

Novo meio seletivo-indicador para detecção de *Aeromonas* e *Plesiomonas*: ágar UNISC

New selective indicator medium for detection of *Aeromonas* and *Plesiomonas*: UNISC agar

Marion Pereira da Rocha¹, Liliane A. Scheid² e Sydney Hartz Alves²

RESUMO

Avaliou-se um novo meio seletivo-indicador (ágar UNISC) para o isolamento de enteropatógenos clássicos e *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides*. A capacidade de fermentação da xilose é indicada pela coloração amarela (fermentadores) ou azul (não fermentadores) que, aliada à prova da oxidase, constitui-se em indicador para a detecção de *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides*. A produtividade e seletividade, avaliadas pelos índice de contagem absoluta e índice de contagem relativa indicam-no como uma alternativa aos coprocultivos clássicos porque permite, num só meio, o isolamento de *Escherichia coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, bem como, *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides*, favorecendo o diagnóstico laboratorial das gastroenterites.

Palavras-chaves: *Aeromonas*. *Plesiomonas*. Coprocultivo. Meio de cultura.

ABSTRACT

We evaluated a new selective indicator medium (UNISC Agar) for isolation of classical enteropathogens, *Aeromonas* spp and *Plesiomonas shigelloides*. The xylose fermentation capacity is indicated by a yellow color (fermenting agents) or blue (no fermenting agent). This, together with the oxidase test, establishes it as an indicator for detecting *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides*. Its productivity and selectivity, as assessed using the absolute count index and relative count index, indicate it as an alternative to the classical feces culturing media. This is because, in a single medium, it enables isolation of *Escherichia coli*, *Shigella* spp and *Salmonella* spp, in addition to *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides*, thereby favoring the laboratory diagnosis of gastroenteritis.

Key-words: *Aeromonas*. *Plesiomonas*. Feces culture. Culture medium.

O diagnóstico laboratorial das gastroenterites causadas por *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* é dependente do emprego de meios de cultura específicos para seu isolamento. O ágar MacConkey e o ágar *Salmonella-Shigella* (SS) ou similares, são rotineiramente utilizados nos coprocultivos e, nestas condições, a detecção de *Aeromonas* spp e *Plesiomona shigelloides* fica comprometida^{8 10}.

O presente estudo foi objetivado a avaliar um novo meio seletivo-indicador capaz de detectar os enteropatógenos clássicos e, ainda, *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides*. O meio proposto (ágar UNISC) homenageia a Universidade de Santa Cruz do Sul (Santa Cruz do Sul, RS) onde o mesmo foi idealizado.

Um total de 30 isolados de *Aeromonas hydrophila* e 30 de *Plesiomonas shigelloides* foram estudados. O estudo também

incluiu *Escherichia coli* (n^o = 12), *Pseudomonas aeruginosa* (n^o = 5), *Proteus mirabilis* (n^o = 10), *Klebsiella pneumoniae* (n^o = 15), *Enterobacter* spp (n^o = 10), *Salmonella* spp (n^o = 12), *Shigella flexneri* (n^o = 8), *Shigella sonnei* (n^o = 5), *Edwardsiella tarda* (n^o = 1) e *Enterococcus faecalis* (n^o = 5) *Pseudomonas aeruginosa* (n^o = 5). A identificação destes isolados foi previamente realizada de acordo com Altweeg, 1999⁵. Como controle de qualidade incluiu-se: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Plesiomonas shigelloides* ATCC 14029, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os isolados foram obtidos no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria.

1. Universidade de Santa Cruz. Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. 2. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Endereço para correspondência: Prof. Sydney Hartz Alves. Rua Andradas 1985/201, 97010-033 Santa Maria, RS.

