

Bioquimia

Volumen 28
Volume

Número 4
Number

Diciembre 2003
December

Artículo:

La identificación genética de *Aeromonas*,
una realidad y una necesidad para la
microbiología diagnóstica

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica

G Castro-Escarpulli^{1ab*}, MG Aguilera-Arreola^{1c}, CH Hernández-Rodríguez^{2ab}, RI Arteaga- Garibay^{1c}, AA Carmona-Martínez¹, A Pérez-Valdespino¹, S Giono-Cerezo^{1ab}, MJ Figueras Salvat³, G Aparicio Ozores^{1ab}

¹Laboratorio de Bacteriología Médica, ²Laboratorio de Microbiología General, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Santo Tomás. Del. Miguel Hidalgo. ³Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus Spain. ^{ab}Becario COFAA, ^{ab}Becario EDD y ^cBecario CONACYT

*Sobretiros: Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Plutarco Elías Calles, 11340 México D.F. México. Fax: 57296207, e-mail: chelacastro@hotmail.com
Recibido: 21/07/03 Aceptado: 14/10/03

Resumen

Recientemente, algunas de las especies de *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública para la población humana provocando infecciones intestinales y extra-intestinales. El objetivo de este trabajo ha sido el identificar genéticamente cepas del género *Aeromonas* aisladas en México a partir de orígenes diferentes. Se trabajaron 151 cepas aisladas de muestras: clínicas (42), de agua (27) y de pescado congelado (82) que fueron identificadas presuntamente por pruebas bioquímicas como pertenecientes al género *Aeromonas*. Por el sistema comercial Vitek (bioMérieux) y pruebas complementarias las cepas fueron identificadas como *A. hydrophila* (50, 33%), *A. caviae* (31, 21%), *A. veronii* bt sobria (30, 20%), *A. salmonicida* (29, 19%) y *A. eucrenophila* (11, 7%). Se realizó la identificación molecular o genética que analiza los patrones de restricción obtenidos (RFLP's) del gen rDNA 16S para todas las cepas. El método genético reveló que solo 135 cepas presentaron patrones de RFLP característico para el género *Aeromonas*, correspondiendo 58 a *A. salmonicida* (38%), 22 a *A. bestiarum* (15%), 22 a *A. veronii* (15%), 19 a *A. hydrophila* (13%), 10 a *A. caviae* (7%), 3 a *A. encheleia* (2%), esta última especie fue identificada por primera vez en México, y 1 a *A. media* (0.6%); mientras que 11 (7%) cepas correspondieron a patrones diferentes a *Aeromonas*. Concluimos que la identificación acertada de las *Aeromonas* spp. es compleja, ya que requiere la identificación genética, lo cual no está disponible para la mayoría de los laboratorios clínicos de nuestro país.

Palabras clave: *Aeromonas*, identificación, fenotípico, genotípico.

Abstract

Recently, *Aeromonas* species have emerged as a public hazard to human population, since cause intestinal and extraintestinal infections. The aim of this study was to identify genetically *Aeromonas* strains obtained from different sources. 151 strains of *Aeromonas* were isolated from clinical samples (42), from water (27), and from frozen fish (82) that were presumptively identified by biochemical tests as *Aeromonas*. Using the automatic method Vitek of bioMérieux carried out complementary biochemical identification. The results presented five species, been *A. hydrophila* the most frequent with 50 strains (33%), followed by *A. caviae* with 31(20%), *A. veronii* bt sobria with 30 (19.8%), *A. salmonicida* with 29(19.2%), and *A. eucrenophila* with 11 (7.2%). All the strains were genetic identified by 16S-rDNA RFLP. The molecular method revealed that only 135 out of the 151 strains corresponded to *Aeromonas*. The seven species identified: *A. salmonicida* (38%), *A. bestiarum* (14%), *A. veronii* (14%), *A. hydrophila* (13%), *A. caviae* (7%), *A. encheleia* (2%) species reported for first time in Mexico, and *A. media* (0.6%). We concluded that efficient *Aeromonas* identification is complex, and requires genetic support, although this kind of procedures is not available in most of the clinical laboratories in our country.

