

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AHK: agar hierro y dos azúcares de Kligler.

AHL: agar hierro lisina

AMP: adenosil monofosfato cíclico

APA: agua de peptona alcalina

APS: atención primaria de salud

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

ATCC: siglas del inglés, *American Type Culture Collection*

BGNMF: bacilo gramnegativo no fermentador

BGNOP: bacilo gramnegativo oxidasa positivo

CDC: siglas del inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM: concentración mínima inhibitoria

CIN: cefsulodina-irgasan-novobiocina

CLSI, del inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLED: cistina lactosa electrolito deficiente

CMHE-10/10: Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de 10 de Octubre

CNCMA: Centro Nacional de Cirugía de Mínimo Acceso

CPHEM: Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología

DNasa: desoxirribonucleasas

EDA: enfermedad diarreica aguda

EGCP: electroforesis en gel de campo pulsado

g: gramos

HGs: grupos de hibridación

H₂S: ácido sulfhídrico

LNR/EDA/IPK: Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, del Instituto "Pedro Kouri"

ABREVIATURAS

LPS: Lipopolisacárido.

MBL: metalo- β -lactamasa

MgCl₂: cloruro de magnesio

NaCl: cloruro de sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PLFA: polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados

PLFR: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción

PME: proteínas de membrana externa

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RT-RCP: reverso transcriptasa

SE: sistema de secreción/excreción

TC: toxina colérica

TCBS: tiosulfato citrato bilis sacarosa

TCP: siglas del inglés, *toxin-coregulated pilus*

TE: toxina termoestable

TL: toxina termolábil

TSML: tipificación de la secuencia Multilocus

VIH: virus de inmunodeficiencia humano

INDICE	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. MARCO TEÓRICO	5
III.1 <i>Aeromonas</i> spp.	5
III.1.1 Características generales del género	5
III.1.2 Características bioquímicas	5
III.1.3 Taxonomía	5
III.1.4 Factores de virulencia	6
III.1.5 Diagnóstico de laboratorio	8
III.1.6 Susceptibilidad antimicrobiana	11
III.1.7 Epidemiología	11
III.1.8 Patogenia	12
III.1.9 Procesos infecciosos producidos por <i>Aeromonas</i> spp.	13
III.1.10 Tratamiento	13
III.2 <i>Plesiomonas</i> sp.	13
III.2.1 Características generales del género	13
III.2.2 Características bioquímicas	14
III.2.3 Taxonomía	14
III.2.4 Factores de virulencia	15
III.2.5 Diagnóstico de laboratorio	16
III.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana	18

III.2.7 Epidemiología	19
III.2.8 Patogenia	20
III.2.9 Procesos infecciosos producidos por <i>Plesiomonas</i> sp.	20
III.2.10 Tratamiento	21
.....III.3 <i>Vibrio</i> spp.	21
.....III.3.1 Características generales del género	21
.....III.3.2 Características bioquímicas	21
.....III.3.3 Taxonomía	21
.....III.3.4 Factores de virulencia	22
.....III.3.5 Diagnóstico de laboratorio	23
.....III.3.6 Susceptibilidad antimicrobiana	27
.....III.3.7 Epidemiología	27
.....III.3.8 Patogenia	29
.....III.3.9 Procesos infecciosos producidos por <i>Vibrio</i> spp.	30
.....III.3.10 Tratamiento	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
IX. ANEXOS	

AGRADECIMIENTOS

**A mi Dios:
Por su amor y por la fuerza que me da para ir
hacia adelante**

**A mis hijas:
Por ser mis más preciados tesoros y la razón de mi
vida**

**A mi esposo:
Por apoyarme en todo**

**A mis tutores y asesores:
Por su apoyo, orientación y disposición incondicional**

A todos gracias y mucho amor.



RESUMEN

Aeromonas, *Plesiomonas* y *Vibrio* son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva, tienen distribución mundial y se aíslan de fuentes diversas, ocasionando infecciones extraintestinales e intestinales. El bajo aislamiento en diferentes áreas geográficas pudiera estar influenciado, por un inadecuado diagnóstico microbiológico, ya que la mayoría de los microbiólogos clínicos, identifican principalmente los patógenos clásicos. Se realizó un estudio en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto "Pedro Kourí" y el Laboratorio de Microbiología del Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de 10 de Octubre, en muestras intestinales y extraintestinales, respectivamente, con el objetivo de analizar la circulación de estos agentes y sus patrones de susceptibilidad, durante el período de mayo 2016 a junio 2017. Se estudiaron 64 aislamientos correspondientes a los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, a los que se les identificó la especie utilizando los métodos Arokey II y Aeroesquema y además se les determinó la susceptibilidad frente a nueve drogas antimicrobianas. Se identificaron cinco aislamientos en el CMHE de 10 de Octubre correspondientes tres de ellos al género *Aeromonas* y dos a *Vibrio*, así como 55 aislamientos de *Aeromonas* y cuatro *Plesiomonas* en el LNR/EDA/IPK. El género *Aeromonas* mostró resistencia variable, mientras que el género *Vibrio*, presentó resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y ampicilina y el género *Plesiomonas*, no mostró resistencia. Con la introducción de la prueba de oxidasa en el laboratorio de Microbiología del CMHE de 10 de Octubre se logró ampliar el diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por estos géneros microbianos.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de mortalidad y discapacidad en el mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo (CDC, 2013a). Entre ellas, las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) demandan gran atención en los servicios de asistencia médica, pues su mayor impacto se observa en la población infantil (niños menores de cinco años), debido a la deshidratación y desnutrición que generan (Lanata CF *et al.*, 2013).

