

Bioquimia

Volumen **30**
Volume

Número **1**
Number

Enero-Marzo **2005**
January-March

Artículo:

Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México

Derechos reservados, Copyright © 2005:
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*

Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México

Lilia Tequianes-Bravo,* Dora Alicia Pérez-González,** María Magdalena González-Malvárez,** Maurilio Flores-Pimentel,** Rubén Marroquín-Segura**

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad aislar y caracterizar microorganismos mesofílicos del género *Aeromonas* en muestras obtenidas de la red de agua potable en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES) y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las cepas aisladas se caracterizaron bioquímicamente, además se determinó la presencia de productos extracelulares. De 70 muestras de agua potable se aislaron 37 cepas del género *Aeromonas* que representó el 58.8% de los muestreos realizados. Las especies de *Aeromonas* aisladas fueron: *A. hydrophila* 45.9%, *A. sobria* 18.9%, *A. caviae* 16.2%, *A. jandaei* 13.5%, *A. salmonicida* 2.7% y *A. veronii* 2.7%. La actividad de aerolisina se reportó en unidades 50% hemolíticas usando glóbulos rojos de rata, obteniendo para *A. hydrophila* 366.5 ± 48.0 , *A. caviae* 334.3 ± 114.5 , y *A. sobria* 261.9 ± 42.1 U. La producción de enterotoxina, evaluada por la cantidad de líquido infiltrado en los segmentos de prueba de ileon de conejo, fue más alta en *A. hydrophila* 3.25 ± 0.58 y *A. sobria* 2.65 ± 1.35 mL. Podemos concluir que, la alta frecuencia de *A. hydrophila* y la presencia de factores de virulencia en las cepas aisladas, sugieren que las aguas contaminadas con estos microorganismos tienen el riesgo potencial de producir infecciones en el humano.

Palabras clave: *Aeromonas*, aislamiento, fenotipo, aerolisina, enterotoxina.

ABSTRACT

The present work had as purpose to isolate and to characterize mesophilic members of the genus *Aeromonas* in 70 samples from municipal drinking water system supplies at Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES) and other dependences of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). *Aeromonas* strains isolated were characterized biochemically and looking for the presence of extracellular products. In the results, thirty seven strains of the genus *Aeromonas* were isolated, that represented 58.8% of the sampling realized. The percentages isolations of species of *Aeromonas* were: *A. hydrophila* 45.9%, *A. sobria* 18.9%, *A. caviae* 16.2%, *A. jandaei* 13.5%, *A. salmonicida* 2.7%, and *A. veronii* 2.7%. Aerolysin activity was reported in units of hemolysins causing 50% hemolysis to rat erythrocytes, media values of these units in each strain were: *A. hydrophila* 366.5 ± 48.0 , *A. caviae* 334.3 ± 114.5 , and *A. sobria* 261.9 ± 42.1 . The enterotoxin production was quantified by the amount of liquid infiltrated in segments of rabbit ileon, and it was higher in *A. hydrophila* 3.25 ± 0.58 and *A. sobria* 2.65 ± 1.35 mL. As conclusion, the high percentage of *A. hydrophila* and the presence of virulence factors in these strains, suggest that municipal drinking water system with these microorganisms have potential risk to produce infections in humans.

Key words: *Aeromonas*, isolation, phenotypic, aerolysin, enterotoxin.

* Laboratorio de Análisis Clínicos. Clínica Estado de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus I.

** Laboratorio de Microbiología e Inmunología L 313. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus II.

Correspondencia:

Dr. Rubén Marroquín Segura. Laboratorio de Microbiología e Inmunología L 313, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus II, Batalla 5 de Mayo s/n, Col. Ejército de Oriente, 09230, México D.F., Fax 015557736335. e-mail: msr@puma2.zaragoza.unam.mx

