Rev. Chil. Pediatr. 58(2): 126-130, 1987

Variaciones geográficas de aislamiento de aeromonas hydrophila en niños con diarrea aguda infantil y población sana

Dra. Olivia Trucco A.¹; Dra. Valeria Prado J.²; Dra. M. Teresa Siri A.²;
Dra. Gloria Dib C.³; Dr. Vicente Millán T.³; T.M. Juan Martínez D.²;
T.M. Lucía Reyes M.²; T.M. Nora Mamani M.²

Geographic differences in isolation of aeromonas hydrophila from infants with and without acute diarrhea

Aeromonas hydrophila has been recently described as etiopathological agent of acute diarrhea. In order to determine its role as potential enteropathogen in Chilean infants we studied 285 infants and toddlers (1 to 24 months old) with acute diarrhea and 140 controls matched by age, sex and socioeconomic level, from two cities (Santiago and Valparaíso) during the summer periods of 1983/84 and 1985/86. In the Valparaíso group, isolation rates of *Aeromonas hydrophila* were 5.5% in infants with acute diarrhea and 2.3% in controls ($p < 0.05$). Among infants from Santiago, no *A. hydrophila* strains were isolated. Enterotoxin production was negative, (both ST and LT) in all the *A. hydrophila* strains. The geographic differences in isolation rates of *Aeromonas* may be related to the presence of aquatic reservoirs.

(Key words: *Aeromonas hydrophila*, acute diarrhea, infants, geographic differences).

Desde el primer aislamiento de *Aeromonas* en deposiciones por Lantrop en 1961, en una epidemia de diarrea aguda, se ha intentado determinar el rol de este potencial patógeno intestinal tanto en niños como en adultos. Han sido múltiples las comunicaciones en las últimas dos décadas que involucran a *Aeromonas* en cuadros de gastroenteritis¹⁻⁷.

Se sabe que el reservorio natural de esta bacteria es fundamentalmente acuático (aguas saladas y dulces) encontrándose también en suelos y en flora intestinal de individuos sanos, en forma transitoria aunque su incidencia no ha sido bien establecida^{8,9,10}.

La actual clasificación del género *Aeromonas* incluye 3 especies móviles (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria*) y una especie inmóvil (*A. salmonicida*) esta última no asociada con patología humana. *A. hydrophila* ha sido la más comúnmente aislada en cuadros de gastroenteritis^{11,12}.

A la dificultad para aclarar la participación de este agente en diarrea aguda, ha contribuido el

1. Becado programa formación especialista en microbiología, Facultad de Medicina Universidad de Chile.
2. Unidad Microbiología, Depto. Salud Pública, Div. Cs. Médicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
3. Servicio Pediatría, Hospital Deformes, Valparaíso.

hecho que estos organismos pueden ser fácilmente confundidos con ciertos miembros de la familia Enterobacteriaceae en medios de cultivo corrientes. Es necesario incluir en el estudio de coprocultivos, medio de cultivo selectivo para su desarrollo junto a la práctica corriente de prueba de oxidasa^{13,14,15}.

Algunos hechos orientan a considerar a *A. hydrophila* como enteropatógeno: la prevalencia más elevada en pacientes con diarrea aguda en relación a controles que han mostrado algunos estudios¹² la determinación de algunos factores de enteropatógenidad y la respuesta humoral frente a la infección. Se asocian con mayor frecuencia a cuadros de gastroenteritis, cepas enterotoxigénicas siendo tal vez este mecanismo de patogenicidad el más importante. También se han descrito numerosos factores extracelulares asociados con virulencia bacteriana como hemolisinas, proteasas, citotoxinas, fimbrias y otras¹⁶⁻¹⁸.

