

M. Concepción Ladrón de Guevara
M. Pilar Romero
Andrea González

Correspondencia:
Concepción Ladrón de Guevara García
Veneras 9, 4^a, 28013, Madrid.
E-mail: cladron.hulp@salud.madrid.org

Servicio de Microbiología y Parasitología.
Hospital Universitario La Paz.
Madrid

Significación clínica y distribución epidemiológica de *Aeromonas* spp aisladas en heces

ORIGINAL

Resumen

Fundamentos: El papel del género *Aeromonas* como enteropatógeno continúa en entredicho en numerosos trabajos. El objetivo es conocer en nuestra serie la distribución epidemiológica, sensibilidad antimicrobiana y el significado clínico de *Aeromonas* spp aisladas en el coprocultivo.

Métodos: Se estudió retrospectivamente la evolución clínica de 152 casos de diarrea con aislamiento de *Aeromonas* spp. (1999-2004). Se utilizó el medio agar sangre ampicilina para aislar *Aeromonas* añadiendo el medio CIN en la segunda parte del estudio.

Resultados: Se aisló *Aeromonas* spp. en 1,24% de 27.109 muestras, distribuidas entre *A. caviae* 59,21%, *A. hydrophila* 17,76%, *A. veronii* var. *sobria* 21,05%, *A. veronii* var. *veronii* 1,31%, *A. schubertii* 0,65%. En el área pediátrica se obtuvieron 124 aislamientos, 90 procedían de urgencias, de primaria 17, de hepatología 9 de neonatología 6 y 2 de hematología. Los adultos la mayoría presentaban enfermedad de base.

Conclusiones: *A. caviae* es la especie más prevalente. Son frecuentes las enfermedades de base asociadas a la diarrea. Para obtener óptimos resultados en el coprocultivo se requiere utilizar más de un medio. La mayoría de las cepas presentaron resistencia exclusivamente a amoxicilina. A falta de estudios de patogenicidad, el aislamiento de *Aeromonas* spp como único agente en el coprocultivo, adquiere significado clínico junto a la diarrea y una posible enfermedad de base.

Palabras clave: *Aeromonas*. Epidemiología. Heces.

Summary

Fundamentals: *Aeromonas* and their link to diarrheic disease have not been clearly established. A study has been performed to observe species distribution, drugs sensitivity and clinical signification of the *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea.

Method: Retrospective study has been performed (1999-2004) to observe the clinical evolution from patients with diarrhea and *Aeromonas* species.

To isolate *Aeromonas* two specific means were used, only blood agar with ampicillin in the first phase, and then adding CIN agar in the second phase of the study.

Results: *Aeromonas* has been isolated in 1,24% of 27.109 samples, with *A. caviae* 59,21%, *A. hydrophila* 17,76%, *A. veronii* var. *sobria* 21,05%, *A. veronii* var. *veronii* 1,31%, *A. schubertii* 0,65%.

124 were children, 90 from emergencies, 17 from primary, 9 hepatology, 6 from neonatology and 2 from hematology. Among the adult patients, most of them were frequently suffering from the basic disease.

Conclusion: The *A. caviae* is the most prevalent species. Most of the stocks were only resistant to the amoxicillin. Isolation of *Aeromonas* strains from stool specimens may require the use of more than one medium. *Aeromonas* are an important cause of diarrhea in patients infected with *Aeromonas* species and underlying disease with clinical signification.

Key words: *Aeromonas*. Epidemiology. Stool.

Introducción

El género *Aeromonas* pertenece a la familia *Aeromonadaceae*, aunque su taxonomía continúa siendo confusa, atendiendo a sus características bioquímicas el género *Aeromonas* incluye 7 fenopecies: *A. hydrophila* complex, *A. caviae* complex, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. schubertii*. Aunque estudios recientes basados en técnicas de hibridación DNA-DNA lo dividen en 17 genoespecies^{1,2}.

El hábitat normal de las *Aeromonas* lo constituyen los ambientes acuáticos con escasa o baja salinidad y el suelo de las zonas pantanosas húmedas.

Junto con la ingesta de agua contaminada y la aspiración de agua durante el baño en ambientes naturales, los alimentos pueden ser para el hombre otra posible fuente de contagio.

Aeromonas spp. se han descrito como agentes etiológicos de gastroenteritis aguda, colecistitis, colangitis, abscesos hepáticos, neumonía, meningitis, artritis séptica, osteomielitis, endocarditis, mionecrosis, fascitis necrosante y bacteriemias³.