Según el Anuario Estadístico, en el 2016, se realizaron 386 507 consultas médicas por EDA en la población cubana, de ahí la importancia que reviste la prevención, el diagnóstico y el enfoque terapéutico de esta entidad clínica (Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/dne>)

Las EDA se favorecen por inadecuados hábitos alimentarios, condiciones higiénico-sanitarias deficientes, el cambio climático (Daskalov H, 2006; Johnston J y Bhatt K, 2011), el uso indiscriminado de antimicrobianos y la infección por microorganismos patógenos como: virus, parásitos, levaduras y bacterias. Entre los agentes bacterianos se destacan los géneros: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Campylobacter* *Yersinia*, que tienen en común el ser bacilos gramnegativos, causantes de infecciones extraintestinales e intestinales en el hombre, donde la diarrea constituye la manifestación clínica más frecuente (Guerrant RL *et al.*, 2001; Luyt CD *et al.*, 2012).

Los microorganismos pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivos, que utilizan la glucosa oxidativa y fermentativamente pero no utilizan la lactosa (Amani J *et al.*, 2015). Poseen una distribución mundial y se aíslan de fuentes tan diversas como el agua (Austin B, 2005), el suelo y los alimentos, causando infecciones en animales y en humanos, de ahí que su caracterización es de gran utilidad para los estudios epidemiológicos (Bravo L *et al.*, 2007; Bravo L *et al.*, 2011).

Aeromonas y *Plesiomonas* se consideran patógenos oportunistas, en individuos sanos o con factores predisponentes; son capaces de producir bacteriemia, endocarditis, meningoencefalitis, neumonía, peritonitis e infecciones hepato-biliares, las que pueden comprometer la vida del paciente (Lobatón T *et al.*, 2015).

I. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes métodos de identificación fenotípica de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, entre ellos se encuentran: Aerokey II y Aeroesquema, ambas técnicas fáciles de realizar y con buena sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en la actualidad se dispone de métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa (RCP), microarreglos, espectrometría de masa, esta última de referencia (Chen PL *et al.*, 2016), entre otros, que contribuyen a una mejor caracterización, aunque son muy costosos. La mayoría de los autores señalan que los sistemas de identificación convencionales, son métodos útiles para el diagnóstico microbiológico en aquellos laboratorios donde las técnicas de avanzada no se han podido desarrollar (Batista N *et al.*, 2014).

Generalmente, los cuadros diarreicos ocasionados por *Aeromonas* y *Plesiomonas* en individuos sanos son autolimitados y evolucionan satisfactoriamente, con una dieta adecuada e hidratación. Sin embargo, en los individuos con factores predisponentes se requiere de tratamiento antimicrobiano (Janda JM *et al.*, 2010). La diarrea causada por *V. cholerae* requiere, además de la hidratación, de antimicrobiano (Beltrán M, 2012; Leibovici Y *et al.*, 2014).

En Cuba existen estudios de aislamientos de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivos, en pacientes con EDA (Bravo L *et al.*, 2011), así como en procesos infecciosos extraintestinales, los que datan del año 1993, cuando Bravo y cols. aíslan e identifican estos microorganismos en pacientes con infecciones del tracto respiratorio y genito-urinario (Bravo L *et al.*, 1993).

Los escasos aislamientos de *Aeromonas* y *Plesiomonas* en diferentes áreas geográficas pudiera estar influenciada, entre otros factores, por un inadecuado diagnóstico microbiológico. La mayoría de los microbiólogos clínicos identifican los patógenos entéricos clásicos (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Y. enterocolitica* y bacilos gramnegativos no fermentadores) no realizándose con sistematicidad la prueba de oxidasa (Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/dne>)

El Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNR/EDA/IPK), comenzó a realizar desde 1988 investigaciones encaminadas a mantener la vigilancia microbiológica de los bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivos, aislados de

1. INTRODUCCIÓN

muestras clínicas, recomendando introducir en toda la Red Nacional de Laboratorios de Microbiología del país la sistematización de esta prueba, con el objetivo de demostrar la circulación de las especies pertenecientes a estos géneros en Cuba. Los resultados obtenidos en los estudios realizados desde esa fecha hasta la actualidad, ratifican la importancia de mantener la vigilancia e incluirlos en la lista de patógenos bacterianos causantes de infecciones intestinales y extraintestinales en Cuba (Bravo L *et al.*, 1993). El laboratorio de Microbiología del CMHE de 10 de Octubre constituye uno de los laboratorios de la red donde no se trabajan muestras de heces por lo que no se realiza la prueba de oxidasa buscando BGNOP. Por este motivo y por la importancia que reviste el tema a nivel nacional e internacional es necesario ampliar el diagnóstico en muestras extraintestinales y mantener la vigilancia microbiológica y epidemiológica de estos bacilos, así como la emergencia y diseminación de aislamientos resistentes, por lo que se propuso demostrar la circulación de estos agentes, así como conocer la susceptibilidad antimicrobiana de los mismos.

II. OBJETIVOS

1. Demostrar la circulación de *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* en muestras extraintestinales en el Centro Municipal de Higiene, Epidemiología y Microbiología de 10 de Octubre.
2. Identificar en género y especie los microorganismos pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* procedentes de la red nacional de microbiología del país.
3. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de todos los aislamientos objeto de estudio.

III.1 *Aeromonas* spp.

