

7
2ej
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



FALLA DE ORIGEN

**Incidencia de Aeromonas y Plesiomonas como
causante de Procesos Diarréicos en una
Población de Lactantes mayores y menores**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo
P R E S E N T A

Alma Angélica López Sandoval

Asesor: Q.F.B. Ma. del Socorro Pulido G.

Guadalajara, Jal

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

I N D I C E

	Pág.
1.- INTRODUCCION	1
1.1 Datos históricos.	1
1.2 Taxonomía y nomenclatura.	2
1.3 Características morfológicas y bioquímicas.	3
1.4 Estructura antigénica	11
1.5 Hábitat y significado clínico	11
1.6 Sensibilidad a antibióticos	17
1.7 Objetivo.	17
2.- MATERIAL Y METODOS	18
2.1 Procedencia y selección de muestras	18
2.2 Conservación y transporte de muestras	18
2.3 Metodología microbiológica.	18
2.3.1 Prímoaislamiento	18
2.3.2 Identificación bioquímica.	18
3.- RESULTADOS	21
4.- CONCLUSIONES	22
5.- RESUMEN.	24
6.- BIBLIOGRAFIA	26

1. - INTRODUCCION

1.1 DATOS HISTORICOS.

AEROMONAS:

La cepa original fue aislada por Ernest en 1890 de una enfermedad bacteriana llamada "pata roja de la rana"

La definición de este género fue dada por Kluyver y VanNiel en 1936. Caselitz y Günter en 1960, Graevonitz y Mensch en 1968, hicieron numerosos aislamientos de heces humanas (12).

En el Departamento de Microbiología del Hospital Princess Margaret en Perth Australia, se hizo un estudio en 1981 en 975 niños con diarrea transitoria e infecciones en heridas, complicadas con celulitis y raramente septicemia.

Tienen distribución cosmopolita, se aísla de aguas saladas corrientes o estancadas y también en aguas negras. Como lo indican sus raíces (hydro-agua, phila-atracción), el habitat natural de las Aeromonas es el agua. También residen en sifones y desagües de piletas y pueden recuperarse de tuberías de agua corriente o destilada, por lo que se considera fuente potencial de infecciones hospitalarias.

También se ha aislado de comida, pus, esputo y de especímenes fecales de personas asintomáticas (6).

PLESIOMONAS:

En 1947 Ferguson y Henderson aislaron un bacilo gram negativo, ---

anaerogénico fermentador lento de la lactosa, que posela un antígeno -- "O" idéntico al de Shigella sonnei en su fase 1, y lo llamaron grupo -- C₂₇. Pero, a diferencia de Shigella, este era móvil, por lo que después de esto el género Plesiomonas fué clasificado variablemente.

En 1954 Bader describió una cepa similar pero con flagelos polares. Sakasaki y sus colaboradores en 1959 examinaron una serie de organismos de una resiembra bioquímica y describió 5 antígenos "O", de los cuales sólo uno fué relativo al de Shigella sonnei y todas las especies fueron tofoétricas.

En 1960 Ewing y Johnson hicieron ver que era oxidasa (+) y por esto se incluyó en el género Aeromonas, llamándola Aeromonas shigelloides.

En 1962 Habs y Schubert crearon el género Plesiomonas (significando cerca o aliados de los monos), con una sola especie P. shigelloides.

Hendrie, Shewan y Veron en 1971, comprobaron que las Plesiomonas son diferentes a las Aeromonas en la ausencia de actividad proteolítica, hemolítica y lipolítica, no ataca manitol, produce ácido del inositol; fermentan glucosa anaeróticamente sin producción de gas, es sensible al agente vibriostático O/ 129, y tiene un contenido de guanina-citocina - arriba del rango del género Vibrio, pero abajo del rango de las Aeromonas, por esto pudo ser clasificado como un Vibrio, y llamado Vibrio shigelloides.

Actualmente se encuentra dentro del género Plesiomonas con una sola especie: Plesiomonas shigelloides.

1.2 TAXONOMIA Y NOMENCLATURA.

La familia Vibrionaceae comprende a bacilos gram negativos, anaero

bios facultativos, que en contraste con la familia Enterobacteriaceae son oxidasa positivo y con excepción de Plesiomonas shigelloides son móviles por medio de flagelos polares monotricos.

Familia Vibrionaceae:

- | | | |
|-----------|-----------------------|---|
| Gen I.- | <i>Vibrio</i> | |
| Gen II.- | <i>Aeromonas</i> | <i>A. salmonicida</i>
<i>A. hydrophila</i>
<i>A. sobria</i>
<i>A. caviae</i> |
| Gen III.- | <i>Plesiomonas</i> | <i>P. shigelloides</i> |
| Gen IV.- | <i>Photobacterium</i> | |
| Gen V.- | <i>Lucibacterium</i> | |

1.3 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS.

