

Identificación genética de cepas de *Aeromonas* spp aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría

Cecilia Hernández-Cortez*

Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola**

Yamilet Chávez-Méndez***

Patricia Arzate-Barbosa****

Antonino Lara-Hernández¹Graciela Castro-Escarpulli²

* Maestría en Ciencias. Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

** Doctora en Ciencias. Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

, * Química Fármaco-Biológa. Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Análisis Clínicos, Instituto Nacional de Pediatría.

¹ Químico farmacobiólogo. Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Análisis Clínicos, Instituto Nacional de Pediatría.

² Doctora en Ciencias. Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia**Dra. en C. Graciela Castro-Escarpulli**

Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n,

colonia Santo Tomás, México 11340, DF

Correo electrónico: chelacastro@hotmail.com

Este artículo debe citarse como: Hernández-Cortez C, Aguilera-Arreola MG, Chávez-Méndez Y, Arzate-Barbosa P. Identificación genética de cepas de *Aeromonas* spp. aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría 2011;24:157-165

www.nietoeditores.com.mx**RESUMEN**

Antecedentes: las especies del género *Aeromonas* provocan infecciones intestinales y extraintestinales en el ser humano. Los métodos de identificación fenotípica no siempre permiten identificarlas correctamente.

Objetivo: identificar genéticamente un grupo de cepas de *Aeromonas* spp aisladas principalmente de niños con infecciones intestinales y extraintestinales.

Material y método: se aislaron, e identificaron previamente, en el Instituto Nacional de Pediatría 69 cepas con el sistema MicroScan Walk Away 96(W/A 96). Las 69 cepas se reidentificaron con el método del RFLP-PCR del gen 16S rDNA.

Resultados: se encontró un porcentaje de correlación muy pobre entre ambos métodos (28.9%). *Aeromonas caviae* fue la especie más aislada. La menor correlación entre el método fenotípico y genotípico se dio al identificar a *A caviae* como *Aeromonas hydrophila* con el sistema MicroScan W/A 96.

Conclusiones: los resultados obtenidos evidencian la necesidad de utilizar el método genético para reconocer la identidad de las especies que enferman a la población mexicana y así aportar datos claros de la epidemiología del género.

Palabras clave: *Aeromonas*, fenotípica, genotípica, identificación, infecciones intestinales y extraintestinales.

ABSTRACT

Background: *Aeromonas* species cause intestinal and extraintestinal infections in humans. Phenotypic methods do not always allow to identify them correctly.

Objective: To identify a group of genetically engineered strains of *Aeromonas* spp. isolated mainly from children with intestinal and extraintestinal infections.

Material and methods: The 69 strains of this study were previously isolated and identified in the National Institute of Pediatrics for the MicroScan Walk Away system 96 (W/A 96). The 69 strains were re-identified using the method of RFLP-PCR of 16S rDNA gen.

Results: There was found a very poor correlation percent between both methods (28.9%). *Aeromonas caviae* was the most isolated. The lower correlation between phenotypic and genotypic method was to identify *A. caviae* and *Aeromonas hydrophila* with the system MicroScan W/A 96.

Conclusions: The results show the need to use the genetic approach to recognize the identity of species that cause diseases in the Mexican population and thus provide clear data on the epidemiology of this genus.

Key words: *Aeromonas*, phenotypic, genotypic identification, and extra-intestinal infections.

Aeromonas es una bacteria oportunista que se aísla como la causa de diversos procesos infecciosos: septicemia, enfermedades pancreáticas o hepatobiliares, peritonitis, colangitis, infecciones nosocomiales, osteomielitis y síndrome urémico hemolítico, entre los más relevantes.^{1,2,3} *Aeromonas* es, además, principalmente un patógeno entérico que afecta con mayor frecuencia a niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos.²

Desde la primera descripción taxonómica, la cantidad de especies de *Aeromonas* se ha incrementado de 4 (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas salmonicida*) a 19, lo que ha complicado su clasificación.^{4,5} Existen serios problemas para la identificación de las especies actualmente descritas, debido a la pobre correlación existente entre las fenopecies que se obtienen mediante pruebas bioquímicas y las genoespecies que se definen con base en estudios de hibridación DNA-DNA. No se han propuesto características fiables de fácil aplicación para distinguir y delimitar a todas las especies del género.⁶ Sólo diez genoespecies de *Aeromonas*, una con dos biovariedades, son patógenas para el ser humano en virtud de su aislamiento en cultivo puro de diversas infecciones y de la gran cantidad de factores putativos de virulencia que portan las cepas. Por esto surge la necesidad de realizar la correcta identificación hasta especie, y establecer cuál es la incidencia real de las especies patógenas y los diferentes cuadros clínicos que producen.

La mayor parte de los laboratorios clínicos utiliza para la identificación del género:

- 1) métodos miniaturizados semiautomáticos como el API20E (20E; Analytab Products, Plainview, Nueva York), el Vitek (bioMérieux Vitek, Hazelwood, Mo.), el BBL[®] Crystal E/NF (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), el MicroScan W/A 96 (Siemens Health Diagnostics, West Sacramento California) por ser relativamente rápidos
- 2) otras pruebas bioquímicas descritas en manuales de

microbiología poco actualizados para la identificación de las especies de *Aeromonas*

La identificación del género *Aeromonas* se realiza con seis pruebas. Sin embargo, la identificación de alguna de las 10 especies de importancia clínica, incluidas las tres más frecuentes, no puede lograrse con pruebas bioquímicas debido a la amplia diversidad fenotípica y por la existencia de cepas atípicas. Las cepas atípicas frecuentemente se aíslan a partir de muestras ambientales y su identificación exacta también es problemática.