III.1.1 Características generales del género: Los microorganismos del género *Aeromonas* son bacilos gramnegativos que miden de 0,3 a 1 µm de ancho por 1 a 3,5 µm de largo. Tienen flagelos monotricos, aunque en los cultivos jóvenes en medio sólidos se observan también bacilos con flagelos peritricos, excepto *A. salmonicida* y *A. media* (especies inmóviles). Reducen los nitratos a nitritos, son anaerobios facultativos y oxidasa positivos. Se desarrollan en un rango de pH entre 5,5 y 9,0. Basado en la temperatura de crecimiento existen dos subdivisiones del género *Aeromonas*: las cepas que crecen entre 35 y 37°C (mesófilas), notorias por producir diversas enfermedades en el hombre y las cepas que tienen un crecimiento óptimo de 22 a 25°C (psicrófilas), este último grupo lo integra una especie (*A. salmonicida*). Todas las cepas de *Aeromonas* son resistentes al compuesto vibriostático O/129 (2,4diamino-6,7disopropilpteridina) (Mansour AM *et al.*, 2012; Naz F *et al.*, 2016).

III.1.2 Características bioquímicas: Son capaces de producir ácidos o ácidos y gas a partir de glucosa, arabinosa, sacarosa, manitol, fructosa, maltosa y trealosa. Además, dan respuesta variable ante la utilización de los aminoácidos: lisina, ornitina y arginina, también pueden hidrolizar el glucósido esculina, no utilizan el inositol, ni producen ácido sulfhídrico (H₂S) en el medio de agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK). Utilizan la glucosa oxidativa y fermentativamente, no ocurriendo así con la lactosa. Hidrolizan almidón, dextrina y glicerol. No tienen capacidad para crecer en caldo con cloruro de sodio (NaCl) al 6,5% (Koneman EW *et al.*, 2008).

III.1.3 Taxonomía: La taxonomía de *Aeromonas* está en transición (Beaz R *et al.*, 2015). En 1890 Zimmeran describió un miembro del género *Aeromonas*, aislando esta bacteria de un suministro de agua potable y lo nombró *Bacillus punctatus*. El género *Aeromonas* fue propuesto por Kluyver Van Neil. Posteriormente, Véron lo incluye en la familia *Vibrionaceae*. Popoff y cols., en 1976, plantean que el género *Aeromonas* es genéticamente heterogéneo a nivel de especie (Chun J y Rainey FA, 2014; Studer N *et al.*, 2013). Colwell y cols., en 1986, propusieron incluirla en la familia *Aeromonadaceae*, basado en resultados obtenidos en la región 16S ARN

III. MARCO TEÓRICO

(ácido ribonucleico) y realizando estudios de hibridación del ARN-ADN (ácido desoxirribonucleico) (Yañez MA *et al.*, 2003). Actualmente, según el Manual de Bacteriología sistemática de Bergey se ubica en el Reino: *Procariota*, Orden XII: *Aeromonadales*, Familia I: *Aeromonadaceae* y Género: *Aeromonas* (Beaz R *et al.*, 2013b).

III.1.4 Factores de virulencia: Entre los factores de virulencia se citan:

Proteínas biológicamente activas:

- Enterotoxinas: Se han verificado tres tipos diferentes: una parecida a la colérica, una enterotoxina citotóxica no neutralizable por la antitoxina y otra con actividad hemolítica e inestable a 56°C. Las enterotoxinas citotóxicas se distinguen *in vitro* de las aerolisinas y α -hemolisinas por producir elongación de las células, pero no lisis. Se describen dos tipos de actividad citotóxica, una asociada con el incremento del adenosil monofosfato cíclico (AMPc), estructuralmente diferente a la toxina colérica (TC) y denominada toxina termolábil (TL) y la conocida toxina termoestable (TE), pero con una mayor homología con la colérica. Ambas se asocian con la producción de diarreas acuosas (Wu CJ *et al.*, 2012).

- Hemolisinas: La caracterización de las hemolisinas se ve obstaculizada por la múltiple terminología empleada para su descripción (Piotrowska Met *et al.*, 2015).

La denominada originalmente como aerolisina (Yousr AH *et al.*, 2007) es la α -hemolisina prototipo para el género, su secuencia de aminoácidos es parcialmente semejante con la toxina α de *Staphylococcus aureus* y con la enterotoxina A de *Clostridium perfringens*. La aerolisina se caracteriza por la formación de poros en las células del hospedero (efecto citolítico) (Grim CJ *et al.*, 2013).

Enzimas hidrolíticas extracelulares: esterasa, amilasa, elastasa, peptidasa, proteasas, lipasas, desoxirribonucleasas (DNasa): Están descritas al menos tres de estas proteínas y se desconoce la posible función que realizan en la patogenia de *Aeromonas* (Chang MC *et al.*, 1992; Tomas JM, 2012; John Net *et al.*, 2013; Alavandi SV *et al.*, 2013; Lilly J *et al.*, 2014).

- Complejo de β -lactamasa: Hacen que el agente sea potencialmente resistente a penicilina, ampicillin, carbenicilina y cefazolina ya que posee enzimas inducibles a

nivel cromosomal (clase B, C y D β -lactamasa). Metalo- β -lactamasa (MBL), AmpC β -lactamasa y penicilinas son las principales β -lactamasas elaboradas por *Aeromonas* (Cisar CR *et al.*, 2014).

Cápsula de polisacáridos ó Biofilm: Polisacárido con función antifagocitaria (Tomás JM, 2012).