El papel como enteropatógeno de las *Aeromonas* spp. se ha puesto en entredicho en numerosos estudios^{4,5}, basándose fundamentalmente en la existencia del 0,2 y el 0,8% de portadores asintomáticos según la serie^{6,7}. Otros estudios parecen demostrar que el género *Aeromonas* es responsable de provocar infecciones intestinales en humanos que van desde una diarrea acuosa hasta otra sanguinolenta de corta o prolongada duración.

Los cuadros diarreicos atribuidos a *Aeromonas* spp. pueden afectar a cualquier grupo de edad, sin embargo se han publicado un mayor número de casos entre población pediátrica⁸.

El motivo de este estudio es conocer en nuestra serie la distribución epidemiológica y el valor patógeno de *Aeromonas* spp aisladas en el coprocultivo.

Material y métodos

Se estudiaron retrospectivamente 152 casos de cuadros diarreicos con aislamiento de *Aeromonas* spp. durante el período comprendido entre enero de 1999 y diciembre de 2004. Se dividieron en tres grupos en función de la edad, niños hasta 14 años, adultos hasta 65 años y adultos mayores de 65 años.

Todas las heces se sembraron en agar MacConkey, SS (Salmonella-Shigella), medios selectivos para *Campylobacter*, CIN (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina) y agar sangre con ampicilina (ASA) y caldo selenite. La detección de rotavirus y adenovirus en heces se realizó mediante el empleo de técnica de inmunocromatografía (Combi-Strip R/A®. Fastia-diagnostics).

Tabla 1. Distribución total de aislados de *Aeromonas* con otros enteropatógenos

	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. schubertii</i>	Total
Aislado único	64	20	21	1	-	106
<i>Salmonella</i> D9	6	2	2	-	1	11
<i>Salmonella</i> B4-5	3	-	2	-	-	5
<i>Salmonella</i> C2-8	1	-	1	-	-	2
<i>C. jejuni</i>	14	4	5	1	-	24
<i>Campylobacter</i> sp.	2	-	-	-	-	2
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	1	-	-	1
Rotavirus	-	1	-	-	-	1

Las cepas de *Aeromonas* spp se recuperaron del medio ASA incubado a 37°C durante 18 horas, este medio permite la detección de la actividad oxidasa directamente de las colonias, así como la observación de la actividad β-hemolítica. A partir de marzo de 2002, se modificaron las técnicas de aislamiento, manteniendo el medio CIN¹, descrito para el aislamiento preferencial de *Yersinia enterocolitica* de las heces, en incubación a temperaturas ambiente durante 48 horas, además del descrito anteriormente.

La identificación presuntiva se realizó a toda colonia beta hemolítica y oxidasa positiva en ASA y a toda colonia con morfología semejante al crecimiento de la cepa control en CIN, que fueron inoculadas en BEA (Agar Bilis Esculina), TSI e indol, completándose la identificación definitiva bioquímicamente mediante sistemas comerciales Vitek® y Wider® y esquema Aerokey II®.

La sensibilidad se determinó mediante sistema automatizado de microdilución en caldo Wider®.

El estudio estadístico se realizó con el programa informático SPSS para realizar el valor de Pearson Chi-Square y aplicar los factores de corrección necesarios.

Resultados

Durante el periodo estudiado se realizaron 27.109 coprocultivos, en 12.276 se recuperó algún enteropatógeno, la distribución en porcentajes fue *Campylobacter* spp. 17%, *Salmonella* sp. 15,94%, *Yersinia* sp. 0,76 % y *Shigella* sp. 0,32%.

Se aisló *Aeromonas* spp. en 152 casos, lo que representa el 1,24% del total de coprocultivos positivos. Las especies aisladas fueron: *A. caviae* 90 (59,21%), *A. hydrophila* 27 (17,76%), *A. veronii* var. *sobria* 32 (21,05%), *A. veronii* var. *veronii* 2 (1,31%) y *A. schubertii* 1 (0,65%). En el 69,73% (106) de los casos fueron aisladas como patógeno único, siendo *A. caviae* la especie más frecuente, aislada en 64 ocasiones (60,37%). En el 30,26% (46) restante de los aislamientos de *Aeromonas* spp. fueron recuperadas en cultivos mixtos, la asociación más frecuente fue con *Campylobacter* sp (17,10%) seguido por *Salmonella* sp (11,84%) y con *Yersinia* sp. (0,65%) (Tabla 1).

