

Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados

Characterization of *Aeromonas* spp isolates from newborns hospitalized

Christiane Soares Pereira¹, Simone Duarte Amorim¹, André Felipe das Mercês Santos¹,
Cristhiane Moura Falavina dos Reis², Grace Nazareth Diogo Theophilo¹
e Dália dos Prazeres Rodrigues¹

RESUMO

Aeromonas spp é reconhecida como patogênica para o homem após o consumo de água e alimentos contaminados. Na presente investigação, foram avaliadas 2.323 amostras de swabs retais de neonatos hospitalizados no Rio de Janeiro objetivando o isolamento de *Aeromonas*. As amostras foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras enteroinfecções bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Os swabs foram submetidos ao enriquecimento em água peptonada alcalina adicionada de 1% de cloreto de sódio (NaCl) e água peptonada alcalina adicionada de 3% de NaCl (37°C/18-24h) e semeadas em agar seletivo para *Pseudomonas aeromonas* (Agar GSP). Foram isoladas 56 cepas de *Aeromonas* assim distribuídas: *Aeromonas caviae* (42,8%), *Aeromonas media* (25%), *Aeromonas veronii* biogrupo sobria (10,7%), *Aeromonas hydrophila* (9%), *Aeromonas veronii* biogrupo veronii (5,3%), *Aeromonas sobria* (1,8%), *Aeromonas jandaei* (1,8%), *Aeromonas schubertii* (1,8%) e *Aeromonas* sp (1,8%). Foi observada resistência a uma ou mais drogas antimicrobianas em 26,8% das cepas. Considerando a relevância de *Aeromonas* torna-se urgente alertar sobre sua importância para o controle de infecções hospitalares.

Palavras-chaves: *Aeromonas* spp. Neonatos. Resistência antimicrobiana. Saúde Pública.

ABSTRACT

Aeromonas spp is recognized as pathogenic to humans after consumption of contaminated water and food. In the present investigation, 2,323 rectal swab samples from newborns hospitalized in Rio de Janeiro were evaluated with a view to isolating *Aeromonas*. The samples were collected and sent to the national reference laboratory for cholera and other bacterial intestinal infections, at the Oswaldo Cruz Institute of the Oswaldo Cruz Foundation. The swabs were subjected to enrichment in alkaline peptonated water with the addition of 1% sodium chloride (NaCl) and alkaline peptonated water plus 3% NaCl (37°C/18-24h) and were streaked onto agar that was selective for *Pseudomonas-Aeromonas* (GSP Agar). Fifty-six *Aeromonas* strains were isolated, distributed as follows: *Aeromonas caviae* (42.8%), *Aeromonas media* (25%), *Aeromonas veronii* biogroup sobria (10.7%), *Aeromonas hydrophila* (9%), *Aeromonas veronii* biogroup veronii (5.3%), *Aeromonas sobria* (1.8%), *Aeromonas jandaei* (1.8%), *Aeromonas schubertii* (1.8%) and *Aeromonas* sp (1.8%). Resistance to one or more antimicrobial drugs was observed in 26.8% of the strains. Considering the importance of *Aeromonas*, there is an urgent need to warn about this in relation to nosocomial infection control.

Key-words: *Aeromonas* spp. Newborns. Antimicrobial resistance. Public health.

Aeromonas spp compreendem bactérias Gram negativas pertencentes à família Aeromonadaceae cujo habitat é predominantemente aquático (dulcícola e marinho) e possuem ampla distribuição geográfica. São microrganismos de circulação ambiental e com capacidade de ocasionar patogenias moderadas ou graves tanto no homem quanto nos animais. Atualmente determinadas espécies de *Aeromonas* tem sido reconhecidas

como patógenos causadores de infecções intestinais ou extra-intestinais no homem assumindo destacada relevância epidemiológica em casos de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos^{1 3 5 8 10 11 13 14 17 18 23}.