Recibido: 09-06-2004

Aceptado: 27-10-2004

INTRODUCCIÓN

Las *Aeromonas* son bacilos cortos de 0.3-1.0 μm de diámetro y 1.0-3.5 μm de largo, Gram negativos, parecidas a los miembros de las enterobacterias que presentan un flagelo polar, excepto *A. salmonicida* y *A. media*,¹ además, los cultivos jóvenes pueden formar flagelos peritricos en medios sólidos. Son aerobios facultativos y quimiorganotróficos, con metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo, su temperatura óptima de crecimiento es de 22° a 28° C; fermentan D-glucosa con producción de ácido y gas y otros carbohidratos como maltosa, D-galactosa y trehalosa, son positivas para las siguientes pruebas: oxidasa, catalasa, arginina hidrolasa, gelatinasa y DNAsa. Son negativas para: ornitina descarboxilasa, ureasa y fenilalanina desaminasa. Reducen nitratos y se diferencian de los vibriones porque son resistentes al agente vibrionostático 2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina (O/129) en concentraciones de 10 y 150 μg y porque no proliferan a concentraciones de NaCl al 6%.²

Las especies de *Aeromonas* se distinguen de las enterobacterias, por la reacción positiva a la oxidasa de las colonias obtenidas de placas de agar base sangre. También son patógenos primarios de muchos poiquilothermos, que incluyen anfibios, peces y reptiles, así como también animales de sangre caliente: aves, mamíferos acuáticos y terrestres.

En humanos son agentes etiológicos de diversas enfermedades, que en ocasiones pueden presentar hemorragia, osteomielitis, neumonía, septicemia y enfermedades ulcerativas.³ Se han descrito un total de 16 grupos de hibridación de *Aeromonas*, 11 asociadas a enfermedades en los humanos,^{3,4} siendo *A. hydrophila* la más importante por liberar muchas proteínas, algunas de las cuales han sido implicadas como factores de virulencia, entre éstos están: dos hemolisinas designadas como α y β (formalmente aerolisina o proteína citotóxica), una enterotoxina, proteasas, fosfolipasas, aciltransferasas y leucocidinas. Las dos principales enfermedades asociadas con *Aeromonas* son las gastroenteritis y la infección de las heridas (con o sin bacteremia).

Existen reportes de que alrededor del 3% de los individuos son portadores gastrointestinales, siendo esta situación más alta en los meses cálidos.^{4,5} Las gastroenteritis suelen ocurrir después de la ingestión de agua o de comida contaminada y la infección de las heridas se observa después de la exposición con agua contaminada. Las especies de *Aeromonas* tienen la capacidad de producir: a) infecciones sistémicas oportunistas en pacientes inmunodeprimidos y también

en personas que tienen enfermedades hepatobiliares o neoplasias primarias, b) enfermedades diarreicas en personas sanas, y c) infección de heridas.⁴ La infección gastrointestinal en niños suele ser una enfermedad aguda y grave, mientras que en los adultos se presenta como una diarrea crónica. La gastroenteritis grave producida por *Aeromonas* es parecida a la shigelosis, hay sangre y leucocitos presentes en las heces de los pacientes afectados. La diarrea aguda es un cuadro autolimitado, por lo que sólo está indicado el tratamiento de soporte. El tratamiento antimicrobiano es necesario en los pacientes con diarrea crónica o con infección sistémica. Son sensibles a gentamicina, trimetoprim/sulfametoxazol y cloramfenicol, resistentes a penicilina, eritromicina y a la mayoría de las cefalosporinas.⁴ Las diarreas provocadas por *Aeromonas spp.* son debidas frecuentemente a cepas toxigénicas las cuales pueden ser investigadas por diferentes pruebas *in vitro* (células adrenales Y-1 y células Vero) o *in vivo* (inoculación intragástrica en ratones lactantes y en asa ligada de íleon de conejo o rata). El mecanismo por el cual los enteropatógenos causan enfermedades diarreicas es por una adhesión al epitelio intestinal, colonización y secreción de toxinas.⁵

Aeromonas ha sido reconocido como un enteropatógeno en humanos y desde 1970 hay un mayor interés hacia la investigación de este género, por lo que en años recientes se han diagnosticado más enfermos con *Aeromonas* como agente etiológico responsable. El aislamiento de este enteropatógeno es relativamente nuevo, varía dependiendo del país donde se realice el estudio, encontrándose en Bangladesh un 33%, Filipinas 1-2%, Perú 30-50%, y aproximadamente un 10% en EUA y Japón.^{6,7}