Telefax: 55 55 3220-8906

e-mail: hartzsa@smail.ufsm.br

Recebido para publicação em 14/01/2008

Aceito em 29/07/2008

A composição do meio proposto (ágar UNISC) incluiu: a) Base: peptona bacteriológica* 5g, extrato de carne* 3g, azul de bromotimol* 0,03g, cristal violeta* 0,001g, L-cistina* 0,13g, ágar bacteriológico* 13g e 900ml de água destilada. Volumes de 180ml do meio base fundido eram distribuídos em erlenmeyers e, a seguir, autoclavados. A base era conservada a 4°C.; b) inclusão da D(+) xilose* 10%: 10g de xilose era solubilizada em volumes de 100ml de água destilada, esterilizada por filtração (membrana millipore 0,22µm) e aliqüotada em volumes de 20ml, sendo conservada em freezer. O meio final era obtido pela inclusão de 20ml da solução de xilose 10% a 180ml da base estéril e fundida; após rápida homogeneização, o meio era distribuído em placas de Petri. O pH final do meio é de 7,2 ± 0,2. Para a avaliação do comportamento das bactérias intestinais no ágar UNISC, os microrganismos eram, inicialmente, semeados no ágar MacConkey e, após 24h de incubação a 35°C, suspensões eram preparadas para a obtenção de inóculos contendo 1 x 10⁴ células/mL em solução fisiológica. *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* eram semeados em ágar sangue e, deste, obtinha-se as suspensões como para os demais microrganismos. A seguir, volumes de 10µL de cada suspensão bacteriana eram semeados por esgotamento no ágar UNISC, e as placas incubadas a 35°C durante 24 h. Para avaliação da produtividade e seletividade empregou-se os índice de crescimento absoluto (ICA) e índice de crescimento relativo (ICR): a partir da avaliação do crescimento bacteriano, no Método Ecométrico¹¹, determinou-se o ICA para o ágar UNISC e para o ágar BHI. Cultivos de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Plesiomonas shigelloides* ATCC 14029, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella setubal* ATCC 19196 e *Shigella flexneri* (isolado clínico) foram empregados. O índice de crescimento relativo representa o quociente entre o ICA no meio de referência (ágar BHI) pelo ICA no meio proposto (ágar UNISC). O isolamento de *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* era realizado a partir de material fecal onde suspensões de enteropatógenos contendo 1 x 10⁴ células/mL eram artificialmente contaminadas com pequena porção de fezes humanas normais (submetidas a coprocultivo convencional) e semeadas (10µL) no ágar UNISC. Após 24h de incubação a 35°C os diferentes tipos coloniais eram avaliados. A Reação da oxidase foi empregada para detecção do sistema citocromo oxidase⁹.

As características fenotípicas das colônias bacterianas após 24 horas de incubação no ágar UNISC foram: amarelas para os microrganismos fermentadores da xilose e azuis para os não fermentadores deste carboidrato. Os crescimentos de *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Edwardsiella tarda*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram-se como colônias azuis devido a não fermentação da xilose. Por outro lado, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp evidenciaram colônias amarelas devido a fermentação da xilose.

A produtividade e seletividade do ágar UNISC foi estimada com base na determinação do ICA e do ICR: *Aeromonas hydrophila*

ATCC 7966 (ICA no BHI= 4,0; ICA no ágar UNISC =3,8; ICR= 0,95); *Aeromonas caviae* ATCC 15468 (ICA no BHI= 4,0; ICA no ágar UNISC = 3,8; ICR= 0,95); *Plesiomonas shigelloides* ATCC 14029 (ICA no BHI= 4,0; ICA no ágar UNISC= 3,6; ICR= 0,90); *Salmonella setubal* ATCC (ICA no BHI= 5,0; ICA no ágar UNISC = 4,0; ICR= 0,80); *Escherichia coli* ATCC 25922 (ICA no BHI = 5,0; ICA no ágar UNISC = 3,8; ICR= 0,76); *Shigella flexneri* (ICA no BHI= 4,0; ICA no ágar UNISC= 3,8; ICR= 0,95). *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* não se desenvolveram na superfície do ágar UNISC devido a ação inibitória do cristal violeta sobre microrganismos Gram positivos. Os cultivos das suspensões contaminadas com material fecal contendo duas espécies resultaram bem diferenciados quando a combinação envolvia fermentador/não fermentador. Quando a combinação, era com dois não fermentadores (ex: *Proteus mirabilis* e *Aeromonas hydrophila*) a prova da oxidase só era positiva para *Aeromonas* spp, o mesmo ocorrendo quando se empregava *Plesiomonas shigelloides*. No ágar UNISC *Pseudomonas aeruginosa* (colônias azuis) foi, como no Mac Conkey, de fácil suspeição. O ágar UNISC fundamenta-se na incapacidade dos gêneros *Aeromonas* e *Plesiomonas* em fermentar a xilose; isto se constitui numa vantagem por ocasião da prova da oxidase, pois, não havendo queda do pH (ausência de formação de ácidos pela fermentação) *Aeromonas* e *Plesiomonas* evidenciam positividade a esta prova¹ sendo esta, um dos critérios fenotípicos essenciais nos fluxogramas de identificação de bacilos Gram negativos⁵. O gênero *Shigella* também é detectado como colônias azuis, todavia, a prova da oxidase resulta negativa para este gênero. Os enteropatógenos fermentadores da xilose são *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Objetivando-se inibir o crescimento em véu de *Proteus* spp, comensais nas fezes humanas, incluiu-se, na composição do ágar UNISC, a L-cistina (0,13g/L) que foi efetiva neste propósito¹³.