Key word: *Aeromonas*, identification, phenotypic, genotypic.

Introducción

Las especies del género *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública para la población humana, ya que provocan infecciones intestinales y extra-intestinales.¹ 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 con mayor frecuencia en pacientes con infección gastrointestinal.²

La identificación correcta de los agentes etiológicos asociados con la infección gastrointestinal es importante, ya que tan sólo en México se reportaron 460,543 casos nuevos de

Cuadro 1. Especies aceptadas en el género *Aeromonas*.

Especie	Cepa de referencia	Equivalentes en otras colecciones
<i>A. hydrophila</i> ^a	CECT839	ATCC 7966; NCIMB 9240
<i>A. bestiarum</i>	CECT4227	ATCC 51108; NCIMB 1134
<i>A. salmonicida</i> ^b	CECT894	ATCC 33658; NCIMB 1102
<i>A. caviae</i> ^c	CECT838	ATCC 15468
<i>A. media</i>	CECT4232	ATCC 33907; NCIMB 2237
<i>A. eucrenophila</i>	CECT4224	ATCC 23309; NCIMB 74
<i>A. sobria</i>	CECT837	ATCC 43979; NCIMB 12065
<i>A. veronii</i> bt sobria ^d	CECT 4246	ATCC 35624; NCIMB 13015
<i>A. jandaei</i>	CECT4228	ATCC 49568
<i>A. veronii</i> bt veronii	CECT 4257	ATCC 35624; LMG 9075
<i>Aeromonas</i> sp.	CECT 4253	ATCC 35941; NCIMB 13014
<i>A. schubertii</i>	CECT4241	ATCC 43700; NCIMB 13161
<i>Aeromonas</i> sp.	CECT 4240	ATCC 43700; LMG 9074
<i>A. trota</i> ^e	CECT4255	ATCC 49657
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT4199	ATCC 51208
<i>A. encheleia</i>	CECT4342	ATCC 51929
<i>A. popoffii</i>	CECT4995	ATCC BAA-243; LMG17541
<i>A. culicicola</i>	CECT5761	MCT 3949; NCIMB 5147

^a Especie tipo del género *Aeromonas*; ^b para la que se han descrito cinco subespecies (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*; *A. salmonicida* subsp. *mansoucida*; *A. salmonicida* subsp. *smitia* y *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*); ^c comparte la misma cepa tipo que *A. punctata*, nombre propuesto para la especie con anterioridad, esta todavía por resolver cual de ambos es el nombre específico correct; ^d para la que se han descrito dos biotipos (*A. veronii* bt. sobria y *A. veronii* bt. veronii); *A. ichtiosmia* es un sinónimo de esta especie; ^e *A. enteropelogenes* es un sinónimo de esta especie. CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA; NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, UK. MCT Microbial Type Culture Collection India.

enfermedad diarreica aguda hasta la semana siete del 2003.³ Las bacterias son uno de los principales agentes etiológicos en prácticamente todos los países del mundo.⁴ 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

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas diferenciales entre géneros relacionados con las *Aeromonadales*.

Pruebas Bioquímicas	Géneros				
	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacterias</i>
Oxidasa	+	+	+	+	-
Fermentación de la glucosa.	+	+	+	-	+
Sensible a 0/129:	S/S	R/R	S/S	NA	NA
10µg/150µg					
Crecimiento en TCBS.	+	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl:					
0%	-	+	+	NA	+
3%	-	+	+/-	NA	-
6%	+	-	+	NA	-
Ácido de Inositol.	-	-	+	NA	V

O/129= 2,4, diamino 6-7 diisopropilpteridina; + = La mayoría de las cepas son positivas; - = La mayoría de las cepas son negativas R= Resistente, S= Sensible, NA= No aplicable

Modificada de (10,22)

geográficas (países desarrollados y en vías de desarrollo) se han documentado como de importancia epidemiológica.^{1,4,5}