La recuperación de *Aeromonas* spp. en función del medio de cultivo empleado y del año de aislamiento se recoge en Tabla 2.

La distribución epidemiológica se produce a lo largo de todo el año, aunque es más frecuente durante los meses de verano y otoño (Figura 1).

En la distribución por edades, el grupo más afectado fue el de 7-12 meses con 30 aislamientos, seguido del de 2-7 años con 17 y del de mayores de 65 años con 16 aislamientos. La especie que se aisló con mayor frecuencia en la edad pediátrica fue *A. caviae* mientras que en los otros grupos no hay una especie predominante (Figura 2).

En el área infantil se produjeron 124 aislamientos, procedentes principalmente de los servicios de urgencias con 90, atención primaria con 17, hepatología con 9, neonatología 6 y hematooncología con 2 aislamientos. Mientras que de los 16 aislamientos en la población adulta, 6 procedían de los servicios de urgencias, 7 de medicina interna y 3 de oncología.

En relación con la sensibilidad estudiada de los aislados de nuestra serie, la mayor parte de las especies recuperadas son resistentes a amoxicilina el 84,8%, mientras que mostraron gran sensibilidad frente a ciprofloxacino en el 98,1% a cotrimoxazol en el 77,8% y a amoxicilina ácido clavulánico en el 99,1%.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la resistencia frente a amoxicilina entre *A. veronii* var sobria (100%) y *A. caviae* (77,7%) y frente a amoxicilina ácido clavulánico entre *A. caviae* (1,2%) y *A. hydrophila* (11,2%).

Discusión

El papel de *Aeromonas* spp. como agente productor de gastroenteritis se ha cuestionado en muchas ocasiones, pero distintos estudios realizados en los últimos años parecen demostrar su papel como agente causal de esta patología¹⁰, así como la imposibilidad de diferenciar cepas patógenas de las no patógenas.

En nuestro estudio la especie *Aeromonas* estuvo asociada a diarrea en el 69,73% de los enfermos. Es difícil predecir la importancia de *Aeromonas* en el 30,26% de los restantes aislamientos debido a que estos pacientes fueron coinfectados con otros patógenos.

Uno de los problemas concernientes a *Aeromonas* spp es su taxonomía. Desde 1987, se han propuesto nuevas especies *Aeromonas* que ha contribuido a exacerbar la confusión en dicha taxonomía. El desarrollo de Aerokey II y estudios de taxonómicos han conseguido identificar la mayoría de las *Aeromonas* a nivel de fenoespecie⁹, aunque en estudios realizados por Abbot, et al.¹¹ concluyen que las especies sólo se pueden identificar correctamente por métodos genéticos. En este estudio se han caracterizado un total de cinco fenoespecies diferentes. En cuanto a la prevalencia de las diferentes especies varía con la localización geográfica *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria* son especies dominantes en Australia y Tailandia, en estudios europeos y americanos la especie más prevalente es *A. caviae*⁵

como en nuestro estudio. Sin embargo *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria* también se aislaron en un número significativo¹². En India hay estudios con diferentes prevalencias y en Bangladesh *A. trota* se aisló en un número importante de enfermos con diarrea¹³, especie que no se ha aislado en otros estudios, debido a la variabilidad geográfica en la prevalencia de las especies, sin excluir la falta de un único esquema de identificación. Estudios previos han establecido el papel patógeno de *A. caviae*, *A.*

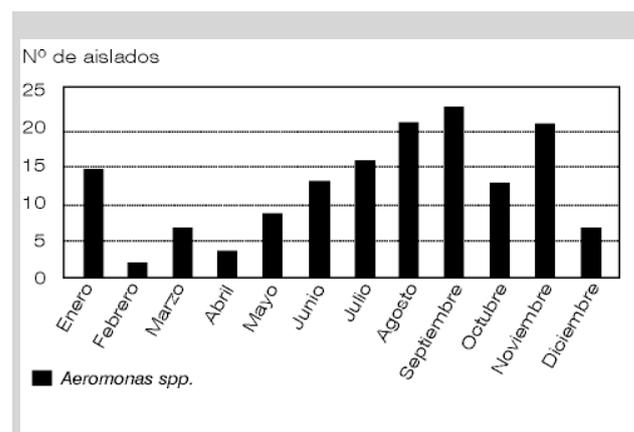


Figura 1. Distribución anual de aislados de *Aeromonas* spp.