No diagnóstico microbiológico das gastroenterites bacterianas, o ágar Mac Conkey e o ágar *Salmonella-Shigella* são, em conjunto, os meios mais empregados pelos laboratórios clínicos¹⁰. *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* não têm desenvolvimento adequado no Mac Conkey, podendo apresentar-se como colônia lactose positiva ou negativa. A fermentação da lactose e a presença de sais biliares do meio, por outro lado, constituem-se em interferentes à prova da oxidase, recurso útil na detecção de *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides*^{6 10}. Este contexto impõe a necessidade de inclusão de um terceiro meio de cultura, específico a estes patógenos ágar sangue-ampicilina⁷, Pril-xilose-ampicilina ágar (PXA)¹², cefsulodin-irgasan-novobiocina ágar², são possibilidades alternativas bem estudadas. A inclusão da ampicilina é um recurso que tem sido utilizado para selecionar *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* resistentes a este agente, entretanto, estirpes sensíveis a esta penicilina já foram relatadas^{4 14}.

Neste contexto, os coprocultivos apresentam-se limitados na detecção de *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* seja pela necessidade de inclusão de um novo meio seletivo e específico, onerando os coprocultivos, seja pela incapacidade dos mesmos em detectar estes patógenos, devido a variações na suscetibilidade à ampicilina. O ágar UNISC constitui-se em proposta racional, todavia, requerendo ainda, validação em

*Peptona bacteriológica (HIMEDIA); *extrato de carne (OXOID); *azul de bromotimol (VETEC); *ágar bacteriológico (HIMEDIA); *xilose (VETEC); *L-cistina(VETEC).

ensaio clínico porque poderá substituir dois meios de cultura (ágar MacConkey e ágar *Salmonella-Shigella*) acrescida da vantagem de diagnosticar também gastroenterites causadas por *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides*.

REFERÊNCIAS

1. Abbott S, Cheung WKW, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2348-2357, 2003.
2. Altorfer R, Altwegg M, Zollinger-Iten J, Von Graevenitz A. Growth of *Aeromonas* spp. on cefsulodin-irgasan-novobiocin agar selective for *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Clinical Microbiology* 22: 478-480, 1985.
3. Altwegg M, Geiss HK. *Aeromonas* as a human pathogen. *Critical Reviews in Microbiology* 16: 235-286, 1989.
4. Carnahan AM, Chakraborty T, Fanning GR, Verma D, Ali A, Janda JM, Joseph SW. *Aeromonas trota* sp. Nov., an ampicilin-susceptible species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1206-1210, 1991.
5. Guerra IMF, Fadanelli R, Figueiró M, Schreiner E, Delamare APL, Wolheim C, Costa SOP, Echeverrigaray S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal Microbiology* 38:638-643, 2007.
6. Hunt LK, Overman TL, Otero RB. Role of pH in oxidase variability of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 13: 1054-1059, 1981.
7. Kay BA, Guerrero CE, Bradley Sack R. Media for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 22: 888-890, 1985.
8. Khardori N, Fainstein V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. *Annual Review Microbiology* 42: 395-419, 1988.
9. Landerdale T, Chapin KC, Murray PR. Reagents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition, ASM Press, Washington, p.1665, 1999.
10. Mishra S, Nair GB, Bhadra RK, Sikder SN, Pal SC. Comparison of a selective media for primary isolation of *Aeromonas* species from human and animal feces. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 2040-2043, 1987.
11. Mossel DAA. *Microbiologia de los Alimentos*. Zaragoza, Editorial Acribia, 1982.
12. Rogol M, Sechter I, Grimberg H, Gerichter CB. Pril-xylose-ampicilin agar, a new selective medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Medical Microbiology* 12: 229-232, 1979.
13. Sandys GH. A new method for preventing swarming of *Proteus* sp with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice. *Journal of Medical and Laboratory Technology* 17: 224-233, 1960.
14. Von Graevenitz A, Bucher C. Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp. from human feces. *Journal of Clinical Microbiology* 17: 16-21, 1983.