

Aeromonas spp. y *Plesiomonas shigelloides* en bivalvos, cieno y aguas del Golfo de Nicoya, Costa Rica.

Evelyn Rodríguez y Florencia Antillón G.

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

(Rec. 19-IX-1988. Acep. 22-XI-1988)

Abstract: Bivalves, mud, and surface water were collected at three different sites of the Gulf of Nicoya, Costa Rica, in search of *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides*. For their isolation, these bacteria were enriched in alkaline peptone water and streaked on MacConkey agar and on brilliant green bile inositol agar. This was followed by the biochemical tests necessary for their identification. Thirty-five strains of *A. hydrophila*, 58 of *A. caviae*, 43 of *A. sobria*, and 7 of *P. shigelloides* were isolated. None of these predominated nor was there any indication of a seasonal distribution along the 15 month's duration of the study. Seven strains of *A. hydrophila* and two of *A. sobria* showed the biochemical characteristics associated with toxin production (positive Voges-Proskauer and lysine decarboxylase tests). These species are widely distributed in the gulf and there is risk of contracting an infection while bathing or when eating raw bivalves from this area.

Aeromonas hydrophila, *A. sobria*, *A. caviae* y *Plesiomonas shigelloides* son bacterias de origen acuático (Hazen *et al.* 1978, von Graevenitz 1985) que han sido aisladas de diversos animales, suelo, vegetales, leche cruda y otros alimentos (Arai *et al.* 1980, Callister & Agger 1987, Buchanan & Palumbo 1985).

En áreas tropicales y subtropicales, estas bacterias han sido implicadas repetidamente como los agentes causales de gastroenteritis, lesiones ulcerativas en piel, otitis, celulitis y septicemias (Tsukamoto *et al.* 1978, Settergren, Broholm & Norrby 1986, Burke *et al.* 1983, Daily *et al.* 1981, Pathak, Custer & Levy 1983). Las infecciones se han adquirido principalmente por exposición a las aguas (Popoff 1984, Seidler *et al.* 1980) o mediante la ingestión de alimentos y aguas contaminados con estos microorganismos (Burke *et al.* 1984, Moyer 1987, Buchanan & Palumbo 1985, Turnbull *et al.* 1984).

En Costa Rica se ha encontrado *A. hydrophila* causando infecciones intestinales y extraintestinales (Herrera *et al.* 1984 y 1987); sin embargo, no hay estudios sobre la presencia de las especies de *Aeromonas* ni de *P. shigelloides* en el ambiente. Por esto creímos importante

proceder a su búsqueda en cieno, agua y bivalvos del Golfo de Nicoya, que ha recibido mala calificación sanitaria para sus aguas y para los bivalvos cosechados de su litoral (Fernández, Brunker & González 1971, Fernández & Brunker 1977, Fernández & Ryan 1983).

MATERIAL Y METODOS

Recolección y transporte de las muestras: se localizaron tres estaciones de muestreo en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, en sitios explotados en la recolección comercial de bivalvos de los géneros *Anadara*, *Dosinia* y *Tagellus*: Jicaral (85° 7.1' W; 9° 58.5' N), Lepanto (85° 2.1' W; 9° 57.7' N) y Puntarenas (84° 50.6' W; 9° 59.4' N).

Desde marzo de 1986 hasta mayo de 1987, cada semana se visitó una estación de muestreo diferente y, empleando recipientes de vidrio estériles para el agua y para el cieno y bolsas plásticas para los bivalvos, se obtuvo una muestra de 200 ml de agua tomada de los 30 cm superiores, una de cieno de aproximadamente 500 g y 25 ejemplares vivos. Todo el material se colocó de inmediato sobre hielo y en menos de

6 horas se le comenzó a procesar en nuestro laboratorio.

La estación de Jicaral se muestreó 14 veces, la de Lepanto 12 y la de Puntarenas 12, obteniéndose así un total de 38 muestras de agua, 38 de cieno y 51 de bivalvos, así: 12 muestras de *Anadara tuberculosa*, 15 de *A. similis*, 12 de *Dosinia* sp. y 12 de *Tagellus* sp.