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar microorganismos del género *Aeromonas* en muestras de agua potable de instalaciones de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM. En México existen pocos datos epidemiológicos de este género, por lo que es necesario caracterizarlo y conocer la frecuencia de estas bacterias y su riesgo potencial de producir enfermedades en usuarios de estas redes de agua potable.⁸

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue realizado con 70 muestras de agua potable tomadas de puntos fijos como son: grifos, filtros, tanques de almacenamiento y bombeo, de las siguientes dependencias: FES Zaragoza Campus I y Campus II, Clínicas multidisciplinarias: Aurora, Be-

nito Juárez, Reforma, Tamaulipas, Los Reyes, Estado de México y Zaragoza, CENDI Zaragoza y CCH Oriente. Semanalmente se acudió a dos de estos lugares, tomándose dos muestras en cada uno. Las cuatro muestras fueron procesadas dentro de las 2 horas siguientes al muestreo.

Muestreo

Para llevar a cabo el método de enriquecimiento se siguieron los lineamientos que indican Giono CS y col. (1991).⁹ Se tomaron aproximadamente 600 mL de agua en un matraz estéril de 1,000 mL. En matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de vaquelita, conteniendo 50 mL de agua peptonada alcalina 10X, se añadieron 450 mL de la muestra de agua y se incubaron a 37° C por 24 horas. Se tomó con un hisopo estéril una muestra de la superficie del agua contenida en el matraz, se sembró en agar sangre de carnero al 5% (Dibico, México) con ampicilina (30 µg/mL), depositando el hisopo en un tubo con 10 mL de agua peptonada alcalina 1X e incubando a 37° C por 24 h.¹⁰

Aislamiento

A partir del crecimiento en agua peptonada alcalina 1X se sembró una placa de agar TCBS (Merck, Alemania), e incubó a 37° C por 24 h. Del crecimiento de la placa de agar sangre de carnero al 5% (Dibico, México) con ampicilina, se seleccionaron y aislaron por estría cruzada aquellas colonias que presentaron α y/o β hemólisis en nuevas placas de agar sangre de carnero al 5% (Dibico, México) con ampicilina e incubaron a 37° C por 24 horas, realizando frotis y tinciones de Gram a las colonias aisladas.

Caracterización

Se llevó a cabo la caracterización bioquímica utilizando los siguientes métodos: presuntivo (factor de CAMP), método convencional y miniaturizado. Así mismo, se determinaron productos extracelulares como son lipasas, aerolisinas, enterotoxinas, proteasas (caseinasas y gelatinasas) y DNAsas.

A) Método presuntivo (factor de CAMP). Se llevó a cabo en placas de agar sangre de carnero al 5% (Dibico), haciendo una estría central con la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC125998 y estriás perpendiculares con las colonias aisladas. El procedimiento efectuado fue por duplicado para incubar unas placas en aerobiosis y otras en condiciones de anaero-

biosis a 37° C por 24 h. La cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 sirvió como testigo de la prueba de CAMP.

B) Método miniaturizado en microplaca. Se utilizaron microplacas Costar de 96 pozos estériles (Cambridge, Ma., EUA), para determinar la producción de ácido a partir de los carbohidratos: D-glucosa, lactosa, L-arabinosa, D-manosa, D-sorbitol, sacarosa, salicina, D-manitol y D-inositol. Los carbohidratos se prepararon al 0.5% en caldo rojo de fenol esterilizados por filtración (Filtros de 0.22µ, Millipore, EUA), colocando en cada pozo 90 µL del medio, e inoculando con 10 µL de una suspensión de los aislamientos de las bacterias a probar, crecidas en caldo Müeller Hinton (Merck, Alemania) y ajustadas a 1.5X10⁸ células/mL; la cepa testigo fue *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 y las placas se incubaron a 37° C por 24 horas.