Por esta razón se ha recurrido a distintos métodos moleculares para diferenciar a nivel de especie a este género. Entre los métodos más utilizados está la hibridación DNA-DNA; sin embargo, dado que es un método lento, laborioso, costoso y, por lo tanto impráctico, a la luz de los avances de la amplificación y secuenciación del DNA, algunos autores han optado por usar otras técnicas como método de identificación único o complementario a la identificación genética.⁷ El uso de estas metodologías debe aplicarse con el fin de poder describir la epidemiología del género.

Sin embargo, hace más de una década se describió un protocolo basado en los patrones del RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del amplicón del gen 16S rDNA que permitió la identificación y diferenciación de 11 especies de *Aeromonas* utilizando cuatro endonucleasas: AluI, MboI, NarI y HaeIII.⁸ Para el año 2000, Figueras y colaboradores agregaron dos enzimas a este protocolo, PstI y AlwNI, para la identificación de 14 de las 17 especies descritas en el género hasta ese año. La aplicación rutinaria de este protocolo reveló que algunas cepas tienen patrones de RFLP atípicos y distintos a los descritos para las cepas tipo de las diferentes especies del género.⁹ En estos casos es necesaria la secuenciación del gen 16S rDNA, que permite establecer la identidad de la cepa y conocer si las secuencias de este gen tienen microheterogenei-

dades; es decir, si tienen nucleótidos diferentes en una misma posición en las distintas copias del gen existentes en el genoma.¹⁰ Este ensamblaje metodológico es el más usado y el que brinda mejores resultados.

Por tanto, este trabajo consistió en la identificación de aislados de origen clínico mediante métodos moleculares para conocer cuáles son, en realidad, las especies que se aíslan en la población de este nosocomio.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

Se trabajaron 69 cepas de *Aeromonas* spp aisladas e identificadas fenotípicamente por el sistema MicroScan Walk Away 96 (Siemens Health Diagnostics Inc, West Sacramento California) provenientes del Instituto Nacional de Pediatría. En el **Cuadro 1** se muestra el origen de las cepas.

Identificación genética

Se realizó con base en el protocolo del análisis de los patrones RFLPs del gen 16S rDNA propuesto por Borrel y colaboradores (1997) y Figueras y su grupo (2000).

Extracción del DNA genómico

Las cepas seleccionadas se sembraron en agar de soya triplicada (TSA, OXOID) y se incubaron durante 18 horas a 37°C. La extracción del DNA bacteriano se realizó mediante la matriz de purificación InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Richmond California), con las indicaciones del fabricante. La concentración y pureza del DNA genómico de cada una de las cepas se evaluó espectrofotométricamente empleando un cuantificador AQ-07 Nucleic Acid Photometer.

Amplificación mediante PCR del gen 16S rDNA

La amplificación del gen 16S rDNA se realizó en un termociclador BIOMETRA (modelo T-Gradient, Alemania) con un volumen final de mezcla de reacción de 50 µL. La mezcla de reacción contenía 200 ng del DNA genómico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.3 µM de desoxirribonucleótidos trifosfato dNTP's (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.3 µM de cada uno de los iniciadores Anti 1 (5' AGA GTT TGA TCA TGG CTC A 3') y S (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad California). Las condicio-

Cuadro 1. Características de las cepas de trabajo.

Especie de <i>Aeromonas</i> *	Número de cepas	Origen intestinal	Origen extraintestinal			Intervalo de edad de los pacientes
			Total	Número de cepas	Muestra	
<i>A. hydrophila</i>	42	35	7	1	Líquido peritoneal	Recién nacido-30 años
				1	Urocultivo	
				5	Hemocultivo	
<i>A. caviae</i>	13	10	3	1	Urocultivo	3 meses-12 años
				1	Líquido de diálisis	
				1	Hemocultivo	
<i>A. sobria</i>	12	10	2	1	Hemocultivo	1 año-35 años
				1	Secuela de escara de pie izquierdo	
<i>A. veronii</i>	2	2	0	-----	-----	1 año-8 años
Total	69	57	12			

*Identificadas fenotípicamente.

nes para cada ciclo de reacción fueron: desnaturación inicial a 96°C durante cinco minutos, 35 ciclos que consistieron en desnaturación a 94°C durante un minuto, alineamiento de los iniciadores a 56°C durante un minuto, extensión a 72°C durante 1.30 minutos, y al finalizar, una extensión a 72°C durante cinco minutos.

Los productos amplificados (1,502 pb) se analizaron con electroforesis en geles de agarosa al 1% (Ultrapure agarose Invitrogen Life Technologies, Carlsbad California) disuelta en una solución reguladora TAE 1X (trisma base 2M-ácido acético-EDTA 0.5 M), a un voltaje de 60 V/cm durante 60 minutos. Despues del corrimiento electroforético los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Se analizaron en un documentador de geles con luz ultravioleta, y se fotografiaron con la cámara Eagle Eye Stratagene (Frameintegrator, California EEUU). Se corrió en paralelo 1 µg/µL del marcador de talla molecular ladder 100 pb (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad California).