Análisis bacteriológico: Siguiendo las indicaciones de Hunt *et al.* (1984), se lavaron escrupulosamente las conchas con agua y cepillo, se pusieron a secar sobre toallas de papel, se abrieron con ayuda de un cuchillo desinfectado y el contenido de cada una se vertió en la jarra de una licuadora hasta alcanzar un peso de entre 100 y 200 g. A esta muestra se adicionó suficiente agua peptonada al 0.5% para obtener una dilución 1:4 al homogenizarla en la licuadora durante 70 segundos. En forma semejante, en lo que corresponda, se procedió a diluir el cieno. De uno y otro material así diluido se tomaron porciones de 25 ml para sembrar volúmenes de 225 ml de agua peptonada alcalina pH 8.4, como medio de enriquecimiento (von Graevenitz, 1985). Las bacterias del agua se concentraron según el método de Seidler *et al.* (1980), mediante filtración de 100 ml de agua a través de una membrana con un poro de 0.45 μm (Millipore Corp., Bedford, Mass); que se colocó en un erlenmeyer conteniendo 225 ml de agua peptonada alcalina. Todo el material se incubó 24 horas a 35 C.

A partir de la película formada en cada uno de los cultivos anteriores se rayaron dos platos de agar MacConkey (BBL) y dos de agar Inositol Bilis Verde Brillante (IBB) preparado según von Graevenitz & Bucher (1983). Los platos se incubaron a 35 C por 18 horas. Las colonias típicas de *Aeromonas* y de *P. shigelloides* que aparecieron se picaron a agar sangre. La identificación posterior a partir de estas colonias se hizo con base en las siguientes pruebas: tinción de Gram, agar triple azúcar hierro, oxidasa, catalasa, movilidad, descarboxilasas de lisina, arginina y ornitina, hidrólisis de esculina y gelatina, Voges-Proskauer, fermentación de glucosa, inositol, manitol, salicina, arabinosa y xilosa, según los esquemas del "Manual of Clinical Microbiology" (von Graevenitz 1985) y los de "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Popoff 1984, Schubert 1984).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se encontró un total de 7 cepas de *P. shigelloides* y 136 del género *Aeromonas*. Una comparación de los aislamientos en los dos medios de cultivo empleados (MacConkey e IBB) se aprecia en la figura 1.

Excepto por *A. sobria*, donde el aislamiento fue significativamente mayor en agar IBB (65%) que en MacConkey (35%), los dos medios de cultivo resultaron ser adecuados para el aislamiento de *Aeromonas* spp. y *P. shigelloides*. Ya que ambos géneros presentan cepas tanto lactosa negativas como lactosa positivas, el valor diferencial del agar MacConkey no sólo se pierde sino que hace que el trabajo de selección de colonias sea más engorroso. Al igual que von Graevenitz & Bucher (1983), encontramos ventajoso el uso del agar IBB para el aislamiento de *P. shigelloides* y *Aeromonas* spp.

De las 136 cepas de *Aeromonas*, 43 (31.5%) correspondieron a *A. sobria*, 35 (26%) a *A. hydrophila* y 58 (42.5%) a *A. caviae*. Esto demuestra la necesidad de hacer una diferenciación hasta especie cuando se trabaja con bacterias del género *Aeromonas*, ya que *A. hydrophila* y *A. sobria* son las especies que con mayor frecuencia se asocian con problemas clínicos (Burke *et al.* 1983, Daily *et al.* 1981, Settergren, Broholm & Norrby 1986, Turnbull *et al.* 1984), en tanto que la patogenicidad de *A. caviae* no está todavía clara. Algunos investigadores como Alwegg & Johl (1987) han encontrado un mayor porcentaje de *A. caviae* en pacientes diarreicos, pero no se pronuncian sobre su significado clínico. Moyer (1987), a diferencia de los anteriores, ha demostrado que algunas cepas de *A. caviae* también aisladas de pacientes diarreicos son capaces de producir gastroenteritis.

Todas estas especies se encontraron en los tres sitios de muestreo y, de las 38 oportunidades en que se muestreó el Golfo, solamente en una no fue posible aislar uno o más de los patógenos buscados.