Ya que el síndrome diarreico agudo continúa siendo un problema frecuente en nuestra población infantil, para obtener mayor información acerca de la epidemiología, incidencia y patogenicidad de esta bacteria, nuestro grupo realizó una búsqueda sistemática de *Aeromonas* en niños menores de 2 años con diarrea aguda y controles en 2 períodos de verano 1983-1984 y 1985-86, estudiando pacientes de 2 ciudades con diferentes características ecológicas en lo que se refiere a reservorios naturales de agua.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 285 niños menores de 2 años de nivel socioeconómico medio bajo con síndrome diarreico agudo y 140 niños controles pareados por edad y sexo, durante los veranos 1983-84 y 85-86. Diarrea fue definida como cuadro clínico caracterizado por deposiciones de mayor contenido acuoso que lo normal con o sin elementos patológicos (mucus, pus y/o sangre) con más de 3 evacuaciones en el día, duración más de un día y menos de 7 días.

Del grupo con diarrea aguda, 73 niños eran del hospital Deformes de Valparaíso y 212 del hospital Luis Calvo Mackenna de Santiago y del consultorio La Faena (Área de Salud Metropolitano Oriente).

Entre los grupos controles 44 niños eran de Valparaíso y 96 niños de Santiago (consultorio La Faena).

Se tomó una muestra de deposición recién emitida o por hisopado rectal a cada niño, las muestras de Valparaíso fueron transportadas en medio Cary Blair. Se confeccionó un cuestionario clínico-epidemiológico en cada caso.

Las muestras fueron sembradas en agar SS, agar MacConkey, agar Campy Bap, agar selectivo para *Yersinia* y agar sangre con ampicilina. La identificación de los diferentes enteropatógenos se efectuó de acuerdo a recomendaciones internacionales¹⁹⁻²³.

Las muestras de deposiciones fueron sembradas en agar sangre base más 5% de sangre de cordero adicionado de 15 µg/ml de ampicilina^{14,15}. A las colonias de

color grisáceo con o sin betahemólisis se les realizó prueba de oxidasa y batería de medios diferenciales para llegar a diagnóstico de Género, la confirmación y tipificación definitiva fue hecha por el Instituto de Salud Pública (ISP).

Se efectuó estudio de enterotoxinas, termolábil (LT) y termoestable (ST) en todas las cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas; toxina LT mediante técnica de ELISA utilizando sobrenadante de cultivo y colonias aisladas paralelamente²⁴. La búsqueda de toxina ST se realizó mediante inoculación intragástrica en ratón lactante (técnica de Dean)²⁵.

El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos, de las *Aeromonas* aisladas se efectuó mediante la técnica de dilución en placa determinando concentración inhibitoria mínima (CIM) de los siguientes antimicrobianos: cloramfenicol, cotrimoxazol, gentamicina, amikacina, dibekacina, cefotaxima, ceftriaxona, cefoperazona siguiendo la técnica internacional recomendada. Los valores de corte para considerar sensibles a las cepas estudiadas fueron: cloramfenicol = 12.5; cotrimoxazol = 80; gentamicina = 4; amikacina = 16; dibekacina = 4; cefotaxima = 16; ceftriaxona = 16; cefoperazona = 16²⁵.

RESULTADOS

Los resultados de los dos períodos de estudio (verano 1983-84 y 85-86) dieron un aislamiento global de *Aeromonas hydrophila* de 5,5% entre lactantes con diarrea aguda en Valparaíso y 2,3% entre controles de esa misma ciudad; diferencia estadísticamente no significativa ($p < 0,05$). En el grupo de niños de Santiago no se aislaron *Aeromonas* ni en pacientes ni en controles (Tabla 1).

La Tabla 2 analiza la importancia relativa que tiene *Aeromonas* entre los agentes de gastroenteritis en población menor de 2 años, ocupando un lugar destacado entre los niños de Valparaíso, no participando como enteropatógeno en Santiago.

