

***Aeromonas* spp. jako původce akutních průjmů dětí do jednoho roku**

Krejčí E.¹, Andělová A.¹, Porazilová I.¹, Sedláček I.²

¹Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum mikrobiologie, parazitologie a imunologie, Ostrava

²Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova Univerzita, Brno

Souhrn

Cíl práce. Cílem práce bylo upozornit na možnou souvislost mezi případy akutních průjmových onemocnění a konkrétním druhem rodu *Aeromonas*.

Materiál a metodiky: Osm studovaných kmenů bylo identifikováno jako *Aeromonas* spp. a blíže charakterizováno na základě výsledků biochemických testů, analýzy mastných kyselin a ribotypizace.

Výsledky: Aeromonády byly opakovaně zachyceny u čtyř dětí do jednoho roku, z nichž dvě musely být pro vodnaté průjmy i hospitalizovány. Z osmi kmenů izolovaných aeromonád bylo šest kmenů identifikováno jako *A. caviae*, jeden jako *A. veronii* bv. *sobria* a jeden kmen se nepodařilo zařadit do druhu. Pouze v jednom případě byla ribotypizací prokázána identita dvou *A. caviae* kmenů od stejného pacienta, v ostatních případech byly izolovány různé kmeny odlišných druhů aeromonád. Pravděpodobným zdrojem infekcí aeromonádami byla kontaminovaná voda nebo potraviny; v jednom případě i kontakt s cestovateli, kteří se vrátili s průjmovým onemocněním.

Závěr: Dokumentované čtyři případy akutních průjmových onemocnění malých dětí ukazují, že aeromonády nejsou vzácné a mohou způsobovat vážné zdravotní problémy. Podrobné epidemiologické souvislosti však zůstávají nejasné. Nepodařilo se prokázat, že klinicky závažné případy byly spojeny s jedním konkrétním druhem rodu *Aeromonas*, i když výsledky naznačují dominantní úlohu druhu *A. caviae*.

Klíčová slova: *Aeromonas* – průjem – identifikace – ribotypizace – FAME.

Summary

Krejčí E., Andělová A., Porazilová I., Sedláček I.: *Aeromonas* spp. as the Causative Agent of Acute Diarrhoea in Children under 1 Year of Age

Study objective: To establish whether there is a link between cases of acute watery diarrhoea and a specific *Aeromonas* species.

Materials and Methods: Eight strains studied were identified as aeromonads and were further characterized by biochemical tests, fatty acid analysis and ribotyping.

Results: Aeromonads were isolated repeatedly from stool specimens of four children under one year of age with acute diarrhoea, two of whom were admitted to hospital. Of eight isolated aeromonads strains six were identified as *A. caviae*, one was classified into *A. veronii* bv. *sobria* and one could not be identified to the species level. Only two *A. caviae* strains from one patient were found to be identical by ribotyping while the *Aeromonas* species (strains) isolated from the other cases differed from one another. Contaminated fresh water, contaminated food and contact with travellers with imported diarrhoea were identified as probable sources of infection.

Conclusion: Four cases of acute gastroenteritis in small children document that aeromonads are not rare and can cause serious health problems. However, epidemiological links remain unclear. We did not prove correlation between the four serious cases of acute diarrhoea and specific *Aeromonas* species but the results suggest the predominant role of *A. caviae*.

Key words: *Aeromonas* – diarrhoea – identification – ribotyping – FAME.

Mezi odbornou veřejností stále existují pochybnosti, zda mají být aeromonády považovány za primární střevní patogeny [2]. Bylo prokázáno, že určité patogenní kmeny aeromonád mohou kolovat mezi pacienty s průjmovým onemocněním. Na základě kontrolní studie, kdy bylo vyšetřováno více než 800 dětí s průjmy z Bangladéše, byly aeromonády označeny jako mikroorganismus, který byl signifikantně spojen s průjmovým onemocněním [11]. Podle uvedené práce byly aeromonády zařazeny mezi hlavní střevní patogeny spolu s dalšími bakteriálními agens jako jsou salmonely, shigely, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* O1 a enteropatogenní/enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli* (EPEC, ETEC). Pro patogenitu aeromonád svědčí také jejich virulence, např. cytotoxin nebo enterotoxiny [6].

Nálezy aeromonád ve stolici jsou popisovány ve spojitosti s akutními vodnatými průjmy, které mohou doprovázet další symptomy jako břišní bolest, horečka, nauzea a zvracení; u závažných onemocnění je možný i nálezy krve ve stolici. Aeromonádové infekce se mohou manifestovat také jako chronická onemocnění ve formě občasných průjmů, které mohou přetrvávat ještě několik měsíců až let po počáteční infekci [1, 14].