C) Método convencional según el Criterio de Abbott³. Para la identificación fenotípica se utilizaron los siguientes medios de cultivo: medio semisólido (movilidad-indol-ornitina) [MIO] (Bioxon, México), caldo rojo de metilio-Voges Proskauer [MRVP] (Bioxon, México), agar lisina-indol-arginina [LIA] (Bioxon, México), agar hierro triple azúcar [TSI] (Bioxon, México), agar citrato de Simmons (Bioxon, México), medio basal OF (BBL, EUA), medio basal de Moeller (Difco, México) con los aminoácidos L-arginina y L-ornitina, agar Müeller Hinton (Merck, Alemania) con concentraciones de NaCl al 0.3 y 6%.

D) Pruebas especiales. Para la prueba de oxidasa se utilizaron bacterias procedentes del cultivo de LIA o a partir de las colonias del medio de agar base sangre de carnero al 5% (Dibico, México). Para la determinación de desoxirribonucleasas se utilizó el medio agar DNAsa (Becton Dickinson BBL, EUA), para lipasas se empleó agar yema de huevo (base agar soya tripticaseína, Bioxon, México), y para proteasas se identificaron caseinasas en agar leche descremada al 10% (agar bacteriológico, Bioxon, México) y gelatinasas en gelatina bacteriológica (Bioxon, México).

Cada uno de los cultivos caracterizados de *Aeromonas* se sembraron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de caldo infusión cerebro-corazón [BHI] (Dibico, México) e incubaron a 22° C con agitación de 150 rpm por 19 h. El centrifugado del medio anterior (10,000 rpm) fue durante una hora y los sobrenadantes filtrados (filtros de 0.22 µm, Millipore, EUA) para determinar actividad de aerolisina y de enterotoxina.

Actividad de aerolisina

La actividad de aerolisina se realizó mediante la técnica de hemólisis al 50%,^{11,12} a partir de tres diluciones de los sobrenadantes 1:25, 1:50 y 1:100 usando un amortiguador de salina trietanolamina (TBS) (Baker, México), y colocados en 4 volúmenes para cada dilución: 0.5 mL, 0.35 mL, 0.25 mL y 0.15 mL; se incluyó un testigo negativo con glóbulos rojos y TBS y un testigo positivo de glóbulos rojos lisados con agua destilada. Para el ensayo de hemólisis a 37° C por 30 minutos se usó una suspensión al 1% de glóbulos rojos de rata (0.3 mL de la suspensión más 1.7 mL de agua destilada) ajustando la lectura a 0.5 de densidad óptica a 550 nm (espectrofotómetro UV/VIS Jenway 6305, Princeton, NJ, EUA). Los porcentajes de hemólisis de las muestras fueron calculados en función del testigo positivo que correspondió al 100% de hemólisis, y éstos se graficaron en hojas log/probitas, interpolándose los valores del 50% de hemólisis y calculando las unidades 50% hemolíticas en el medio filtrado sin diluir.

Ensayo de enterotoxina

Se siguió el método de Ljungh¹³ utilizando conejos Nueva Zelanda blancos con peso de 2 – 2.5 kg, sometidos previamente a un ayuno de 18 h y anestesiados con pentobarbital sódico (anestésico 6.3 g/100 mL, Pfizer, México) a dosis de 1 mL por cada 2.5 kg de peso por vía intravenosa, realizando asepsia de pared abdominal y mediante incisión se extrajo intestino delgado para localizar ileon, el cual fue ligado en cinco segmentos de 8 cm de largo, los segmentos elegidos fueron inoculados, con jeringa aguja calibre 26, con 1 mL de los caldos de cultivos positivos esterilizados previamente por filtración, dejando un segmento sin inocular entre cada muestra. Como testigo de la prueba se inyectó 1 mL de medio de cultivo estéril, y el animal fue suturado en dos planos. Se sacrificó al conejo después de 18 h, aplicando 2 mL/2.5 kg de peso de pentobarbital sódico (anestésico 6.3 g/100 mL, Pfizer, México). Se sacó el intestino delgado, se localizaron las asas ligadas y el líquido acumulado de cada segmento se midió en tubos cónicos graduados.