Los resultados del estudio de sensibilidad de las cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas se observa en la Tabla 3, la que muestra dos cepas resistentes a cloramfenicol (CIM $\geq 12,5$ µg/ml); el resto de los antimicrobianos estudiados fueron

Tabla 1.
Frecuencia porcentual de *Aeromonas hydrophila* aisladas en lactantes de Santiago y Valparaíso. Veranos 1983/84 y 85/86

	Recuperación <i>Aeromonas hydrophila</i>	
	Santiago Nº/Nº total	Valparaíso Nº/Nº total
Diarrea aguda	0/212	4*/73 (5,5%)
Controles	0/96	1*/44 (2,3%)
TOTAL	0/308	5/117

* único enteropatógeno.

Tabla 2.
Importancia relativa de *Aeromonas* respecto de otras bacterias enteropatógenas
en lactantes de Santiago y Valparaíso. Veranos 1983/84 y 85/86

Bacterias enteropatógenas	SANTIAGO		VALPARAISO		P
	Diarrea n = 212	Control n = 96	Diarrea n = 73	Control n = 44	
	%	%	%	%	
<i>E. coli</i> enteropatógeno	34,9	14,6	26	11,4	
<i>E. coli</i> enterotoxigénico*	19	9	ne	ne	
<i>E. coli</i> enteroinvasor	1,4	1	0	0	
<i>Shigella</i>	10,8	0	2,7	0	
<i>Campylobacter</i>	6,1	0	2,7	0	
<i>Aeromonas</i>	0	0	5,5	2,3	≥0,05
<i>Salmonella</i>	0,9	0	0	0	
<i>Yersinia</i>	0	0	0	0	

* ECET corresponde a 161 pacientes con diarrea y 74 controles.
ne = no estudiado.

Tabla 3.
Actividad comparativa in vitro (CIM ugc/ml) de 8 antimicrobianos
frente a 5 cepas de *Aeromonas hydrophila*

Antimicrobiano	CIM (ugc/ml)				
	1	2	3	4	5 (cepas)
Cloramfenicol	0,5	256	256	8	2
Cotrimoxazol	2	2	1	1	
Gentamicina	≤0,25	0,5	0,5	≤0,25	≤0,25
Amikacina	2	2	2	2	1
Dibekacina	1	1	1	0,5	0,5
Cefotaxima	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Ceftriaxona	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Cefoperazona	≤0,25	8	2	1	2

activos frente a la totalidad de las cepas. La mayor actividad in vitro correspondió a Ceftriaxona y Cefotaxima.

En el estudio de enterotoxigenidad de las 5 cepas de *Aeromonas hydrophila*, la búsqueda de toxina termolábil (LT) resultó negativa en todas mediante técnica de ELISA, tanto en sobrenadantes de cultivo como con cultivo directo de colonia. Tampoco se detectó producción de toxina termoestable (ST) en ninguna de estas cepas, en el modelo de ratón lactante.

COMENTARIO

Los resultados de este estudio nos estarían indicando que *Aeromonas hydrophila* parece tener una distribución regional variable en nuestro medio. Se aisló *Aeromonas* en deposiciones sólo de niños que provenían de Valparaíso no aislándose este agente en Santiago, variación que tal vez podría explicarse por diferencias ecológi-

cas en relación a la existencia de reservorios naturales de este potencial enteropatógeno.

Resultó ser más frecuente su aislamiento entre niños con diarrea aguda que en controles, diferencia que no resultó estadísticamente significativa. Estos datos concuerdan con otros autores como Pitarangsi⁶ y Gracey¹ quienes no encontraron diferencias significativas cuando se trataba de cepas no enterotoxigénicas, situación que ocurrió en nuestro estudio ya que en ninguna de las cepas de *Aeromonas hydrophila* se demostró la presencia de enterotoxina ST ni LT.

Todas las cepas aisladas correspondieron a la especie *A. hydrophila*, que ha sido la más frecuentemente involucrada como agente de gastroenteritis, sin embargo se han descrito cuadros similares al cólera producidos por *A. sobria*³.