Para que los especialistas establezcan el significado epidemiológico del género *Aeromonas*, necesitan contar con una metodología que permita identificar de manera fiable a las diferentes especies del género (Cuadro 1), además de considerar que no solo se deben analizar muestras clínicas, sino también ambientales y de alimentos. Todo lo anterior indica la necesidad de utilizar técnicas moleculares que resulten útiles en la identificación y/o tipificación de las diferentes cepas recuperadas.^{6,7,8}

En el laboratorio clínico, los miembros del género *Aeromonas* pueden crecer en medios diferenciales y selectivos de uso común, como aquellos empleados para el aislamiento rutinario de bacterias Gram negativas.^{1,9,10}

La identificación microbiológica del género se puede realizar con 6 pruebas básicas (Cuadro 2); no obstante, se necesitan de un mínimo de 19 pruebas, entre bioquímicas y de susceptibilidad a varios antimicrobianos, para lograr la identificación fenotípica de las 8 especies asociadas a cuadros clínicos (Cuadro 3).^{1,9,10}

La identificación por métodos miniaturizados y por sistemas automatizados se ha convertido en otra alternativa que resulta

conveniente para fines diagnósticos, pues en estos sistemas, comparativamente a los métodos tradicionales, hay ahorro de tiempo, material y esfuerzo.⁶ Los sistemas miniaturizados y automatizados (API, Vitek, BBLCrystal y MicroScan) requieren de pruebas previas como Gram y oxidasa; pero presentan la limitante de que no identifican a todas las especies de importancia clínica, ya que éstas no se encuentran codificadas en las bases de datos. Inclusive, para determinar la especie correcta dentro de las tres especies de *Aeromonas* de importancia clínica que están codificadas en las bases de datos de estos sistemas (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* que actualmente corresponde *A. veronii* bt sobria), se deben realizar pruebas convencionales adicionales como la hidrólisis de esculina, producción de gas a partir de glucosa, Voges-Proskauer, crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl y la beta hemólisis en agar sangre.^{9,11} Diversos autores han ensayado estos sistemas de identificación, encontrando que el método convencional de marchas aplicado en bacteriología médica empleando pruebas bioquímicas y antimicrobianos, resulta ser el más útil para los laboratorios clínicos.^{1,9}

En general todos los métodos de identificación fenotípicos previamente señalados tienden a identificar incorrectamente a las especies de *Aeromonas*. Este hecho ha sido demostrado al comparar los resultados obtenidos con los obtenidos con el método genotípico, basado en el polimorfismo de fragmentos

Cuadro 3. Identificación de las especies del género *Aeromonas* consideradas de importancia clínica.

Características	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i> bt veronii	<i>A. jandaei</i>	<i>A. subertii</i>	<i>A. trota</i>
Indol	+	+	+	+	+	-	+
Gas de glucosa	+	-	+	+	+	-	+
Arginina dihidrolasa	+	+	+	-	+	+	+
Descarboxilación de:							
lisina	+	-	+	+	+	+	+
ornitina	-	-	-	+	-	-	-
Voges-proskauer	+	-	+	+	+	-	-
Ácido de:							
L-arabinosa	+	+	-	-	-	-	-
Lactosa	-	+	-	-	ND	-	ND
Sacarosa	+	+	+	+	-	-	-
m-Inositol	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	-	+
Salicina	+	+	-	+	-	-	-
Celobiosa	v	+	v	v	-	-	+
Hidrólisis de esculina	+	+	-	+	-	-	-
Beta hemólisis en sangre de carnero	+	-	+	+	+	v	v
Susceptibilidad a:							
Cefalotina	-	-	+	+	-	+	-
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	+
Susceptibilidad a 0/129:							
10µg	-	-	-	-	-	-	-
150µg	-	-	-	-	-	-	-

+ =positivo; - = negativo; v = variable; ND = dato no disponible, bt= biotipo. Modificada de ^{1,9}

de restricción obtenidos de un producto de la reacción en cadena de la polimerasa (RFLP-PCR) del 16S rDNA que desarrollaron Figueras y cols. en el año 2000.¹² Estos autores propusieron un esquema fiable de identificación de todas las especies de *Aeromonas* descritas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue el comparar los resultados obtenidos de la identificación fenotípica por el método de Vitek con la genética por RFLP rDNA 16S de 151 cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de muestras de nuestro país.