Os principais fatores de virulência destes patógenos estão associados à presença de enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas, aerolisinas e proteases que possuem habilidade de adesão as

1. Laboratório de Referência Nacional de Cólera e Outras Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2. Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Endereço para correspondência: Dra Christiane Soares Pereira. Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas/IOC/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365/3º andar, Pavilhão Rocha Lima, Mangueiras, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ.

Tel: 55 21 2270-6565; ramal 320.

e-mail: chrisspm@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação em: 18/10/2007

Aceito em: 07/03/2008

células teciduais causando diversos graus de injúria tecidual. A maioria dos casos de infecção intestinal no homem é representada por sintomas de diarreia aguda e a severidade da doença depende diretamente dos fatores de virulência envolvidos e do estado imunológico do paciente^{2 3 11 15 20 22}.

As principais manifestações extra-intestinais são representadas por casos de celulites, fascites necrotizantes, meningites, síndrome hemolítica urêmica e seps. Essas infecções nosocomiais assumem papel de destaque especialmente quando reportadas em grupos suscetíveis como crianças, idosos e portadores de doenças crônico-degenerativas, muitos destes internados em unidades hospitalares em todo o mundo^{9 21 22 23 24}.

No Brasil, estudos revelaram o isolamento de *Aeromonas* a partir de diferentes nichos como o ecossistema marinho, amostras de solo, alimentos como pescado, mariscos e vegetais e também a partir de infecções em animais domésticos, mamíferos marinhos e animais de sangue frio. Destaca-se também a característica de sazonalidade observada em alguns estudos, os quais revelaram que épocas de temperaturas ambientais elevadas (verão) apresentaram maiores índices de isolamento destes patógenos^{5 12 14 17 18 19}.

A biodiversidade de habitats onde estes patógenos têm sido isolados assume destacado papel para a saúde pública no que se refere à pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Entre estes pacientes, os neonatos representam importante grupo de risco, pois infecções podem ser favorecidas devido às práticas hospitalares como o uso de cateter endovenoso, intervenções cirúrgicas de várias magnitudes, antibioticoterapia e administração de corticoesteróides. Em nosso meio, a prevenção e controle de seps seguida de óbito nestes pacientes representam um desafio para as equipes de controle de infecção hospitalar das instituições públicas e privadas^{9 16 24}.

A presente investigação, objetivou avaliar a presença de *Aeromonas* spp e seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em amostras de swabs retais de neonatos hospitalizados no município do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 2.323 swabs retais de neonatos com sintomas de diarreia aguda hospitalizados em unidades de terapia intensiva de três hospitais municipais no Rio de Janeiro, no período de 1998 a 2006. As amostras foram coletadas pelos profissionais de saúde hospitalares durante a rotina e antes do início da antibioticoterapia.

Após a coleta, as amostras foram transportadas em meio Cary-Blair, acondicionadas em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, onde as análises microbiológicas foram efetuadas num prazo máximo que não excedeu duas horas.

O procedimento de isolamento incluiu o enriquecimento direto dos swabs enviados em meio de água peptonada alcalina (APA) acrescida de 1% de cloreto de sódio (NaCl) e água peptonada alcalina adicionada de 3% de NaCl (37°C/24h). Em seqüência

foi realizada semeadura em meio agar seletivo para *Pseudomonas-Aeromonas* (GSP) e incubadas a temperatura de 37°C (18-24h). As colônias suspeitas (5 a 10) foram repicadas para meios de triagem (kligler iron agar e lysine iron agar), agar nutriente acrescido de 1% de cloreto de sódio (NaCl) e, em seguida realizada caracterização bioquímica, com base nos testes de citocromo-oxidase, resistência ao agente vibriostático O129 (2,4 diamino, 6,7 diisopropilpteridine), produção de orto-nitrofenil-beta-D galactosidase (ONPG), produção de acetoina em meio Voges-Proskauer, fermentação da glicose, sacarose, arabinose e manose e utilização de aminoácidos (lisina e ornitina descarboxilase e arginina dehidrolase) a fim de obter a identificação conclusiva das cepas isoladas^{1 6}.