Také v našich podmínkách lze u pacientů s průjmovým onemocněním izolovat aeromonády. Jejich identifikace na úroveň druhu je však kvůli stále se měnící taxonomii a podobným biochemickým vlastnostem jednotlivých druhů obtížná. V posledních několika letech byly popsány v rámci rodu *Aeromonas* nové druhy i poddruhy, v současné době existuje 16 druhů aeromonád s několika poddruhy (<http://www.bacterio.cirt.fr/a/aeromonas.html>). Z jednotlivých druhů jsou ze stolice izolovány nejčastěji *A. caviae*, dále *A. veronii* bv. *sobria* nebo *A. hydrophila* [1]. Do skupiny pro člověka patogenních aeromonád však byly zařazeny i druhy *A. jandaei*, *A. veronii* bv. *veronii* nebo *A. schubertii* [12]. Mezi nově popsané druhy aeromonád, které byly nalezeny u případů průjmových onemocnění, patří také *A. media*, *A. encheleia* a *A. bestiarum* [13].

Průjmová onemocnění vyvolaná aeromonádami nejsou podle našich zkušeností vzácná. Infekce, které jsou většinou dobře zvládnutelné, jsme zaznamenali především u malých dětí a starších osob, mohou souviset i s pobytem v zahraničí. Zdroj aeromonádové infekce a cesta přenosu jsou většinou neznámé. Obecně platí, že k infekci aeromonádami dochází především po přímém kontaktu s kontaminovanou vodou (i plavání, potápění) nebo kontaminovanými potravinami (čerstvé ovoce, zelenina, maso, rybí i mléčné produkty) [1, 12, 16].

Zajímalo nás, zda existuje spojitost mezi závažným průjmovým onemocněním a konkrétním



druhem rodu *Aeromonas*. Uvádíme zde čtyři případy akutního průjmového onemocnění u malých dětí do jednoho roku, u kterých byly opakovaně zachyceny kmeny aeromonád. Pátrali jsme po možných epidemiologických souvislostech. Pro identifikaci aeromonád byly zvoleny následující metody: biochemická identifikace, analýza mastných kyselin a ribotypizace. Biochemická identifikace neznámých aeromonád do druhu vyžaduje velké množství testů [3, 10, 16] a navíc nemusí být spolehlivá, neboť chybí dostatek druhově rozlišujících testů s dobrou diskriminační hodnotou. Testované kmeny byly proto identifikovány i pomocí analýzy mastných kyselin. Tato metoda je založena na poznatku, že různé druhy bakterií se liší v zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Analýza mastných kyselin se již dříve pro klasifikaci aeromonád osvědčila [9]. Poslední z použitých metod – ribotypizace – vychází z restriční analýzy genomové DNA s následnou hybridizací se sondou komplementární k 16S a 23S rRNA bakterie *E. coli*. Sekvence genů pro ribozomy jsou vysoce konzervativní a jsou velmi podobné mezi všemi bakteriemi. Ribotypizace byla proto zvolena jako metoda vhodná nejen pro charakterizaci a identifikaci aeromonád [4], ale i k porovnání identity kmenů izolovaných od jednoho pacienta.

Materiál a metody

Bakteriální kmeny

K záchytu střevních patogenů (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, enteropatogenní/enterotoxigenní kmeny *E. coli*, *Aeromonas* spp.) byly vzorky stolic očkovány na MacConkey agar (Merck), deoxycholátový citrátový agar (Merck) a po pomnožení v selenitovém bujonu také na cefsulodin-irgasan-novobiocin agar (Oxoid). Pro záchyt aeromonád byl navíc použit *Aeromonas* agar (LAB M), jehož selektivitu zajišťují žlučové soli, briliantová zeleň a irgasan. Na tomto agaru jsou schopné růst také aeromonády citlivé k ampicilinu [1, 2, 3]. Uvedené agary s naočkovanými vzorky (včetně sele-

nitového bujony) byly inkubovány po dobu 18–24 hodin při teplotě 36 °C. Plotny se vzorky stolic naočkovaných na selektivní agar pro záchyt kampylobakterů (Tryptose Blood Agar Base, Campylobacter Selective Supplement IV, Himedia) byly kultivovány mikroaerofilně (souprava CAMPY-kult) 48 hodin při teplotě 42 °C.