AEROMONAS:

Los miembros del género Aeromonas son anaerobios facultativos de forma bacilar con puntas redondeadas, miden de 1.0 a 4.4 μ m. de diámetro por 0.4 a 1.0 μ m. de ancho, semejando a cocos, ocasionalmente forman filamentos, se presentan solos, en pares o cadenas.

Son móviles, poseen un único flagelo polar usualmente monotrico - con una onda de 1.7 μ m. (excepción no móvil es la especie Aeromonas salmonicida). En cultivos viejos de 2-4 horas puede ser visto un flagelo -

lateral corto con una onda de menos de 1.7 μ m.

Hidroliza la caseína y licúa la gelatina, reducen los nitratos a nitritos.

Aeromonas son heterotróficas, producen oxidasa y catalasa y fermentan glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácido o ácido y gas.

Algunas especies no muestran crecimiento a 37°C, para otras el rango de crecimiento es de 0-41°C. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C.

Su crecimiento se restringe a un rango de pH de 5.5 - 9.0. La Descarboxilación de la ornitina, es negativa, fermenta glucosa, así como manitol, dextrina. Su falta de crecimiento en presencia de 6.5% de sal, separa este género de los vibrios morfológicamente y bioquímicamente similares, particularmente Vibrio fluvialis y Vibrio furnissii.

No son sensibles al agente vibriostático (O/129) y su proporción de guanina-citocina en DNA es de 57-63 moles%. Crecen rápidamente en la mayoría de los medios convencionales después de 24 horas de incubación, como son agar sangre, S.S., Mc. Conckey y EMB.

En agar sangre las colonias son pequeñas (1-3 μ m. de diámetro) grises, suaves y convexas pueden estar rodeadas de una zona grande de beta hemólisis, cambiando a verde oscuro después de 3 a 5 días.

También puede tener buen crecimiento en medios entéricos incluyendo EMB, Mc. Conckey y Salmonella-Shigella agar a 25 a 35°C. En EMB las colonias son claras y tienden a ser pequeñas, las colonias fermentadoras de lactosa pueden ser rosas.

La demostración de una reacción positiva a la oxidasa y flagelación polar son más usuales para distinguir estos organismos de otros bacilos gram negativos facultativos de importancia clínica.

La utilidad de estos dos procedimientos de prueba en la identificación de miembros del género Aeromonas no pueden ser sobreenfatizados -- desde que estos organismos fueron incluidos como miembros de la familia Enterobacteriaceae. Estos mostraron similitud con E. coli, especies de Enterobacter y Providencia particularmente en pruebas bioquímicas convencionales usadas en las etapas tempranas de los procesos de identificación.

El indol es usualmente producido de triptófano, el cual ayuda a -- separar las Aeromonas de Pseudomonas.

En el diagnóstico de rutina del laboratorio las características -- más importantes que muestran un diagnóstico presuntivo de Aeromonas son su crecimiento en agar Mc. Conkey, una reacción positiva a la oxidasa, y fermentación de carbohidratos.

La prueba de oxidasa es positiva si se practica con cualquier reactivo en colonias de agar sangre, pero puede ser negativo si se practica en colonias de agares entéricos, las cuales muestran signos de fermentación.

Debería ser notado que algunas clases de Aeromonas hydrophila son oxidasa negativas cuando son probadas de medios diferenciales como el -- Mc. Conkey porque ellos fermentan lactosa en el medio disminuyendo el pH a 5.2, este problema en las reacciones falsas negativas de oxidasa -- pueden ser evitadas usando una prueba rápida de oxidasa en las colonias del medio diferencial el mismo día.

La diferenciación de Aeromonas sp. de Plesiomonas shigelloides comprende principalmente las pruebas de la descarboxilación de la ornitina y la DNAsa. Han sido reportadas recientemente especies de Aeromonas — inositol positivo. Por otra parte la tinción flagelar no es necesaria para su confirmación.

Dentro de las Aeromonas existen 2 grupos. Los primeros son el grupo móvil indol positivo que crecen óptimamente de 35 a 37°C; estudios recientes de su taxonomía (1984) demostraron que existen sólo 3 especies en este grupo, y las cepas que no concuerdan con éstos pueden ser variantes raras de estas especies. Las especies pertenecientes a este grupo son Aeromonas hydrophyla, Aeromonas sobria y Aeromonas caviae.

Al segundo grupo corresponde Aeromonas salmonicida. Es oxidasa positiva y se caracteriza por su falta de motilidad y producción de indol, auxotrófica, inhabilidad para crecer a 37°C. Y producción de un pigmento melanínico en agar conteniendo tiroxina. Causa furunculosis en el pescado, generalmente en el salmón y es de importancia económica en la industria pesquera. Ninguna infección humana debido a esta bacteria ha sido reportada.