Restricción de los fragmentos polimórficos del gen 16S rDNA

Previo a la digestión se procedió a la limpieza del producto amplificado con el sistema Pure Link PCR Purification System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad California), con las indicaciones del fabricante. El producto resultante de la limpieza se sometió a la digestión enzimática doble, se preparó una mezcla que contenía 12 µL del fragmento amplificado, 1 µL del regulador de digestión (10X), 10 U/µL de cada enzima AluI y MboI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad California), y se llevó hasta un volumen final de 20 µL con agua. Posteriormente, la mezcla se incubó a 37°C. Los productos de la restricción se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories, Richmond California) a 17%, a un voltaje de 300 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Al término del tiempo se analizaron en un documentador de geles con luz ultravioleta, y se fotografiaron con la cámara Eagle Eye Stratagene (Frameintegrator, California EUA). En todos los geles se corrió en paralelo el marcador de talla molecular Marker V de 8 a 587 pb (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA).

Determinación de especie por comparación de los perfiles electroforéticos

Los patrones obtenidos de los RFLP-PCR del gen 16S rDNA se compararon con los patrones descritos para las cepas de referencia de cada una de las especies del género *Aeromonas*, asignándose así la identidad correspondiente.

RESULTADOS

Distribución de las cepas de *Aeromonas* de origen clínico con base en su identificación fenotípica.

Mediante el sistema automatizado MicroScan W/A 96 se identificaron, hasta el nivel de especie, las 69 cepas del género *Aeromonas* aisladas de muestras clínicas. La mayor parte de las cepas se identificó por este método como: *A. hydrophila* con 60.9% (n=42), seguida de *A. caviae* con 18.8% (n=13), *A. sobria* con 17.4% (n=12) y *A. veronii* con 2.9% (n=2).

El patrón de distribución de las especies con base en el tipo de muestras se desglosa en el Cuadro 1.

Identificación genética de las cepas de *Aeromonas*

Extracción del DNA. En la Figura 1a se observa el corrimiento electroforético del DNA genómico de ocho de las cepas problema. La concentración y pureza del DNA genómico obtenido por la técnica de InstaGene Matrix fueron satisfactorias, por lo que se procedió a la amplificación del gen 16S rDNA.

Amplificación y purificación del gen 16S rDNA. La Figura 1b muestra el electroferograma obtenido del amplificación de 1502 pb correspondiente a la amplificación del gen 16S rDNA de algunas cepas problema. La amplificación se realizó en las 69 cepas.

Digestión enzimática doble (AluI y MboI). La digestión de los amplicones del gen 16S rDNA (RFLP's 16S rDNA) reveló que sólo 66 de las 69 cepas ensayadas pertenecen al género *Aeromonas* en virtud de que éstas tenían patrones de RFLP similares a los reportados para las cepas tipo del género. Así, 51 de las 69 cepas tuvieron un patrón especie-específico correspondiente a: 39 cepas a *A. caviae* y 12 cepas a *A. hydrophila*. En la Figura 1c se observa un ejemplo del patrón especie-específico para 13 cepas.

En 2 de las 69 cepas se encontró un patrón común, por lo que fue necesario aplicar el método extendido de digestión. Se realizó una digestión con la enzima NarI y en la cepa 380264 se obtuvo un patrón *A. bestiarum/A. salmonicida* (bandas 1050 y 452 pb; **Figura 2a**), por lo que fue necesario realizar una segunda digestión con la enzima PstI que mostró un patrón especie-específico característico de la especie *A. bestiarum* (bandas 1005 y 497 pb; **Figura 2a**). La cepa 439732 no mostró digestión con la enzima NarI, lo cual según Figueras, es compatible para *Aeromonas HG11/A. encheleia/A. popoffii* (banda de 1502 pb; **Figura 2b**), por lo que se continuó con la digestión ahora con la enzima HaeIII encontrándose un patrón común de *A. encheleia/A. popoffii* (bandas 317, 220, 204, 171, 168 pb; **Figura 2b**). Para discernir entre estas últimas dos especies fue necesario digerir con AlwNI y así lograr determinar la identidad. El resultado fue un patrón compatible con *A. encheleia* (bandas 1044, 458 pb; Figura 2b).

Por comparación con los patrones electroforéticos con las cepas tipo y de referencia de especies pertenecientes a géneros afines, las 16 cepas (23.1%) restantes mostraron patrones electroforéticos diferentes a los esperados;

3 cepas mostraban patrones de *Vibrio* y las 13 cepas restantes mostraron un único patrón atípico GH2/GH3 con dos bandas extras (atípicas en el género) de 180 pb y 158 pb. En dichas cepas (n=13) fue necesaria la secuenciación del amplicón de 1502 pb del gen *16S rDNA* para así determinar su identidad.

Secuenciación del gen *16S rDNA*. Los análisis de la secuenciación se realizaron en cuatro amplicones de las 13 cepas con el patrón atípico. La señal de secuenciación de los amplicones osciló entre 433-839 nucleótidos y se tomaron en consideración para el análisis los primeros 300 de los extremos del amplificado.