Material y Métodos

Material biológico. Se trabajaron 151 cepas aisladas de muestras de diferente origen: clínico (42), agua (27) y pescado congelado (82), que fueron identificadas por pruebas bioquímicas como pertenecientes al género *Aeromonas*.^{13,14,15} Todas las cepas utilizadas en el presente estudio fueron conservadas en caldo Todd Hewitt con 20% de glicerol a -70°C hasta su uso.

Identificación fenotípica. La identificación de las cepas se realizó empleando el sistema automatizado Vitek® (bioMérieux) como se describe a continuación. Se realizó una suspensión de cada una de las cepas en un tubo de ensayo estéril, conteniendo 1.8 mL de solución salina al 0.45%. Se ajustó la suspensión al tubo número 1 del nefelómetro de McFarland (3×10^8 células/mL). Se extrajo la tarjeta GNI (identificación para Gram negativo) de la bolsa individual y se marcó el número de cepa con el marcador Vitek. Se llenó la tarjeta en el módulo del soporte de llenado, se selló y se colocó en el módulo lector/incubador y se siguió el procedimiento indicado en el manual Vitek® hasta obtener el reporte generado por el equipo.^{11, 14, 16}

Identificación genética. La identificación molecular se basó en el estudio de Figueras y cols.¹² que brevemente consiste en lo siguiente. Cada una de las cepas se sembró en agar de soya tripticasina (TSA, Oxoid) y se incubó a 37°C durante 18 h. La extracción del ADN bacteriano se realizó mediante la matriz de purificación InstaGENE (Bio-Rad Laboratories Inc. Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del DNA genómico para cada una de las cepas se evaluó espectrofotométricamente (Gene QuantPro ADN/RNA, Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, España) a una absorbancia de 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (1 OD) equivale a 50 µg/mL de ADN.

Se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el gen rDNA 16S, en un termociclador "Gene-AMP" (PCR System Perkin Elmer 2400), partiendo de aproximadamente 200-300 ng del ADN genómico que se ajustó en un

volumen final de 50 µL. La mezcla de reacción contenía 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.3 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato dNTP's (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.3 µM de cada uno de los iniciadores (Anti 1⁵ AGA GTT TGA TCA TGG CTC A³ y S⁵ GGT TAC CTT GTT ACG ACT T³) y 2.5U de *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 96°C por 5 min (desnaturalización), 94°C por 1 min (desnaturalización), 56°C por 1 min (hibridación), 72°C por 1.30 min (extensión), estas condiciones se repitieron por 35 ciclos y al finalizar se efectuó una última extensión durante 5 min a 72°C.

Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (agarosa D-1 Baja EEO, Pronadisa, Barcelona España) disuelta en una solución reguladora TAE 1X (trisma base 2M-ácido acético-EDTA 0.5 M) que se calentó hasta su disolución, se le adicionó 5 µL de bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Después de su gelificación las muestras se colocaron dentro de los pocillos, mezclando 2 µL de densificante 6X tipo IV (azul de bromofenol al 0.25%, 40% de sacarosa (w/v) en agua) con 5 µL de las muestras amplificadas. Estas se corrieron a 55 V/cm durante 60 min, al término del tiempo se visualizaron en un documentador de geles con luz ultravioleta, fotografiando el gel con una cámara Gel printer plus (TDI). Para esta reacción de PCR se esperaba un fragmento amplificado de 1502 pb. para cuya verificación se corrió en paralelo 1 µg/µL del marcador de peso molecular de 50-2000 pb (AmpliSize™ Biorad, Barcelona, España).