Suspektní kolonie aeromonád byly izolovány na neselektivní médium (krevní agar) a byla ověřena oxidázová reakce. Oxidáza- pozitivní izoláty fermentující glukózu byly považovány za aeromonády a dále identifikovány. U všech izolátů bylo potvrzeno zařazení do rodu *Aeromonas* ověřením rezistence k vibriostatiku O/129 (150 µg) a neschopností růst v přítomnosti 6 % NaCl.

Testované kmeny aeromonád byly získány během rutinního vyšetřování vzorků stolic v letech 2004 až 2005. K bližší charakterizaci bylo vybráno osm kmenů pocházejících ze čtyř případů akutního průjemového onemocnění. Do testování byly zařazeny také referenční kultury *A. caviae* CCM 4491^T, *A. hydrophila* ssp. *hydrophila* CCM 7232^T, *A. veronii* bv. *sobria* CCM 1242 a *A. veronii* bv. *veronii* CCM 4359^T.

Biochemická identifikace

Pro biochemickou identifikaci izolátů byly použity výsledky mikrotestů z komerční soupravy ENTEROtest 24 (Pliva-Lachema Diagnostika): produkce indolu, ureáza, tvorba sirovodíku, Voges-Proskauerův test, dekarboxylace lyzinu a ornitinu, arginin dihydroláza, beta-galaktosidáza (ONPG), malonát sodný, Simmons citrát, kyselina z adonitolu, cellobiózy, dulcitu, glukózy, inositolu, mannitolu, melibiózy, rafinózy, rhamnózy, sacharózy, sorbitolu a trehalózy; pro další hodnocení nebyly použity nespolehlivé testy hydrolyza eskulinu a deaminace fenylalaninu. Souprava byla naočkována a inkubována podle doporučení výrobce. Výsledky dalších biochemických testů byly získány pomocí konvenčních metod. K testování beta-hemolýzy byl použit 10% krevní agar (Columbia Blood Agar Base, Merck). Testy pro průkaz hydrolyzy eskulinu a užití glukonátu byly připraveny podle postupů uvedených v Cowan and Steel's manual [7]. K průkazu tvorby kyseliny z L-arabinózy, arbutinu, mannózy a salicinu bylo použito OF basal medium (Difco) s konečnou 1% koncentrací jednotlivých cukrů. Hottingerův bujon (tryptóza 10 g/l, NaCl 5 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l; pH 7,4) sloužil jako základ pro přípravu testu produkce kyseliny a plynu z glukózy. Jako pH indikátor byl použit roztok bromtymolové modři (2 g/l byly rozpuštěny v 5% roztoku 0,1 N NaOH). Pro přípravu kompletní půdy byla k základu přidána glukóza (10 g/l) a roztok bromtymolové modři (4 ml/l). Finální médium bylo rozplněno do sterilních zkumavek s plynovkou. Pohyb byl testován v Motility test mediu (BBL, Becton Dickinson). Produkce elastázy byla testována na Brain Heart Infusion agaru (Oxoid) s přidavkem elastin-kongo červeně (3 g/l, Sigma-Aldrich). Konvenční testy byly inkubovány při teplotě 36 °C. Výsledky testů beta-hemolýzy, užití glukonátu a tvorby plynu z glukózy byly odečítány po 24 hodinách, produkce elastázy po 7 dnech, ostatní testy po 48 hodinách kultivace.

Analýza mastných kyselin

K identifikaci pomocí analýzy mastných kyselin byl použit Microbial Identification System [MIS] Sherlock (MIDI, Inc., Newark, DE, USA). Kmeny pro analýzu celobuněčných mastných kyselin byly kultivovány na médiu doporučeném pro srovnání se standardní databází mikroorganismů CLIN50 jmenovaného systému MIS Sherlock. Agar se skládal z bujony Trypticase Soy Broth (BBL, Becton Dickinson), granulovaného agaru (15 g/l, Difco, Becton Dickinson) a beraní krve (5%). Kmeny byly inkubovány 24 hodin při teplotě 35 °C. Jedna plná klička čerstvě narostlé biomasy byla přenesena do čisté skleněné zkumavky s teflonovým uzávěrem. Mastné kyseliny přítomné ve vzorku byly převedeny na metylestery mastných

kyselin (FAME, fatty acid methyl esters) pomocí alkalické hydrolyzy za horka a extrahovány do směsi organických rozpouštědel. Saponifikace, metylace a extrakce byly provedeny podle doporučených postupů [15]. FAME byly detekovány na plynovém chromatografu HP 6890 vybaveném plamenovým ionizačním detektorem a kapilární kolonou (Agilent Ultra 2). Píky jednotlivých FAME byly pojmenovány a vyhodnoceny pomocí MIS Sherlock softwaru.