Capa S: Formada sólo por proteínas y glicoproteínas que se involucran en la unión de la bacteria a los componentes de la célula del hospedero y confieren resistencia a las propiedades bactericidas del complemento (Kotloff KL *et al.*, 2012).

Capa Lipopolisacárida (LPS)

Adhesinas: Favorecen el proceso de adherencia y la colonización a las células epiteliales. Los pili están constituidos por proteínas (pilinas), situadas en los extremos de las fimbrias. Se describen tres tipos de pili: los del tipo I, descritos en *A. hydrophila*, con una composición de aminoácidos muy similar a los pili tipo I de *E. coli*; los de tipo IV descritos en *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* y al tercer tipo se le denomina mini-pili, que guarda gran semejanza con *V. cholerae*. Entre las adhesinas no filamentosas se describen las macromoléculas: monómeros de la capa S, LPS y proteínas de membrana (Beaz R *et al.*, 2013b).

Flagelos: Permiten el movimiento bacteriano. Están constituidos por proteínas (flagelinas) (Brooks GF *et al.*, 2001). Permiten la formación de nuevas colonias lejanas al punto de contacto. *Aeromonas* poseen dos sistemas flagelares, el polar (monotrico) y el lateral (peritrico). Ambas estructuras contribuyen con la formación de microcolonias y biopelículas (Merino S *et al.*, 2003).

Proteínas de Membrana Externa (PME)

Sistema de secreción/excreción (SE): Generalmente, las proteínas secretadas son del tipo III (T3SS) y son las responsables de activar las vías de transducción de la señal, el reacondicionamiento de la actina y la unión a la intimina (Grim CJ *et al.*, 2013).

Sideróforos: Con una alta afinidad por el hierro y se sintetizan bajo condiciones de estrés, para competir por este crítico elemento, cuando su concentración está

limitada. Cepas de *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. caviae* sintetizan un sideróforo (amonobactina) (Menanteau *Set al.*, 2014a; Menanteau *Set al.*, 2014b).

Transposones: Tienen un papel importante en la transferencia genética horizontal y la diseminación de la resistencia interespecies (Oliveira PH *et al.*, 2014).

III.1.5 Diagnóstico de laboratorio

Aislamiento: Las muestras a estudiar dependen de la localización de la infección, se utilizan heces o muestras de otras localizaciones anatómicas. Los aislamientos de *Aeromonas* no sobreviven a la temperatura ambiente o de refrigeración por más de 30 días, para conservar las especies de *Aeromonas* durante períodos prolongados se recomienda el glicerol al 10% a -70°C (Koneman EW *et al.*, 2008). Entre los medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *Aeromonas* se encuentran, el agar sangre con ampicilina (10mg/L) y el agar cefsulodina-irgasan-novobiocina (CIN) (Olaniran AO *et al.*, 2015). También se utilizan los medios selectivos y diferenciales como agar MacConkey, medio de AHK, agar hierro lisina (AHL), agar desoxicolato, agar eosina azul de metileno y agar *Salmonella-Shigella* (Koneman EW *et al.*, 2008; Chen PL *et al.*, 2015).

Los procedimientos convencionales para el diagnóstico son engorrosos y demoran los resultados de siete a diez días. Una nueva metodología emplea medios de cultivo elaborados con sustratos cromogénicos y fluorogénicos (CromoCen AGN y CromoCen AE), que permiten simplificar y acelerar el diagnóstico, además de ofrecer resultados altamente específicos (Viera DR *et al.*, 2016).

Identificación del género *Aeromonas*: Las colonias no fermentadoras de la lactosa y no productoras de H₂S en agar MacConkey o agar *Salmonella-Shigella*, se inoculan en medio de AHK y AHL, medios donde se comprueban las propiedades fisiológicas, posteriormente se realiza la prueba de oxidasa y catalasa (ambas positivas). Las pruebas bioquímicas para reconocer al género *Aeromonas* incluyen: el crecimiento en un caldo nutritivo con la adición de 3 y 6% de NaCl, la producción de ácido a partir del manitol e inositol, dihidrolación de la arginina y descarboxilación de la lisina y la ornitina (Rodríguez Cet *al.*, 2014; VieraDR *et al.*, 2015; Humphries R *Met al.*, 2015).

III. MARCO TEÓRICO

Identificación de las especies del género *Aeromonas*: A nivel de especie la clasificación puede ser compleja debido a la heterogeneidad fenotípica y genotípica. Desde el punto de vista bioquímico, se identifican como fenoespecies, mientras que las genéticamente diferentes se denominan grupos de hibridación (HG) o geno-especies, determinadas por pruebas de hibridación del ADN total (Ching W *et al.*, 2015). Además, se incluyen dos grupos con ADN homólogo: *Aeromonas* spp. (HG11) y *Aeromonas* spp. (HG13), los cuales no cuentan con nombres (Sandrin TR *et al.*, 2013; Sifaw K *et al.*, 2014). En la tabla 1 se muestran las geno-especies y feno-especies que integran al género *Aeromonas*.

A pesar de las dificultades que implica su caracterización fenotípica, el Aerokey II se usa para la diferenciación de cepas individuales de *Aeromonas* (Carnahan A *et al.*, 1991). Es de gran utilidad en la identificación de las siete especies de mayor importancia clínica del género: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. trota*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. veronii* biovar *veronii* y *A. veronii* biovar *sobria*. Las pruebas utilizadas están dispuestas en una clave dicotómica flexible que incluyen: la producción de indol, hidrólisis de la esculina, producción de gas a partir de la glucosa, producción de ácido a partir de la arabinosa y la sacarosa, Voges-Proskauer y resistencia a la cefalotina.