Análisis de datos de los productos secuenciados. Con el propósito de comparar las secuencias obtenidas y conocer la identidad de las cepas con los patrones atípicos, se realizó un alineamiento mediante la plataforma de BLAST del NCBI.¹¹ Se confirmó que la secuencia de las 13 cepas pertenecía a *Aeromonas salmonicida*. El análisis del valor de expectación y el porcentaje de similitud fue significativo para confirmar la identidad de las cepas (datos no mostrados).

Identidad genética de las cepas analizadas. En el Cuadro 2 se observan los resultados de la comparación entre la

Cuadro 2. Resultados comparativos de la identificación bioquímica y genética de las 69 cepas intestinales y extraintestinales.

Identificación genética RFLP-PCR del 16S rDNA		Identidad bioquímica			% de concordancia
Especie	Número de cepas	Especie	Número de cepas intestinales	Número de cepas extraintestinales	
<i>A. caviae</i>	39	<i>A. caviae</i>	10	2	30.8
		<i>A. hydrophila</i>	23	3	NA
		<i>A. veronii</i>	1	0	NA
<i>A. hydrophila</i>	12	<i>A. hydrophila</i>	6	2	66.6
		<i>A. sobria</i>	2	1	NA
		<i>A. caviae</i>	0	1	NA
<i>A. salmonicida</i>	13	<i>A. sobria</i>	6	1	NA
		<i>A. hydrophila</i>	4	2	NA
<i>A. bestiarum</i>	1	<i>A. sobria</i>	1	0	NA
<i>A. encheleia</i>	1	<i>A. hydrophila</i>	1	0	NA
No <i>Aeromonas</i>	3	<i>A. sobria</i>	1	0	NA
		<i>A. veronii</i>	1	0	NA
		<i>A. hydrophila</i>	1	0	NA
Total	69		57	12	

* Genéticamente no se identificó *A. sobria* ni *A. veronii*. NA= No aplica

identificación bioquímica y genética en las 69 cepas aisladas a partir de muestras intestinales y extraintestinales. La frecuencia de especies de las 69 cepas identificadas por el método automatizado MicroScan W/A 96 fue, en orden ascendente: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*. Al utilizar el método genético RFLP's *16S rDNA*, sólo se identificaron 63 cepas de las 69 como pertenecientes al género *Aeromonas*. La distribución de la frecuencia de las especies mediante el empleo del método genético tuvo como resultado la identificación de *A. caviae* como especie predominante, seguida de *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y *A. encheleia*. El porcentaje general de concordancia entre ambos métodos fue de 28.9%. El sistema automatizado MicroScan W/A 96 resultó incapaz de reconocer a las 13 cepas de *A. salmonicida*, identificadas genéticamente.

DISCUSIÓN

Los trabajos enfocados a la búsqueda, aislamiento, identificación y tipificación de cepas del género *Aeromonas* en México son escasos. Los datos conocidos indican que las especies de mayor frecuencia de aislamiento en cuadros clínicos de humanos son *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*. Mientras que en otras especies animales se ha reportado *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y *A. encheleia*. Respecto a las frecuencias de aislamiento, los resultados de este trabajo concuerdan parcialmente, ya que entre las 69 cepas aisladas de muestras clínicas, procedentes del Instituto Nacional de Pediatría (INP) en la Ciudad de México, las especies más frecuentemente encontradas tras la identificación genética fueron: *A. caviae* (56.5%), *A. salmonicida* (18.8%), *A. hydrophila* (17.4%), *A. bestiarum* (1.44%) y *A. encheleia* (1.44%), mientras que los resultados reportados por Castro-Escarpulli y colaboradores en el año 2002, establecen que la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aeromonas* a partir de muestras clínicas varía de acuerdo con el área geográfica estudiada; ellos observan que de las 68 cepas aisladas en el estado de Hidalgo, *A. caviae* (42.6%) fue la especie prevalente seguida por *A. hydrophila* (36.8%) y *A. veronii* bv. *sobria* (19.1%), mientras que en las cepas estudiadas (n=42) aisladas del Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México, *A. veronii* bv. *sobria* (31%) ocupó el primer lugar, seguida de *A. hydrophila* (29%) y de *A. caviae* (17%).¹²

Las cepas aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría no fueron de pacientes con cuadros intestinales ni extraintestinales a la especie *A. veronii* bv *sobria*. *A. caviae* y *A. hydrophila* se encontraron como las especies más frecuentes, como se describió previamente para cepas aisladas de cuadros gastrointestinales del estado de Hidalgo y de la Ciudad de México.

Estos datos concuerdan con lo obtenido en Perú, en 2002, donde se tomaron muestras en cinco centros hospitalarios diferentes (285 muestras de heces procedentes de niños con diarrea aguda) en donde *A. caviae* fue la bacteria más aislada entre los enteropatógenos, sobre todo en niños menores de dos años.¹³

En el año 2000, Albert y colaboradores reportaron aislamientos de *Aeromonas* en niños con gastroenteritis, con *A. caviae* como la especie de mayor prevalencia en estos cuadros clínicos.¹⁴ Un resultado interesante e innovador fue que entre las cepas estudiadas se identificaron 13 cepas de *A. salmonicida*, esta especie representó el segundo mayor porcentaje de aislamiento a partir de muestras intestinales (17.5%) (n=10/57). Estas cepas mostraron patrones atípicos en la restricción del gen *16S rDNA*; sin embargo, la secuenciación de un fragmento del gen no dejó dudas sobre su identidad.

