clinical Immunology. 4^a. ed. Great Britain: MPG Books; 1999.p. 314-317.
19. Chakraborty T, Hule B, Hof H, Bergbauer H, Goebel W. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. *Infect Immun* 1987; 55: 2274-80.
20. Elydyard PM, Whelan A & Fanger MW. Instant notes in Immunology. USA: Bios Scientific Publishers; 2000. p. 275- 279.
21. Gutierrez DA. Implementación del método inmunológico por hemaglutinación pasiva para detectar presencia de aerolisina en cultivo de *Aeromonas hydrophila*. DF, México. FES UNAM 2002.
22. Holt JG, Krieg NR, Sneath Peter HA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9^a. ed. Baltimore (USA): Lippincott Williams & Wikins; 1994. p. 190-192, 254-256.
23. Howard SP, Buckley JT. Membrana glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochemistry* 1982; 21: 1662-7.
24. Jawetz, Melnick & Adelberg. Microbiología médica. 14^a.edición. México: El Manual Moderno; 1992. p.125-127, 663-64.
25. Kent JF, Fife EH. Precise standardization of reagents for complement fixation. *Am J Med Trop* 1963; 12: 103-116.
26. Koneman MD. Diagnóstico Microbiológico. 3^a. ed. México: Panamericana; 1992.

p. 317-325.

27. Ljungh ASA, Popoff M & Wadstrom T. *Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease: detection of enterotoxin and biotyping of strains. J Clin Microbiol 1977; 6:96-100.
28. Marroquín SR, Flores PM, Manual de laboratorio de Inmunología básica y clínica. Carrera de QFB 8º semestre. FES Zaragoza UNAM. 2002; 17-19.
29. Parker MW, Van Der Goot FG, Buckley JT. Aerolysin –the ins and outs of a model channel-forming toxin. Mol Microbiol 1995; 19: 205-12.
30. Pérez PS, Tamayo CE y col. Primer reporte en Cuba de aislamientos de *Aeromonas* en muestras extraintestinales. Rev Cubana Med Milit 1997; 26(1): 50-54.
31. Stites PD, Terr AI and Parslow TG. Inmunología básica y clínica. 9ª edición. México: El Manual Moderno; 1999, p.244-7.
32. Tequianes BL. Aislamiento y caracterización de *Aeromonas* a partir de muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM. México: FES UNAM; 2001.
33. Vadivelu J, Puthuchery SD, Phipps M, Che YW. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. J. Med. Microbiol 1995; 42:171-4
34. Vila J, Ruiz J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and Antimicrobial resistance. Emerging Infectious Diseases 2003; 9(5): 552-555.
35. Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, Herzenberg LA. Handbook of experimental Immunology Immunochemistry. 4ª. ed. Great Britain: Blackwell Scientific Publications; 1986. p. 32.9- 32.13.

ANEXOS

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Caldo BHI (Infusión cerebro partido)

Infusión de cerebro de ternera

Infusión de partido

Peptona proteasa Bacto

Dextrosa Bacto

Cloruro de Sodio

Fosfato de Sodio

Disolver 37 g en 1000 mL de agua destilada, esterilizar a 121 por 15 min.

PH final 7.4 ± 0.2 a 25 C.

Agar CASO (Soya tripticaseína)

Peptona de caseína

Peptona de harina de soya

Cloruro sódico

Agar-agar

Disolver 40 g en 1000 mL de agua destilada, esterilizar por autoclave

a 121 C por 15 min. pH final 7.3 ± 0.2 a 25 C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de Alsever	fórmula para 100 mL
Dextrosa	2.05 g
Citrato de Sodio (2 HO)	0.8 g
ácido cítrico (HO)	0.055 g
Cloruro de Sodio	0.420 g
Agua destilada	100 mL

Esterilizar esta solución en autoclave a 10 lb. de presión durante 15 min. El pH deberá ser de 6.1 ajustar con ácido cítrico al 10% o con NaOH 0.1 N. La sangre de carnero se recibe en esta solución volumen a volumen y se deja durante una semana en refrigeración antes de usarse para que se estabilice.

Nota: No deberá usarse pasadas 4 semanas de su recolección

Buffer TRIS 0.01 M pH 7.2 -**NaCl** 0.145 M -**Gelatina** al 2%.

	fórmula para 1000mL
TRIS (hidroxiaminometano)	1.21 g
Cloruro de sodio	8.41 g
Gelatina	20 g

Disolver la gelatina en 100 mL de agua destilada y calentar hasta punto de ebullición y completa disolución. Disolver el TRIS y el NaCl en agua destilada, adicionar la gelatina y aforar a 1000 mL con agua destilada.

Solución salina isotónica al 0.85%

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 mL