El Aeroesquema (Furuwatari CH *et al.*, 1994), está diseñado también para la identificación, a través de un esquema dicotómico, de las especies de *Aeromonas* y además discrimina *P. shigelloides* y dos especies de *Vibrio* (*V. cholerae* y *V. mimicus*). Al igual que en el Aerokey II se necesita un cultivo puro recientemente obtenido a partir de una sola colonia y pruebas bioquímicas previas (tinción de Gram, fermentación de la glucosa, oxidasa y crecimiento en ausencia de NaCl), antes de iniciar el esquema de identificación.

III. MARCO TEÓRICO

Tabla 1. Genoespecies y fenoespecies que integran al género *Aeromonas*.

Genoespecie	Fenoespecie	Grupo DNA o hibridación ⁽¹⁾	Cepa tipo	Sinónimo
<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1	ATCC 7966t	
<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	2	ATCC 51108t	
<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>	3	ATCC 33658t	
<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	4	ATCC 15468t	<i>A. punctata</i>
<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>	5	ATCC 33907t	
<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. caviae</i>	6	ATCC 23309t	<i>A. punctata</i>
<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	7	ATCC 43979t	
<i>A. veronii biovar sobria</i>	<i>A. sobria</i>	8	ATCC 9071	<i>A. ichthiosmia</i>
<i>A. jandaei</i>	<i>A. sobria</i>	9	ATCC 49568t	
<i>A. veronii biovar veronii</i>	<i>A. sobria</i>	10	ATCC 35604t	
<i>Aeromonas</i> spHG11	<i>Aeromonas</i> sp.	11	ATCC 35941	
<i>A. schubbertii</i>	<i>A. hydrophila</i>	12	ATCC 43700t	
<i>Aeromonas</i> spHG13	<i>Aeromonas</i> sp.	13	ATCC 43946	
<i>A. trota</i>	<i>A. sobria</i>	14	ATCC 49657	<i>A. enteropelogenes</i>
<i>A. allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	15	ATCC 1208t	
<i>A. encheleia</i>	<i>A. caviae</i>	16	ATCC 51929t	
<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>	17	LMG 17541t	
<i>A. culicicula</i>	<i>A. culicicula</i>	18	CECT 5761	

1. Grupos de hibridación (HGs) definidos por el CDC.

ATCC (American Type Culture Collection)

LMG (Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent)

CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia España)

Diferenciación de las especies del género *Aeromonas*: Para la identificación y diferenciación a nivel de especie de los aislamientos clínicos de *Aeromonas* se encuentran: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PLFR), secuenciación, RCP (Szczyka E *et al.*, 2014), reverso transcriptasa RCP (RT-RCP), citometría de flujo con activación de células por fluorescencia, polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (PLFA) y electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP) (Perry L *et al.*, 2007). Se usan, además, nuevos sistemas de identificación como: microarreglo de ADN (Puthuchery SD *et al.*, 2012),

III. MARCO TEÓRICO

tipificación de la secuencia multilocus (TSML) y la espectrometría de masa (Wang W *et al.*, 2014; Bong H *et al.*, 2015), constituyendo esta última la técnica de referencia (Chen PL *et al.*, 2016).

Tipificación: La tipificación serológica se basa en la presencia del antígeno somático O de naturaleza lipopolisacáridica. El serotipaje es de ayuda epidemiológica para dilucidar el papel de los patógenos en el proceso infeccioso (Menanteau S *et al.*, 2016). El género *Aeromonas* tiene 96 serogrupos: unos propuestos por Sakasaki y Shimada (1984), obteniéndose su clasificación a partir de cepas de *Aeromonas* mesófilas y posteriormente se clasificaron aislamientos hechos en Inglaterra, Perú, Brasil y Australia. Con estos esquemas, se definieron serogrupos importantes, Ej. O:11, relacionado con infecciones extraintestinales (incluyendo septicemia y meningitis), O:34 vinculado con infecciones de heridas y O:16 relacionado con gastroenteritis (Figueras MJ, 2005). Cada especie es serológicamente heterogénea, incluyendo más de un serogrupo. Además, un simple serogrupo puede encontrarse en más de una especie (Austin B, 2015).

III.1.6 Susceptibilidad antimicrobiana: Son susceptibles a tetraciclinas y aminoglucósidos. Aunque se está mostrando una resistencia inusual (Vincent AT *et al.*, 2015), particularmente relacionada con la producción de β -lactamasas codificadas por cromosomas, descritas en diferentes especies (Longa A *et al.*, 2015). Se ha evidenciado corresponsencia con las quinolonas y las cefalosporinas y se ha usado alternativamente carbapenémicos y colistina (Sung Q *et al.*, 2014; Jallad MA *et al.*, 2015).

III.1.7 Epidemiología: Se incluye a las especies del género *Aeromonas* en la lista de patógenos emergentes por dos razones: la primera relacionada con el gran consumo de alimentos con poca cocción y naturales que son conservados a bajas temperaturas, lo que no elimina el riesgo de infección, pues algunas especies de *Aeromonas* son psicrófilas; y la segunda razón se vincula con el incremento de estas especies en el agua, durante las estaciones más cálidas, posibilitando un mayor contacto del hospedero con la fuente de infección (Castro G *et al.*, 2003; Galindo CL y Chopra AK, 2007).