Según lo descrito, la hemólisis se relaciona con capacidad enterotóxica en 96% o más de los casos, lo que también resultó concordante con nuestras observaciones, ya que las 5 cepas de

Aeromonas hydrophila aisladas no producían hemólisis en agar sangre ni eran enterotoxigénicas.

Respecto de las características clínicas de cuadros de gastroenteritis en los cuales se ha aislado *Aeromonas* como único agente enteropatógeno, se han observado diferentes perfiles clínicos, desde diarreas leves de corta duración a síndrome disintérico graves y también gastroenteritis con deposiciones líquidas profusas similares al cólera. En nuestra experiencia los pacientes en que se aisló *Aeromonas*, 4 presentaron diarrea aguda con deshidratación leve, las deposiciones fueron descritas como líquidas de frecuencia entre 4 a 6 por día, sin elementos patológicos (pus o sangre).

No presentaron fiebre ni vómitos y el estado nutricional de los niños al ingreso al hospital era bueno (eutróficos). Sólo uno de los niños había recibido medicamentos previo al estudio (antiparasitario). El otro niño en que se aisló *Aeromonas* estaba asintomático y pertenecía al grupo control.

La frecuencia de portadores ha sido variable en diferentes estudios dependiendo del empleo de medios de cultivo selectivos que facilitan el aislamiento de *A. hydrophila*; Graevenitz en 1968 reportaba 0,7% de portación subiendo a 3,2% en estudios posteriores al introducir agar con ampicilina⁵, Millership encontró 4,2%⁸, valores similares a la frecuencia de 2,3% detectada en nuestro estudio.

Se han publicado muchos estudios relacionados con sensibilidad antimicrobiana y hasta la fecha no se han descrito cepas de *A. hydrophila* sensibles a ampicilina, de ahí que este antimicrobiano sea útil como agente selectivo en medios de aislamiento. Sin embargo, se han descrito cepas de *A. sobria* sensibles a ampicilina, especie que también ha sido involucrada en diarrea aguda aunque con menor frecuencia. En general las cepas aisladas en gastroenteritis se describen como sensibles a gentamicina, cloramfenicol, ceftazidima y otros apareciendo resistencia a eritromicina, clindamicina, cefradina, cefazolina²⁶. En nuestro estudio encontramos 2 cepas resistentes a cloramfenicol siendo sensibles al resto de los antimicrobianos estudiados.

Es interesante destacar los diferentes elementos asociados con virulencia bacteriana que se han descrito en *A. hydrophila*: fimbrias de adherencia que iniciarían el proceso infeccioso, citotoxinas las cuales han sido estudiadas en diferentes líneas celulares (fibroblastos humanos, células tumorales humanas: HELA, células de riñón de mono verde africano), enterotoxinas y una gran variedad de enzimas entre ellas hemolisinas, proteasas, lecitinasas, nucleasas, amilasas,

elastasas y otras.

Sin embargo es necesario acumular mayor información tanto epidemiológica como patogénica, para definir mejor la importancia de *A. hydrophila* en el síndrome diarreico agudo.

RESUMEN

Entre los nuevos agentes capaces de producir diarrea aguda se ha descrito la participación de *Aeromonas hydrophila*. Con objeto de conocer la incidencia e importancia relativa de este potencial enteropatógeno en nuestro medio, estudiamos 285 niños menores de 2 años con síndrome diarreico agudo y 140 niños controles pareados por edad y sexo en 2 ciudades (Santiago y Valparaíso) durante los veranos 1983-84 y 85-86.

El aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en pacientes de Valparaíso fue de 5,5% (4/73) en niños con diarrea y 2,3% (1/44) en controles, diferencia estadísticamente no significativa. No hubo aislamiento de este agente en Santiago (0/212). Se efectuó estudio de enterotoxigenidad de las cepas aisladas que resultó negativo tanto para enterotoxinas termoestable (ST) mediante modelo de ratón lactante y para enterotoxina termolábil (LT) mediante ELISA.