El Manual Bergey's reorganiza 4 especies de Aeromonas: Aeromonas hydrophyla, Aeromonas sobria, Aeromonas caviae y Aeromonas salmonicida (con sub-especies, salmonicida, achromogenes y masocida). Recientemente fue descrita una especie acuática Aeromonas media (no móvil como Aeromonas salmonicida) que no se encuentra en especímenes humanos.

Uno de los aspectos más intrigantes de los estudios bioquímicos de Aeromonas han sido la correlación de ciertos fenotipos con enteropatogenicidad. En 1979 Cumlath y colaboradores encontraron una asociación distinta entre clases de Aeromonas hydrophyla recuperadas de casos de diarrea con producción de citotoxinas, descarboxilación de la lisina posi-

tiva y Voges Proskauer positivo.

PLESTOMONAS:

Al igual que las Aeromonas, Plesiomonas shigelloides es anaeróbica facultativa.

Son células con puntas redondeadas gram negativas midiendo de 2.0- a 3.0 μ m. por 0.1 a 1.0 agrupados en pares o cadenas cortas.

Son móviles debido a flagelos polares lofotricos (generalmente de 2 a 5) con una onda de 3.5 a 4.0 μ m. en cultivos de 2 a 4 horas de viejos puede mostrar flagelo lateral con una onda corta. Células monotricas así como clases no móviles ocurren.

Plesiomonas shigelloides es heterotrófica, produce oxidasa y catalasa, fermenta glucosa y sólo un poco otros carbohidratos produciendo ácido pero no gas.

Los nitratos son reducidos a nitritos y es citrato positivo. En -- contraste con Aeromonas hydrophila fermenta inositol, y no fermenta manitol o sacarosa, no licúa la gelatina.

Producen descarboxilación de la lisina y la ornitina, la deshidrogenación de la arginina es positiva y la lipasa es negativa.

La temperatura mínima de crecimiento es de 5°C, su crecimiento óptimo es de 30°C y a 37°C hay un buen crecimiento, el rango máximo de -- temperatura va de 39 a 41°C. El rango de pH para su crecimiento es de 5.0 a 7.7.

Al igual que Aeromonas puede crecer en la mayoría de los agares --

entrícos. No hay crecimiento en caldos nutritivos que contengan 7.5% de NaCl.

La mayoría crecen en medios minerales conteniendo amonio como fuente de Nitrógeno y glucosa así como sacarosa como fuente de carbono.

La mayoría de las cepas son sensibles al agente vibriostático 2,4-diamino 6,7 diisopropil pteridina (O/ 129), debido a esto se incluyó en la Familia Vibrionaceae.

Generalmente no fermenta lactosa en agares entrícos. El contenido de guanina-citocina en el DNA es de 51 moles %. Este organismo no produce beta hemólisis en agar sangre a diferencia de Aeromonas hydrophyla. Las colonias pueden ser claras o rosas en el medio EMB.

No existen medios selectivos para Plesiomonas, pero crecen pobremente en agar TCBS, crece bien en agar desoxicolato citrato y McConkey, las colonias se parecen a Shigella y algunas especies son fuertemente aglutinadas por antisuero de Shigella sonnei.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE AEROMONAS SP.
Y PLESIOMONAS SHIGELLÓIDES

	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>P. shigelloides</i>
Oxidasa	+	+
ONPG	+	+
Arginina dehidrolasa	+	+
Descarboxilación lisina	+/-	+
Descarboxilación ornitina	-	+
Citrato	+/-	-
Sulfuro de hidrógeno	-	-
Ureasa	-	-
Desaminación triptófano	-	-
Indol	V+	+
Voges-Proskauer	V+	-
Licuefacción gelatina	+	-
Glucosa		
Acido	+	+
Gas	V-	-
Manitol	+	-
Inositol	-	+
Sorbitol	V-	-
Sacarosa	V+	-
Amigdalina	V+	-
Arabinosa	V+	-
Amilasa	+	-
Catalasa	+	+
DNasa	+	-

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DIFERENCIALES DE AEROMONAS

	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>
Hidrólisis esculina	+	+	-
Crecimiento KCN	+	+	-
Acido de salicina	+	+	-
Gas de glucosa	+	-	+
Voges-Proskauer	+	-	+/-
Producción de Elastasa	+	-	-

1.4 ESTRUCTURA ANTIGENICA.

Los anticuerpos de Aeromonas hydrophila (antihemolisina, aglutinina, precipitina) han sido detectados en pacientes que han sufrido infecciones agudas y no en aquellas con infecciones superficiales. Varios factores tóxicos han sido aislados de cultivos de Aeromonas hydrophila (leucocidina, hemolisina y citotoxina).

1.5 HABITAT Y SIGNIFICADO CLINICO.

AEROMONAS:

Aeromonas sp. está ampliamente distribuida en agua estancada, en alcantarillás, con un rango de densidad de menos de uno a muchos miles de células por mililitro. Han sido encontrados en valores de pH de 5.2- a 9.8 y a temperatura de 4 y 45°C. No son consideradas halofílicas ya que el rango de tolerancia a NaCl es sólo de 0 a 4%. También han sido aisladas de tierra y la sobrevivencia parece depender de la humedad y la presencia de materia orgánica. Han sido aisladas de comestibles así como de especímenes fecales de personas asintomáticas. Reptiles o pescados pueden también ser infectados o pueden transportar el organismo.

