

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Caracterización fenotípica de cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda

Laura Bravo Fariñas,^I Anabel Fernández Abreu,^{II} Deyánira González Leiva,^{II} Margarita Ramírez Álvarez,^{III} Adalberto Aguila Sánchez,^{IV} Nereyda Cabrera Cantelar,^V Isabel Martínez Mota,^{VI} Carlos Fernández Andreu,^{VII} Liset Sánchez Valdéz,^{VIII} Yanaika Cruz Infante^{IX}

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: las enfermedades diarreicas agudas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los niños menores de 5 años y en la población general, esto ocasiona una gran demanda de atención en los servicios de salud. La situación se agrava por el abuso de los antimicrobianos y el desarrollo de resistencia bacteriana, suceso que hoy día constituye un problema emergente de salud en diversas regiones del mundo. Entre los microorganismos causantes de enfermedades diarreicas agudas se encuentran los pertenecientes al género *Aeromonas*, los cuales han sido reconocidos como patógenos emergentes de riesgo II. **OBJETIVOS:** determinar las especies de *Aeromonas* más frecuentemente aisladas a partir de muestras de heces de pacientes con enfermedades diarreicas agudas y su susceptibilidad antimicrobiana. **MÉTODOS:** se determinó la susceptibilidad mediante el método de Bauer-Kirby frente a diferentes antimicrobianos a 100 aislamientos remitidos desde los centros provinciales de higiene y epidemiología del país durante 2007-2008. **RESULTADOS:** En 67 % de los aislamientos se logró la identificación hasta especie, se observó el predominio de *A. caviae* (33 %) y *A. hydrophila* (29 %). Se demostró que 100 % de los aislamientos resultaron resistentes al menos a un antimicrobiano de los investigados. El porcentaje más elevado de resistencia se observó frente a la cefalotina, las sulfonamidas y el ácido nalidíxico. **CONCLUSIONES:** se propone a la tetraciclina y el cloranfenicol como fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones intestinales producidas por estos microorganismos en Cuba.

Palabras clave: *Aeromonas*, enfermedad diarreica aguda, susceptibilidad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

En Cuba los géneros bacterianos más frecuentemente involucrados en las diarreas son *Salmonella*, *Shigella* y algunos serotipos de *Escherichia coli*.¹ La introducción de la prueba de oxidasa para el estudio de los bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, por parte

del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNR/EDA/IPK) en todos los laboratorios de la red nacional de microbiología, ha permitido agregar a esta lista los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas*. Estos han sido reconocidos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los

^I Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Titular. Instructora. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Máster en Bacteriología-Micología. IPK. La Habana, Cuba.

^{III} Doctora en Ciencias Médicas. Investigadora Auxiliar. Instructora. IPK. La Habana, Cuba.

^{IV} Máster en Bacteriología-Micología. Investigador Agregado. Instructor. IPK. La Habana, Cuba.

^V Máster en Bacteriología-Micología. Investigadora Auxiliar. Profesora Auxiliar. IPK. La Habana, Cuba.

^{VI} Doctora en Ciencias Médicas. Investigadora Titular. Profesora Titular. Instituto Finlay. La Habana, Cuba.

^{VII} Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Titular. Profesora Titular. IPK. La Habana, Cuba.

^{VIII} Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Auxiliar. Instructora. IPK. La Habana, Cuba.

^{IX} Técnica en Procesos Biológicos. IPK. La Habana, Cuba.