Obtención de aerolisina

De una cepa aislada y caracterizada bioquímicamente de *Aeromonas hydrophila* y con ensayos positivos de producción de hemolisina, se centrifugó y purificó de acuerdo a los métodos de Asao, 1986¹² y Bernheimer,

1974.¹⁴ La cepa de *Aeromonas hydrophila* se sembró en 200 mL de caldo BHI (Dibico, México) e incubó a 22° C con agitación de 1,500 rpm durante 19 h. El sobrenadante separado de la biomasa por centrifugación a 10,000 rpm por una hora, se esterilizó por filtración usando vacío en un filtro Nalge, de 0.22 µm (Nalgene Sybron), adicionando sulfato de amonio (JT Baker, EUA) en una relación de 336 g/600 mL, y mezclando bien con agitación constante durante toda la noche en refrigeración. La mezcla fue centrifugada a 6,000 rpm por 30 min, y el precipitado disuelto en 7.5 mL de borato de sodio 0.3 M y centrifugado a 6,000 rpm por 20 min, el sobrenadante se desechó y el precipitado fue disuelto una vez más en 4 mL de borato de sodio 0.3 M, procediendo a centrifugar, encontrándose en el sobrenadante la aerolisina. Nota (en la primera disolución del precipitado con 7.5 mL del borato de sodio, la aerolisina no se disuelve quizás debido al exceso de sulfato de amonio presente en el precipitado y es hasta el segundo volumen adicionado donde se solubiliza). La muestra fue separada a través de una columna calibrada de Sephadex G100-50 (Pharmacia, EUA) y el tubo donde se encontró la actividad biológica de hemolisina fue aplicado en un gel de poliacrilamida (gel empacador al 5% y un gel separador al 12%, se incluyeron marcadores de peso molecular preteñidos 16.5 a 175 kDa (Biolabs, EUA).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través de estadística descriptiva utilizando el paquete estadístico SPSS V.10.0 (SPSS Inc. Michigan, IL, EUA), reportándose frecuencias, porcentajes y promedios ± error estándar (EE).¹⁵

RESULTADOS

Los resultados mostraron que de 70 muestras de agua, se obtuvieron 37 aislamientos del género *Aeromonas* lo que representó el 58.8% de los muestreos realizados. Como se observa en el cuadro I, las especies de *Aeromonas* con mayor frecuencia fueron: *A. hydrophila* 45.9%, *A. sobria* 18.9% y *A. caviae* 16.2%. En el cuadro II se muestran los promedios de las actividades de aerolisinas dadas en unidades 50% de hemólisis, en donde se observa que *A. jandaei* no mostró actividad. La actividad de enterotoxinas en las diferentes cepas fue reportada como la acumulación de líquido intestinal medido en mililitros como se puede ver en el cuadro III, observándose que las cepas con mayor actividad fueron *A. hydrophila* que ge-

Cuadro I. Porcentaje de aislamientos de cepas de *Aeromonas* en 70 muestras de agua potable analizadas.

Cepas	Porcentaje de aislamientos	
<i>A. hydrophila</i>	17/37	(45.9%)
<i>A. sobria</i>	7/37	(18.9%)
<i>A. caviae</i>	6/37	(16.2%)
<i>A. jandaei</i>	5/37	(13.5%)
<i>A. veronii veronii</i>	1/37	(2.7%)
<i>A. salmonicida</i>	1/37	(2.7%)

Cuadro II. Unidades 50% hemolíticas de aerolisina de las cepas de *Aeromonas* aisladas.

Cepa	Promedio \pm EE*	Porcentaje de cepas con actividad
<i>A. hydrophila</i>	366.5 \pm 48.0	9/10 (90%)
<i>A. caviae</i>	334.3 \pm 114.5	2/2 (100%)
<i>A. sobria</i>	261.9 \pm 42.1	2/2 (100%)
<i>A. jandaei</i>	no mostró actividad	0/1 (0%)

*EE = error estándar.

La actividad de la aerolisina se determinó en los cultivos filtrados de *Aeromonas*, utilizándose para el ensayo glóbulos rojos de rata.

Cuadro III. Actividad de enterotoxina de las cepas de *Aeromonas* aisladas.

Cepa	Promedio \pm EE*	Porcentaje de cepas con actividad
<i>A. hydrophila</i>	3.25 \pm 0.58	9/10 (90%)
<i>A. sobria</i>	2.65 \pm 1.35	2/2 (100%)
<i>A. caviae</i>	1.1 \pm 0.5	2/2 (100%)
<i>A. jandaei</i>	2.5	1/1 (100%)

*EE = error estándar.