Las infecciones humanas con Aeromonas ocurren predominantemente durante el periodo de mayo a noviembre, probablemente causadas por el origen acuático de la bacteria y han sido el objeto de muchos estudios recientes. Sin embargo el mecanismo por el cual causa enfermedad intestinal permanece incierto.

CUATRO CATEGORIAS DE INFECCIONES HAN SIDO DESCRITAS:

a) Celulitis o infección de heridas relacionada por exposición al agua

o tierra.

- b) Enfermedad diarreica aguda de corta duracion, algunas veces sanguinolenta o coleriforme, ocurriendo mundialmente y afectando cualquier edad (aunque es vista particularmente frecuente en pacientes con -- procesos diarreicos con menos de 5 años de edad).
- c) Septicemia mayormente en asociacion con enfermedades hepatobiliares o malignas (frecuentemente cirrosis de hgado o leucemia aguda).
- d) Otras infecciones, varias infecciones de tejido blando y raros casos de infeccion del tracto urinario, meningitis, peritonitis, otitis y endocarditis.

Los procesos diarreicos afectan millones de personas cada año, particularmente procesos de paises industrializados cuando visitan regiones menos desarrolladas como lo son Asia, Africa, Centro y Sudamerica. Los principales agentes etiologicos son: Escherichia coli enterotoxigenica, especies de Shigella y Salmonella. Protozoarios como lo son: Giardia lamblia y Entamoeba histolytica.

En un estudio hecho en 1984 (Princess Margaret Children's Medical-Research Foundation Western Australia) fueron aisladas colonias de Aeromonas con el uso de Desoxicolato Citrato agar (DCA) y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). (11). La presencia de colonias lactosa negativas en DCA y colonias formadoras de acido en XLD han producido una alta incidencia en el aislamiento de Aeromonas hydrophila aunque fermentadoras rapidas de lactosa se perderán.

Hemos encontrado que la produccion de aislamiento de Aeromonas de heces es mayor cuando el agar sangre es usado para el aislamiento primario. Se recomienda agregar 10 mg/lt de ampicilina al agar usado para --

cultivar heces de pacientes con diarrea. Esto permite un reconocimiento más fácil de la beta hemólisis en colonias de Aeromonas hydrophila que está frecuentemente pero no siempre asociado con Aeromonas hydrophila - enterotoxigénica. Así Aeromonas sp. debería ser incluido en la lista de posibles patógenos entéricos buscados en pacientes con procesos diarreicos.

Aeromonas hydrophila es un microorganismo potencialmente patógeno que ha sido aislado de casos de gastroenteritis (Rosner 1964), infección del tracto urinario (Von Graevenitz and Mitchell 1972), meningitis (Qadri y colaboradores 1975), infecciones de heridas (Hansen y col 1977).

La infección en humanos puede ocurrir a través de traumas o ingestión de agua o alimentos contaminados.

Aeromonas hydrophila y Aeromonas sobria son las Aeromonas más patógenas a nivel entérico. Las nuevas especies han sido recientemente asociadas con gastroenteritis fulminante imitando cólera.

Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae y Aeromonas sobria son más comúnmente aisladas de pacientes con diarrea que de heces normales, pero donde Aeromonas hydrophila es común en agua corriente, el aislamiento es igualmente frecuente. Aeromonas hydrophila es considerada la especie típica de este género.

Aeromonas hydrophila ha sido aislada de heces de pacientes con enfermedades diarreicas y algunos de estos aislamientos producen enterotoxinas pero el rol enterotoxigénico todavía no está establecido. La gastroenteritis asociada con este organismo es usualmente autolimitada y no requiere tratamiento.

La prueba positiva a la descarboxilación de la lisina y Voges-Proskauer

kauer positivo están relacionadas con las cifras productoras de enterotoxina citotóxica. Un caso aislado de diarrea recurrente con repetidos aislamientos de Aeromonas hydrophila de heces en ausencia de otros patógenos entéricos con recuperación después de un tratamiento con cotrimoxazole en el cual el filtrado de un cultivo produjo un incremento en la permeabilidad vascular en pruebas de piel de conejo ha dado una fuerte evidencia a favor del papel enteropatogénico de esta especie. (Depto. - de Medicina y Microbiología del Hospital Stevenage Hertz, 1980). (10).

Determinando la hemólisis, descarboxilación de lisina y Voges-Proskauer de aislamiento de Aeromonas recuperados de casos de gastroenteritis, uno puede predecir con un alto grado de exactitud si una especie individual produce enterotoxina o no y de ese modo establecer el agente etiológico de la enfermedad.

