

## Prevalencia de *Aeromonas* spp. en agua de superficie

Pilar Hernández S<sup>1</sup> y Raquel Rodríguez de García<sup>2</sup>

Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Apto 40109, Caracas 1040, Venezuela.

**RESUMEN.** Evidencias microbiológicas, clínicas, inmunológicas y epidemiológicas han demostrado la enteropatogenicidad de algunas cepas de *Aeromonas*. La principal fuente de infección es el agua y estos microorganismos han sido hallados virtualmente en todos los ambientes acuáticos. Adicionalmente, algunas *Aeromonas*, incluyendo las cepas enterotoxigénicas, son capaces de crecer rápidamente a temperatura de 5° C y aun de producir toxinas. Los productos vegetales regados con aguas contaminadas pueden alcanzar niveles críticos de *Aeromonas* después de ser mantenidos bajo refrigeración, y constituyen así un riesgo para la salud pública al ser consumidos sin cocción en forma de ensaladas. Se realizó el presente estudio con el propósito de evaluar este riesgo. Las muestras de agua de superficie fueron sembradas en placas de agar ampicilina almidón y de agar inositol-verde brillante-sales biliares. 100 ml de cada muestra fueron filtrados a través de una membrana Milipore de 0.45 µm. Los filtros fueron colocados en agua peptonada alcalina como medio de enriquecimiento durante 24h a 35°C. Un asa impregnada con el enriquecimiento fue utilizada para el aislamiento en superficie de los agares selectivos mencionados. Las colonias presuntivas fueron identificadas mediante el sistema API 20E. El nivel de prevalencia de *Aeromonas* en las muestras analizadas fue del 17.8%. Se observó una mayor frecuencia de aislamiento cuando se empleaba la técnica de enriquecimiento. *A. Veronii* biotipo *sobria*. (anteriormente *A. sobria*) fue la especie más frecuentemente hallada. Debido a que esta especie ha estado asociada con la mayor virulencia, el uso de agua contaminada para el riego de los productos vegetales que van a ser conservados bajo refrigeración y consumidos crudos puede representar un riesgo para la salud pública.

**PALABRAS CLAVE:** aguas de superficie, *Aeromonas*, productos vegetales.

### INTRODUCCION

Los resultados de investigaciones microbiológicas, clínicas, inmunológicas y epidemiológicas han permitido establecer la enteropatogenicidad de algunas cepas de *Aeromonas* (1-4).

Estos microorganismos están asociados con casos de gastroenteritis en infantes menores de dos años, en ancianos y en pacientes inmunocomprometidos. Se han aislado principalmente en ambientes acuáticos y se ha atribuido el origen de algunas infecciones al consumo de agua contaminada (5-9). En Australia, los niveles del orden de 10<sup>2</sup> por 100 ml han estado relacionados con un aumento en los casos de gastroenteritis asociados con *Aeromonas* durante los meses de verano (6). Algunas especies de *Aeromonas* móviles presentan la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración, de allí que una baja población en un alimento conservado bajo esta forma durante varios días puede alcanzar niveles

**SUMMARY. Prevalence of *Aeromonas* spp. in surface water.** Some *Aeromonas* strains are well recognized enteropathogens according to microbiological, clinical, immunological and epidemiological evidence. The main source of infection seems to be untreated water, these microorganisms can be found in virtually all aquatic environments. Additionally, some *Aeromonas*, which include enterotoxigenic strains, are capable of rapid growth at 5°C and even of producing toxins. Vegetable products irrigated with contaminated water may reach critical *Aeromonas* levels after being kept under refrigeration, this could represent a public health risk when they are consumed as uncooked salads. This study was pursued to evaluate such risk. Surface water samples were streaked on starch ampicillin and inositol-brilliant green-bile salts agar dishes. In addition, 100 ml of each sample were filtered through a 0.45 µm Millipore membrane filter. The filters were incubated on alkaline peptone water as enrichment media during 24h at 35°C. Enrichment broth was then streaked on the selective agars above mentioned. Isolates from both tests were identified using the API 20 E System. The prevalence of *Aeromonas* strains in the analyzed samples was 17.8%. A higher isolation rate was observed after the enrichment technique. Starch ampicillin agar showed a higher recuperation rate. *A. veronii* biotype *sobria* (formerly *A. sobria*) was isolated with higher frequency. Since this species has been associated with the greatest virulence, the use of contaminated water to irrigate vegetable products that are to be kept under refrigeration and consumed without ulterior cooking may represent a risk to the public health.