Subseqüente ao isolamento as cepas de *Aeromonas* isoladas foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos utilizando os seguintes fármacos: cloranfenicol 30mcg (CHL), cefoxitina 30mcg (FOX), ceftriaxona 30mcg (CRO), nitrofurantoína 300mcg (NIT), cefalotina 30mcg (CEP), ácido nalidíxico 30mcg (NIT), ciprofloxacina 5mcg (CIP), gentamicina 10mcg (GEN), imipenem 10mcg (IMP), sulfametoxazol-trimetoprim 23,75mcg/1,25mcg (SXT) e tetraciclina 30mcg (TCY), através do método de difusão em disco segundo as recomendações do CLSI, 2006⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso meio, as espécies de *Aeromonas* que apresentam elevados índices de isolamento em associação à patogenia humana são *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* biogrupo sobria. Esses microrganismos têm sido isolados de diferentes nichos ecológicos e considerados de importância para a prática médica, pois há relatos de isolamento a partir de amostras clínicas humanas e casos de diarreia infantil^{7 16}.

Na presente investigação, foram identificadas 8 espécies de *Aeromonas* isoladas a partir de amostras de neonatos hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva. Entre as espécies isoladas observou-se o isolamento de 56 cepas, assim distribuídas: *Aeromonas caviae* em 42,8% dos isolados, seguida de *Aeromonas media* (25%), *Aeromonas veronii* biogrupo sobria (10,7%), *Aeromonas hydrophila* (9%), *Aeromonas veronii* biogrupo veronii (5,3%), *Aeromonas sobria*, *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas schubertii* (1,8% cada) e uma cepa caracterizada como *Aeromonas* sp (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais espécies de *Aeromonas* isoladas de neonatos hospitalizados no Rio de Janeiro, no período de 1998 a 2006.

Microrganismos	Número	Porcentagem
<i>Aeromonas caviae</i>	24	42,8
<i>Aeromonas media</i>	14	25,0
<i>Aeromonas veronii</i> biogrupo sobria	6	10,7
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5	9,0
<i>Aeromonas veronii</i> biogrupo veronii	3	5,3
<i>Aeromonas schubertii</i>	1	1,8
<i>Aeromonas sobria</i>	1	1,8
<i>Aeromonas jandaei</i>	1	1,8
<i>Aeromonas</i> sp	1	1,8

Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz.

A maioria das espécies de *Aeromonas* isoladas tem sido associada à gastroenterite humana incluindo casos denominados *diarréia dos viajantes*. *Aeromonas caviae* representou o principal patógeno isolado neste estudo e sua importância está relacionada ao seu elevado potencial de virulência, especialmente em casos de sepse e infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos²⁴. É digno de nota ressaltar o isolamento da espécie *Aeromonas media*, o que não é muito comum a partir de casos clínicos. Paralelamente, a identificação de *Aeromonas hydrophila* com perfil de resistência aos antimicrobianos representa um dado epidemiológico importante para a saúde pública, corroborando com outros estudos associados à gastroenterite aguda em crianças^{11 21 22}.

Embora, o isolamento de algumas espécies de *Aeromonas* possa ser considerado discreto por sua baixa frequência, cabe salientar que *Aeromonas sobria* tem sido isolada como patógeno humano em infecções entéricas. Estudos revelam que a maioria das cepas desta espécie possui uma toxina similar à toxina colérica e cerca de 20% dos pacientes acometidos pela doença apresentam sintomas de disenteria semelhante às provocadas por espécies de *Shigella* e cepas de *Campylobacter jejuni* invasoras^{2 15}.

Por outro lado, *Aeromonas schubertii* e *Aeromonas jandaei* assumem importância clínico-epidemiológica associada ao isolamento a partir de infecção de lesões cutâneas subsequentes à exposição à água ou solo contaminado³⁹. Esses dados reforçam a importância de alertar aos profissionais de saúde quanto à necessidade de higienização das mãos antes e após manipulação direta ou indireta dos pacientes, bem como da observação das normas gerais de biossegurança hospitalar.