Un incremento en la incidencia de infecciones humanas causadas por Aeromonas hydrophila ha sido reportada incluyendo heridas traumáticas - infectadas (algunas con una historia de exposición al suelo o agua): - Septicemia, meningitis, gastroenteritis, heridas postoperatorias infecciosas (usualmente de cultivos mixtos). Pacientes con enfermedades hematólogicas parecen ser susceptibles a la infección con este organismo.

En un estudio hecho en Tailandia para evaluar la enteropatogenicidad de Aeromonas hydrophila, cuando la mucosa intestinal de conejos infectados fue examinada histológicamente Aeromonas hydrophila pareció -- ser enteroinvasiva, sin embargo filtrados estériles de cultivos de Aeromonas hydrophila distendieron el intestino de animales, indicando que - la citotoxina así como la habilidad del organismo para invadir mucosa-intestinal juega un papel muy importante en la patogenicidad de este organismo, aunque ambas capacidades enteroinvasiva y citotoxigenicidad de este organismo, causa lesiones en la mucosa intestinal de animales, es incierto cuál es el responsable de causar diarrea en humanos.

La patogenicidad de Aeromonas hydrophila citotóxica puede ser similar a aquella de Shigella dysenteriae o Clostridium perfringens aunque - las toxinas producidas por estas tres especies son inmunológicamente no relacionadas.

Un grupo de investigadores han encontrado correlación entre toxicidad y descarboxilación de la lisina así como reacción positiva a - Voges-Proskauer.

Estudios en humanos y/o biopsias intestinales de pacientes con diarrea de quienes Aeromonas sp. son aisladas probablemente serán requeridos para definitivamente establecer si Aeromonas hydrophila y Plesiomonas shigelloides son patógenos gastrointestinales.

PLESIOMONAS:

La distribución acuática de Plesiomonas shigelloides está limitada por un crecimiento mínimo de temperatura de 8°C y es un hecho que no sobreviven bien en agua de mar. Ha sido aislada del intestino de pescados de agua fresca, de agua de superficie y de muchos animales como el perro, gatos, monos, serpientes.

La mayor parte de los aislamientos de Plesiomonas shigelloides en humanos han sido aislados en heces de pacientes con diarrea de habitantes de áreas tropicales y subtropicales. La mayoría de estas infecciones fueron probablemente transmitidas por agua, pero su mecanismo de patogenicidad permanece incierto. También se ha aislado de sangre y LCR.

Las pocas infecciones extraintestinales han sido recientemente reportadas (celulitis, septicemia, meningitis neonatal).

Plesiomonas shigelloides ha sido infrecuentemente reportada como -

causa de infección severa en el período neonatal. La mayoría de los aislamientos previamente reportados ambos de niños y adultos han sido de cultivos de heces diarreicas. Sólo de unas pocas fuentes no intestinales se ha aislado este organismo.

Vandepitte revisó la experiencia de 8 años y reportaron 41 aislamientos de especímenes fecales y uno de bilis, 24 de estos aislamientos fueron de niños menores de 12 años de edad. (3). Este organismo ha sido aislado de cervix de una mujer con piometra; 3 aislamientos han sido de celulitis de pierna y uno de orina. Ewing menciona aislamientos de sangre y LCR, pero los detalles clínicos no están disponibles. (3).

Un caso reportado donde una celulitis fatal y septicemia rápidamente progresaron después de que una mano de una mujer de 68 años de edad con anemia de células falciformes fue atravesada con un hueso de pescado apoyan el concepto de que Plesiomonas shigelloides pueden causar un cuadro clínico no usual una vez que éste invade el organismo. (4).

Sólo tres casos de septicemia y meningitis neonatas causada por -- Plesiomonas shigelloides han sido reportadas. (3).

Plesiomonas shigelloides fue aislada como el único patógeno de bilis y pared de la vesícula biliar en una mujer de 58 años de edad con colesistitis aguda. (14).

La mayoría de los aislamientos posteriores fueron de especímenes fecales obtenidos de niños y adultos y fueron implicados como una causa de enteritis particularmente en infantes.

1.6 SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

AEROMONAS:

Aeromonas hydrophila es altamente susceptible a los aminoglicósidos, gentamicina, kanamicina, cloranfenicol, cotrimoxazole; es variablemente susceptible a tetraciclina.

PLESIOMONAS:

Plesiomonas shigelloides frecuentemente es resistente a ampicilina, pero es susceptible a cefalosporina, tetraciclina, aminoglicósidos, clo_rrafenicol y cotrimoxazole.

1.7 OBJETIVO.

Debido a que la diarrea es un grave problema sobre todo en la época de verano, este trabajo de investigación pretendió aislar e identificar Aeromonas y/o Plesiomonas como causantes de procesos diarreicos así como hacer la evaluación de un medio selectivo DCA (desoxicolato citrato agar), sobre 3 medios utilizados de rutina, SS (Salmonella-Shigella), Agar Mc. Conkey y Agar XLD.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1 PROCEDENCIA Y SELECCION DE MUESTRAS.