**KEY WORDS:** Surface water, *Aeromonas*, vegetable produce.

críticos y producir enterotoxinas. Se ha descrito que las poblaciones de *Aeromonas* spp. normalmente presentes en los alimentos almacenados durante 7 a 10 días a temperaturas de 5°C pueden mostrar un aumento de población entre 10 y 100 veces mayor (10-13). De allí que la eventual utilización de aguas de riego contaminadas con estos microorganismos puede constituir un riesgo para la salud pública, especialmente si se considera que muchos alimentos de origen vegetal, almacenados bajo refrigeración, serán consumidos sin cocción ulterior bajo la forma de ensaladas.

Así mismo, las especies de *Aeromonas* han estado asociadas con infecciones extraintestinales tales como heridas infectadas (por contacto con aguas o con moluscos contaminados) septicemia, meningitis y bacteremia. Este tipo de infecciones ha sido observadas con mayor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos o con SIDA (1,10, 14).

1. Autor a quien puede dirigirse la correspondencia

En la ciudad de Caracas se ha observado un marcado incremento en la incidencia de *Aeromonas* spp aisladas en las heces de pacientes con diarrea acuosa profusa. Se estableció el presente estudio con el propósito de conocer el papel del agua como reservorio del microorganismo y vehículo de transmisión, identificar las especies aisladas y conocer el efecto estacional en su incidencia pues no se disponía de información previa.

## MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 49 muestras de agua tomadas de los diferentes reservorios con que cuenta la ciudad para abastecer sus estaciones de tratamiento. El análisis se realizó durante el período de transición de la estación de sequía a la estación de lluvia, época en la que se registran las máximas temperaturas en la ciudad de Caracas. Las muestras fueron captadas conforme a las recomendaciones establecidas en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (15) y analizadas el día de la toma.

Se procedió al aislamiento directo de la muestra, mediante un asa, en la superficie de placas de agar ampicilina-almidón (AA) (16) y de agar inositol-sales biliares-verde brillante (IBB) (17). En forma paralela, 100 ml de cada muestra fueron filtrados a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). La membrana se colocó en agua peptonada alcalina (pH 8.6), incubándose a 35°C durante 24 horas. Posteriormente, se aisló con un asa en la superficie de placas con los agares selectivos antes mencionados y todas las placas fueron incubadas a 35°C por 24 horas. En el agar AA, las colonias son de color amarillo miel rodeadas de un halo que corresponde a la hidrólisis del almidón y que se evidenciará mediante la adición de reactivo de Lugol. En el agar IBB, las colonias son incoloras.

De cada medio se escogieron colonias típicas que fueron transferidas a cuñas de agar nutritivo y una vez se comprobó su pureza y se apreciaron, mediante tinción de Gram, las características microscópicas típicas de *Aeromonas* spp., fueron caracterizadas mediante el sistema API 20E (bio Merieux S.A., Marcy l'Etoile, Francia). Se llevaron a cabo, en forma paralela, controles positivos y negativos. Los cultivos de referencia fueron suministrados por el Dr. Carlos Abeyta del U.S. Food and Drug Administration Seafood Products Research Center, Bothell, Washington, USA y por la Colección Española de Cultivos, Departamento de Microbiología, Valencia, España.

Se utilizó la prueba de Fisher para la evaluación estadística del efecto estacional ( $p < 0.05$ )

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los resultados de la incidencia de *Aeromonas* spp en las muestras analizadas por período. En la tabla 2 se muestra la distribución de las especies caracterizadas. La incidencia promedio fue de 17.8%

TABLA 1  
Incidencia de *Aeromonas* spp en las muestras analizadas por período

| Período    | % Positivo |
|------------|------------|
| Marzo      | 13.3       |
| Abril/Mayo | 26.7       |
| Junio      | 13.3       |

TABLA 2  
Distribución de las especies *Aeromonas* caracterizadas

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| <i>Aeromonas sobria</i>     | 62.50% |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 12.50% |
| <i>Aeromonas</i> spp.       | 25.00% |

Una mayor tasa de recuperación fue observada en el agar AA mostrando de esta forma que su efectividad para el aislamiento de *Aeromonas* spp en muestras ambientales es equiparable a la observada en alimentos. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (18).