III. MARCO TEÓRICO

Aeromonas spp. pueden formar parte de la microbiota gastrointestinal normal de personas sanas asintomáticas (Pitarangsi C *et al.*, 1982).

Habitán ecosistemas acuáticos: agua subterránea, agua potable de las plantas de tratamiento, sistemas de distribución de agua, regadíos y plantas de reserva de agua, así como lagos, ríos y ambientes marinos con una baja concentración de sodio (Aravena M *et al.*, 2013). Pueden ser recuperadas también de alimentos congelados a -20°C durante períodos prolongados (Figueras MJ *et al.*, 2015).

La OMS considera *Aeromonas* como microorganismos pertenecientes al nivel de Riesgo II (Disponible en: <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/msds-ftss/msds6e.html>; http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/2edvolb.pdf)

Principales aspectos:

(Disponible en: <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/msds-ftss/msds6e.html>)

Distribución: Mundial.

Reservorio: El hombre, animales terrestres y marinos; aguas salobres, dulces, cloradas y estuarios marinos.

Modo de transmisión: Por ingestión de agua y alimentos contaminados (pescados, mariscos, frutas, vegetales, carnes rojas y productos lácteos). Las infecciones de heridas se adquieren por exposición a agua y suelos contaminados.

Período de incubación: Variable, de 24 a 72 horas para las infecciones intestinales y hasta siete días para otros sitios de infección.

Período de transmisibilidad: Durante la fase aguda de la enfermedad y hasta que no esté presente en las heces el agente infeccioso.

Susceptibilidad y resistencia: Son patógenos oportunistas y producen infecciones en individuos inmunocompetentes, aunque con mayor frecuencia en individuos con factores predisponentes (diabetes mellitus, linfomas, leucemias), así como ancianos y niños (Kotloff KL *et al.*, 2013; Lobatón T *et al.*, 2015).

III.1.8 Patogenia: El papel de *Aeromonas* como patógeno entérico constituye aún un tema controversial. La no disponibilidad de un modelo animal adecuado dificulta demostrar su enteropatogenicidad. Desde 1985 se describen estudios de inoculación oral en humanos voluntarios, pero no se logró reproducir la enfermedad diarreica (Morgan DR *et al.*, 1985).

III.1.9 Procesos infecciosos producidos por *Aeromonas* spp: Producen una variedad de expresiones clínicas donde la diarrea aguda autolimitada constituye la manifestación clínica más común, aunque también se describe la diarrea mucopio sanguinolenta acompañada de dolor abdominal y la diarrea acuosa, profusa parecida al cólera (Kotloff KL *et al.*, 2013; Lobatón T *et al.*, 2015). Entre las infecciones extraintestinales se destacan las infecciones de piel y tejidos blandos como celulitis, forunculosis, fascitis necrotizante, colangitis (Lobatón T *et al.*, 2015; Attéré SA *et al.*, 2015). Se describe con menor frecuencia peritonitis, neumonía, bacteriemia, síndrome urémico-hemolítico e infección del tracto hepato-biliar (Spadaro S *et al.*, 2014; Lobatón T *et al.*, 2015; Longa B *et al.*, 2015; Brata P *et al.*, 2016). Causan infecciones oculares (aunque son raras): blefaroconjuntivitis y endoftalmitis (Tamura T y Hilda T, 2003). Además, pueden producir infecciones nosocomiales como consecuencia del cateterismo (Longa B *et al.*, 2015; Batra P *et al.*, 2016).

Su papel como patógeno humano en los desastres naturales se probó con el tsunami que devastó las costas de Tailandia (2004). En un estudio de 305 sobrevivientes con infecciones en la piel, fue el patógeno más identificado (Dixon B, 2008). También, ha sido causa de peritonitis pos desastres naturales (Lin WT *et al.*, 2013).

III.1.10 Tratamiento: La infección entérica por *Aeromonas* spp es autolimitada y no se recomienda el uso de antimicrobianos, sólo en pacientes inmunodeprimidos o con factores predisponentes, donde se utiliza el trimetoprím-sulfametoxazol y en las infecciones extraintestinales donde se emplean cefalosporinas de segunda o tercera generación y cloranfenicol (Disponible en: <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/msds-ftss/msds6e.html>)

III.2 *Plesiomonasshigelloides*

III.2.1 Características generales del género: *P. shigelloides* es un bacilo gramnegativo, mide 0,1 a 1 µm de ancho por 2 a 3 µm de largo. Tiene de 2 a 5 flagelos polares (lofotricos) y flagelos laterales más cortos. Puede haber cepas inmóviles o con flagelos monotricos. Reduce los nitratos a nitritos, es anaerobio

facultativo y oxidasa positivo (Viera DR *et al.*, 2015). La temperatura de crecimiento oscila de 8 a 45°C (temperatura óptima: 35°C-39°C) (mesófila), aunque un estudio reporta cepas psicrófilas de *P. shigelloides* con un mínimo de crecimiento de 0°C (Rouf MA *et al.*, 1971; Janda JM *et al.*, 2016). Se describe que el pH óptimo de crecimiento es de 4,0 a 9,0 y en un máximo de concentración de NaCl de 5% *P. shigelloides* es resistente al compuesto vibriostático O/129 (Morales A y González A, 2013).