Estas cepas presentaron también un comportamiento bioquímico atípico: crecieron a 37°C y algunas fueron móviles. Ambas características permiten reconocer a estos aislamientos como cepas de *A. salmonicida* atípicas. Hallazgos que concuerdan con los reportes de autores como Hänninen y Hirvelä-Koski en 1999, quienes desde esos años reportan que cada vez sería más frecuente encontrar casos clínicos causados por *A. salmonicida* atípica.¹⁵

Figueras y colaboradores, en 1999, también reportaron infección en seres humanos causada por esta especie.¹⁶ Mientras que en 1993, Carnahan y Joseph reportaron casos clínicos por la ingestión de especies marinas infectadas con *A. hydrophila* "like" HG 3, que es una cepa móvil y capaz de crecer a 37°C.¹⁷ Recientemente Aguilera-Arreola y colaboradores, en 2009, aislaron una cepa de *A. salmonicida* atípica que resultó *A. hydrophila* "like" HG 3, como único patógeno en una muestra de heces diarreicas provenientes de un niño de un año de edad.¹⁸ Por todo lo anterior, las cepas de *A. salmonicida*, al menos las atípicas, no son una especie que afecta sólo

a animales poiquilotermos, como se aseguraba hace algunos años.¹⁹

Un hallazgo importante fue la detección de cepas de *A encheleia* a partir de una muestra intestinal. Por lo general, esta especie se aisla con mayor frecuencia en peces o aguas contaminadas.²⁰ Tal como lo describe Castro-Escarpulli y colaboradores en 2003, quienes reportaron por primera vez esta especie en México, aislada a partir de pescado congelado destinado a consumo humano.¹⁹ Así como Janda, en 2001, encontró a esta especie como agente etiológico de una infección extraintestinal.²¹ Estas especies en nuestra cadena alimenticia, como en pescados congelados y agua destinados al consumo humano constituyen la fuente de transmisión más probable.

Cuando sólo se analiza la identidad de las cepas aisladas a partir de cuadros extraintestinales, se encuentra *A caviae* en 41.66% (n=5). La procedencia de las muestras fue la siguiente: líquido de diálisis (n=1), hemocultivos (n=2) y urocultivos (n=2). La especie de *A hydrophila* se aisló con 33.33% (n=4) que correspondió a hemocultivos (n=3), secuela de escara de pie izquierdo (n=1), también se identificaron tres cepas como *A salmonicida* atípicas, de las que pertenecían a hemocultivos (n=2) y a líquido peritoneal (n=1).

El aislamiento de *Aeromonas* a partir de hemocultivos coincide con los resultados obtenidos en Cuba por Cabrerá y colaboradores en 2007, en donde se aislaron 47 cepas de diferentes especies de *Aeromonas*, con predominio de *A jandaei*.²² En un estudio realizado por Tena y colaboradores en 2007, se encontró *Aeromonas* spp en la sangre de siete enfermos; en cuatro de ellos, la bacteriemia fue secundaria a una infección biliar o cutánea por *Aeromonas* spp, y en las tres restantes la bacteriemia fue la única manifestación clínica.

En este mismo estudio se reporta el aislamiento de *Aeromonas* spp en la orina de tres pacientes con cistitis (n=2) y bacteriuria asintomática (n=1). En nuestro estudio se identificaron dos cepas de *A caviae* aisladas a partir de urocultivos, que concuerda con lo reportado por Tena.²³ La baja frecuencia de aislamiento de esta especie coincide con lo reportado por Ojeda-Vargas y colaboradores en 2005, que aislaron tres diferentes especies de *Aeromonas*, *A hydrophila* (6 cepas), *A caviae* (1 cepa) y *A veronii* bv sobria (1 cepa), de 10,921 muestras recolec-

tadas a lo largo de ocho años (1996-2003) en un hospital de España.²⁴

La mayoría de estos casos son de adquisición nosocomial, debido a que los pacientes están frecuentemente sometidos a procesos de inmunosupresión.

En este estudio se confirmó la coexistencia de *Aeromonas* spp en el líquido de diálisis, líquido peritoneal y en la secuela de escara del pie izquierdo de un paciente. Estas infecciones pueden deberse a infecciones nosocomiales. Parras y colaboradores, en 1993, reportaron el caso de un paciente con meningoencefalitis por *Aeromonas* y choque séptico con antecedentes de alcoholismo crónico. Este microorganismo se aisló de hemocultivos, coprocultivos, líquido peritoneal, líquido céfaloarquídeo y lesiones en la piel.²⁵

Los estudios taxonómicos realizados con numerosos aislamientos clínicos han revelado, repetidamente, que la mayor parte de las especies aisladas se encuentran en los grupos de hibridación,^{1,4,8} que corresponden fenotípicamente a *A hydrophila*, *A caviae* y *A veronii* bv sobria.^{1,13,26,27,28} Se ha realizado un gran número de trabajos que han llevado a esta conclusión, aplicando diversas técnicas de identificación. Sin embargo, los esfuerzos no han generado buenos resultados en la identificación de algunas especies, sobre todo por la poca certeza que se tiene al usar métodos convencionales cuyas discrepancias se hacen notar al recurrir a métodos genéticos.^{8,29}