Después se realizó la generación de fragmentos polimórficos del gen rDNA 16S por digestión con enzimas de restricción. Primero se procedió a la limpieza del producto amplificado empleando el sistema Concert Rapid PCR (Gibco- BRL, Barcelona, España), el cual está diseñado para obtener una purificación rápida de los productos de PCR. El producto resultante de la limpieza se sometió a la digestión enzimática doble, se preparó una mezcla la cual contenía 12 µL del fragmento amplificado, 1 µL del regulador de digestión (10x), 10U/µL *AluI* y 10U/µL de la enzima *MboI* (Gibco BRL, Barcelona, España), adicionando agua para un volumen final de 20 µL, la mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos polimórficos, fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Biorad, Barcelona, España) al 15% a 300 V/56mA durante 3 horas. En todos los geles se colocó el marcador de peso molecular marcador V de 8 a 587pb (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Al término del tiempo se tiñeron los geles durante 30 min con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y se visualizaron en un documentador de geles con luz ultravioleta, fotografiando el gel con una cámara Gel printer plus (TDI). Las fotografías de los RFLP obtenidos de las digestiones dobles con las enzimas *AluI* y *MboI*, fueron comparadas con los patrones obtenidos para las cepas tipo de

Cuadro 4. Resultados comparativos de la identificación bioquímica y genética (RFLP rDNA 16S) de 151 cepas de *Aeromonas* aisladas en México.

Identificación genética RFLP-PCR rDNA 16S			Identificación Bioquímica por Vitek más pruebas complementarias		% de Concordancia entre ambos métodos
No. de cepas	Especies (*)	% de Identificación	No. de cepas	Especies	
58	<i>A. salmonicida</i> (29)	38.41	16	<i>A. hydrophila</i>	33
			19	<i>A. salmonicida</i>	
			10	<i>A. caviae</i>	
			6	<i>A. veronii bt sobria</i>	
			7	<i>A. eucrenophila</i>	
22	<i>A. bestiarum</i> (0)	14.56	8	<i>A. hydrophila</i>	0
			7	<i>A. salmonicida</i>	
			3	<i>A. caviae</i>	
			4	<i>A. veronii bt sobria</i>	
			0	<i>A. bestiarum</i>	
22	<i>A. veronii</i> (30)	14.56	3	<i>A. hydrophila</i>	73
			1	<i>A. salmonicida</i>	
			2	<i>A. caviae</i>	
			16	<i>A. veronii bt sobria</i>	
19	<i>A. hydrophila</i> (50)	12.58	11	<i>A. hydrophila</i>	58
			7	<i>A. caviae</i>	
			1	<i>A. eucrenophila</i>	
10	<i>A. caviae</i> (31)	6.62	3	<i>A. hydrophila</i>	60
			6	<i>A. caviae</i>	
			1	<i>A. veronii bt sobria</i>	
3	<i>A. encheleia</i> (0)	1.98	3	<i>A. eucrenophila</i>	0
			0	<i>A. encheleia</i>	
1	<i>A. media</i> (0)	0.66	1	<i>A. hydrophila</i>	0
			0	<i>A. media</i>	
11	Otros géneros	7.28	9	<i>A. hydrophila</i>	0
			2	<i>A. salmonicida</i>	
5	Patrón atípico GH2/GH3	3.31	3	<i>A. caviae</i>	0
			2	<i>A. veronii bt sobria</i>	

n= número de cepas, 11 cepas de *A. eucrenophila*

cada una de las especies, para asignar a cada cepa la especie correspondiente. En todas aquellas cepas en las que los patrones de *AluI* y *MboI* producían un patrón común se les realizaron digestiones simples (*NarI*, *HaeIII*, *PstI* o *SfaNI* y *AlwNI*), y se identificaron según los patrones descritos por los mismos autores.

Resultados

La identificación de las cepas realizada por el sistema automatizado Vitek®, emite un informe que contiene el

porcentaje de concordancia con respecto a las especies contenidas en sus bases de datos, además sugiere la realización de pruebas bioquímicas complementarias para la identificación final, logrando finalmente identificar los 151 aislamientos.