Así mismo, se observó una mayor frecuencia de aislamiento cuando se utilizó la técnica de enriquecimiento. Esto debido a que, a diferencia de las muestras clínicas, las poblaciones del microorganismo son usualmente bajas en las muestras de agua y de alimentos y debe competir con la microflora acompañante, viéndose así su recuperación favorecida mediante la utilización del agua peptonada alcalina, resultados que concuerdan con los ya observados por otros investigadores (19,20)

Se apreció una mayor incidencia durante el período de instalación de la estación de lluvia, período en que se registran las temperaturas máximas y aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), los resultados coinciden con la tendencia observada en otro estudio (21) en el que también señala una mayor frecuencia de aislamiento durante los meses cálidos.

En la Tabla 2 se muestra la distribución de las especies de *Aeromonas* caracterizadas. Las cepas de *Aeromonas veronii* presentaron reacciones de Voges-Proskauer y lisina decarboxilasa positivas, resultados estos que se han relacionado con la patogenicidad de las cepas (22). *Aeromonas veronii* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia, resultados similares fueron obtenidos por otros autores en muestras ambientales de Costa Rica y Australia (23, 24).

Así mismo, se ha observado que es la especie que se ha visto más frecuentemente asociada con gastroenteritis (25-30) y es la que ha estado involucrada con la aparición de los síntomas más severos (27, 3) es mucho más invasiva que *Aeromonas hydrophila* (30,31) y ha estado más frecuentemente asociada con bacteremia.

Los resultados obtenidos indican que las aguas de superficie pueden constituir un importante reservorio de *Aeromonas*, especialmente de las especies potencialmente patógenas y que su consumo sin tratamiento, utilización con fines

recreacionales, o utilización como agua de riego particularmente en aquellos alimentos que son almacenados bajo refrigeración y se consumen sin previa cocción, pueden constituir un riesgo potencial para la salud pública especialmente para los segmentos de población señalados como particularmente sensibles.

### RECONOCIMIENTO

El presente trabajo fue financiado por el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Se agradece la colaboración del personal de la Planta Experimental de Tratamiento de Agua de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Central de Venezuela por su valioso aporte en la captación de las muestras.