Há relatos de isolamento de cepas de *Aeromonas veronii* biogrupo sobria potencialmente virulentas a partir de casos de gastroenterite humana, bem como casos de infecção por *Aeromonas trota* acometendo crianças. Embora, o papel das *Aeromonas* como agentes causadores de gastroenterite permaneça não totalmente elucidado, estes patógenos tem sido epidemiologicamente associados à ocorrência de diarréia aguda em crianças^{2 10 13 20}.

Das 56 cepas de *Aeromonas* isoladas, um percentual de 26,78% apresentou perfil de resistência e multirresistência aos antimicrobianos, distribuídas entre as seguintes espécies: *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas veronii* biogrupo sobria, *Aeromonas veronii* biogrupo veronii, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas schubertii*. Essas espécies apresentaram diferentes perfis frente ao teste de suscetibilidade antimicrobiana merecendo destaque para a multirresistência em *Aeromonas caviae* (TCY-CEP-FOX) e *Aeromonas veronii* biogrupo veronii (SXT-CHL-TCY-NIT). Contudo, perfis de resistência observados para *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* biogrupo veronii para cefalosporinas de terceira geração é um relato de particular interesse clínico (Tabela 2).

Observa-se que a resistência a cefalotina tem sido usada para diferenciar *Aeromonas veronii* biogrupo veronii de *Aeromonas hydrophila*. Entretanto, as cepas destas espécies isoladas neste estudo apresentaram sensibilidade frente a este fármaco¹⁵. Estudos

Tabela 2 - Perfis de Resistência aos Antimicrobianos em *Aeromonas spp* isoladas de neonatos hospitalizados no Rio de Janeiro, no período de 1998 a 2006.

Perfil de Resistência aos Antimicrobianos	Microrganismos	Total
FOX	<i>Aeromonas schubertii</i>	1
	<i>Aeromonas caviae</i>	1
	<i>Aeromonas veronii</i> biogrupo veronii	1
SXT	<i>Aeromonas caviae</i>	1
	<i>Aeromonas media</i>	2
TCY	<i>Aeromonas veronii</i> biogrupo sobria	2
TCY-NAL	<i>Aeromonas veronii</i> biogrupo sobria	1
TCY-CHL	<i>Aeromonas media</i>	1
TCY-CEP-FOX	<i>Aeromonas caviae</i>	1
SXT-CEP	<i>Aeromonas caviae</i>	1
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
SXT-TCY	<i>Aeromonas caviae</i>	1
SXT-CHL-TCY-NIT	<i>Aeromonas veronii</i> biogrupo veronii	1

FOX: ceftriaxona, SXT: sulfametoxazol-trimetoprim, TCY: tetraciclina, NAL: ácido nalidíxico, CHL: cloranfenicol, CEP: cefalotina, NIT: nitrofurantóina.

Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz.

conduzidos na Índia revelaram cepas de *Aeromonas* resistentes ao ácido nalidíxico, cefalotina dentre outros antimicrobianos. Com relação ao ácido nalidíxico apenas uma cepa de *Aeromonas veronii* biogrupo sobria apresentou perfil de resistência para esta droga em associação à tetraciclina²¹.

A circulação de espécies de *Aeromonas* multiresistentes entre neonatos hospitalizados em unidades de terapia intensiva pode potencializar os riscos de disseminação dos genes de resistência através de plasmídeos ou transposons, o que implica na necessidade de contínuo monitoramento da resistência antimicrobiana, especialmente no ambiente hospitalar⁸.

Portanto, ao considerarmos as implicações clínico-epidemiológicas das espécies de *Aeromonas* isoladas no presente estudo, bem como a identificação de perfis de resistência e multirresistência aos principais antimicrobianos de uso corrente na prática médico-hospitalar, observamos a necessidade urgente de alertar e esclarecer a verdadeira importância destes patógenos para a Saúde Pública. Esse conhecimento poderá auxiliar positivamente no estabelecimento de diretrizes de controle preventivo de infecções hospitalares em unidades de terapia intensiva neonatal das redes pública e privada no Rio de Janeiro e em todo o território nacional.