Estados Unidos de América como patógenos emergentes y la Organización Mundial de la Salud los considera como microorganismos riesgo II.^{2,3}

Los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas* tienen una distribución cosmopolita y han adquirido gran importancia clínica por su capacidad para producir cuadros clínicos gastrointestinales, donde la diarrea es la forma de presentación más común, en general con un desarrollo autolimitado, aunque pueden ocasionar también cuadros extraintestinales.^{4,5}

La terapia antimicrobiana de las infecciones intestinales ocasionadas por *Aeromonas* no está bien definida. Generalmente, los cuadros diarreicos de los individuos sanos son autolimitados. En los casos con afecciones crónicas y en los individuos inmunocomprometidos se requiere del tratamiento antimicrobiano, se identifican cepas sensibles a las cefalosporinas de segunda y tercera generación, así como a las quinolonas, que presentan una resistencia variable a los aminoglucósidos y macrólidos.⁶

En las últimas décadas, el ascenso de la circulación de especies de *Aeromonas* en el ambiente, por lo general en el medio acuático, y el incremento del número de infecciones intestinales y extraintestinales asociadas con estos microorganismos suscita un interés creciente, por establecer el riesgo que ellos representan para la salud pública y conocer el papel de la resistencia antimicrobiana en el tratamiento de pacientes infectados por aislamientos de este género.⁴

Por lo antes expuesto y la importancia que reviste a nivel nacional e internacional la vigilancia microbiológica y epidemiológica de los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas*, así como la emergencia y diseminación de cepas resistentes a los agentes antimicrobianos se propuso realizar la caracterización fenotípica de aislamientos de *Aeromonas* en Cuba.

MÉTODOS

Microorganismos

Se estudiaron 100 aislamientos de *Aeromonas* recibidas en el LNR/EDA/IPK, enviados desde diferentes centros provinciales de higiene, epidemiología y microbiología y del municipio Isla de la

Juventud, durante el período 2007-2008. Todos los aislamientos fueron recuperados de heces de niños menores de cinco años con un cuadro clínico de las enfermedades diarreicas agudas (EDA) y se encontraban conservados en el medio "Pasteur" para enterobacterias; se inocularon en caldo cerebro-corazón y se incubaron en aerobiosis a 37 °C (18-24 h). Posteriormente, se sembró por agotamiento una asada del cultivo en placas de agar MacConkey y agar sangre con 5 % de sangre de carnero. Trascorridas 24 h, todos los aislamientos fueron transferidos por punción y estría a los medios de diferenciación primaria: agar hierro y 2 azúcares de Kligler (AHK) y agar hierro lisina (AHL), incubándose en las mismas condiciones de temperatura y aireación antes mencionadas.^{7,8}

Se realizó la confirmación de género y todos los aislamientos se sometieron al estudio fisiológico mediante *Aeroesquema* y *Aerokey II* para su identificación en especies.^{9,10}

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

Se determinó la susceptibilidad a 12 de los principales antimicrobianos empleados en el tratamiento de la EDA, utilizando el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), y siguiendo los criterios del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico, 2007.¹¹

Como cepas controles se utilizaron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.¹¹

Procesamiento estadístico

Los datos se almacenaron en Excel y se procesaron en el paquete de programas EPIINFO, versión 6.04.¹²

RESULTADOS

Los 100 aislamientos fueron confirmados como pertenecientes al género *Aeromonas*. En 67 % de los aislamientos se logró la identificación hasta especies (*A. caviae* [33 %], *A. hydrophila*

TABLA. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de las especies de *Aeromonas* aisladas en Cuba

Especies	KF	CAZ	CRO	ATM	NAL	CIP	DXT	GEN	K	AMK	STA	SXT
<i>A. hydrophila</i>	68,9	3,4	3,4	0	17,2	3,4	6,8	6,8	3,4	3,4	27,6	17,2
<i>A. caviae</i>	66,7	0	0	0	6,1	3,0	12,1	0	0	6,1	12,1	21,2
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	50	0	0	0	25	25	25	0	0	0	0	0
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas</i> spp.	54,5	0	3,0	0	18,1	3,0	12,1	3,0	3,0	6,1	21,2	0

cefalotina (KF), ceftazidima (CAZ), ceftriazona (CRO), aztreonam (ATM), ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), doxiciclina (DXT), gentamicina (GEN), kanamicina (K), amikacina (AMK), sulfonamida (STA), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

[29 %], *A. veronii* bv. *sobria* [4 %], *A. veronii* bv. *veronii* [1 %]). No se pudo identificar en especie 33 % de las cepas investigadas.