### REFERENCIAS

1. Altwegg, M., and H.K. Geiss. *Aeromonas* as a human pathogen. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 16: 253-286, 1989.
2. Kuijper, E., L. Van Alpen, M.F. Peters, and D.J. Brenner. Human serum antibody response to the presence of *Aeromonas* spp in the intestinal tract. *J. Clin. Microbiol.* 28: 584-590, 1990.
3. Janda, J.M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 397-410, 1991.
4. Jiang, Z.D., A.C. Nelson, J.J. Mathewson, C.D. Ericson, and H.L. Dupont. Intestinal secretory immune response to infection with *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* among students from the United States in México. *J. Infect. Dis.* 164: 979-982, 1991.
5. Le Chevalier, M.W., T.M. Evans, R.J. Seidler, O.P. Daily, B.R. Merrell, D.M. Rollins, and S.W. Joseph. *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supplies. *Microb. Ecol.* 8: 325-333, 1982.
6. Burke, V., J. Robinson, M. Gracey, D. Peterson, and K. Partridge. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 361-366, 1984.
7. Hazen, T.C., C.B. Fliermans, R.P. Hirsch, and G.W. Esch. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 731-738, 1978.
8. Abeyta C., and M.M. Wekell. Potential sources of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Safety* 9: 11-22, 1988.
9. Schubert, R.H. *Aeromonas* and their significance as potential pathogen in water. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 20: 131S-135S, 1991.
10. Palumbo, S.A., C. Abeyta, and G. Stelma. *Aeromonas hydrophila* group. En: *Compendium of Methods for the microbiological Examination of Foods.* C. Vanderzant and D.F. Splittstoesser (Ed.). American Public Health Association, Washington, D.C. 1992, p. 479-515.
11. Callister, S.M. and W.A. Agger. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:249-253, 1987.
12. Berrang, M.E., R.E. Brackett, and L.R. Beuchat. Growth of *Aeromonas hydrophila*, on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2167-2171, 1989.
13. Kirov, S.M. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int. J. Food. Microbiol.* 20:179-198, 1993.
14. Rolston, K.V.I., S.E. Zandvliet, S. Rodríguez, H.T. Nguyen, and G.P. Bodey. Species of *Aeromonas* and *Plesiomonas* infections in patients with cancer and AIDS. *Experientia.* 47: 437-439, 1991.
15. American Public Health Association. *Standard Methods for the examination of water and wastewater.* Washington, D.C., the Association, 1985.
16. Palumbo, S.A., F. Maximo, A.C. Williams, R.L. Buchanam, and D.W. Thayer. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1027-1030, 1985.
17. Schubert, R.H.W. Ueber den Nachweis von *Plesiomonas shigelloides* Habs und Schubert, 1962, und ein Elektivmedium, den Inositol-Brillantgrün-Gallesaltz-Agar. *E. Rodenwaldt-Arch.* 4: 97-103, 1977.
18. Jeppesen, Claus. Media for *Aeromonas* spp. *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp from food and environment. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 25-41, 1995.
19. von Graevenitz, A. and C. Bucher. Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp. from human faeces. *J. Clin. Microbiol.* 17:16-21, 1983.
20. Freund, S.M., J.A. Koburger, and C.I. Wei. Enhanced recovery of *Plesiomonas shigelloides* following an enrichment technique. *J. Food Protect.* 51: 110-112, 1988.
21. Wilcox, M.H., A.M. Cook, A. Eley, and R.C. Spencer. *Aeromonas* spp as potential cause of diarrhea in children. *J. Clin. Pathol.* 45: 959-963, 1992.
22. Burke, V., J. Robinson, J. Beaman, M. Gracey, M. Lesmana, R. Rockhill, P. Echevarria and J.M. Janda. Correlation of enterotoxicity with biotype in *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1196-1200, 1983.
23. Rodríguez, E. y F. Antillón. *Aeromonas* spp y *Plesiomonas shigelloides* en bivalvos, cieno y aguas del Golfo Nicoya, Costa, Rica. *Rev. Biol. Trop.* 37: 69-74, 1989.
24. Cahill, M.M. and I.C. Mac Rae. Characteristics of O/129 sensitive motile *Aeromonas* strains isolated from freshwater on starch ampicillin agar. *Microb. Ecol.* 24: 215-226, 1992.
25. Daily, O.P., S.W. Joseph, J.C. Coolbaugh, R.I. Walker, B.R. Merrel, D.M. Rollins R.J. Seidler, R.R. Colwell, and C.R. Lissner. Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *J. Clin. Microbiol.* 13: 769-777, 1981.
26. Kirov, S.M., B. Rees, R.C. Welloock, J.M. Goldsmid and A.D. Van Galen. Virulence characteristics of *Aeromonas* spp in relation to source and biotype. *J. Clin. Microbiol.* 24: 827-834, 1986.
27. Carrello, A., K.A. Silburn, J.R. Budden and B.J. Chang. Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HE-p-2 cells. *J. Med. Microbiol.* 26: 19-27, 1988.
28. Kirov, S.M. and L.J. Hayward. Virulence traits of *Aeromonas* in relation to species and geographic region. *Aust. J. Med. Sci.* 14: 54-58, 1993.
29. Havelar, A.H., F.M. Schets, A. van Silfhout, W.H. Jansse, G. Wieten, and D. van der Kooij. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 72:435-444, 1992.
30. Watson, I.M., J. Robinson, V. Burke, and M. Gracey. Invasiveness of *Aeromonas* spp in relation to biotype, virulence factors and clinical features. *J. Clin. Microbiol.* 22: 48-51, 1985.
31. Gray, S.J., D.J. Sticker and T.N. Bryant. The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from farm animals and their environment. *Epidemiol. Infect.* 105:277-294, 1990.

Recibido: 21-02-1996

Aceptado: 15-10-1996