El porcentaje obtenido con la comparación de la identificación bioquímica mediante un método automatizado MicroScan W/A 96 y la identificación con la técnica de los RFLP del gen 16S rDNA (**Cuadro 2**) demuestra que sólo 20 cepas de las 69; es decir, 28.9% se identificaron correctamente con el método automatizado. El mayor error se produjo al identificar 42 cepas como *A hydrophila* cuando en realidad sólo ocho de estas correspondieron a esta especie, el resto genéticamente fueron: 26 cepas *A caviae*, 6 cepas *A salmonicida*, 1 cepa *A besnierum* y 1 cepa no perteneciente al género *Aeromonas*. La difícil separación bioquímica entre las especies de *Aeromonas* se ha puesto de manifiesto por numerosos autores, de tal manera que estos resultados suman información a este respecto.^{9,30} En un estudio realizado por Soler y colaboradores, en 2003, se evaluaron dos sistemas de identificación bacteriana (BBL Crystal E/

NF y MicroScan W/A) comúnmente utilizados en las clínicas para la identificación de *Aeromonas* spp. Esta evaluación se realizó con 22 cepas tipo y de referencia, que incluían todas las especies del género y 52 cepas clínicas. Se demostró que el sistema MicroScan W/A sólo era capaz de identificar correctamente a nivel de especie a 10% de las cepas y el sistema BBL Crystal a 20.3%. Además, el BBL Crystal y el MicroScan W/A, identificaron incorrectamente 71.4% y 85.7% de las cepas como *A hydrophila*, respectivamente. También es importante destacar que el MicroScan W/A y el BBL Crystal confundieron, respectivamente, a 21.6 y 8.1% de las cepas de *Aeromonas* con otros géneros, y en especial con el género *Vibrio*. El MicroScan W/A confundió 10.8% de las cepas con *Vibrio fluvialis*, y el BBL Crystal 2.7% de éstas con *Vibrio cholerae*.³¹

En México se realizó un estudio en el que participaron 228 laboratorios (IMSS, ISSSTE, SSA, PEMEX, estatales y particulares), dentro de un ciclo de evaluación de la calidad del PECEL (Programa de Evaluación de la Calidad entre Laboratorios). Para tal efecto, a cada laboratorio participante se le envió una muestra de *A hydrophila* para que fuera identificada. En este estudio sólo 43% de los laboratorios fue evaluado positivamente con al menos la identificación del género, mientras que el resto de los laboratorios generaron resultados erróneos, que reportaron 45 géneros bacterianos diferentes entre los que destacaron *Vibrio*, *Plesiomonas*, *Pasteurella* y varios de la familia *Enterobacteriaceae*. Este fracaso analítico refleja la dificultad que se tiene, a nivel de laboratorio clínico, para la identificación del género *Aeromonas*. Esto sin considerar que algunos laboratorios con resultados negativos emplearon sistemas automatizados como el BBLR Crystal y Vitek.³² Vivas y colaboradores, en 2000, evaluaron también este sistema indicando dicha confusión. Podríamos, por tanto, decir que en términos generales estos sistemas son imprecisos y que no se han adaptado a los cambios taxonómicos ocurridos en el género *Aeromonas*.³³

En un grupo de cepas aisladas en el estado de Hidalgo, el porcentaje de error en la identificación bioquímica cuando se comparó con la identificación genética fue de 55.9%, al usar pruebas convencionales de laboratorio y de 32.4% con el sistema automatizado Vitek, incluyendo las pruebas complemen-

tarias recomendadas por el fabricante: hidrólisis de la esculina, producción de ácido a partir de glucosa, beta-hemólisis en gelosa sangre y crecimiento en NaCl al 6%. Se evidenciaron mayores discrepancias entre la identificación bioquímica convencional y la identificación cuando se estudió un grupo de 82 cepas aisladas de pescado congelado en la Ciudad de México, en las que el porcentaje de concordancia alcanzó sólo 28.5%.³⁴

Por lo anterior, sugerimos a los laboratorios clínicos que realicen la búsqueda del género con pruebas simples, tomando siempre en consideración que, para analizar los resultados sin fines de reporte de diagnóstico clínico, es necesario confirmarlos con pruebas genéticas, como el RFLP del 16S rDNA.¹² Además, los métodos comerciales identifican incorrectamente la mayor parte de las cepas como *A hydrophila*; probablemente ésta sea una de las razones de la inmerecida importancia que se ha atribuido a esta especie frente a otras que infectan con mayor frecuencia en la clínica.⁵ Es importante no reportar los aislamientos de muestras clínicas identificadas por estos sistemas como *A sobria*, por tratarse de una terminología incorrecta para referirse a la biovariedad sobria de la especie *A veronii*. *A sobria*, sensu stricto, es una especie principalmente de origen ambiental, mientras *A. veronii* bv sobria está frecuentemente involucrada con cuadros gastrointestinales y extraintestinales.^{21,35}

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

AGRADECIMIENTOS

Este estudio formó parte del proyecto de investigación “Biopelícula, islas de patogenicidad, quórum sensing y resistencia antimicrobiana” con claves SIP 20090729 y 20100252, dentro del programa “Diagnóstico bacteriológico y molecular de bacterias de interés médico”, Clave SIP 948-1079. CEG, AAMG. Becarias EDI, COFFA, SNI. HCC. Becaria PIFI, CONACyT.