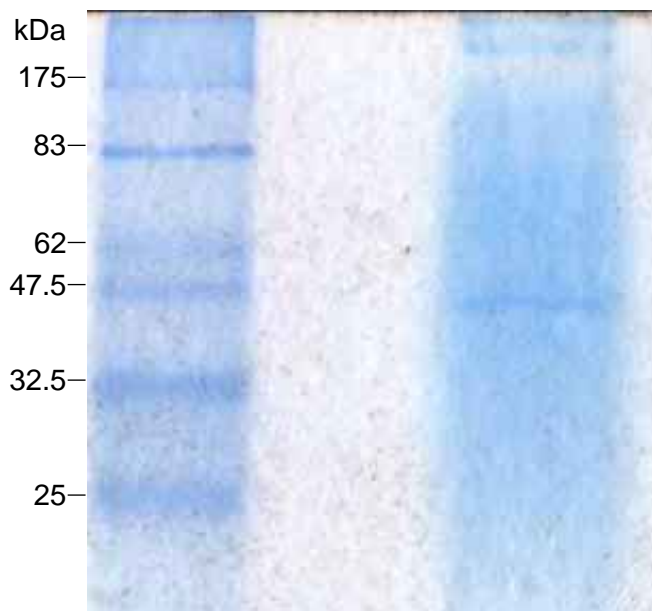
La actividad de la enterotoxina está reportada en mililitros de líquido infiltrado en los segmentos de ileon de conejo

neraron un promedio de 3.25 \pm 0.58 mL. Los valores fueron corregidos restando a todos los volúmenes de las muestras de cultivos de *Aeromonas*, la acumulación de líquido generado por el testigo del ensayo.

La figura 1 muestra que la actividad hemolítica de una cepa de *A. hydrophila* está dada por una proteína que tiene un peso molecular aproximado de 47 kDa y que corresponde al peso molecular reportado para la aerolisina.^{14,16}

DISCUSIÓN

El género *Aeromonas* es frecuentemente aislado de sistemas de agua potable municipal, diversos estudios



Electroforesis en gel de poliacrilamida con gel concentrador al 5% y gel separador al 12%. El carril de la izquierda corresponde a los marcadores de peso molecular y el de la derecha corresponde a la muestra de la aerolisina purificada.

Figura 1. Electroforesis de aerolisina purificada de *A. hydrophila*.

lo han mostrado anteriormente. En el Reino Unido, en los sistemas de distribución de agua potable en Londres y Essex en 1985, se reportó un porcentaje de aislamiento de *A. hydrophila* de 25% en agua potable clorada en verano y de 7% en invierno, mientras que el análisis en aguas no tratadas las tasas de aislamiento subieron al 82% en verano y 75% en invierno.¹⁷ Knochel y Jeppensen¹⁸ (1990), en Dinamarca reportan el 28% de muestras positivas para *Aeromonas*, representando *A. hydrophila* el 97% de los aislamientos. Ghanem y cols.¹⁹ (1993) en el Cairo, aislaron 90% de *Aeromonas*; Krovacek y cols.²⁰ (1992) en Suecia reportaron un 85% de aislamiento de las muestras para *Aeromonas* y *A. hydrophila* representó el 67% del total de los aislamientos, el resto fue para *A. sobria*. En nuestro estudio encontramos que de 70 muestreos realizados se aislaron 37 cepas del género *Aeromonas*, lo que correspondió al 58.8% y que de estos aislamientos *A. hydrophila* representó el 45.9% y *A. sobria* 18.9%, estos resultados son similares a los reportados por Krovacek en Suecia,²⁰ en donde el porcentaje más alto lo muestra *A. hydrophila*.

El significado en la salud pública de detectar *Aeromonas* mesofílicas en el suministro de agua potable

no está bien entendido, ya que el establecer la aparición de un brote de *Aeromonas* en el agua potable y la asociación epidemiológica es difícil; sin embargo un estudio de Burke y cols.²¹ (1984) en Holanda reportaron un aislamiento elevado de *Aeromonas* en el agua potable que coincidió con un aumento en el número de casos de diarrea en la población.

