

AEROMONAS. IDENTIFICACION DE ESPECIES Y CORRELACION DE MARCADORES BIOQUIMICOS Y PRUEBAS DE ENTEROPATOGENIDAD

*Aide Bracho Parra**

RESUMEN

La patogenicidad intestinal de *Aeromonas* para el humano ha sido bien establecida y se conoce que producen enterotoxinas, citotoxinas y tienen capacidad de adherencia a las células del epitelio intestinal. En nuestro medio constituyen un importante patógeno intestinal, aislándoseles en 185 (15%) de 1264 coprocultivos positivos, constituyéndose en el quinto patógeno intestinal en frecuencia. Se estudian 185 cepas de *Aeromonas*, aisladas en el C. R. B. del H. U. M., durante los años 1983-1986. Para la especiación se usa el esquema Popoff y Veron, se sigue a Dean, mediante la utilización de las pruebas de ratones lactantes, para detectar enterotoxina y a Burke y cols. para la hemolisina. De las 185 cepas estudiadas, 84 (45.41%) son *A. hydrophila*, 21 (11.35%) *A. sobria* y 80 (43.24%) *A. caviae*. Este estudio ratifica que en *A.*

*Cátedra de Bacteriología. Escuela de Bioanálisis Facultad de Medicina. L.U.Z. Maracaibo - Venezuela.

hydrophila el patrón VP+L+A- y hemolisina + está presente en cepas que producen enterotoxina capaces, con este mecanismo conocido, de producir infección diarreica. En **A. Sobria** el patrón VP+L+A- presente en 66.67% no concuerda con la producción de hemolisina y enterotoxina. Esta especie que se reporta también frecuente como enteropatógeno, pudiera no siempre serlo o poseer otros mecanismos distintos de patogenicidad a los estudiados. El estudio es coincidente con otros en que ese patrón no está presente con frecuencia en **A.caviae**, no obstante, es interesante que 2 son hemolisina+ y 3 enterotoxina+, ello pudiera explicar la enteropatogenicidad que esporádicamente se le reporta.

Palabras claves: **Aeromonas**, Identificación de especies. Marcadores bioquímicos. Enteropatogenicidad.

ANEXO

Aeromonas the fifth intestinal pathogen in the ambient environment of positive stool culture: 15% (185/1264). A study of 185 strains of **Aeromonas** for its identifyfcation, biochemicals marker correlation, and enteropatogenicity tests is reported. **A. hydrophyla** (45.41%), **A sobria** (11.35%), **A. caviae** (43.24%). **A. hydrophyla** 's pattern VP+L+A- and haemolysin+ is present in strains yield enterotoxin, able to bring diarrheic infection. **A. sobria** 's pattern VP+L+A- is present in 66.67% is not agree with the production of haemolysin and enterotoxin. This species could be or not enteropathogen or to have another pathogenicity mechanism. In this study is showed thal in **A. caviae** the pattern is not present, some how, showed 2 haemolysin+ and 3 enterotoxin+.

Keywords: **Aeromonas**, Identification species, Biochemical markers. Enteropatogenicity.

INTRODUCCION

Los miembros del género *Aeromonas* fueron recuperados originalmente del agua (1, 17, 18, 22, 34, 35) y de animales como

peces, anfibios y reptiles (24, 25). En el humano se han encontrado, produciendo una gran variedad de infecciones que varían desde celulitis o lesiones ulcerativas (16,26) a gastroenteritis (15, 20, 41) o también bacteriemia principalmente en individuos susceptibles (19, 23, 29), en quienes se piensa que la sepsis es originada por colonización del tracto gastrointestinal (29) o heridas (2). Otras infecciones, aunque infrecuentes, incluyen endocarditis, osteomielitis, meningitis e infecciones del tracto urinario (8).

En años recientes sólo dos especies o biogrupos dentro del género *Aeromonas* eran reconocidas. Un grupo representado por *Aeromonas salmonicida* el cual está asociado con furunculosis en peces (11) y es una causa extremadamente importante de pérdidas económicas en la industria pesquera. *A. salmonicida* es oxidasa positiva y está caracterizada por ser no mótil, no producir indol, incapaz de crecer a 37°C y elaborar un pigmento similar a la melanina en medios conteniendo tirosina. Infecciones en el humano por esta bacteria no han sido reportadas. El segundo grupo de *Aeromonas* está compuesto por especies móviles, indol positivo, que crecen óptimamente a 35°C 37°C, las cuales han sido referidas como "*Aeromonas hydrophila* complejo". Durante los pasados 25 años varios investigadores han propuesto desde 1 a 4 especies dentro de este complejo, usando designaciones como *A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. caviae*, *A. dourgesi* y *A. proteolytica* (10, 12, 27, 37, 38). En 1974 Schubert propone que se reconozcan dos especies: *A. hydrophila* y *A. punctata*, cada una con sus subespecies específicas basándose primariamente en la producción de acetil metil carbinol y utilización aerógena de la glucosa (39). Estudios mas recientes basados en un mayor número de datos (25, 31) y estudios del ADN sugieren que dentro de las cepas móviles se incluyen tres especies (o biogrupos): *A. hydrophila*, *A. sobria* y una especie anaerogénica. *A. caviae*, dentro de cada especie existe más de un grupo de hibridación, lo cual continúa complicando la taxonomía del género *Aeromonas*.