Figura 1. Identificación genética empleando RFLP-PCR del gen 16S rDNA de cepas de *Aeromonas*

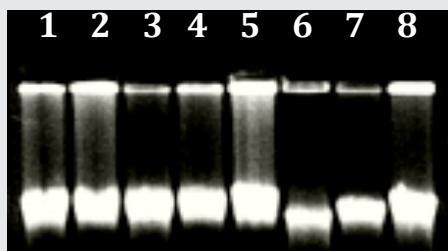


Figura 1a DNA genómico. Electrofograma del DNA genómico de cepas de *Aeromonas*

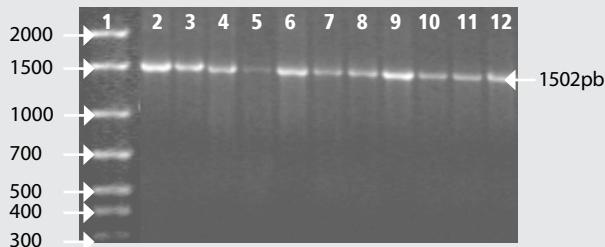


Figura 1b PCR (gen 16S rDNA). Electrofograma del producto amplificado del gen 16S rDNA mediante PCR carril 1 marcador de talla molecular (Amplisize™ Biorad)



Figura 1c. RFLP-PCR (Alu1+ Mbo 1). Electrofograma de los patrones de RFLP-PCR del amplicón 16S rDNA. Carril 1: Marcador de talla molecular V (587-8 pb Roche); Carril 2: cepa 349713 No *Aeromonas*; Carril 3: cepa 415677 *A. hydrophila*; Carril 4: cepa 377218 *A. hydrophila*; Carril 5: cepa F-0049 *A. caviae*; Carril 6: cepa F-1724 *A. caviae*; Carril 7: cepa 444544 *A. caviae*; Carril 8: cepa 445547 *A. caviae*; Carril 9: cepa F-4093 *A. hydrophila*; Carril 10: cepa 451595 *A. caviae*; Carril 11: cepa 453612 *A. hydrophila*; Carril 12: cepa 455681 *A. hydrophila*; Carril 13: cepa 455681 *A. hydrophila*; Carril 14: cepa 450279 *A. caviae*; Carril 15: Marcador de talla molecular V (587-8 pb Roche).

Figura 2. Electrofogramas de los patrones de restricción realizados para la cepa 380264.

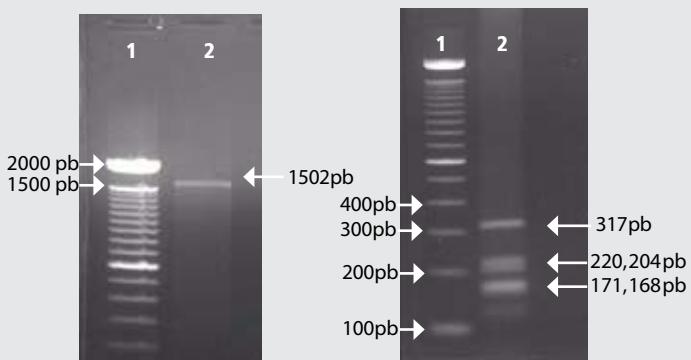
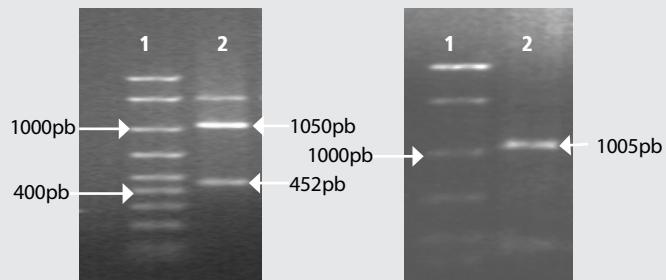


Figura 2a Nar1/Pst1. Electrofograma del producto amplificado del gen 16S rDNA mediante PCR carril 1 marcador de talla molecular (Amplisize™ Biorad)

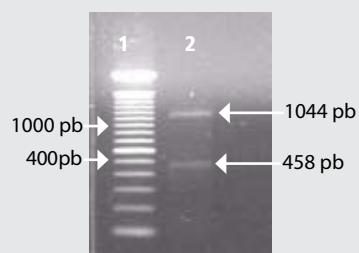


Figura 2b. NarI / HaeIII /AlwNI . Electrofogramas de los patrones de restricción realizados para la cepa 439732. Digestión con las enzima NarI/HaeIII /AlwNI para discriminar *Aeromonas HG11/A. encheleia/A. popoffii*.