Ribotypizace

Kmeny pro ribotypizaci byly předpěstovány 18 hodin při teplotě 37 °C v Trypton Soya Broth (Oxoid), centrifugovány a resuspendovány ve fosfátovém pufru. Lyze buněk probíhala standardním postupem (lysozym, SDS, proteináza K). Roztok fenol-chloroform-izoamylalkoholu (25:24:1) byl použit k extrakci proteinů. Izolovaná DNA byla vysrážena 95% alkoholem a rozpuštěna v odpovídajícím množství TE pufru. K restrikčnímu štěpení testovaných izolátů a referenčních kultur byl použit restrikční enzym *EcoRI*. Vzniklé fragmenty byly rozděleny horizontální gelovou elektroforézou (0,6% agarózový gel 20 x 20 cm, 1% TBE pufr, 16 hodin při 55V) a přeneseny vakuovým blottingem na pozitivně nabenou nylonovou membránu. Následovala hybridizace DNA fragmentů se sondou komplementární k 16S a 23S rRNA *E. coli* a imunologická detekce hybridizačních profilů. Získané ribotypy byly hodnoceny v programu GelCompar II a dosažené výsledky hybridizačních profilů byly porovnávány s databází ribotypů všech dosud popsáných druhů aeromonád.

Výsledky

U popisovaných případů se z klinických příznaků objevovaly nejčastěji profuzní vodnatý průjem, páchnoucí stolice s hlenem nebo bez něj, silná pohmatová bolestivost břicha a horečka. V žádném z případů nebyla pozorována nauzea či zvracení ani krev ve stolici.

1. případ: Čtyřměsíční holčička. Čtyřměsíční holčička byla hospitalizována na infekčním oddělení. Bakteriologické kultivační vyšetření prokázalo *A. caviae* a *E. coli* O26. Další vzorek stolice odebraný po šesti týdnech obsahoval znovu *A. caviae* a *E. coli* O26. Zdroj infekce se nepodařilo vypátrat.

2. případ: Jednoletý chlapec. U chlapce se objevila horečka a profuzní průjem, na druhý den matka navštívila lékaře. Chlapec byl hodně bledý, měl silné škroukání v břiše, břicho bylo na pohmat bolestivé, trpěl nechutenstvím. V době návštěvy u lékaře byl už jen subfebrilní, dobře hydratovaný a jeho stav byl stabilizovaný. Páchnoucí průjem se ještě objevoval několikrát denně. Byl proveden odběr stolice na kultivační vyšetření a nasazen Hylak. Z tohoto odběru byl izolován *C. jejuni* a dále dva kmeny aeromonád, oba byly identifikovány jako *A. caviae*. Po pěti dnech byl chlapec již bez teplot, šikovní, řídkší stolice měl stále několikrát denně. Druhý kontrolní odběr za dva týdny byl již negativní. Možným zdrojem nákazy mohla být kontaminovaná voda. V rodinné

Tab. 1. Výsledky biochemických testů u izolovaných aeromonád a referenčních kmenů

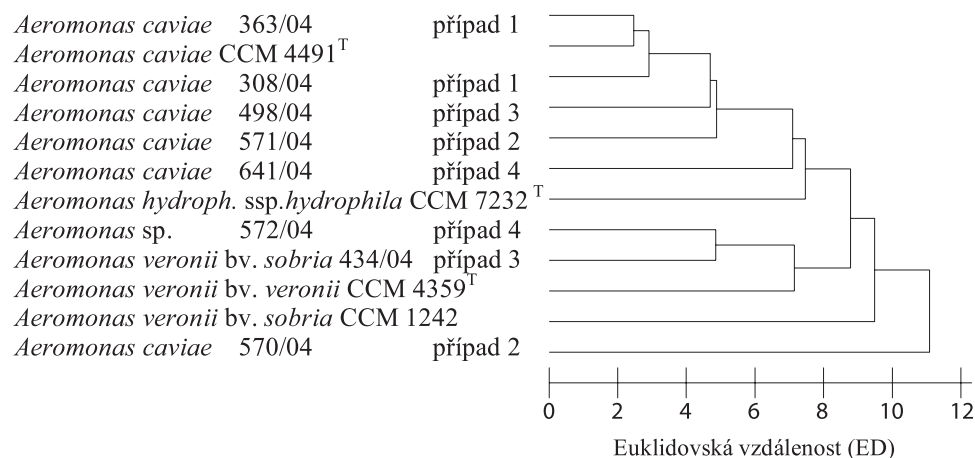
Table 1. Results of biochemical tests in isolated aeromonads and reference strains