La importancia de *Aeromonas* como patógeno intestinal es controversial. Algunos investigadores han aislado estos microorganismos de muestras de heces más frecuentemente de pacientes con diarrea que de pacientes controles (15), otros investigadores no han encontrado diferencias significativas en la tasa de aislamiento entre los dos grupos de pacientes (28, 30). En algunos estudios cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enteritis resultaron ser enterotoxigénicas, mientras que cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes sanos raramente mostraron propiedades enterotóxicas (5, 15). En otras investigaciones ninguna diferencia ha sido encontrada en la producción de enterotoxina por *Aeromonas* aisladas de pacientes de controles, del medio ambiente o de fuente animal (3, 30, 42). Quizás la identificación de especies de los aislamientos de *Aeromonas* pueda traer una luz a esta materia, desde que sólo algunas especies tienen tanto in vitro como in vivo propiedades de virulencia (30, 42). De acuerdo a Popoff (32) las especies móviles y mesofílicas de *Aeromonas*: *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*, son las únicas que causan gastroenteritis en el humano. En nuestro medio constituyen un importante patógeno intestinal. Las estadísticas del Centro de Referencia Bacteriológica del H.U.M., revelan que *Aeromonas* es aislada en 185 (15%) de 1.264 coprocultivos positivos procesados durante los años 1968-1986, siendo el quinto patógeno intestinal en frecuencia.

La patogenicidad intestinal de *Aeromonas* para el humano ha sido bien establecida y se conocen que pueden producir entero toxinas, hemolisinas, citotoxinas y tener capacidad de adherencia a las células del epitelio intestinal.

Entre las pruebas que han sido utilizadas para demostrar cambios en la función intestinal por la presencia de la enteropatogenicidad de *Aeromonas* se encuentran las pruebas en ratones lactantes, asa ileal del conejo, perfusión del yeyuno de rata in vivo (9, 36, 40). Todos estos métodos difícilmente se pueden implantar en la rutina de un laboratorio clínico. Sistemas de cultivos celulares también han sido

utilizados para la demostración de toxinas de *Aeromonas*, no obstante citotoxicidad no es enterotoxicidad, habiéndose demostrado que muchas cepas no enterotoxigénicas pueden producir citotoxinas, una mayor correlación parece haber entre producción de hemolisinas y enterotoxinas (4). También se ha encontrado buena correlación entre enterotoxigenicidad y marcadores bioquímicos, como por ejemplo: Voges-Proskauer +, Lisina Decarboxilasa + y Arabinosa- (6, 7), constituyendo el conjunto de estos marcadores bioquímicos una orientación fácil en el laboratorio para saber el microbiólogo si está en presencia o no de una cepa enterotoxigénica.

En el presente trabajo se estudian los aislamientos de *Aeromonas* obtenidas a partir de las heces de pacientes durante los años 1983 - 1986, en el H.U.M., a fin de determinar las especies y correlacionar marcadores bioquímicos y pruebas de enteropatogenicidad.

MATERIALES Y METODOS

Cepas Bacterianas

El material de estudios para el presente trabajo está representado por 185 cepas de *Aeromonas* de origen humano, aisladas a partir de muestras de heces de pacientes, principalmente niños, quienes recibieron atención médica en el Hospital Universitario de Maracaibo durante los años 1983-1986. El aislamiento e identificación como miembros del género *Aeromonas* es realizado en la Sección Diagnóstica del Centro de Referencia Bacteriológica, siguiendo para ello la metodología descrita por Prieto & Martínez (33).

Identificación de especies

El esquema utilizado para la identificación de especies es el propuesto por Popoff y Genus (32). De las pruebas utilizadas por Popoff y Veron (31) y Jande y col. (21), se seleccionan las siguientes:

hidrólisis de la esculina, Voges Proskauer, Lisina Decarboxilasa, crecimiento en KCN, producción de gas de glucosa y glicerol, producción de ácido a partir de salicin, arabinosa, celobiosa, manosa y lactosa al 10%. Además se determina la actividad bacteriológica contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Lecitinasa y la actividad hemolítica en agar sangre de carnero (5).