Cinco especies fueron las que correspondieron a todas las cepas del estudio, encontrándose 50 cepas como *A. hydrophila* (33%), 31 como *A. caviae* (21%), 30 como *A. veronii bt sobria* (20%), 29 como *A. salmonicida* (19%) y 11 como *A. eucrenophila* (7%). El patrón de distribución de las especies fue diferente en

los distintos tipos de muestras. *A. veronii* bt sobria (45%) fue la que se identificó con mayor frecuencia en cepas de origen intestinal, seguida de *A. hydrophila* (34%) y *A. caviae* (21%). En las cepas provenientes de aguas se identificó con mayor frecuencia *A. hydrophila* (59%), seguida de *A. caviae* (33%) y *A. veronii* bt. sobria (7%) y en el caso de las cepas de pescado congelado para consumo humano se identificó con mayor frecuencia *A. salmonicida* (35%), seguida de *A. hydrophila* (21%), *A. caviae* (17%), *A. veronii* bt sobria (14%) y *A. eucrenophila* (13%). Se observó que las especies *A. salmonicida* y *A. eucrenophila* fueron identificadas exclusivamente a partir de pescado congelado.¹⁴

Al utilizar el método genético RFLP's rDNA 16S sólo se identificaron 135 cepas de las 151 como pertenecientes al género. La distribución de las especies obtenida con este método dio como resultado la identificación de siete especies diferentes, siendo *A. salmonicida* (38%) la especie predominante, seguida de *A. bestiarum* (15%), *A. veronii* (15%), *A. hydrophila* (13%), *A. caviae* (7%), *A. encheleia* (2%), especie reportada por primera vez en México y 0.7% de *A. media*.^(13,14) De las 16 cepas que presentaron patrones electroforéticos diferentes, 11 cepas fueron identificadas como *Shigella sonnei* y las 5 cepas restantes presentaron patrón atípico de GH2/GH3 (Cuadro 4).

Discusión

El porcentaje obtenido con la comparación de la identificación bioquímica y la identificación genética con los RFLP's rDNA 16S a un total de 151 cepas de *Aeromonas* aisladas en México a partir de muestras clínicas, aguas y de pescado en el cuadro 4 se pueden observar importantes diferencias entre ambos métodos. Un 11% de las cepas identificadas como *Aeromonas* resultaron no pertenecer a este género; así mismo, 38.5% de las identificaciones concordaron en ambos métodos. La mayor discrepancia se produjo en las once cepas que habían sido identificadas bioquímicamente como *A. eucrenophila*, ya que en realidad ninguna correspondió a esta especie. El método bioquímico resultó también incapaz de reconocer las 22 cepas de *A. bestiarum* identificadas genéticamente, mismas que fueron confundidas mayoritariamente con otras especies próximas como son: *A. hydrophila* (8 cepas) y *A. salmonicida* (7 cepas). La difícil separación bioquímica entre *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *A. bestiarum* ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores.^{16,17} Estos resultados establecen las bases que permitirán realizar la identificación acertada de las especies de *Aeromonas*, lo que permitirá en un futuro establecer la frecuencia real de las especies en México.

Aunque existen diversos esquemas de identificación para las especies de *Aeromonas* aisladas de muestras clínicas,^{1,9,16,17}

este trabajo demuestra que la identificación correcta y específica sólo puede realizarse cuando se utilizan métodos moleculares (RFLP rDNA 16S).