A diferencia de Daily *et al.* (1981), en los E.U., quienes encontraron una mayor cantidad de *A. hydrophila* que de *A. sobria* en muestras de variadas fuentes del ambiente, en este estudio se encontró mayor frecuencia de *A. sobria* en aguas y cieno, mientras que la mayor frecuencia de *A. hydrophila* se dio solamente en bivalvos (figura 2). La especie más comúnmente aislada fue *A. caviae*, que es precisamente

Fig. 1.

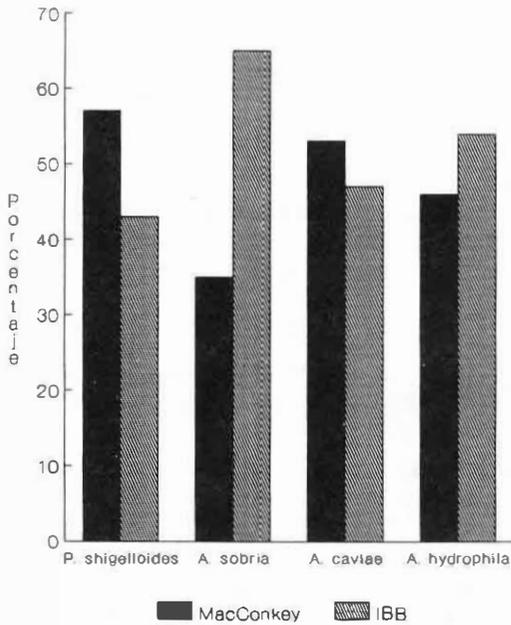


Fig. 2.

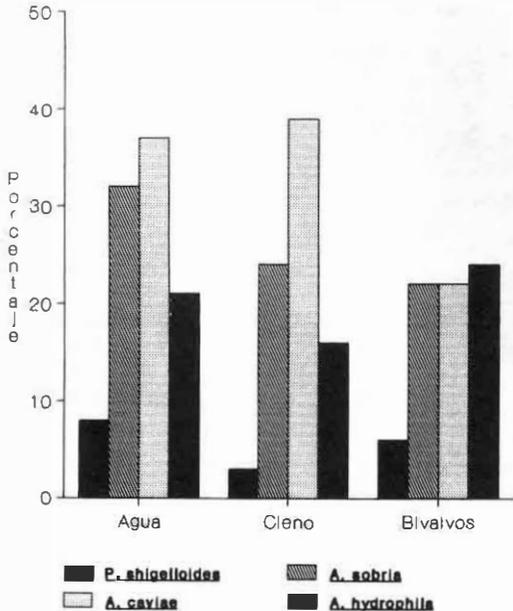


Fig. 1. Frecuencia de aislamientos de *P. shigelloides* y *Aeromonas* spp. según el medio de cultivo empleado.
 Fig. 2. Frecuencia de aislamiento de *P. shigelloides* y *Aeromonas* spp. según el tipo de muestra.

Fig. 3.

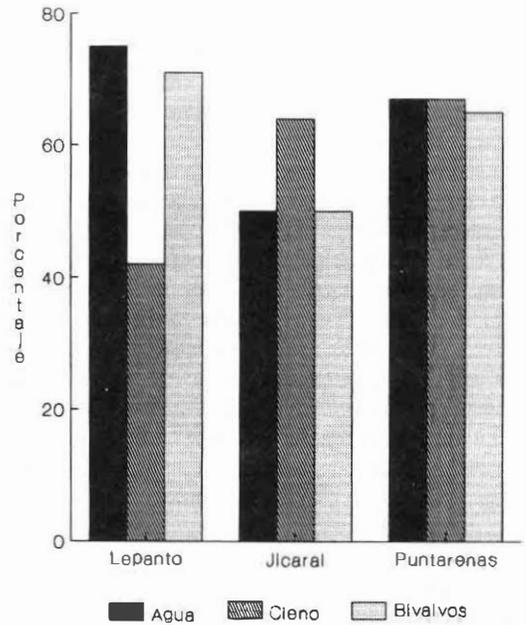


Fig. 3 Frecuencia de muestras positivas por uno o más de los microorganismos estudiados, según el sitio de muestreo y el tipo de muestra.

la que menos se ha relacionado con problemas clínicos (Altwegg & Johl 1987), por lo que podría pensarse que es un habitante normal de las aguas del Golfo. La limitada presencia de *P. shigelloides* está de acuerdo con lo encontrado por otros investigadores, quienes señalan la mala supervivencia de esta especie en ambientes marinos (von Graevenitz 1985).