Determinación de exotoxinas

1. Prueba de la hemolisina (6, 14): A partir de cultivos frescos cada cepa es inoculada en 5 ml. de caldo soya tripticasa suplementado con 0.6% de extracto de levadura y luego incubado a 37°C durante 24 horas. Las preparaciones libres de células se obtienen mediante la centrifugación de cultivos a 2.500 rpm. por 30 minutos a 4°C. Este sobrenadante debe ser preparado inmediatamente antes de su uso. La actividad hemolítica es probada en placas de microtitulación, utilizando volúmenes, 0.025 ml., de diluciones al doble de caldo libre de células en buffer fosfato salino, al cual se le adiciona una suspensión de eritrocitos de conejo al 1%. Las cepas son consideradas positivas, cuando su filtrado, a una dilución mayor de 1:4 causa lisis de más de un 50% de los eritrocitos, después de incubación a 37°C por 1 hora y a 4°C por una hora adicional.

2. Prueba de los ratones lactantes: Esta prueba se le realiza a 84 cepas de *Aeromonas* seleccionadas del total de los aislamientos, 43 *A. hydrophila*, 32 *A. caviae* y 9 *A. sobria*. El método utilizado para determinar la producción de enterotoxina, es con algunas variantes el descrito por Dean, A. (9) y que a continuación se describe:

a) Preparación de sobrenadante: A partir de cultivos frescos las cepas de *Aeromonas* son sembradas en tubos conteniendo 3 ml. de medio de Evans, se colocan en agitación (130 rpm.) por 18-24 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de crecimiento se centrifugan a 2.500 rpm. por 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos son transferidos a tubos estériles y conservados en congelación a -20°C hasta el momento de su uso.

b) Técnica: Los sobrenadantes son descongelados y coloreados con azul de Evans en una proporción de 1 gota por ml. de sobrenadante. Se utiliza un número mínimo de 3 ratones por cepa. Se inyecta a través de la piel, en estómago de ratones recién nacidos (1 a 3 días) amamantados, 0.1 ml. del sobrenadante coloreado. Luego de inyectados los animales son mantenidos a una temperatura de 28–30°C durante 4 horas. Seguidamente los ratones son sacrificados colocándoles algodón impregnado con éter en las fosas nasales y los intestinos grueso y delgado, son removidos del resto del cuerpo y la relación Peso intestino (PI)/Peso del cuerpo (PC) es calculada. Esta prueba es considerada positiva si los intestinos se observan dilatados y la relación PI/PC es mayor de 0.083 (14). La producción de enterotoxina puede también ser detectada por la dilatación de las asas intestinales provocada por acumulación del fluido en su interior (9, 14).

RESULTADOS

Las reacciones de las 185 cepas de *Aeromonas* en los medios de T.S.I. y L.I.A. son mostradas en la Tabla 1. En el medio de T.S.I. el 94.05% de las cepas dan reacciones de bisel ácido, taco ácido con gas variable y sin producción de H₂S y un 5.95% presentan reacciones de bisel alcalino, taco ácido, gas variable sin producción de H₂S. Las reacciones de estas cepas en el medio de L.I.A. muestran un 45.95% bisel y taco alcalino, sin producción de H₂S y un 54.05% dan bisel alcalino, taco ácido, H₂S negativo.

En la Tabla 2 se observan las diferentes reacciones bioquímicas que muestran las 185 cepas de *Aeromonas*. El 100% de las cepas, a las 24 horas, dan la reacción de la oxidasa y producen ácido a partir del manitol. Todas las cepas fallan en producir ácido a partir de

TABLA 1
 AEROMONAS. 185 CEPAS
 REACCIONES EN LOS MEDIOS T.S.I. Y L. I. A.
 HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986

	Nº DE CEPAS	%
T. S. I.		
BISEL : ACIDO TACO : ACIDO H ₂ S : - GAS : V	174	94,05
BISEL : ALCALINO TACO : ACIDO H ₂ S : - GAS : V	11	5,95
L. I. A.		
BISEL : ALCALINO TACO : ALCALINO H ₂ S : -	85	45,95
BISEL : ALCALINO TACO : ACIDO H ₂ S -	100	54,05

dulcitol, adonitol e inositol. Ninguna de las cepas utiliza el malonato de sodio, ni decarboxilan la ornitina, así como tampoco muestran crecimiento en el medio de caldo con C1Na al 6%. En cuanto al resto de las pruebas bioquímicas se observa variabilidad en las reacciones.

Con la utilización del sistema primario de identificación, el cual consta de 7 pruebas, las 185 cepas de *Aeromonas* aisladas son identificadas a nivel de especies: 84 (45.41%) son compatibles con *Aeromonas hydrophila*, 21 (11.35%) con *Aeromonas sobria* y 80 (43.24%) con *Aeromonas caviae*, como se muestra en la Tabla 3.