Číslo kmene	Výsledek identifikace	VPT	LDC	ADH	ELA	GLP	ARA	ARB	CEL	MAN	SAL	MOT	SCI	ESC	GLC	HEM
čtyřměsíční holčička – případ 1																
308/04	<i>A. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
363/04	<i>A. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
jednoletý chlapec – případ 2																
570/04	<i>A. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
571/04	<i>A. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
šestiměsíční chlapec – případ 3																
434/04	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
498/04	<i>A. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
čtyřměsíční děvčátko – případ 4																
572/04	<i>Aeromonas</i> sp.	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
641/04	<i>A. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
referenční kmeny																
CCM 4491 ^T	<i>A. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
CCM 7232 ^T	<i>A. hydrophila</i> ssp. <i>hydrophila</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
CCM 4359 ^T	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
CCM 1242	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+

+ = pozitivní, - = negativní, VPT = Voges-Proskauer test, LDC = lyzinní dekarboxyláza, ADH = arginin dihydroxyláza, ELA = elastáza, GLP = plyn z glukózy, ARA = kyselina z L-arabinozy, ARB = kyselina z arbutinu, CEL = kyselina z cellobiozy, MAN = kyselina z mannózy, SAL = kyselina z salicinu, MOT = pohyb, SCI = Simmons citrát, ESC = hydrolyza eskulinu, GLC = oxidace glukonátu, HEM = beta-hemolýza

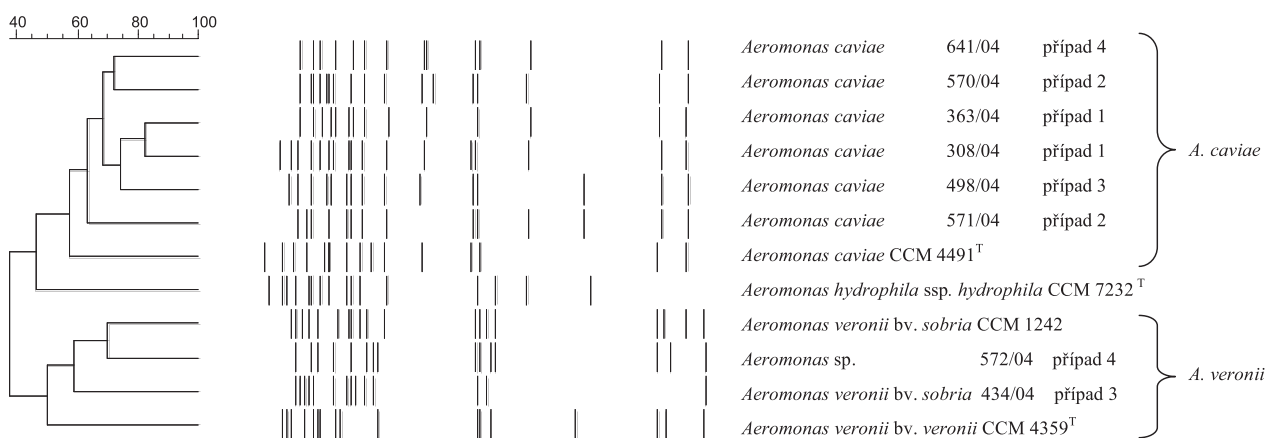
Všechny kmeny vykazovaly u následujících testů pozitivní reakce – produkce indolu, ONPG, kyselina z glukózy, mannitolu, sacharózy a trehalózy – resp. negativní reakce – sirovodík, ureáza, ornitin dekarboxyláza, malonát sodný, kyselina z adonitolu, dulcitu, inositolu, melibiozy, rafinózy, rhamnózy, sorbitolu.

+ positive, - negative, VPT Voges-Proskauer test, LDC lysine decarboxylase, ADH arginine dihydroxylase, ELA elastase, GLP glucose gas, ARA acid from L-arabinose, ARB acid from arbutin, CEL acid from cellobiose, MAN acid from mannose, SAL acid from salicin, MOT motility, SCI Simmons citrate, ESC esculin hydrolysis, GLC gluconate oxidation, HEM betahemolysis. All of the strains showed positivity in the following tests: indol production, ONPG, acid from glucose, acid from mannitol, acid from trehalose, and negativity in the following tests: hydrogen sulphide, urease, ornithine decarboxylase, sodium malonate, acid from adonitol, acid from dulcitate, acid from inositol, acid from raffinose, acid from rhamnose, and acid from sorbitol.