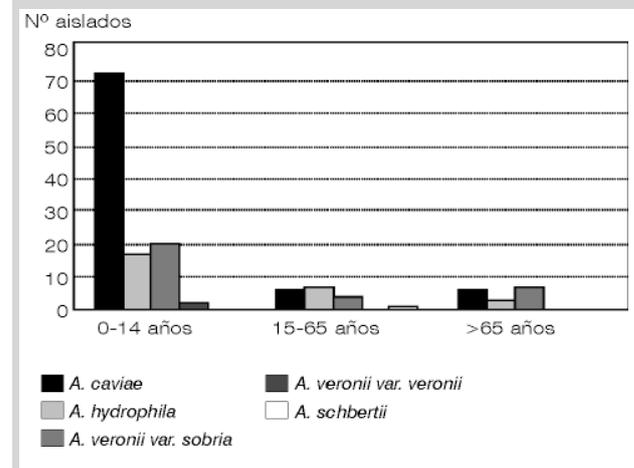


Figura 2. Aislamientos por especies de *Aeromonas* en función del grupo de edad

Tabla 2. Muestras aisladas por año y medio de cultivo

	1999-2001	2002	2003	2004
ASA	37	11 (33,34%)	5 (12,3%)	4 (8,33)%
CIN	-	14 (42,42 %)	28 (70,2%)	33 (68,75)%
ASA+ CIN	-	8 (24,24%)	7 (17,5%)	11 (22,92)%
Total	37 (24,34%)	33 (21,71%)	40 (26,31%)	48 (31,57)%

hydrophila y *A. veronii* bv. *sobria* en más del 85% de los aislamientos en diarreas¹⁴, en nuestro estudio estas especies se han presentado como único aislado en el 99% de los casos.

Otras especies también se han descrito asociadas a procesos diarreicos³ como *A. trota*, *A. jandaei*, *A. veronii* bv. *veronii*, esta última especie sólo la hemos encontrado en un caso como único aislado. Las demás especies se han recuperado acompañadas de otros patógenos lo que hace difícil asignarles valor etiológico en la diarrea y en el caso de *A. trota* no la hemos aislado.

La recuperación de *Aeromonas* spp. se vio incrementada al modificar las técnicas de aislamiento a partir marzo del año 2002, año en el que se introdujo la incubación de CIN a T⁸ ambiente durante 48 horas¹⁵. Este hecho puede deberse a la existencia de un 5% de cepas β hemolíticas y a las cepas sensibles a ampicilina, que no podrían ser recuperadas en agar sangre ampicilina. Este medio tiene el problema de no detectar la presencia de citocromo-oxidasa directamente de las colonias. El medio idóneo para el aislamiento de *Aeromonas* es la fórmula modificada de la forma original, lo que se ha descrito como CIN II, es decir el que contiene 4 microgramos /ml de cefsulidina en vez de 15 microgramos /ml debido a que esta concentración tan elevada parece inhibir el crecimiento de un porcentaje de cepas, a pesar de ello con el CIN I se ha recuperado un porcentaje de hasta el 70% en tasa de aislamiento en un año, estos resultados hacen recomendable su uso y para obtener un óptimo aislamiento es necesario combinar agar sangre ampicilina y CIN. La temperatura de incubación debe realizarse a 25-30°C debido a la diferencia sensibilidad antibiótica según la temperatura. En incubación durante 48 horas permite la recuperación de *Yersinia* sp en el mismo medio.

La mayoría de las cepas estudiadas conservan la sensibilidad a ciprofloxacino y en menor medida a amoxicilina ácido clavulánico como en un trabajo recientemente publicado en nuestro entorno geográfico¹⁶. La resistencia a la amoxicilina es una característica de las *Aeromonas*, salvo de *A. trota* lo que

hace necesario para recuperarla utilizar medios sin ampicilina. Se ha descrito en India un descenso de la susceptibilidad a quinolonas¹², con perfiles de multi-resistencia y en Asia a cotrimoxazol, cefalosporinas de tercera generación e imipenem¹⁷ pudiendo ser una importante amenaza a la hora de tratar la patología asociada a *Aeromonas* spp.