TABLA 2
AEROMONAS. 185 CEPAS
REACCIONES BIOQUIMICAS
HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986

REACCIONES BIOQUIMICAS	SIGNO	Nº DE CEPAS POSITIVAS	% DE POSITIVIDAD
OXIDASA	+	185	100
INDOL	+	169	91,35
ROJO DE METILO	+ o -	125	67,57
VOGES-PROSKAUER	- o +	88	47,57
CITRATO (SIMMON'S)	+ o -	107	57,84
UREA	-	14	7,57
KCr	+ o -	161	87,03
MOTILIDAD	+ o -	164	88,65
GELATINA (22°C)	+ o -	155	83,78
LISINA DECARBOXILASA	- o +	85	45,95
ARGININA DEHIDROLASA	+ o -	155	83,78
ORNITINA DECARBOXILASA	-	0	0
FENILALANINA DEAMINASA	-	4	2,16
MALONATO	-	0	0
LACTOSA	- o +	51	27,57
SUCROSA	+ o -	164	88,65
MANITOL	+	185	100
DULCITOL	-	0	0
SALICIN	+ o -	118	63,78
ADONITOL	-	0	0
INOSITOL	-	0	0
SORBITOL	-	2	1,08
ARABINOSA	- o +	81	43,78
RAFINOSA	-	1	0,54
RAMNOSA	-	3	1,62
CALDO + CLNa AL 6%	-	0	0

En la Tabla 4 pueden apreciarse las 6 pruebas suplementarias, las cuales tienen gran utilidad para confirmar la identificación de las cepas que no fueron identificadas plenamente con el sistema primario y corroborar la identificación a nivel de especies de las cepas restantes. La hemolisina, actividad staphylofítica son útiles en la separación de

TABLA 3
 AEROMONAS. 185 CEPAS
 IDENTIFICACION DE ESPECIES
 HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986

PRUEBAS PRIMARIAS	Nº DE CEPAS POSITIVAS (%)		
	A. HYDROPHILA n = 84 (45,41%)	A. SOBRIA n = 21 (11,35%)	A. CAVIAE n = 80(43,24%)
HIDROLISIS DE LA ESCULINA	83(99,80%)	1(4,76%)	78(97,50%)
KCn	84(100%)	4(19,05%)	80(100%)
SALICIN	38(45,24%)	0(0%)	67(83,75%)
GAS DE GLUCOSA	82(97,62%)	19(90,48%)	0(0%)
VOGES PROSKAUER	84(100%)	15(71,43%)	2(2,50%)
LISINA	78(92,86%)	21(100%)	4(5,0%)
ARABINOSA	9(10,71%)	1 (4,76%)	73(91,25%)

A. hydrophila de las otras dos especies. De un modo similar la formación de ácido a partir de arabinosa y celobiosa al igual que la descarboxilación de la lisina nos diferencian la *A. caviae* de *A. hydrophila* y *A. sobria*.

Los resultados de las reacciones de Voges- Proskauer, lisina decarboxilasa y fermentación de la arabinosa obtenidos con las cepas estudiadas se muestran en la Tabla 5. De las 84 cepas identificadas como *A. hydrophila*, 72 (85.72%) muestran reacciones de VP+L+LA-. Las 12 cepas restantes, 6 (7.14%) son VP+L+A+, 3 (3.57%) VP+L-A+ y 3 (3.57%) VP+L-A-.

TABLA 4
 AEROMONAS. 185 CEPAS
 IDENTIFICACION DE ESPECIES
 HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986.

PRUEBAS SUPLEMENTARIAS	Nº DE CEPAS POSITIVAS (%)		
	A. HYDROPHILA n = 84 (45, 41%)	A. SOBRIA n = 21 (11,35%)	A. CAVIAE n = 80 (43,24%)
HEMOLISINA	73 (86,90%)	9 (42,85%)	11 (13,75%)
LECTINASA	74 (88,09%)	14 (66,66%)	55 (68,75%)
ACTIVIDAD STAPHYLOLITICA	61 (72,61%)	0 (0%)	0 (0%)
CELOBIOSA	9 (10,71%)	8 (38,09%)	61 (76,25%)
MANOSA	81 (96,42%)	21 (100%)	62 (77,50%)
LACTOSA 10%	10 (11,90%)	1 (4,76%)	39 (48,75%)

Los resultados obtenidos con las 21 cepas de *A. sobria* muestran que en 15 (71.43%) se observa el marcador bioquímico VP+ L+A-, 5 (23.81%) se presentan como VP-L+A- y la cepa restante como VP-L+A+.

De las 80 cepas de *A. caviae* ninguna muestra el patrón VP+L+A-. El marcador bioquímico más frecuentemente observado en estas cepas es VP-L-A+, el cual está presente en 68 (85.00%) de las cepas, 6 (7.50%) son VP-L-A- 4 (5.00%) VP-L+A+, 1 (1.25%) VP-L-A+ y 1 (1.25%) VP+L-A-.

En la Tabla 6 se pueden observar los resultados obtenidos con la prueba de hemolisina 69 (82,14%) de las cepas de *A. hydrophila*, 1 (4.76%) de *A. sobria* y 2 (2.50%) de *A. caviae* dan la prueba positiva.