El estudio realizado dentro de un ciclo de evaluación de la calidad del Programa de Evaluación de la Calidad entre Laboratorios (PACAL, ENCB) reveló que en México hay dificultades para identificar *Aeromonas*. En esta evaluación participaron 228 laboratorios (IMSS, ISSSTE, SSA, PEMEX, estatales y particulares), a cada laboratorio participante se le envió una muestra de *A. hydrophila* para que fuera identificada y sólo 98 (43%) de los laboratorios fueron evaluados positivamente con al menos la identificación del género; mientras que el resto de los laboratorios generaron resultados erróneos, ya que reportaron 45 géneros bacterianos diferentes entre los que destacaron: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Pasteurella* y hubo varios informes de la familia *Enterobacteriaceae*. Este fracaso analítico refleja la gran dificultad que se tiene, a nivel de laboratorio clínico para la identificación del género *Aeromonas*, esto sin considerar que 32 (41%) laboratorios obtuvieron resultados negativos cuando emplearon sistemas automatizados como el Crystal BBL y Vitek. Por lo anterior, nos unimos a la recomendación de Aquino y cols. en el sentido de mejorar la capacitación del personal de laboratorio.¹⁸

También se ha descrito que la utilización de sistemas comerciales confunde *Aeromonas* con cepas de *Vibrio damsela*, *Vibrio cholerae* o *Vibrio fluvialis* y se da con frecuencia resultados erróneos.^(17,19,20,21,22) En un estudio reciente con 52 cepas fueron identificadas con el sistema MicroScan W/A, por ser éste el sistema de identificación que utiliza en la actualidad el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Barcelona. El sistema MicroScan W/A con la utilización del Combo panel 1S, de nuevo generó una identificación totalmente incorrecta, ya que sólo identificó correctamente a *A. hydrophila* teniéndola definida el sistema como *A. hydrophila group*. Las especies *A. veronii*, *A. jandaei* y *A. salmonicida* en este sistema eran como primera elección que se trataba de cepas de *V. fluvialis* (comunicación personal de Figueras Salvat). En un trabajo publicado recientemente en el que se evaluó también este sistema, los autores indican que hay esta confusión.²² Podríamos por tanto indicar que en general estos sistemas son imprecisos y que no se han adaptado a los cambios taxonómicos ocurridos en el género *Aeromonas*.^{6,22,23}

Por lo anterior, sugerimos que los laboratorios clínicos que puedan hacerlo realicen la búsqueda de las tres especies aisladas más frecuentemente, tomando en consideración que cuando los aislamientos se identifiquen con un sistema miniaturizado comercial como el API o con un sistema automatizado como Vitek GNI-CARD y BBL[®] Crystal DD Enteric/Nonfermenter, deben efectuar las pruebas complementarias recomendadas por

estos sistemas, ya que se ha reportado que las bases de datos de estos equipos sólo contemplan tres especies y en la mayoría de las ocasiones dan un informe combinado *A. hydrophila* / *A. caviae* o *A. hydrophila* / *A. sobria*. Además los métodos comerciales identifican incorrectamente la mayoría de las cepas como *A. hydrophila*; probablemente siendo ésta una de las razones de la importancia que se ha atribuido a esta especie frente a otras especies con mayor frecuencia en clínica.^{1,9,20,21}

Adicionalmente es importante no reportar los aislamientos de muestras clínicas identificados por estos sistemas como *A. sobria* por tratarse de una terminología incorrecta para referirse al biotipo sobria de la especie *A. veronii*. *A. sobria sensu stricto* es una especie principalmente de origen ambiental mientras que el biotipo sobria está frecuentemente involucrado en cuadros clínicos diarreicos.^{1,9}

Aunque las técnicas moleculares en la actualidad son una herramienta para emplear en los laboratorios de diagnóstico y estos métodos se reservan para su aplicación en la investigación epidemiológica y la enseñanza, consideramos que es importante insistir sobre la utilidad de los métodos moleculares, debido a los problemas de reproducibilidad y poder discriminatorio que presentan los métodos fenotípicos. Así mismo, la aplicación de métodos genotípicos abren nuevas perspectivas a los microbiólogos clínicos para la identificación y/o tipificación de algunos géneros fastidiosos en términos de taxonomía y epidemiología, tal como es el caso de *Aeromonas*.^{23,24}

Agradecimiento

Este trabajo forma parte de los proyectos "Estudio de los RFLP de los espacios intergénicos 16S-23S rDNA de cepas de *Aeromonas* aisladas en México". CGPI 200468 y "Estudio de cepas patógenas de *Aeromonas spp.* aisladas en México (resistencia antibiótica, métodos de identificación molecular, tipificación epidemiológica) CGPI 20030305 del Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México; FIS 90/044 y FIS 96/0579 del Ministerio de Salud Español; de CIRIT (SGR 1999/00103 y de la Fundación Ciencia i Salut, España.