Obr. 1. Srovnání podobnosti profilů mastných kyselin všech izolovaných aeromonád a referenčních kmenů v dendrogramu

Fig. 1. Dendrogram comparison of fatty acid profiles of isolated aeromonads and reference strains



Obr. 2. Srovnání ribotypů všech izolovaných aeromonád a referenčních kmenů získaných štěpením pomocí restriktivního enzymu *EcoRI*

Fig. 2. Comparison of *EcoRI* ribotypes of isolated aeromonads and reference strains

anamnéze uvedli rodiče výlet na Žermanickou přehradu, kde se chlapec napil vody v blízkosti břehu jeden den předtím, než se průjemové onemocnění objevilo.

3. případ. Šestiměsíční chlapec: Několik dní před počátkem příznaků se matka rozhodla přestat kojit a začala synovi dávat také tuhou stravu. Počáteční průjemové obtíže byly zprvu lékařem hodnoceny jako možná alergická reakce. Nealergická strava však průjemové obtíže nezlepšila. Byl proveden odběr stolice na bakteriologické kulturační vyšetření. V prvním vzorku stolice byla nalezena *A. veronii* bv. *sobria*. Chlapec měl stále protrahované průjmy, zapáchající objemné stolice a jeho stav skončil hospitalizací. V druhém vzorku odebraném po dvou týdnech v nemocnici byla izolována *A. caviae*. Třetí kontrolní vzorek odebraný

praktickým lékařem po dalších šesti týdnech byl již negativní. Možným zdrojem nákazy mohla být kontaminovaná potrava.

4. případ. Čtyřměsíční děvčátko. Děvčátko bylo v poradně tři dny před vypuknutím potíží v naprostém pořádku, dobře prospívala. Náhle ze dne na den se objevily prudké kolikové bolesti břicha a horečky, které trvaly 5 dní. Ošetřující lékařka uvažovala o hospitalizaci, hydratace byla hraniční. Děvčátko mělo mnohokrát denně vodnatou páchnoucí stolicí s hlenem. Léčena byla Hylakem a Smectou. Při kontrole šestý den od počátku onemocnění byla první den znovu bez teplot, začala jíst a pomalu se stabilizovala. Pro úpravu střevní flóry byl nasazen Lacidofil. První odběr na kulturační vyšetření prokázal *Aeromonas* sp., z druhého odběru stolice provedeného po

dvou týdnech byla izolována *A. caviae*. V té době bylo již dítě bez potíží. Zdrojem nákazy byli s největší pravděpodobností prarodiče dítěte. Tři dny před vypuknutím obtíží se vrátili z Egypta oba s průjmem. Po dva dny před začátkem onemocnění byli s dítětem v kontaktu. Průjem prarodičů trval i v době onemocnění dítěte, lékaře však nenavštívili.

Výsledky biochemických testů jednotlivých izolátů uvádí tabulka 1. Z osmi kmenů bylo šest určeno jako *A. caviae*, jeden kmen byl identifikován jako *A. veronii* bv. *sobria* a jeden kmen byl označen jako *Aeromonas* sp. Pokud porovnáme vždy dva kmeny izolované od jednoho pacienta, pouze ve dvou případech byl izolován stejný druh aeromonády. Z toho pouze v případě čtyřměsíční holčičky (případ 1) měly *A. caviae* stejný fenotypový profil; v případě jednoletého chlapce (případ 2) se kmeny *A. caviae* lišily biochemicky ve schopnosti produkovat kyselinu z cellobiózy a salicinu. Rozdíl byl patrný už při izolaci kmenů z MacConkeyho agaru – jeden kmen zkvašoval laktózu (570/04), druhý byl laktóza negativní (571/04).