Los resultados del estudio de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas aisladas de pacientes con EDA demostraron que los porcentajes más altos de resistencia estuvieron representados por cefalotina 62 %, sulfonamida 17 % y la tendencia al aumento de la resistencia del ácido nalidíxico. En relación con la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas analizadas en el período de 2007-2008, se demostró que 100 % resultó resistente al menos a un antimicrobiano. Todas las especies tuvieron resistencia elevada a la cefalotina (tabla).

DISCUSIÓN

La diarrea asociada a *Aeromonas* ocurre comúnmente en niños menores de 5 años, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. En general, las especies patógenas con mayor implicación clínica en casos de diarrea son *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. caviae* y en menor proporción *A. veronii* bv. *veronii*, *A. jandaei*, *A. shubertii*.^{2,13,14}

La identificación bioquímica de las especies causantes de EDA constituye una herramienta importante para la vigilancia epidemiológica, porque permite determinar la prevalencia de una serovariedad o especie en distintas zonas geográficas, así como es también de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y sus vías de transmisión.¹⁵

En la década de los noventa, Bravo y otros publicaron un estudio sobre la circulación de nuevas especies de *Aeromonas* aisladas en Cuba, los autores demostraron la circulación de *A. caviae*,

A. hydrophila y *A. veronii* bv. *sobria*; y en menor porcentaje aislaron *A. veronii* bv. *veronii* y *A. shubertii*.¹⁶ Recientemente, Majano y otros, realizaron un estudio sobre la caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva, aislados de pacientes con enfermedad diarreica en Cuba, en el cual se evidenció la circulación de especies similares a las encontradas en la presente investigación.¹⁷

En investigación clínica realizada por Longa y otros, en Mérida, Venezuela, se evidenció la circulación de *A. caviae* en muestras de niños con enfermedad diarreica aguda.¹⁸ Los resultados expuestos en el presente trabajo resultaron semejantes a los de los autores mencionados.

En México, Arteaga-Garibay y otros, al estudiar cepas procedentes de muestras clínicas de pacientes con EDA señalaron también el predominio de las especies *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria*.¹⁹

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación se describieron en Nasarawa, Nigeria, en un estudio realizado en 5 hospitales a 250 pacientes con diarreas, donde la especie más frecuente fue *A. hydrophila*.²⁰

Sin embargo, las especies identificadas en este trabajo no se corresponden con las descritas en la población infantil menor de 1 año con EDA en la República Checa, donde la especie más frecuente es *A. veronii* bv. *veronii*.²¹

Tampoco existió correspondencia entre los resultados del presente estudio con los obtenidos por Vila y otros en Barcelona, España, quienes describen *A. jandaei* como más frecuente en pacientes hospitalizados.²²

Con el objetivo de facilitar la identificación de *Aeromonas* spp. en los laboratorios clínicos, Carnahan y otros (1991) y Furawatari (1994)

desarrollan nuevos esquemas.^{9,10} Investigadores como *Sinha* y otros (2004), evalúan ambos esquemas, lo cual les permitió identificar satisfactoriamente en especie 95,3-98,2 % de las cepas clínicas recibidas durante un período de 2 años. El porcentaje de especies identificadas en este trabajo está acorde con los resultados obtenidos por los autores antes mencionados.²³

El carácter autolimitado de las infecciones entéricas provocadas por *Aeromonas*, reserva la terapia antimicrobiana para los casos de disentería severa, enfermedad parecida al cólera o en las diarreas prolongadas, para los pacientes inmunocomprometidos con enfermedades subyacentes y ante una evidencia de infección extraintestinal.²⁴

Generalmente, la mayor parte de los aislamientos del género *Aeromonas* muestran resistencia a un gran número de antibióticos, entre los que se incluyen los β -lactámicos (penicilina, carbenicilina, ampicilina y amoxicilina).²⁵⁻²⁶

De igual forma *Ko* y otros, en Taiwán, describen la existencia de cepas de *Aeromonas* aisladas de muestras de heces con altos porcentajes de resistencia a cefalosporinas de primera generación, resultados que coinciden con los obtenidos en este estudio.²⁷