Referencias

1. Janda JM. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En Sussman M, Editores. Molecular medical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology; 2001. p. 1237-1270.
2. Joseph SW, Carnahan AM. Update on the genus *Aeromonas*. ASM News 2000; 66: 218- 232.
3. Secretaría de Salud México. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2003; 19: 13-15.

4. Giono CS. Agentes bacterianos de infecciones gastrointestinales. En: S. Giono Cerezo; A. Escobar Gutiérrez y J.L. Valdespino Gómez, editores. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico. Secretaría de Salud. p.175-179.
5. Velasco ML, Cano PL, de Mateos O. Vigilancia de la infección por *Aeromonas* en España. Área de Vigilancia de la Salud pública de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III 1999; 41-44.
6. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editores. Manual of clinical microbiology. 7ª ed. Washington DC : American Society for Microbiology; 1999. p. 190-208.
7. Aparicio OG, Castro-Escarpulli G, Hernández JT. La biología molecular aplicada a la Bacteriología Médica. Bioquímica 1999; 24: 23-29.
8. Belkum van A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 547-560.
9. Altwegg, M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editores. Manual of clinical microbiology. 7ª ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 507-16.
10. Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Giono Cerezo S, Hernández-Rodríguez CH, Rodríguez Chacón M, Soler Falgás L, et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? Enf Infec y Microbiol 2002; 22: 206-216.
11. BioMérieux - Manual de entrenamiento del sistema de identificación microbiana Vitek. Marcy -l'Etoile France.
12. Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. Extended method for discrimination of *Aeromonas spp.* by 16S rDNA RFLP analysis. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50: 2069-73.
13. Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio OG, et al. Characterization of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. Int J Food Microbiol 2003; 84: 41-49.
14. Castro-Escarpulli G. Aplicación de técnicas moleculares en cepas de *Aeromonas* aisladas en México. Tesis doctoral- ENCB (IPN) 2002.
15. Aguilera Arreola MG. Caracterización de cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado congelado. Tesis de Licenciatura. México, D. F. ENCB (IPN); 2000.
16. Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Kellogg GH, Shimada T. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. J Clin Microbiol 1996; 34: 1930-3.
17. Kaznowski A. Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. J Appl Microbiol 1998; 84: 423-30.
18. Aquino-Santiago C, Lugo-de la Fuente G, Castañeda-Colín C, Guerrero ER, Cabañas-Cortés EM, Alba-Estrada SI. Programa de evaluación de la calidad de entre laboratorios XXVIII. Diez Evaluaciones de Calidad analítica en Bacteriología Médica. III. LAB-acta 2002; 14: 21-7.
19. Overman TL, Kessler JF, Seabolt JP. Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFE for identification of members of the family *Vibrionaceae*. J Clin Microbiol 1985; 22: 778-81.

20. Overman TL, Overley JK. Feasibility of same-day identification of members of the family *Vibrionaceae* by the API 20E system. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 715-7.
21. Abbott SL, Seli LS, Catino M Jr, Hartley MA, Janda JM. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1103-4.
22. Vivas J, Saa AI, Tinajas A, Barbeyto L, Rodríguez LA. Identification of motile *Aeromonas* strains with the Microscan Walkaway System in conjunction with the combo negative type 1S panels. *Appl Environ Microbiol* 2000;66: 1764-1766.
23. Castro-Escarpulli G, Aparicio Ozores G. *Aeromonas* y *Plesiomonas*. En José Tomás Hernández Méndez (Eds). *Bacteriología médica diagnóstica*. 2ª ed. México: Editorial Cuellar; 2003. p. 17-31.
24. Janda JM, Abbott S. Bacterial identification publication: when is enough enough?. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1887-91.