Las variaciones geográficas observadas en el aislamiento de *Aeromonas* en diarrea aguda, puede correlacionarse tal vez con existencia de reservorios acuáticos naturales.

REFERENCIAS

1. Gracey, M., Bruke, V., Robinson, J.: *Aeromonas* associated gastroenteritis. Lancet 2: 1304, 1982.
2. Lance, G., Nakata, M., Thompson, J., White, M.: *Aeromonas* related diarrhea in adults. Arch Intern Med 145: 2207, 1985.
3. Arampas, A., Rothman, E., Mathieu, D., Andremon, A., Auzepy, P.: Cholera-like illness due to *Aeromonas sobria*. J Infect Dis 145(2): 248, 1982.
4. Marsik, F.: Other gram negative bacilli. Mandell, Douglas, Bennett II. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York John Wiley & Sons 1985 Second edition, 1318.
5. Graevenitz, A.: *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Lennette E. Manual of clinical Microbiology Washington. American Society for Microbiology. Third Edition, 1980, 220-225.
6. Pitarangsi, C., Echeverría, P., Whitmore, R. et al: Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas Shigelloides*: Prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. Infect Immun 35: 666, 1982.
7. Davis, W.A., Kane, J., Garagush, V.: Human *Aeromonas* infections. Medicine, 57: 267, 1978.
8. Millership, S., Curnow, S., Chattopadhyay B. Faecal carriage rate of *Aeromonas hydrophila*. J Clin Pathol 36: 920, 1983.

9. Gracey and colleagues.: Isolation of *Aeromonas* from faeces. *Lancet* 1: 351, 1983.
10. Shread, P.T., Donovan, T., Lee, J.: A survey of the incidence of *Aeromonas* in human faeces. *Soc Gen Microbiol* 8: 184, 1981.
11. Agger, W.A. et al.: Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila* associated diarrheae. *J Clin Microbiol* 21: 909, 1985.
12. Frey, B.J.: *Aeromonas* biology of the organism and diseases in children. *Pediatr Infect Dis* 3: 164, 1984.
13. Robinson, J., Bruke, V., Worthy, P.: Media for isolation of *Aeromonas* spp. from faeces. *J Med Microbiol* 18: 405, 1984.
14. Kay, B.A. et al.: Media for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Microbiol* 22: 888, 1985.
15. Van Graevenitz, A. et al.: Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* from human feces. *J Clin Microbiol* 17: 16, 1983.
16. Honda, P.: Demonstration of cholera-toxin related factor in cultures of *Aeromonas* with ELISA. *Infect Immun* 50: 322, 1985.
17. Morgan, D.R.: Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas* and enteropathogenicity for humans. *Infect Immun* 50: 62, 1985.
18. Cumberbatch, N., Gruwith, M.J., Laughton, C.: Cytotoxic enterotoxin produced by *A. hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheae disease. *Infect Immun* 23: 829, 1979.
19. Edwards, P.R., Ewing, W.H.: *Identificación of enterobacteriaceae*. 3º Ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn. 1972.
20. OMS/OPS documento oficial 80.2.: 83º Comité ejecutivo Programa de control de enfermedades diarreicas.
21. Sereny, B.: Experimental *Shigella* Keratoconjunctivitis: a preliminary report. *Acta Microbiol Acad Sci* 2: 293, 1955.
22. Honda, T., Glass, R., Akhtar, Q.: A simple assay to detect *E. coli* producing LT enterotoxin: results of a field study of the Biken test in Bangladesh. *Lancet* 1: 609, 1981.
23. Dean, A.G., Ching, Y. et al.: Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in study of diarrheae in children in Honolulu. *J Infect Dis* 125: 407, 1972.
24. Ristaino, P.A., Levine, M.M., Young, Ch.R.: Improved GM₁-enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol* 18: 808, 1983.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA. 1982.
26. Zemelman, R. et al.: *Aeromonas* spp susceptibility to 22 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 151, 1985.