Se recolectaron 100 muestras diarréicas de lactantes mayores y menores del Hospital "Angel Leño", "Ramón Garibay", "Santa Mónica" y Hospital Infantil Guadalupano de la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

No se establecieron parámetros (moco, sangre) como requisito para la selección de dichas muestras; sólo se tomó en cuenta su aspecto diarreico.

2.2 CONSERVACION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS.

Las muestras se tomaron con un hisopo estéril y se pasaron a un medio de transporte (Stuart) para su posterior proceso en el laboratorio.

2.3 METODOLOGIA MICROBIOLOGICA.

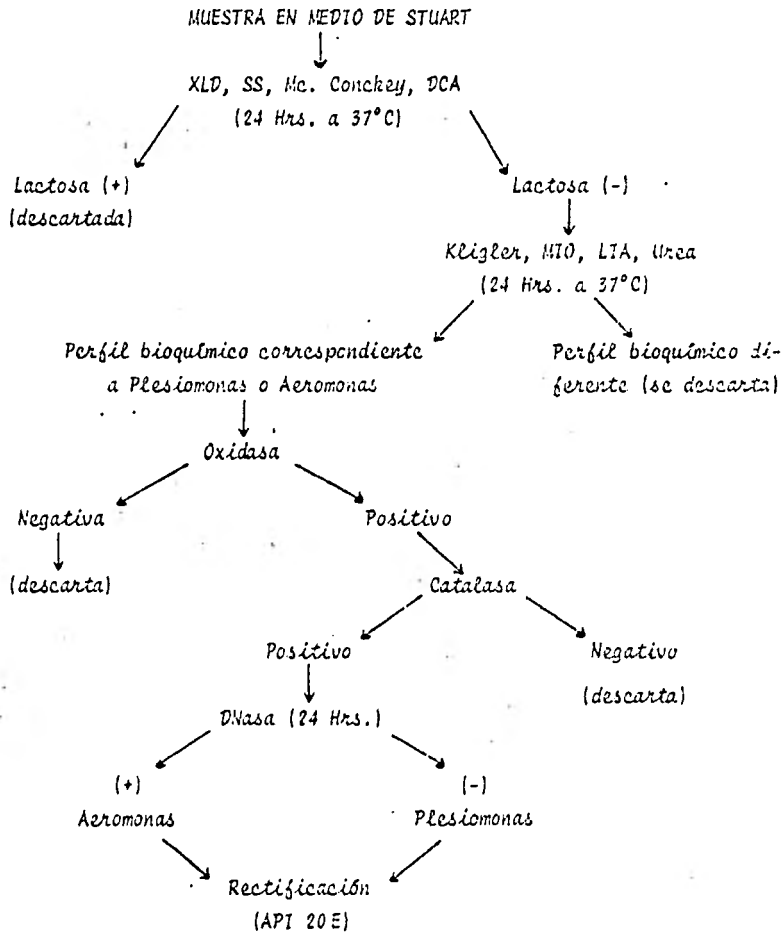
2.3.1 PRIMAISLAMIENTO.

Las muestras en el laboratorio se sembraron en 3 medios usuales -- (SS, XLD, Mc. Conkey) y un medio selectivo (DCA) para su aislamiento, incubándose por 24 horas a 37°C.

2.3.2 IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

A las colonias sospechosas lactosa negativas se les practicaron -- pruebas bioquímicas (Kliger, MIO, LIA, Urea) para su identificación. -

ESQUEMA PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE AEROMONAS Y PLESIOMONAS



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Si el perfil bioquímico correspondió a Aeromonas o Plesiomonas se realizaron las pruebas de oxidasa, catalasa y DNasa para su diferenciación y confirmación. Si concordaron con el patrón establecido, se rectificaron por medio del sistema API 20E.

API 20 E:

El sistema API 20 E es una versión estandarizada y miniaturizada de los procedimientos convencionales para la identificación de enterobacterias y otras bacterias gram negativas. Es un sistema de microtubos listos para usarse designados para practicar 23 pruebas bioquímicas estándar de una simple colonia de bacterias de un medio. La identificación bioquímica de Salmonella, Arizona hinshawii, E. coli, así como Vibrio cholera provenientes de una muestra de gastroenteritis pueden ser consideradas como una identificación presuntiva y confirmada serológicamente.

Debido a la claridad de las reacciones y a la facilidad de lectura e interpretación permiten una comparación válida de los resultados obtenidos en cualquier laboratorio.

PRINCIPIOS QUÍMICOS Y FÍSICOS:

El sistema API 20 E consiste en microtubos conteniendo medios deshidratados. Estos medios son reconstituidos por la adición de una suspensión bacteriana. Al incubarlos estos organismos reaccionan con el contenido de los tubos y se leen cuando los diferentes sistemas indicadores son afectados por el metabolismo al añadir reactivos, generalmente sucede después de 18 a 24 horas de incubación de 35 a 37°C.