Desde el punto de vista de salud pública nos interesó conocer cuál fue la frecuencia de muestras positivas por uno o más de los microorganismos estudiados, según la estación y tipo de muestra. Todos los sitios de muestreo presentan un riesgo potencial de infección (Fig. 3) si se piensa que muchos de los problemas causados por especies de *Aeromonas* y *P. shigelloides*, se asocian con la exposición a aguas contaminadas (Seidler *et al.* 1980, Settergren, Broholm & Norrby 1986). Además, son bien conocidos los problemas de gastroenteritis asociados con la ingestión de aguas y alimentos (bivalvos en este caso) que se encuentran contaminados con estos microorganismos (Buchanan & Palumbo 1985, Burke *et al.* 1984, Callister & Agger 1987, Moyer 1987). En Costa Rica se ha informado sobre tres pacientes que

presentaron infecciones de heridas después de bañarse en un río (Herrera *et al.* 1987).

A pesar de que Moyer (1987) encontró en un estudio de dos años mayor frecuencia de aislamientos de *Aeromonas* spp. en los meses de verano e invierno, en nuestro estudio no se dio tal distribución estacional ni con ese género ni con *P. shigelloides*.

Encontramos 7 cepas de *A. hydrophila* y 2 de *A. sobria* que dieron positivas las pruebas de Voges-Proskauer y descarboxilasa de la lisina, dos de las características bioquímicas que se han asociado con la producción de toxinas (Kirov *et al.* 1986). Según Turnbull *et al.* (1984) esto permite asegurar con un alto grado de confianza que estas cepas son toxigénicas. Sin embargo, no podríamos afirmar que los otros aislamientos de *Aeromonas* no sean patógenos, ya que en nuestro medio se han presentado al menos tres casos de enfermedad diarreica producidos por *A. hydrophila* Voges-Proskauer negativa (Herrera *et al.* 1984).

Nuestros datos revelan que las especies estudiadas se encuentran distribuidas en un ámbito amplio del Golfo de Nicoya y que existe el riesgo de contraer infección al bañarse en las playas aledañas o cuando se ingieren bivalvos crudos procedentes de dicha zona.

AGRADECIMIENTO

Los autores manifiestan su agradecimiento a Bernal Fernández, de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, por la revisión de este manuscrito y a María Laura Arias E. por su ayuda técnica. Proyecto No. 430-86-022, Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica.

RESUMEN

Se recolectaron muestras de bivalvos, cieno y aguas superficiales en tres sitios del Golfo de Nicoya, Costa Rica, con el propósito de determinar la presencia de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*. Para el aislamiento de estas bacterias las muestras se enriquecieron en agua peptonada alcalina y luego se sembraron en agar MacConkey y en agar inositol bilis verde brillante. Su identificación se completó con pruebas bioquímicas. Se aislaron 35 cepas de *A. hydrophila*, 58 de *A. caviae*, 43 de *A. sobria* y 7 de *P. shigelloides*. Ninguna de las especies predominó en los sitios muestreados ni se eviden-

ció patrón alguno en su distribución estacional a través de los 15 meses que duró el estudio. Siete cepas de *A. hydrophila* y dos de *A. sobria* presentaron las características bioquímicas que se han asociado con la producción de toxinas (Voges-Proskauer y descarboxilasa de la lisina positiva). Los datos revelan que las especies estudiadas se encuentran distribuidas en un amplio ámbito del Golfo de Nicoya y que existe el riesgo de contraer una infección al bañarse en las playas aledañas o cuando se ingieren bivalvos crudos procedentes de dicha zona.