Algunas cepas de *Aeromonas* poseen un rango amplio de factores de virulencia (enterotoxinas, citotoxinas, aerolisinas), por lo que tienen una alta capacidad invasiva.²² Estos factores se expresan tanto en cepas aisladas de agua como de muestras clínicas.²³ En la literatura hay informes sobre cepas enterotoxigénicas de *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*.^{19,24} Otros autores como Millership y cols.²⁵ (1986) encontraron que el 28% de las *Aeromonas* aisladas fueron citotóxicas y el 83% de las cepas de *A. hydrophila* mostraron citotoxicidad, además de una cepa de *A. sobria*. En el mismo estudio se encontró a *A. caviae* en el 50% de los aislamientos, aunque no mostró citotoxicidad. Por su parte, Holmes y cols.²⁶ (1995) encontraron que el 20% de las *Aeromonas* aisladas mostraron enteropatogenicidad y de esos aislamientos el 75% correspondió a *A. hydrophila*, 14% *A. sobria* y 9% *A. caviae*. Así mismo, Burke y cols.²⁹ (1984) reportaron que el 61% de las *Aeromonas* aisladas de la red de agua potable no clorada en Australia fueron enteropatogénicas y el 64% produjo aerolisina. Krovacek y cols.²⁰ (1992) en un estudio en la red de agua potable en Suecia reportaron que el 100% de las cepas de *A. hydrophila* y el 70% de las cepas de *A. sobria* fueron hemolíticas; pero menos del 30% de las cepas mostró actividad de enteropatogenicidad. Los hallazgos reportaron que el 90% de las cepas de *A. hydrophila* tienen actividad de aerolisina y enterotoxina y éstas mostraron los títulos más altos de todas las cepas. En este trabajo observamos que todas las *Aeromonas* aisladas mostraron diferentes grados de hemólisis, excepto *A. jandaei* que no tuvo actividad hemolítica; pero sí actividad de enterotoxina. El título de aerolisina reportado es alto y se debe a que para el ensayo se utilizaron glóbulos rojos de rata que son los más sensibles a la acción de la aerolisina.²⁸ En este sentido, está reportado que las lipasas, como la glicerofosfolípido:colesterol aciltransferasa (GCAT) producidas por las *Aeromonas* tienen la capacidad de digerir las membranas plasmáticas y causar hemólisis de los eritrocitos, que pudieran confundirse con la hemólisis producida por las aerolisinas, como ocurre con muchas cepas de *A. salmonicida* que producen lipasas con actividad hemolítica débil, pero no aerolisina activa, en medios de cultivo.²⁹ Para establecer si la lisis observada en las cepas aisladas estaba mediada por aereo-

lisinas, purificamos una aerolisina de una cepa aislada de *A. hydrophila*, en la que previamente evaluamos su capacidad hemolítica. La actividad de esta toxina se encontró alrededor de los 47 kDa que es el peso molecular descrito para la aerolisina activada,^{14,16} con lo cual podemos decir que la lisis reportada, cuando menos en esa cepa, correspondió a la actividad de una aerolisina y los títulos altos reportados como actividad hemolítica en las cepas estudiadas, lo que nos sugieren que estamos determinando con el ensayo hemolítico la presencia de aerolisinas, ya que las lipasas dan generalmente hemólisis con títulos débiles. El aislamiento de *Aeromonas* con capacidad de producir factores de virulencia en la red de agua potable que abastece a la FES Zaragoza, Clínicas multidisciplinarias, CCH Oriente y CENDI Zaragoza, nos indica que su presencia pudiera provocar cuadros diarreicos, por lo que sería interesante realizar un estudio epidemiológico en la búsqueda de *Aeromonas* en muestras clínicas de la población afectada.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Graciela Castro Escarpulli y a la M. en C. María Guadalupe Aguilera Arreola, del Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, la asesoría en la identificación fenotípica de los aislamientos de las cepas de *Aeromonas*.