La relación de los marcadores bioquímicos y la prueba de hemolisina de las 185 cepas estudiadas es mostrada en la Tabla 7. En

TABLA 5
AEROMONAS. 185 CEPAS
MARCADORES BIOQUIMICOS: VOGES-PROSKAUER, LISINA Y ARABINOSA
HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986.

MARCADORES BIOQUIMICOS	A. HYDROPHILA (n = 84)	A. SOBRIA (n = 21)	A. CAVIAE (n = 80)
VP (+), L (+), A (-)	72 (85,72%)	15 (71,43%)	0
VP (-), L (-), A (+)	0	0	68 (85,00%)
VP (+), L (+), A (+)	6 (7,14%)	0	0
VP (+), L (-), A (+)	3 (3,57%)	0	1 (1,25%)
VP (-), L (+), A (-)	0	5(23,81%)	0
VP (-), L (+), A (+)	0	1 (4,76%)	4 (5,00%)
VP (-), L (-), A (-)	0	0	6 (7,50%)
VP (+), L (-), A (-)	3 (3,57%)	0	1 (1,25%)

TABLA 6
AEROMONAS. 185 CEPAS
PRUEBA DE LA HEMOLISINA
HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986

Nº TOTAL DE CEPAS	Nº DE CEPAS POSITIVAS	% DE POSITIVIDAD
A. HIDROPHYLA (n = 84)	69	82,14
A. SOBRIA (n = 21)	1	4,76
A. CAVIAE (n = 80)	2	2,50

TABLA 7
AEROMONAS. 185 CEPAS
RELACION DE MARCADORES BIOQUIMICOS Y HEMOLISINA
HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986

Nº TOTAL DE CEPAS	MARCADORES BIOQUIMICOS	HEMOLISINA % DE POSITIVIDAD
A. HYDROPHILA (n = 84)	VP (+), L (+), A (-) 72 (85,72%)	68 (94,44%)
	VP (+), L (+), A (+) 6(7,14%)	1 (16,67%)
	VP (+), L(-), A (+) 3(3,57%)	0(0%)
	VP(+), L(-), A (-) 3(3,57%)	0(0%)
A. SOBRIA (n = 21)	VP(+), L (+), A (-) 15(71,43%)	0(0%)
	VP (-), L (+), A (-) 5 (23,81%)	1(20,00%)
	VP (-), L (+), A (+) 1 (4,76%)	0(0%)
A. CAVIAE (n = 80)	VP (-), L (-), A (+) 68(85,00%)	2(2,94%)
	VP (-), L (-), A (-) 6(7,50%)	0(0%)
	VP (-), L (+), A (+) 4 (5,00%)	0(0%)
	VP (+), L (-), A (+) 1 (1,25%)	0(0%)
	VP (+), L (-), A (-) 1(1,25%)	0(0%)

la misma es importante resaltar que las 72 (85.72%) cepas de *A. hydrophila* que presentan el marcador bioquímico VP+L+A-, 68 (94.44%) dan hemolisina +. Del resto de las cepas de *A. hydrophila* sólo 1 (16.67%) cepa VP+L+A+ es hemolisina +. De las 15 (71.43%) cepas de *A. sobria* que muestra el patrón VP+L+A-,

ninguna produce hemolisina, sólo 1 (20.00%) cepa VP-L+A-, es hemolisina +.

De todas las cepas de *A. caviae* estudiadas, solo en 2 (2.94%) de ellas que presentan el marcador bioquímico VP-L-A± se observa la producción de hemolisina.

En la Tabla 8 puede notarse la comparación de los resultados obtenidos en las pruebas de hemolisina, enterotoxina y los marcadores bioquímicos Voges-Proskauer, lisina decarboxilasa y arabinosa en las 84 cepas seleccionadas del total de las cepas estudiadas. De las 38 (88.38%) cepas identificadas como *A. hydrophila* que presentan el patrón VP+L+A-, 37 (97.37%) dan positiva la prueba de hemolisina y 36 (94.74%) producen enterotoxina en la prueba de los ratones

TABLA 8
AEROMONAS. 84 CEPAS
RELACION DE MARCADORES BIOQUIMICOS
Y
PRUEBAS DE ENTEROPATOGENICIDAD
HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1983 - 1986

Nº DE CEPAS SELECCIONADAS	MARCADORES BIOQUIMICOS	HEMOLISINA	ENTEROTOXINA
A. HYDROPHILA (n = 43)	VP (+), L (+), A (-) 38(88,38%)	37(97,37%)	36(94,74%)
	VP(+), L (+), A (+) 4(9,30%)	1(25%)	0(0%)
	VP (+), L (-), A (+) 1 (2,33%)	0(0%)	0(0)%
A. SOBRIA (n = 9)	VP (+), L (+), A (-) 6(66,67%)	0(0%)	0(0%)
	VP (-), L(+), A (-) 3(33,33%)	1 (33,33%)	0(0%)
A. CAVIAE (n = 32)	VP (-), L (-), A (+) 31(96,88%)	2 (6,45%)	3 (9,68%)
	VP (+), L (-), A (+) 1 (3,12%)	0(0%)	0(0%)

lactantes. De las 5 cepas restantes 4 (9.30%) son VP+L+A+ y 1 (2.33%) VP+L-A+, de ellas sólo 1 (25.00%) VP+L+A+ es hemolisina + y enterotoxina-.