REFERÊNCIAS

- Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2348-2357, 2003.
- Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, Kuhn I, Rahman M, Faruque ASG, Islam MS, Sack RB, Mollby R. Prevalence of Enterotoxin Genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 785-3790, 2000.
- Carnahan AM, Maril MA, Fanning GR, Pass MA, Joseph SW. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 1826-1830, 1989.

4. Clinical and Laboratories Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing fifteenth informational supplement M-100-S15. Wayne (PA): inical and Laboratories Standards Institute, 2006.
5. Evangelista NSB, Vieira RHSE, Carvalho FCT, Torres RCO, Sant'anna ES, Rodrigues DP, Reis CME. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48: 129-133, 2006.
6. Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual. 7th edition, 1992.
7. Hay J, Seak DV. Ornamental fish: look but not touch. *Journal of Royal Society Medicine* 89: 359, 1996.
8. Hirsch D, Pereira Jr DJ, Logato PVR, Piccoli RH, Figueiredo HCP. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis e isoladas de peixes e ambientes aquáticos. *Ciência Agrotécnica* 30: 1211-1217, 2006.
9. Hofer E, Reis CME, Theophilo GND, Cavalcanti VO, Lima NV, Henriques MFCM. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:217-219, 2006.
10. Joseph SW, Carnahan AM, Brayton PR, Fanning GR, Almazan R, Drabick C, Trudo Jr EW, Colwell RR. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 565-569, 1991.
11. Juan HJ, Tang RB, Wu TC, Yu KW. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in children with diarrhea. *Journal of Microbiology and Immunology Infection* 33: 115-117, 2000.
12. Koelle K, Pascual M, Yunus M. Pathogen adaptation to seasonal forcing and climate change. *Proceedings Biology Science* 272: 971-977, 2005.
13. Leblanc M, Delage G, Rousseau E, Bonnin ACB. Prévalence d'*Aeromonas* spp. Dans les gastro-entérites de l'enfant. *Canadian Medical Association Journal* 138: 714-717, 1988.
14. Moro EM, Weiss RDN, Friedrich RSC, Vargas AC, Weiss LHN, Nunes MP. *Aeromonas hydrophila* isolated from cases of bovine seminal vesiculites in South Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 189-191, 1999.
15. Moyer NP. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 2044-2048, 1987.
16. Ong KR, Sordillo E, Frankel E. Unusual case of *Aeromonas hydrophila* endocarditis. *Journal of Clinical of Microbiology* 29: 1056-1057, 1991.
17. Pereira CS. A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a Saúde Pública - Contexto Político-Social e Microbiológico. Tese de Doutorado, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, RJ, 2003.
18. Pereira CS, Amorim SD, Santos AFM, Siciliano S, Moreno IMB, Ott PH, Rodrigues DP. *Vibrio* spp. isolados de mamíferos marinhos capturados na região litorânea do sudeste ao sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27: 81-83, 2007.
19. Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24: 562-566, 2004.
20. Reina J, Lopez A. Gastroenteritis caused by *Aeromonas trota* in a child. *Journal of Clinical Pathology* 49: 173-175, 1996.
21. Sinha S, Shimada T, Ramamurthy T, Battacharya SK, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. *Journal of Medical Microbiology* 53: 527-534, 2004.
22. Subashkumar R, Thayumanavan T, Vivekanandhan G, Lakshmanaperumalsamy P. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in acute gastroenteritis among children. *Indian Journal of Medical Research* 123: 61-66, 2006.
23. Tena D, González-Praetorius A, Simeno C, Pérez-Pomata MT, Bisquert J. Extraintestinal infection due to *Aeromonas* spp.: a review of 38 cases. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25: 235-241, 2004.
24. Wang G, Tyler KD, Munro CK, Johnson WM. Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining presence of a unique hemolysin gene. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 3203-3205, 1996.