Analýza mastných kyselin potvrdila u všech izolovaných kmenů zařazení do rodu *Aeromonas*. Ukázalo se však, že využití standardní databáze CLIN50 k druhové identifikaci může být sporné. Kmeny aeromonád byly proto identifikovány podle příbuznosti profilů mastných kyselin. V dendrogramu sestaveném pomocí klastrové analýzy byly srovnány aeromonády izolované od pacientů spolu s referenčními kmeny (obr. 1). Je vidět, že všechny kmeny *A. caviae* byly až na výjimky (laktóza pozitivní kmen 570/04) nejvíce podobné s profilem mastných kyselin referenčního kmene *A. caviae* CCM 4491^T a tedy že identifikace kmenů *A. caviae* podle porovnání profilů mastných kyselin s referenčními kmeny je ve shodě s výsledky biochemické identifikace. Ze všech srovnávaných kmenů si byly nejvíce podobné i oba fenotypově shodné kmeny *A. caviae* izolované od čtyřměsíční holčičky (případ 1).

Také porovnání ribotypů izolovaných i referenčních kmenů ukazuje výsledky ve shodě s výsledky biochemické identifikace (obr. 2). U případu čtyřměsíční holčičky (případ 1) bylo navíc potvrzeno, že byl opakovaně izolován stejný kmen *A. caviae*. V případě jednoletého chlapce (případ 2) ribotypizace prokázala, že se nejedná o variantu jednoho kmene a u chlapce byly nalezeny dva odlišné kmeny *A. caviae*.

Ukázalo se, že identifikace na základě porovnávání profilů mastných kyselin byla u biovarů *A. veronii* bv. *veronii* a *A. veronii* bv. *sobria* nespolehlivá (obr. 1). Podle výsledků analýzy mastných kyselin by tak byly kmeny 434/04 a 572/04 chybně určeny jako *A. veronii* bv. *veronii*. Výsledky biochemických testů a ribotypizace určily kmen

434/04 shodně jako *A. veronii* bv. *sobria*. Ribotyp kmene 572/04 byl nejvíce podobný s referenčním kmenem *A. veronii* bv. *sobria* CCM 1242 a také biochemicky byl nejbližší druhům z *A. sobria* komplexu (*A. veronii* bv. *sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*) [2]. Podle výsledků biochemických testů, které byly v rozporu s publikovanými daty (pozitivní tvorba kyseliny z cellobiózy a hydrolýza eskulinu), nemohl však být kmen 572/04 jednoznačně identifikován a byl označen jako *Aeromonas* sp., i když pravděpodobně patří do komplexu *A. sobria*.

Diskuse

Čtyři případy akutního průjmového onemocnění u dětí do jednoho roku ukazují, že aeromonády mohou způsobovat vážnější problémy [5]. U vyšetřovaných dětí se podařilo zachytit různé druhy aeromonád, nejčastěji byla ve shodě s literárními údaji izolována *A. caviae* [8, 17]. Pouze v jednom případě byl opakovaně izolován stejný kmen, v ostatních případech byly izolovány vždy dva různé kmeny (druhy) rodu *Aeromonas*. V žádném z případů akutních průjmů nebyly nalezeny střevní patogeny jako *Salmonella* spp., *Shigella* spp. nebo *Yersinia enterocolitica*.

Zjištění, že ve třech případech ze čtyř byl v kontrolním odběru izolován jiný kmen aeromonády, je překvapivé. Předpokládali bychom, že pokud budou aeromonády izolovány i z kontrolních odběrů, kdy se dětem většinou dařilo lépe, jedná se už jen o pouhé vylučování infekčního agens po prodělané infekci. Protože bývají z vyšetřovaného materiálu izolovány pouze jedna nebo dvě suspektní kolonie, nevíme, zda je možné již v akutní fázi onemocnění zachytit ve stolici více druhů aeromonád, z nichž pouze jeden by byl patogenní.

Otázkou také zůstává, zda a za jakých okolností jsou aeromonády schopny vyvolat akutní průjmové onemocnění samy či zda se pouze podílejí na průběhu onemocnění. Ve dvou případech ze čtyř byly izolovány i jiné střevní patogeny – *E. coli* O26 (čtyřměsíční holčička) a *C. jejuni* (jednoletý chlapec). Zajímavé je, že v případech, kdy nebyl izolován žádný jiný střevní patogen, byl v prvním vyšetřovaném vzorku odebraném v akutní fázi onemocnění nalezen jiný druh než *A. caviae* (*A. veronii* bv. *sobria* u šestiměsíčního chlapce a *Aeromonas* sp. u čtyřměsíčního děvčátka). V obou případech pak byla v dalším vzorku stolice prokázána „jen“ *A. caviae*.