Estos microorganismos poseen diferentes factores de virulencia, enterotoxinas, endotoxinas, citotoxinas, hemolisinas, factores de adherencia¹⁸; la unión de estos factores con la producción de diarrea no ha sido claramente demostrada. Se ha caracterizado una enterotoxina citotónica termolabil (Alt) otra enterotoxina citotónica termoestable (Ast) y una enterotoxina citotóxica (Act)¹⁹. La presencia de las tres enterotoxinas en diferentes combinaciones en cada cepa de *Aeromonas* podría dictar la severidad de la diarrea¹⁹.

Las observaciones clínicas relacionadas con la diarrea por *Aeromonas* se presentaron como diarrea aguda en todos los grupos de edad, siendo mayoritaria en niños de 7-12 meses, seguido de los de 2-7 años y del de mayores de 65 años.

El mayor número de aislamientos tanto en el área infantil como en la población adulta corresponde al área de urgencias, tratándose por lo general de episodios diarreicos de corta duración y evolución favorable. Dentro del hospital infantil hay que destacar los procedentes de servicios de hematología, gastroenterología y cardiología por tratarse de niños inmunodeprimidos o con alteraciones hepáticas, asociación que se ha comprobado en otros estudios¹⁰ al igual que en los enfermos adultos remitidos desde los servicios de medicina interna y oncología, con enfermedades de base que predisponen a la infección por *Aeromonas*²⁰. En ningún caso se asoció a bacteriemia y en estos enfermos con evolución más tórpida, en los que fue necesaria la terapia antibiótica, la evolución final fue favorable.

Sería deseable conocer los genes de patogenicidad de cada aislamiento pero en la actualidad no se dispone de métodos moleculares al alcance de todos para la detección de los mismos.

El aislamiento de *Aeromonas* como único agente en las heces diarreicas, adquiere significado clínico junto a la clínica de diarrea y una posible enfermedad de base.

Es importante incluir el estudio de estos patógenos con más de un medio en heces diarreicas, sobre todo en neonatos, trasplantados, enfermos oncológicos y hepáticos, en los que puede existir la posibilidad de desarrollar bacteriemia con posibles focos secundarios de infección que habría que tratar. Todas estas circunstancias hacen necesario el estudio de la sensibilidad de los aislados y conocer la distribución epidemiológica de las resistencias en *Aeromonas* spp.

Bibliografía

1. Abbot SL. *Aeromonas*. En: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Washington YR (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, 2003:701-5.
2. Miñana-Galbis D, Farfán M, Lorén JG, Fusté MC. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated environmental and clinical samples in Spain. *J Appl Microbiol* 2002;93:420-30.
3. Alweegg M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Washington YR (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology 1999:507-16.
4. Holmberg SD, Farmer JJ3rd. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections. *Rev Infect Dis* 1984;6:633-9.
5. Altwegg M, Geiss HK. *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit Rev Microbiol* 1989;16:253-86.
6. Freji BJ. *Aeromonas*: biology of the organism and disease in children. *Pediatric Infect Dis J* 1974;3:164-75.
7. Millership SE, Curnow SR. Faecal carriage rate of *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Pathol* 1983;36:920-3.
8. Moyer NP. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1987;11:2044-8.
9. Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II: A flexible Key for Identifying Clinical *Aeromonas* Species. *J Clin Microbiol* 1991;29:2843-9.
10. Janda, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998;27:332-4.

11. Abbott SL, Cheung WK, Janda JM. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *J Clin Microbiol* 2003;41:2348-57.
12. Sinha S, Shimada T, Rammurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Takeda Y Balakrish. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India Nair. *J Med Microbiol* 2004;53:527-34.
13. Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, Kuhn I, Rahman M, Faruque ASG, Islam MS, Sack RB, Molby R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol* 2000;38:3785-90.
14. Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:397-410.
15. Altorfer R, Altwegg M, Zollinger-Iten J, Graevenitz AV. Growth of *Aeromonas* spp. on cefsulodin-irgasan-novobiocin agar selective for *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1985;22:478-80.
16. Tena D, González-Praetorius A, Gimeno C, Pérez-Pomata MT, Bisquert J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 36 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:235-41.
17. Ko Wc, Yu KW, Liu CY, Huang CT, Leu HS, Chuang YC. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1260-2.
18. ThorneyJP, Shaw JG, Gryllos IA, Eley A. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species: evidence for pathogenicity. *Rev Med Microbiol* 1997;8:61-72.
19. Sha J, Kozlova EV, Chopra AK. Role of various enterotoxin in *Aeromonas hydrophila* -induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun* 2002;70:1924-35.
20. Clark N M, Chenoweth CE. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 case and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2003;37:506-13.