REFERENCIAS

- Altwegg M. & M Johl. 1987. Isolation frequency of *Aeromonas* spp. in relation to patient's age. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: 55-56.
- Arai, T., N. Ikejima, T. Itoh, S. Sakai, T. Shimada & R. Sakazaki. 1980. A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets, and humans. J. Hyg. 84: 203-212.
- Buchanan, R.L. & S.A. Palumbo. 1985. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. J. Food Safety 7: 15-29.
- Burke V., M. Gracey, J. Robinson, D. Peck, J. Beaman & C. Bundell. 1983. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. J. Infect. Dis. 148: 68-74.
- Burke, V., J. Robinson, M. Gracey, D. Peterson & K. Partridge. 1984. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. Appl. Environ. Microbiol. 48: 361-366.
- Callister, S. & W. Agger. 1987. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store products. Appl. Environ. Microbiol. 53: 249-253.
- Daily, O.P., S.W. Joseph, J.C. Coolbaugh, R.I. Walter, B.R. Merrell, D.M. Rollins, R.J. Seidler, R.R. Colwell & C.R. Lissner. 1981. Association of *Aeromonas sobria* with human infection. J. Clin. Microbiol. 13: 769-777.
- Fernández, B. & T. Bruncker. 1977. Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica. I. Condición del molusco recién recolectado. Rev. Biol. Trop. 25: 101-107.
- Fernández, B., T. Bruncker & C. González. 1971. Calidad sanitaria de las aguas de la playa de Puntarenas. II. Primera recalificación. Acta Médica. Cost. 14: 91-100.
- Fernández, B. & K. Ryan. 1983. Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica. II.

- Condición del molusco al momento de comercio. *Rev. Biol. Trop.* 31: 311-316.
- Hazen, T.C., C.B. Fliermans, R.P. Hirsch & G.H. Esch. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 731-738.
- Herrera, M.L., J. Guevara, J.L. Salas y C. Lizano, 1987. Aislamiento extraintestinal de *Aeromonas hydrophila* en Costa Rica. *Rev. Med. Hosp. Nal. de Niños Costa Rica.* 1: 29-34.
- Hunt D., J. Miescier, J. Redman, A. Salinger & J. Lucas. 1984. Molluscan shellfish, fresh or freshfrozen oysters, mussels, or clams. p. 590-607. *In* M. Speck (ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Second ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Kirov S.M., E. Rees, R.C. Wellock, J.M. Goldsmid & A.D. Galen. 1986. Virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in relation to source and biotype. *J. Clin. Microbiol.* 24: 827-834.
- Moyer, N.P. 1987. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2044-2048.
- Pathak, A., J.R. Custer & J. Leuy. 1983. Neonatal septicemia and meningitis due to *Plesiomonas shigelloides*. *Pediatrics* 71: 389-391.
- Popoff, M. 1984. *Aeromonas*. p. 545-548. *In* N.R. Krieg & J.G. Holt (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams Wilkins Co. Baltimore.
- San Joaquín, V.H. & D.A. Pickett. 1988. *Aeromonas* associated gastroenteritis in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7: 53-57.
- Schubert, R. 1984. *Plesiomonas*, p. 548-550. *In* N.R. Krieg & J.G. Holt (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams Wilkins Co., Baltimore.
- Seidler, R.J., D.A. Allen, H. Lockman, R.R. Colwell, S.W. Joseph & O.P. Daily. 1980. Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1010-1018.
- Settergren, B., K.A. Broholm & S. Norrby. 1986. Fatal infection with *Aeromonas sobria* and *Plesiomonas shigelloides*. *Br. Med. J.* 292: 525-526.
- Tsukamoto, T., Y. Kinoshita, T. Shimada & R. Sakazaki. 1978. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. *J. Hyg.* 80: 275-280.
- Turnbull, P., J. Lee, M.D. Miliotis, S. Van De Walle, H.J. Koornhof, L. Jeffery & T. Bryant. 1984. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* 19: 175-180.
- Von Graevenitz, A. 1985. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. p. 278-281. *In* E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, and H.J. Shadomy (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. Fourth ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Von Graevenitz, A. & C. Bucher. 1983. Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp. from human feces. *J. Clin. Microbiol.* 17: 16-21.