Ninguna de las 6 (66.67%) cepas de *A. sobria* con marcador bioquímico VP+L+A- produce hemolisina ni enterotoxina, en 1(33.33%) VP+L+A+ se demuestra solamente la producción de hemolisina.

Corresponden a *A. caviae* 32 cepas, 31 (96.88%) con patrón bioquímico VP-L-A+, en 5 de ellas se demuestra la producción de exotoxinas: en 2 (6.45%) hemolisina y en 3 (9.68%) enterotoxina. La cepa restante es VP+L-A+, hemolisina y enterotoxina negativa.

DISCUSION

Estudios realizados por varios autores (4, 14, 15, 20, 21) han reportado que algunas especies de *Aeromonas* son causas importantes de gastroenteritis en el humano, especialmente en pacientes pediátricos. En la mayoría de los pacientes la enfermedad diarreaica es autolimitante, sin embargo, una pequeña fracción de pacientes presentan un cuadro severo de gastroenteritis, la cual puede requerir hasta hospitalización. El estado de severidad de la infección puede estar relacionado con la edad y estado de salud del huésped, factores socioeconómicos y el biotipo de la cepa infectante de *Aeromonas* (8, 20).

Con la utilización del esquema propuesto por Popoff y Veron (31) las 185 cepas estudiadas son caracterizadas a nivel de especies, *A. hydrophila* (45.41%) y *A. caviae* (43.24%) predominan dentro de las especies clasificadas, representando los aislamientos de *A. sobria* el 11.35%. Estos resultados son diferentes a los mostrados por otros autores (6, 14, 21) quienes reportan un predominio de aislamientos de *A. caviae* y diferencias insignificantes entre la prevalencia de *A. hydrophila* y *A. sobria*.

Como ha sido demostrado en otras investigaciones, la mayoría de las cepas enterotoxigénicas de *Aeromonas* están incluidas en el grupo de Voges Proskauer +, Lisina decarboxilasa + y Arabinosa - (4, 6). Variaciones en relación a estas asociaciones han sido encontradas, sin embargo, la mayor diferencia ha sido observada en aislamientos de procedencia no fecal.

Al relacionar los marcadores bioquímicos, las pruebas de hemolisina y enterotoxina en las 84 cepas seleccionadas del total de las cepas estudiadas, se observa una buena correlación en las cepas clasificadas como *A. hydrophila* y las cuales son VP+L+A-, el 97.37% de ellas dan hemolisina + y el 94.74% producen enterotoxina, esto es coincidente con el hallazgo reportado por otros autores (4, 6, 7, 14) en que en *A. hydrophila* el patrón bioquímico VP+L+A- y hemolisina + están presentes en cepas que producen enterotoxina.

En *A. sobria* el patrón bioquímico VP+L+A- presente en el 66.67% de las cepas no concuerda con la producción de hemolisina y enterotoxina, 1 cepa (33.33%) VP-L+A- es hemolisina + y enterotoxina -. Esta especie, que se ha reportado también con frecuencia como enteropatógena (14.21) pudiera no siempre serlo o poseer otros mecanismos distintos de patogenicidad a los estudiados, por lo cual se recomienda el estudio de un mayor número de cepas y de otros parámetros de patogenicidad bacterianos.

El estudio es también coincidente con otros (6, 14, 15, 37) en que este patrón no está presente con frecuencia en *A. caviae*, 31 (86.88%) de las cepas son VP-L+A+, no obstante, es interesante que 2 cepas son hemolisina + y 3 enterotoxina +, ello pudiera explicar la enteropatógenidad que esporádicamente se ha reportado para esta bacteria.

Al comparar la prueba de hemolisina y de los ratones lactantes para demostrar la presencia de enterotoxina se observa, al igual que lo reportado por otros autores (4, 6), una buena correlación entre ambos métodos con las cepas de *A. hydrophila*, de las 37 (97.37%) cepas que son hemolisina +, 36 (94.74%) producen enterotoxina. Estas diferencias son observadas entre estos dos métodos con las cepas de *A. sobria* y *A. caviae*, 1 (33.33%) y 2 (6.45%) respectivamente, dan la prueba de hemolisina, mas no la prueba de enterotoxina y 3 (9.68%) cepas de *A. caviae* son hemolisina - y producen enterotoxina.