REFERENCIAS

1. Castro EG, Aguilera AMG, Giono CS, Hernández RCH, Rodríguez ChM, Soler FL, et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enf Infect Micro* 2002; 22: 206-216.
2. Holt JG, Krieg NR, Sneath Peter HA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9ª ed. Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 1994: 190-192, 254-256.
3. Janda JM, Abbot SL. *Human pathogens*. In: Austin B, Alwegg M. editors. The genus *Aeromonas*. England: Wiley; 1996: 151-173.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashy GS, Pfaller MA. *Microbiología Médica*. 4ª ed. Madrid: Elsevier Science Mosby; 2002.
5. Pettibone G. Population's dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. *J Appl Microbiol* 1998; 85: 723-730.
6. Chaudhury A, Nath G, Shukla BN. Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolated. *J Med Microbiol* 1996; 44: 434-437.
7. Kühn I, Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alasbi SA, Islam SM, et al. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *Clin Microbiol* 1977; 29: 369-373.

8. Castro EG, Aguilera AMG, Hernández RCh, Arteaga GRI, Carmona MAA, Pérez VA, et al. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímica* 2003; 28:11-18.
9. Giono CS, Gutiérrez CL, Hinojosa AAM. *Manual de procedimiento y caracterización de Vibrio cholerae* O1. México: INDRE S.S.; 1991: 16-19.
10. Hanninen M, Siitonen A. Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiol Infect* 1995; 115: 39-50.
11. Kozaki S, Kato K, Asao T, Kamata Y, Sakaguchi G. Activities of *Aeromonas hydrophila* hemolysins and their interaction with erythrocyte membranes. *Infect Immune* 1987; 55: 1594-1599.
12. Asao T, Kozaki S, Kato K, Konishita Y, Otsu K, Uem T, et al. Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* haemolysin. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 228-232.
13. Ljungh A, Kronevi T. *Aeromonas hydrophila* toxins-intestinal fluid accumulation and mucosal injury in animal models. *Toxicon* 1982; 20: 397-407.
14. Bernheimer AW, Avigad LS. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1974; 9: 1016-1021.
15. Salkind NJ, Akey TM. Using SPSS for windows. *Analysing and understanding data*. New Jersey: Prentice-Hall; 2001.
16. Howard P, Macintyre S, Buckley JT. *Toxins*. In: Austin B, Alwegg M. Editors. The genus *Aeromonas*. England: Wiley; 1996: 267-286.
17. Millership SE, Chattopadhyay B. *Aeromonas hydrophila* in chlorinated water supplies. *J Hosp Infect* 1985; 6: 75-80.
18. Knochel S, Jeppesen C. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. *J Food Microbiol* 1990; 10: 317-322.
19. Ghanem EH, Mussa ME, Eraki HM. *Aeromonas* associated gastro-enteritis in Egypt. *Zentralbl Mikrobiol* 1993; 148: 441-447.
20. Krovacek K, Faris A, Baloda SB, Lindberg T, Peterz M, Mansson I. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* ssp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol* 1992; 9: 215-222.
21. Burke V, Robinson J, Gracey M, Peterson D, Partridge K. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48: 361-366.
22. Kirov SM. The public health significance of *Aeromonas* ssp. in foods. *Int J food Microbiol* 1993; 20: 179-198.
23. Cahill MM. Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *J Appl Bacteriol* 1990; 69: 1-16.
24. Deodhar LP, Saraswathi K, Vardukar A. *Aeromonas* ssp. and their association with human diarrheal disease. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 853-856.
25. Millership SF, Barer MR, Tabaqchali S. Toxin production by *Aeromonas* ssp. From different sources. *Med Microbiol* 1986; 22: 311-314.
26. Holmes P, Niccolls LN. *Aeromonas* in drinking water supplies-their occurrence and significance. *J Chartered Inst Water Environ Manage* 1995; 5: 464-469.
27. Burke V, Robinson J, Gracey M, Peterson D, Meyer N, Haley V. Isolation of *Aeromonas* ssp. from an unchlorinated domestic water supply. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48: 367-370.
28. Bernheimer AW, Avigad LS, Avigad G. Interaction between aerolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes. *Infect Immun* 1975; 11: 1312-1319.
29. Lee KK, Ellis AE. Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolisaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J Bacteriol* 1990; 172: 5382-5393.