Los resultados del presente estudio coinciden con los publicados en Río de Janeiro por *Arteaga-Garybay* y otros, quienes aíslan especies de *Aeromonas* con aparición de resistencia a sulfonamidas recuperadas de pacientes con EDA.¹⁹

Igualmente existe la coincidencia con el estudio de *Vila* y otros, en Barcelona, España, quienes realizaron estudios de susceptibilidad antimicrobiana y señalan bajos porcentajes de resistencia de *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* *bv. sobria*, frente a los aminoglucósidos gentamicina y amikacina.²²

Los resultados de este trabajo son similares con los publicados por *Pohkrel* y otros, quienes realizaron un estudio en un hospital de Nepal en pacientes con EDA, donde se evidenciaron bajos niveles de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.²⁸

Los resultados de esta investigación muestran que la tetraciclina y el cloranfenicol pueden ser empleados como fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones intestinales producidas por estos microorganismos en Cuba.

Phenotypic characterization of *Aeromonas* isolated from patients with acute diarrheal diseases

ABSTRACT

INTRODUCTION: the acute diarrheal diseases are one of the main causes of morbidity and mortality in children aged under 5 years and in the general population; this demands a great deal of care in the healthcare services. The situation worsens due to the overuse of antimicrobials and the development of bacterial resistance, being the latter an emerging health problem in different areas of the world. Among the causative microorganisms of acute diarrheal diseases are those of *Aeromonas* genus, recognized as second risk emerging pathogens. **OBJECTIVES:** to determine the most frequently isolated *Aeromonas* species in fecal samples from acute diarrheal patients and their antimicrobial susceptibility. **METHODS:** the Bauer-Kirby's method allowed identifying the susceptibility to several antimicrobials of 100 isolated samples coming from the provincial hygiene and epidemiology centers during 2007 and 2008. **RESULTS:** identification of the species was accomplished in 67% of isolates, being *A. caviae* (33 %) y *A. hydrophila* (29 %) the predominant species. It was demonstrated that 100 % of isolates got resistant to at least one of the studied antimicrobials. Drug resistance to cefalotine, sulfonamides and nalidixic acid showed the highest percentages. **CONCLUSIONS:** tetracycline and chloramphenicol are recommended as the drugs of choice for treating intestinal infections caused by these microorganisms in Cuba.

Key words: *Aeromonas*, acute diarrheal disease, antimicrobial susceptibility.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ortiz Bultó PL, Pérez A, Rivero A, Díaz M. Pronóstico bioclimático mensual: enero 2008. Boletín Epidemiológico del IPK. 2007;17(52) [citado 31 Ago 2008]. Disponible en: <http://www.ipk.sld.cu/bolepid3/bol52-07.htm>
2. Galindo CI, Chopra Ak. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. En: Doyle MP, Beuch LR, editors. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington,DC: ASM Press; 2007. p.1-56.
3. Material safety data sheet: infectious substances. Section 1. Infectious agent. Office of Laboratory Safety, PPHB. 2001 [citado 20 Abr 2004]. Disponible en: <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/msds-ftss/msds6e.html>
4. Castro-Escarpulli G, Aguilera GM, Giono Cerezo S, Hernández-Rodríguez C, Rodríguez Chacón M, Soler Falgás L. El género *Aeromonas*: ¿Un patógeno importante en México? *Enf Infecc Microbiol*. 2002;22(4):206-16.
5. Swartz MN. Infecciones de piel y partes blandas. En: Mandell G, Bennett JE, Dolin R, editors. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. 5ta. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2002. p. 1258-304.
6. Aguilera-Arreola MG. Caracterización de cepas de *Aeromonas* spp. Aisladas de pescado congelado [Tesis de Licenciatura]. México DF: ENCB IPN; 2000.
7. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WN, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. 3era ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1998.
8. Martin-Carnahan A, Joseph SW. *Aeromonadaceae*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staly JT, Garrity GM, editores. The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2^{da}. ed. Volumen 2. New York: Springer-Verlag; 2005. p. 557-8.