3.- RESULTADOS

De las 100 muestras estudiadas sólo se logró aislar Aeromonas hydrophila en un 1%, mientras que el porcentaje de Plesiomonas fue nulo.

De las muestras restantes el 61% correspondió a E. coli, 14% a Enterobacter, 7% Salmonella, 4% Citrobacter, 7% Proteus, 1% Shigella, 5% Pseudomonas.

4.- CONCLUSIONES

Como se comprobó anteriormente, los resultados no fueron tan satisfactorios como se esperaba, ya que de las 100 muestras utilizadas, sólo se logró aislar una cepa de Aeromonas hydrophila y de Plesiomonas shigelloides el aislamiento fue nulo.

Es un porcentaje muy bajo si lo comparamos con otros estudios reportados (18), en donde una población de 975 niños (547 hombres y 428 mujeres), fueron estudiadas, se encontró que de los especímenes fecales encontrados solamente el 10.8% correspondía al género Aeromonas.

Debido al porcentaje tan bajo obtenido, no pudimos cumplir el objetivo de evaluar el medio DCA, usado como selectivo para Aeromonas, sobre 3 medios entéricos comúnmente utilizados, como fueron Agar SS, Mc-Conckey y XLD (xilosa, lisina, desoxicolato agar).

Diversos autores (11), aseguraron que no todas las clases de Aeromonas sp. crecerán en un medio ampliamente utilizado como lo es el agar Mc. Conckey. Algunas Aeromonas sp. fermentan la lactosa en estos medios haciendo las colonias morfológicamente indistinguibles de E. coli y dando falsas negativas de oxidasa, las cuales pueden resultar de cambios en el pH causados por fermentación de azúcares en el medio.

En un estudio hecho en Princess Margaret Children's Medical Research Foundation Western Australia en 1984, reportaron cepas de Aeromonas que fueron obtenidas con el uso de DCA y XLD. En los cuales la presencia de colonias lactosa negativas, así como las formadoras de ácido en XLD produjeron un alto índice de aislamiento de Aeromonas hydrophila. Sin embargo las fermentadoras rápidas de la lactosa se perdieron.

Otros estudios más recientes (15), recomiendan usar el agar desoxicolato porque es el que presentó el menor índice de inhibición del crecimiento de Aeromonas, comparándolo con otros agares entéricos como son (XLD, SS, Mc. Conkey, HE, Verde Brillante, Sulfito de Bismuto), además aseguran que en este medio se aíslan muy bien Salmonella y Shigella, -- así como otras bacterias entéricas patógenas de importancia médica. En segundo lugar se encontró el medio XLD.

En algunos estudios realizados (11), aseguran que el aislamiento de Aeromonas de heces es mayor cuando el agar sangre es usado para el primario aislamiento, y recomienda que el agar sangre conteniendo 10 mg/lt. de ampicilina sea agregado al medio usado para examinar heces de pacientes con diarrea ya que es más fácil el reconocimiento de beta hemólisis rodeando a las colonias de Aeromonas hydrophila. Sin embargo, debido al swarming que presenta Proteus sp. en agar sangre, puede evitar el aislamiento de Aeromonas. El uso de agares entéricos con una excelente ayuda cuando se usan en conjunción con el agar sangre (15).

De acuerdo con lo reportado anteriormente y debido a que se ha comprobado que tanto Aeromonas como Plesiomonas son agentes causantes de procesos diarreicos, se recomienda que se le preste especial atención a estas bacterias, principalmente a Aeromona hydrophila, ya que se ha visto que es la mayormente involucrada en procesos diarreicos.

Para su aislamiento se recomienda utilizar agar sangre en conjunción con otros agares entéricos, principalmente XLD y Agar Desoxicolato.

El bajo porcentaje de aislamiento obtenido pudo deberse a la época de recolección de las muestras siendo ésta de Enero a Marzo, la cual no es una época muy adecuada para padecimientos diarreicos.

5. - RESUMEN

Los primeros aislamientos para Aeromonas y Plesiomonas fueron hechos desde 1890 y 1947 respectivamente, desde ese tiempo a la fecha se han hecho numerosos aislamientos de especímenes de sangre y líquido cefalorraquídeo, así como también se han visto implicados en otros padecimientos como lo son septicemia e infecciones en heridas.

Aunque el mecanismo por el cual causan enfermedad permanece incierto son considerados causantes de diarrea por su aislamiento más frecuente en pacientes con este padecimiento, siendo en su mayoría niños.

Varios estudios se han hecho y se han reportado casos como en Japón donde P. shigelloides estuvo implicada en dos grandes epidemias de enfermedades diarreicas y otro caso donde A. hydrophila ocupó un 10.8% en un estudio hecho en Australia a 975 niños con diarrea.