REFERENCIAS

- Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998;27:332-344.
- Figueras MJ, Suarez-Franquet A, Chacón MR, Soler L, Navarro M, et al. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol* 2007;71:538-541.
- von Graevenitz A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection* 2007;35:59-64.
- Martin-Carnahan A, Joseph SW. *Aeromonadaceae*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. New York: Springer, 2005; vol. 2.
- Janda JM, Abbott SL. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:35-73.
- Martínez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S r bosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:412-421.
- Dijkshoorn L, Towner KJ, Struelens M. In: New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Chapter 1. An introduction to the generation and analysis of microbial typing data. New York: Elsevier Science, 2001;2:25
- Abbot S, Seli LS, Catino M, Hartley MA, Janda M. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J Clin Microbiol* 1998;36:1103-1104.
- Borrel N, Acinas S, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S RNA genes. *J Clin Microbiol* 1997;35:1671-1674.
- Vivas J, Saa AI, Tinajas A, Barbeyto L, Rodriguez LA. Identification of motile *Aeromonas* strains with the MicroScan WalkAway system in conjunction with the combo negative type 1S panels. *App Environ Microbiol* 2000;66:1764-1766.
- Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rRNA RFLP. *Int Syst Evol Microbiol* 2000;50:2069-2073.
- Alperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. Analysis 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *International Microbiology* 2008;11:185-194.
- National Center for Biotechnology Information. USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Castro-Escarpulli G, Aguilera MG, Giono S, Hernández CH, y col. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enf Infect Microb* 2002;22:206-216.
- Guevara JM, Huamaní C, Zerpa R, Valencia E, Guevara JMM, Anaya M. *Aeromonas* en la diarrea aguda de niños menores de 5 años. *Anales de la Facultad de Medicina* 2002;63:125-129.
- Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol* 2000;38:3785-3790.
- Hänninen ML, Hirvelä-Koski V. Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect* 1999;123:299-307.
- Figueras MJ, Soler L, Martinez-Murcia A, Guarro J, Aeromonas bestiarum and *A. salmonicida*, two closely related species of clinical significance. Sixth International *Aeromonas/Plesiomonas* Symposium, Chicago, USA 1999. P:17.
- Carnahan AM, Joseph SW. Systematic assessment of geographically and clinically diverse aeromonads. *Syst Appl Microbiol* 1993;16:72-84.
- Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Castro-Escarpulli G. Molecular and phenotypic characterization of *A. hydrophila* like HG3 strain isolated of an infant with diarrhea in Mexico. *Bioquímia* 2009;34: 183-189.
- Castro-Escarpulli G, Figueras M.J, Aguilera-Arreola MG, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro JM, Chacón R. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Inter J Food Microbiol* 2003;84:41- 49.
- Szczuka E, Kaznowski A. Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:220-228.
- Janda JM. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Molecular Medical Microbiology. San Diego: Academic Press, 2001;1237-1270.
- Cabrera L, Castro-Escarpulli G, Ramirez M, Llop A, y col. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba. *Rev Chil Infect* 2007;24:204-208.
- Tena D, González-Pretarius A, Gimeno C, Pérez-Pomata MT, Bisquert J. Infección Extraintestinal por *Aeromonas* spp: revisión de 38 casos. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2007;25:235-241.
- Ojeda-Vargas M, González-Fernández MA, Alfonso-Rodríguez O, Monzón-Moreno C. Infecciones del tracto urinario causadas por bacterias del género *Aeromonas*. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2005;23:179-182.
- Parras F, Díaz MD, Reina J, Moreno S, Guerrero C, Bouza E. Meningitis due to *Aeromonas* species: Case report and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:1058-1060.
- Camus AC, Durborow RM, Hemstreet WG, Thune RL, Hawke JP. *Aeromonas* Bacterial Infections-Motile Aeromonad septicemia. *SRAC* 1998;478:1-4.
- Wilcox MH, Cook AM, Eley A, Spencer RC. *Aeromonas* spp. as a potential cause of diarrhea in children. *J Clin Pathol* 1992;45:959-963.
- Abbot S, Seli LS, Catino M, Hartley MA, Janda M. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J Clin Microbiol* 1998;36:1103-1104.
- Janda JM, Abbot SL, Khashe S, Kellogg GH, Shimada T. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J Clin Microbiol* 1996;34:1930-1933.
- Castro-Escarpulli G, Aguilera MG, Hernández CH, Arteaga RI, y col. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímia* 2003;28:11-18.
- Soler L, Marco F, Vila J, Chacon MR, et al. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41:5732-5734.
- Aquino-Santiago C, Lugo-de la Fuente G, Castañeda-Colín C, Guerrero MER, y col. Programa de Evaluación de la calidad entre laboratorios. XXVIII. Diez Evaluaciones de Calidad analítica en Bacteriología Médica. III. *Lab Acta* 2002;14:21-27.
- Vivas J, Saa AI, Tinajas A, Barbeyto L, Rodriguez LA. Identification of motile *Aeromonas* strains with the MicroScan WalkAway system in conjunction with the combo negative type 1S panels. *App Environ Microbiol* 2000;66:1764-1766.
- Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Giono-Cerezo S. Capítulo XXII Género *Aeromonas*. En Molina J. Bacteriología y Virología Médica. 1a. ed. México: Méndez Editores, 2010; 261-274.
- Horneman AJ, Ali A, Abbott SL. *Aeromonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yueken RH. Manual of Clinical Microbiology. 9th edition. Washington: American Society for Microbiology, 2007; 716-722.