Do jaké míry je druhové zastoupení aeromonád určující pro průběh onemocnění není jasné. Zda opravdu existuje vztah mezi konkrétním

druhem aeromonády a akutním průjmovým onemocněním by mohlo ukázat až paralelní vyšetření kontrolní skupiny. Taková studie by ověřila, zda se aeromonády vyskytují (příp. jaké druhy) i u zdravých dětí. K objasnění cesty přenosu k vnímavým jedincům je však zapotřebí znát i prevalenci druhů aeromonád v prostředí. Tato problematika je zatím opomíjena. V současné době neexistuje zákonná norma, která by nařizovala zjišťovat existenci a počet aeromonád např. ve vodě. Aeromonády jsou naopak považovány za běžnou vodní mikroflóru a při stanovení koliformních bakterií jsou vyřazovány pouze na základě pozitivního cytochromoxidázového testu.

Závěr

Neprokázali jsme, že uvedené klinicky závažné případy souvisí s jedním konkrétním druhem rodu *Aeromonas*. Opakované záchyty aeromonád ze stolice ukazují, že aeromonádovým infekcím bude třeba věnovat větší pozornost. V námi popsaných případech byla pravděpodobným zdrojem aeromonádové infekce kontaminovaná voda nebo potraviny a kontakt s cestovateli, kteří onemocněli průjmem. K potvrzení zdrojů nákazy a zodpovězení otázky zda a do jaké míry se aeromonády podílejí na průjmových onemocněních je nutná dobrá spolupráce ošetřujícího lékaře, mikrobiologa a epidemiologa.

Práce vznikla za podpory IGA MZ ČR, číslo projektu: NR/8011-2.

Za spolupráci při šetření epidemiologických souvislostí děkujeme MUDr. Elišce Mackowské a MUDr. Evě Schallerové, za připomínky k textu RNDr. Daně Baudyšové, Ph.D.

Literatura

1. **Abbott, S. L.** *Aeromonas*. In *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition (Murray, P. R. et al. eds). Washington DC: ASM Press, 2003, 701–705.
2. **Abbott, S. L., Cheung, W. K. W., Janda, J. M.** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, 6, 2348–2357.
3. **Aldová, E., Schindler, J., Urbášková, P., Nemeč, A.** Biochemická identifikace aeromonád. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 1994, 43, 2, 55–60.
4. **Bingen, E. H., Denamur, F., Elion, J.** Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7, 3, 311–327.
5. **Chang, S. S. W., Ng, K. C., Lyon, D. J., Cheung, W. L. et al.** Acute bacterial gastroenteritis: a study of adult patients with positive stool cultures treated in the emergency department. *Emerg Med J*, 2003, 20, 335–338.
6. **Chopra, A. K., Houston, C. W.** Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, 1999, 1, 13, 1129–1137.
7. **Cowan, S. T.** Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge: University Press, 1974, 150–171.
8. **Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A., Beretta, M., Peduzzi, R.** Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping. *Eur J Epidemiol*, 2000, 16, 5, 447–453.
9. **Huys, G., Vancanneyt, M., Coopman, R., Janssen, P. et al.** Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44, 4, 651–658.
10. **Kaznowski, A.** Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. *J App Microbiol*, 1998, 84, 423–430.
11. **Kühn, I., Albert, M. J., Ansaruzzman, M., Bhuiyan, N. A. et al.** Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *J Clin Microbiol*, 1997, 35, 2, 369–373.
12. **Miyake, M., Iga, K., Izumi, C., Miyagawa, A. et al.** Rapidly progressive pneumonia due to *A. hydrophila* shortly after near-drowning. *Intern Med*, 2000, 9, 12, 1128–1130.
13. **Ørmen, Ø., Granum, P. E., Lassen, J., Figueras, M. J.** Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS*, 2005, 113, 203–207.
14. **Rautelin, H., Hanninen, M. L., Sivonen, A., Turunen, U., Valtonen, V.** Chronic diarrhea due to a single strain of *Aeromonas caviae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1995, 14, 1, 51–53.
15. **Sasser, M.** Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI technical note 101, MIDI, Newark, DE, USA.
16. **Sedláček, I., Jakšl, V., Přepěchalová, H.** Identifikace aeromonád z vod. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 1994, 43, 2, 61–66.
17. **Sinha, S., Shimada, T., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K. et al.** Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. *J Med Microbiol*, 2004, 53, 527–534.

Do redakce došlo 31. 1. 2006

Mgr. Eva Krejčí
Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
Centrum mikrobiologie, parazitologie a imunologie
Partyzánské nám. 7
70200 Ostrava
e-mail: eva.krejci@zuova.cz