Su habitat natural es el agua fresca y salada, considerada por eso fuente potencial de infecciones hospitalarias, debido a esto, y a que en nuestro país no conocemos la incidencia de estas bacterias, este trabajo de investigación fué hecho con el fin de aislar Aeromonas y Plesiomonas de muestras diarreicas así como evaluar un medio selectivo DCA -- (Desoxicolato, citrato agar) sobre 3 medios utilizados de rutina SS, agar Mc. Conkey y Agar XLD.

Se utilizaron 100 muestras de niños lactantes mayores y menores, los cuales estaban cursando un proceso diarreico, en las cuales no se tomaron en cuenta parámetros como sangre y moco. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio incubándose por 24 horas a 37°C. A las colonias sospechosas lactosa negativos se les practicaron pruebas bioquímicas usuales como son Kligler, MTO, LTA, Urea, así como oxidasa, cata-

lasa y DNasa confirmandose con el sistema API 20 E.

De las 100 muestras estudiadas sólo se logró aislar Aeromona hydrophila en un 1% mientras que el porcentaje para Plesiomonas shigelloides fue nulo, de las muestras restantes el 61% correspondió a E. coli, 14% a Enterobacter, 7% a Salmonella, 4% Citrobacter, 7% Proteus, 1% Shigella y 5% Pseudomonas.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios si los comparamos con otros estudios reportados donde A. hydrophila ha alcanzado porcentajes hasta del 10.8%. El bajo porcentaje obtenido pudo deberse a -- que la época de recolección de muestras no fué la apropiada para este tipo de padecimientos.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lennette E. H., Ballows A., Hauster W.J. and Truant J.P., Manual of Clinical Microbiology, 3rd. ed., Washington D.C. 1980, 220-225.
- 2.- Janda M.J., Reitano M. and Bottone E.J., Biotyping of Aeromonas -- isolates as a correlate to delinating a species-associated disease spectrum. Journal of Clinical Microbiology 19: 44-47. 1984.
- 3.- Pathak A., MD, Custer J.R. and Levy J., Neonatal septicemia and meningitis due to Plesiomonas shigelloides. Pediatrics 71: 389-391. 1983.
- 4.- Ellner P.D., Lawrence R. and Mc. Carthy, Aeromonas shigelloides -- Bacteremia. J. Clin. Pathol. 59: 216-218, 1973.
- 5.- Janda J.M., Biochemical and Exoenzymatic Properties of Aeromonas - spp. Sinai Hospital New York Department of Microbiology, pg.1-22.
- 6.- Finegold S.M., Martin W.J., Diagnostic of Microbiology, 6th ed., - London, 1982.
- 7.- Springer, Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, Edited by John A. Washington, New York 1981, 211-214.
- 8.- Von Graevenitz A. and Bucher C., Evaluation of Differential and - Selective Media for Isolation of Aeromonas and Plesiomonas spp. -- from Human Feces, J. of Clin. Microbiology 17: 16-21. 1983.
- 9.- Pitarangse Ch., Echeverria P., Whitmore R., Tirapat Ch., Forman S., Dammin G.J. and Tingtalapong M., Enteropathogenicity of Aeromonas-

hydrophila and Plesiomonas shigelloides: Prevalence Among Individuals with and without Diarrhoea in Thailand. *Infection and Immunity*, 35: 666-675. 1982.

- 10.- Srahman A.F., Willoughby J.H., Dysentery-like syndrome associated with Aeromonas hydrophila, *British Medical Journal*, 281: 276. 1980.
- 11.- Gracey M., Burkey V., Robinson J., Masters P.L., Stewart J., Fearman J., Aeromonas spp. in travellers diarrhoea. *British Medical Journal*, 289: 258. 1984.
- 12.- Wilson G., Miles A., Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 6th ed., Vol. 1. 1975, 677-679.
- 13.- Lennette E.H., Ballows A., Huaster W.J. and Shadomy H.J., Manual of clinical Microbiology, 4th ed., Washington D.C. 1985, p.278-281.
- 14.- Claesson B.W., Holmlund D.E., Lindhagen A. and Marzsch T.W., Plesiomonas shigelloides in Acute Cholecystitis: a Case Report., *J. of Clinical Microbiology*, 20: 985-987. 1984.
- 15.- Desmond E. and Janda J.M., Growth of Aeromonas species on Enteric Agars, *J. of Clinical Microbiology*, 23: 1065-1067. 1986.
- 16.- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R. y Sommers H.M., Diagnóstico-Microbiológico. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. 1983.
- 17.- Burrows W., Tratado de Microbiología, 20a. edición, Nueva Editorial Interamericana. 1974.
- 18.- Burke V., Gracey M., Robinson J., Peck D., Beaman J. and Bundel C.

The Microbiology of Childhood Gastroenteritis: Aeromonas species -
and other infective agents., *Journal of Infectious diseases*, 148:-
68-73. 1983.