9. Furuwaturi CH, Kawakami ay, Akahame T, Hidaka E, Okimura Y, Nakayama J, et al. Proposal for an Aeroscheme (modified Aerokey II) for the identification of clinical *Aeromonas* species. *Med Sci Res.* 1994;22:617-9.
10. Carnahan A, Behran S, Joseph S. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2843-9
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Wayne CSLI Document M100-S17; 2007. p. 32-6, 64.
12. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. Epi Info Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta, GA: Centers for Disease Control; 1994.
13. Janda JM, Abbott SI. Envolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of especies, disease presentations and unanswered questions. *Clin Infect Dis.* 1998;27:332-42.
14. Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Arteaga-Garibay NI, Carmona-Martínez AA, Pérez-Valdespino A, et al. La identificación genética de *Aeromonas* una realidad y una necesidad en la microbiología dagnóstica. *Bioquímica.* 2003;28(4):11-8.
15. Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V. Etiology of children diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated patogénesis and inusual isolates. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2134-39.
16. Bravo L, Monte R, Alfonso V, Cabrera N, Gómez M, Hernández R, et al. Nuevas especies de *Aeromonas* aisladas en Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 1995;47(3):215-6.
17. Majano-Mendoza A, Bravo L, Fernández A, Martínez I, Nuñez F, Mederos L, et al. Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Rev Biomed.* 2009;20:25-32.
18. Longa A, Vizcaya I, Nieves B, Bravo L, Morier L, Cabrera LE, et al. Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp aisladas de niños con diarrea en Mérida, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57(2):85-91.
19. Arteaga-Garibay RI, Aguilera MG, Navarro A, Molina J, Sánchez M, Molina J, Campos C, et al. Serogroups, K1 antigen and antimicrobial resistant patterns of *Aeromonas* spp strains isolated from different sources in México. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;10(12):157-61.
20. Kandakai-Olukemi YT, Mawak JD, Olukemi MA, Ojumah SO *Aeromonas*-related diarrhoea in Nasarawa, Nigeria. *Ann Afr Med.* 2007;6(2):76-9.
21. Krejčí E, Andelová A, Porazilova I, Sedlacek I. *Aeromonas* spp. as a causative agent of acute diarrhoea in children. Halifax, Nova Scotia: 8th International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*; 2005. p. 42.
22. Vila J, Ruíz J, Gallardo F, Vargas M, Solert L, Figueras MJ, Gasón J. *Aeromonas* spp. And travelers diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:552-5.
23. Sinha S, Shimada T, Ramamurty T, Bhattacharya S, Yamasaki Y, Balakrish Nair G. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Koalta India. *J Med Microbiol.* 2004;53:527-34.
24. Atkins JT, Cleary TG. *Aeromonas* y *Plesiomonas*. En: Behman RE, Kuegman RM, Jonson HB, editores. *Nelson Tratado de pediatría.* 16ta ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 945-7.
25. Garay G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frere JM, Dideberg O. A metallobetalactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase cphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol.* 2005;345(4):785-95
26. Hasan J. *Aeromonas*: human health criteria document. United States: EPA Office Watyer; 2006.
27. Ko WC, Chiang SR, Lee HC, Tang HJ, Wang YY, Yuang YC. *In vitro* and *in vivo* activities of fluoroquinolonas against *Aeromonas hydrophila* creasing. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2003;47(7):2217-22.
28. Pokhrel BM, Thapa N. Prevalence of *Aeromonas* in different clinical and water samples with special reference to gastroenteritis. *Nepal Med Coll J.* 2004;6(2):139-43.

Recibido: 12 de mayo de 2010. Aprobado: 21 de octubre de 2010.
 Laura Bravo. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".
 Autopista Novia del Mediodía km 6 ½, AP 601, Marianao 13. La
 Habana, Cuba. Correo electrónico: laura@ipk.sld.cu