En vista que ha sido encontrada una diferencia significativa entre aislamientos de *Aeromonas* enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas en niños con diarrea (15) es de mucha importancia que laboratorios microbiológicos estén capacitados para identificar *Aeromonas* enterotoxigénicas. El esquema utilizado por Burke y col. (4) y

realizado en este trabajo, permite una clasificación correcta del 95% al 97% de las cepas *Aeromonas* sin necesidad de pruebas más laboriosas y especializadas para la demostración de enterotoxinas. La realización de las pruebas bioquímicas (Voges-Proskauer, Lisina decarboxilasa y Arabinosa) y la prueba de hemolisina, las cuales pueden ser establecidas de rutina en un Laboratorio de Microbiología Clínica, permiten identificar la mayoría de los aislamientos de *A. hydrophila* como enterotoxigénicas. Las cepas deben ser separadas primariamente en relación a las pruebas de Voges-Proskauer y lisina decarboxilasa. Cepas VP+, L+ clasificadas como *A. hydrophila* requerirían estudios de hemolisina, aunque cepas Arabinosa negativa pueden ser asumidas como enterotoxigénicas con un margen de error de un 10% (6).

En relación a si las otras dos especies de *Aeromonas* son enteropatógenos importantes, se hace necesario estudiar un mayor número de cepas, realizar otros tipos de estudios y correlacionar los resultados con la clínica del paciente para así conocer mejor el papel patógeno real para el humano de *A. sobria* y *A. caviae* en nuestro medio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALDOVA, E.; RAKOVSKY, J. & CHOVANCOVA, A. Microbiological diagnostics of strains of *Aeromonas shigelloides* isolated in Cuba. *Journal of Hygien and Epidemiology*. 10: 470, 1960.
2. AMPEL, N. & PETER G. *Aeromonas* bacteremia in a burn patient. *Lancet ii*. 987, 1981.
3. ANNAPURNA, E. & SANYAL, S. Enterotoxigenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Medical Microbiology*. 10: 317, 1977.
4. BURKE, V.; ROBINSON, J.; ATKINSON, H. & GRACEY, M. Biochemical characteristics of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 15: 48, 1982.
5. BURKE, V.; GRACEY, M.; ROBINSON, J.; PECK, D.; BEAMAN, J. & BUNDELL, C. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. *Journal of Infectious Diseases*. 148: 68, 1983.
6. BURKE V.; ROBINSON, J.; BEAMAN, J.; GRACEY, M.; LESMANA, M.; ROCKHILL, R.; ECHEVERRIA, P. & JANDA, M. Correlation of enterotoxigenicity with biotype in *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 18: 1196, 1983.
7. CUMBERBATCH, N.; GURWITH, M.; LANSTON, C.; SACK, R. & BRUNTON, J. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infection and Immunity*. 23: 829, 1979.

8. DAVIS, W.; KANE, J. & GARAGUSI, V. Human aeromonas infections: a review of the literatura and a case report endocarditis. *Medicine*. 57: 277, 1978.
9. DEAN, A.; CHING, Y.; WILLIAMS, R. & HARDEN L. Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *Journal of Infectious Diseases*. 125: 407, 1972.
10. EDDY B. Further studies on Aeromonas. I. Additional strains and supplementary biochemical test, *Applied bacteriology*. 25: 137, 1962.
11. ELLIS, A.; HASTINGS, T. & MUNRO, A. The role of Aeromonas salmonicida extracellular products in the pathology of furunculosis. *Journal Fish Diseases*. 4: 41, 1981.
12. EWING, W.; HUGH, R. JOHNSON, J. Studies on the Aeromonas group. U.S. Department of Health. Education and Welfare. Center for Disease Control. 1961.
13. FIGURA, N. & ROSSOLONI, A. Aeromonas hydrophila gastroenteritis in Tuscany children. *Pediatric Infectious Diseases*. 3: 283, 1984.
14. FIGURA, N.; MARRI, L.; VERDIANI, S.; CECHERINI, C. & BARBERI, A. Prevalence species differentiation and toxigenicity of Aeromonas strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. *Journal of Clinical Microbiology*. 23: 595, 1986.
15. GRACEY, M.; BURKE, V. & ROBBINSON, J. Aeromonas associated gastroenteritis. *Lancet ii*: 1304, 1982.
16. HANSON, P.; STRADRIDGE, J.; JARRET, F. & MAKI, D. Freswater wound infection due to Aeromonas hydrophila. *Journal of American Medical Association*. 238: 1053, 1977.
17. HAZEN, T. & FLEIRMANS, C. Distribution of Aeromonas hydrophila in natural and man-made thermal effluents. *Applied and Environmental Microbiology*. 36: 731, 1978.
18. JANZEN, T.; FLEIRMANS, C.; HIRSCH, R. & ESCH, G. Prevalence and distribution of Aeromonas hydrophila in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 36: 731, 1978.
19. JANDA, J.; BOTTONE, E. & REITANO, M. Aeromonas species in clinical microbiology: significance, epidemiology and speciation. *Diagnostic Microbiology Infection Diseases*. 1: 221, 1983.
20. JANDA, J.; BOTTONE, E.; SKINNES, C. & CALCATERRA, D. Phenotypic markers associated with gastrointestinal Aeromonas hydrophila isolates from sytomatic children. *Journal of Clinical Microbiology*. 17: 588, 1983.
21. JANDA, J.; REITANO, M. & BOTTONE, E. Biotyping of Aeromonas isolates as a correlate to delineating a species - associated disease spectrum. *Journal of Clinical Microbiology*. 19: 44, 1984.
22. JOSEPH, S.; DAILY, O. HUNT, W.; SEIDLER, R.; ALLEN, D. & COLWELL, R. Aeromonas primary wound infection of a diver in polluted waters. *Journal Clinical Microbiology*. 10: 46, 1979.
23. KETOVES, B.; YOUNG, L. & ARMSTRONG, D. Septicemia due to Aeromonas hydrophila: clinical and immunologic aspects. *Journal of Infectious Diseases*. 127: 284, 1973.