III.2.2 Características bioquímicas: *P. shigelloides* no utiliza la lactosa ni el manitol, pero sí el inositol como fuente de energía, produce indol y es urea, citrato, fenilalanina, Voges-Proskauer, esculina, gas y H₂S negativo. Carece de exoenzimas tales como, gelatinasa, DNasa, lipasa y amilasa, descarboxila la lisina y la ornitina y dihidroliza la arginina, fermenta la glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido, pero no gas, es heterotrófica (Koneman EW *et al.*, 2008).

III.2.3 Taxonomía: *Plesiomonas* incluye una sola especie: *shigelloides*, que fue aislada por primera vez de las heces y la denominaron Paracolón C-27 (Ferguson WW *et al.*, 1947). Posteriormente, se observó que estas cepas (C-27) carecían de exoenzimas tales como lipasa y gelatinasa, a diferencia del género *Aeromonas*, por lo que no debía ser denominada *A. shigelloides* y propusieron un nuevo género con una sola especie: *P. shigelloides* (Habs H y Schubert RH, 1962). Véron propuso dos géneros: *Aeromonas* y *Plesiomonas*, incluidos en la familia *Vibrionaceae*, basado en algunas propiedades comunes con *Vibrio*. Para determinar la especie se tuvo en cuenta los datos de hibridación con ADN (Véron MM, 1965). La reclasificación se basó en el análisis de la secuencia genética 5S, 16S y TSML que indicó que el taxón correspondía a enterobacterias y no a *Vibrio* (Janda JM *et al.*, 2016). Actualmente, según el Manual de Bacteriología y Sistemática de Bergey, teniendo en cuenta el porcentaje de similitud entre las bases de ADN del género *Proteus* de la familia *Enterobacteriaceae* y *P. shigelloides*, se ubica en el Reino: *Procariota*, Orden XIII: *Enterobacteriales*, Familia I: *Enterobacteriaceae*, Género XXVII: *Plesiomonas* (Janda JM, 2005).

III.2.4 Factores de virulencia: Los mecanismos de patogenicidad de.....

P. shigelloides no están totalmente definidos, aunque se citan:

Endotoxina: Conferida por la capa LPS (gramnegativo), la cual es altamente inmunogénica y está asociada con las manifestaciones patológicas de la activación inmune, como el shock séptico. Ésta incluye lípido A, O-polisacárido y un oligosacárido (Kasowska Met *al.*, 2013; Aquilini Eet *al.*, 2014).

Enterotoxinas: *P. shigelloides* elabora toxinas TL y TE. Las TE tienen homología con el ADN de las enterotoxinas de *E. coli* y *V. cholerae*, aunque en algunas investigaciones (reacción de látex reverso pasivo, método de enfrentamiento de las cepas a las células adrenales Y1, así como la hibridación directa de colonias para determinar si tienen secuencias homólogas a la TC), se han obtenido resultados negativos (Matthews BG *et al.*, 1988).

Citolisina: Estudios realizados en células Hep-2, en células Vero y en células Y1, han demostrado la producción de ésta, la cual juega un papel importante en la colonización e invasión de las células epiteliales, produciendo inhibición o destrucción de la microbiota residente; aunque no causa lisis de los eritrocitos (Jagger TD, 2000).

Hemolisina: Actúa como una enterotoxina a nivel intestinal, las bacterias que la producen lisan los eritrocitos y utilizan la hemoglobina, la hemina y la hematina como fuente para adquirir el hierro en los hospederos mamíferos (Oldham AL, 2008).

Elastasa: Actúa degradando el tejido conjuntivo (Santos JA *et al.*, 1999).

Plásmidos: Son moléculas de ADN circulares de doble cadena, extracromosómicos, autorreplicables. Los plásmidos de resistencia (R) portan un grupo de enzimas que pueden degradar antibióticos y modifican los sistemas de transporte en la membrana (Bravo L *et al.*, 1998).

Adherencia bacteriana: Es un paso fundamental para la infectividad al interactuar con las células del hospedero y es el paso previo a la colonización. La adhesión tiene dos categorías: específica (la bacteria produce receptores proteicos en la superficie, con especificidad para juegos de ligandos tales como carbohidratos) y la no específica (la adhesión puede ser mediada por proteínas, pero típicamente

III. MARCO TEÓRICO

incluye una variedad de polímeros y/o exopolisacáridos, que resultan en la adhesión vía hidrofóbica o interacciones iónicas) (Tsugawa *et al.*, 2007).

Los receptores son usualmente carbohidratos y pueden ser expresados también sobre eritrocitos, las adhesinas son llamadas también lectinas y hemaglutininas (Bravo L *et al.*, 2009).

Hidrofobicidad celular: En el proceso de la adherencia, las interacciones entre bacterias y células de la superficie de los tejidos son complejas. Cuanto más hidrófoba sea la superficie de la célula bacteriana, mayor será la adherencia a la célula del hospedero (Simon P *et al.*, 1987).

Producción de exopolisacáridos para la formación de biofilm: El hospedero no reconoce con facilidad estos exopolisacáridos como algo extraño, frente a lo que debe producir una respuesta inmune (anticuerpos). Los microorganismos que producen exopolisacáridos tras adherirse a los epitelios forman microcolonias, de este modo la infección puede tornarse crónica, se evita la fagocitosis y se facilita la resistencia frente a los antimicrobianos (Balsega E *et al.*, 1993).

Motilidad: El número de flagelos es variable. Es el único miembro de la familia *Enterobacteriaceae* con flagelo polar (monotrico), cuando crece en medio líquido. Los flagelos laterales (peritrico) y mechones en uno o ambos extremos (lofotrico) son inducibles y se muestran en medios viscosos, sólidos o semisólidos (Merino S *et al.*, 2015).