24. KOU, G. Studies on the occurrence and biochemical properties of virulent and avirulent strains of freshwater fish pathogen. *Aeromonas liquefaciens*. *Journal Fish Society Taiwan*. 1: 8, 1972.
25. LEE, J.; SHREAD, P.; FURNISS, A. & BRYANT, T. Taxonomy and descripción of *Vibrio fluvialis* sop. nov. (synonym group F. Vibrios, groups EFG). *Journal of Applied Bacteriology*. 50: 73, 1981.
26. LYNCH, J.; TILSON, W.; HODGES, G.; BARNES, W.; BOPP, W. & WATANABE, I. Nosocomial *Aeromonas hydrophila* cellulitis and bacteriemia in a nonimmunocompromised patient *South Medical Journal*. 74: 901, 1981.
27. MERKEL, J.; TRAGANZA, E.; MUKHERJEA, B.; GRIFFIN, T. & PRESCOTT, J. Proteolytic activity and general characteristics of a marine bacterium. *Aeromonas proteolytica*. sp. n. *Journal of Bacteriology*. 87: 1227, 1964.
28. MILLERSHIP, S.; CURNOW, S. & CHATTOPADHYAY, F. Faecal Carriage rate of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Pathology*. 36: 920, 1983.
29. PEARSON, T.; MITCHELL, C. & HUGHES, W. *Aeromonas hydrophila* septicemia. *American Journal Diseases Children*. 123: 579, 1972.
30. PITARANGSI, C.; ECHEVERRIA, P.; WHITMIRE, R.; TIRAPAT, C.; FORMAL, S.; DAMMIN, G. & TINGTALAPONG, M. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. *Infection and Immunity*. 35: 666, 1982.
31. POPOFF, M. & VERON, M. A Taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila* - *Aeromonas punctata* group. *Journal of General microbiology*. 94: 11, 1976.
32. POPOFF, M. GENUS III, *Aeromonas* p. 545-548. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1 The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1984.
33. Prieto. G. Aislamiento e identificación de enteropatógenos no convencionales. 1983 (Publicación del Centro Regional de Referencia Bacteriológica del H.U.M.).
34. Rahman, A. & Willoughby, J. Dysentery-like syndrome associated with *Aeromonas hydrophila*. *British Medical Journal*. 281: 976, 1980.
35. SACK, R.; GORBACH, S.; BANWELL, J.; JACOBS, J.; CHATTERJEE, B. & MILTRA, R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *Journal Infectious Disease*. 112: 378, 1971.
36. SANYAL, S.; SINGH, S. & SEN, P. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *Journal of Medical Microbiology*. 8: 199, 1975.
37. SCHUBERT, R. The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas*. Kluyses and Van Niel. 1926. Part I. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the aerogenic *Aeromonas* species. *Internacional Journal of Systematic Bacteriolog*. 17: 23, 1967.
38. SCHUBERT, R. he tazonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas*. Kluyses and Van Niel. 1936. Part II Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the anaerogenic aeromonads. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology*. 17: 273, 1967.

39. SCHUBERT, R. GENUS II. *Aeromonas*. Kluyves and Van Niel. 1936. p. 345-348. In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (ed.). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 8th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1974.

40. THELEN, P.; BURKE, V. & GRACEY, M. Effects of intestinal microorganisms on fluid and electrolyte transport in the jejunum of the rat. *Journal of Medical Microbiology*. 11: 463, 1978.

41. TRUST, T. & CHIPMAN, D. Clinical involvement of *Aeromonas hydrophila*. *Canadian Medical Association journal*. 120: 942, 1979.

42. TURNBULL, P.; LEE, J.; MITIOTIS, M.; VAN DE WALLE, S., KOORNHOF, H.; JEFFERY, L. & BRYANT, T. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 19: 175, 1984.