Los flagelos, son apéndices delgados y flexibles, de locomoción; están formados por una sola clase de subunidad proteica (flagelina). Las bacterias con flagelos son móviles y tienen ventaja sobre las bacterias no móviles, porque le facilitan el desplazamiento, la posibilidad de la formación de nuevas colonias, la extensión de la infección fuera del punto de contacto y la penetración celular (Wilhelms M *et al.*, 2013; Parker JL *et al.*, 2014).

III.2.5 Diagnóstico de laboratorio

Aislamiento: Las muestras a estudiar dependen de la localización de la infección, se utilizan heces o muestras de otras localizaciones. Se pueden depositar directamente en medios convencionales o inocularlas en medios de transporte

III. MARCO TEÓRICO

(Stuart o Cary Blair), los cuales se trabajarán hasta cinco días después de su inoculación (Koneman EW *et al.*, 2008).

En los medios de cultivo como agar sangre las colonias son de 1 a 1,5 mm de diámetro, a diferencia de los medios con lactosa donde son de 0,5 a 2,0 mm de diámetro. Son traslúcidas, brillantes, con el centro ligeramente elevado, con la superficie lisa y los bordes enteros a las 24 horas, en los cultivos viejos se han observado variaciones en la morfología. En caldo de peptona crece con turbidez uniforme, no se sedimenta ni forma película, pero en caldo nutriente que contenga 7,5% de NaCl no crece (Larsen AMet *et al.*, 2014).

Se han utilizado para el aislamiento de *P. shigelloides*, medios de cultivo tales como agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella*, agar Hektoen y agar desoxicolato. En 1984 se creó agar *Plesiomonas* para el aislamiento de este microorganismo en heces, donde las colonias crecen entre 1 y 2 mm de diámetro, de color rosado opaco; también se utiliza el agar inositol verde brillante sales biliares, siendo las colonias a las 48 horas traslúcidas con variadas tonalidades de rojo (Koneman EW *et al.*, 2008).

Identificación del género *Plesiomonas*: Las colonias no fermentadoras de la lactosa y no productoras de H₂S en agar MacConkey o agar *Salmonella-Shigella*, se inoculan en medio de AHK y AHL, medios donde se comprueban las propiedades fisiológicas mencionadas, posteriormente se realiza la prueba de oxidasa y catalasa (ambas positivas). Se complementa la identificación del género con pruebas tales como: resistencia al agente vibriostático O/129, dihidrolación de la arginina, descarboxilación de la lisina y la ornitina, así como la no utilización del manitol y utilización del inositol (Nisha RG *et al.*, 2014).

Identificación de la especie de *Plesiomonas*: Este género cuenta con una especie. Una vez identificado el género, se realizan las siguientes pruebas bioquímicas: indol, rojo de metilo, β-galactosidasa, Voges-Proskauer, urea, citrato, fenilalanina, esculina y producción de gas a partir de la glucosa (Matsuyama R *et al.*, 2015).

Existen reportes de la detección de *P. shigelloides* por RCP, basado en el gen 23S rRNA. Los resultados obtenidos demuestran su utilidad en la identificación rápida y

III. MARCO TEÓRICO

sensible de este microorganismo a partir de muestras clínicas y medio ambientales (González *Cet al.*, 2000). El panel gastrointestinal FilmArray, es una RCP en tiempo real multiplex para 23 patógenos (14 bacterias, 5 virus y 4 parásitos), incluye a *P. shigelloides*. Estudios preliminares demuestran una sensibilidad y una especificidad para la detección de *P.shigelloides* aproximadamente de 100% (Khare R *et al.*, 2014; Buss SN *et al.*, 2015).

Tipificación: *P. shigelloides* al igual que las demás enterobacterias presenta antígenos O (somático) y H (flagelar). Los antígenos O son termoestables, resistentes al calentamiento hasta 100°C y no se destruyen con alcohol ni con ácidos diluidos; son de naturaleza polisacárida y determinan los subgrupos somáticos a los que pertenecen los microorganismos. Los antígenos H se encuentran ubicados en los flagelos, son de índole proteica. Su variación antigénica se debe a las secuencias de aminoácidos y se inactivan con temperaturas superiores a 60°C, con alcoholes y ácidos (Aquilini E *et al.*, 2013;Kaszowska M *et al.*, 2013b; Aquilini E *et al.*, 2014; Lundqvist L *et al.*, 2015).

El esquema antigénico aplicado internacionalmente es extenso y variable, ha sufrido continuos cambios por la aparición de nuevos serotipos. Bravo y cols. en el año 2000, en Cuba, demuestranla circulación de los serotipos O93:H2, O94:H3, O95:H4 y O96:H5, los cuales fueron incluidos en el esquema de serotipificación internacional. En ese mismo año se descubrieron 26 nuevos antígenos O (O77-O102) y 10 nuevos antígenos H (H42-H50 y H1a-d), por lo que el último esquema puesto en práctica para el serotipaje fue propuesto por Aldová E (2000) y actualmente consta de 102 antígenos O y 51 antígenos H. Tiene serotipos que presentan reacción cruzada con el género *Shigella*, como el O17:H3 (que tiene un lipopolisacárido idéntico al de *S. sonnei* fase 1), utilizando éste en preparados de candidatos vacunales contra la shigelosis, el O11:H11 que reacciona de forma cruzada con *S. dysenteriae*, al igual que O22:H3 y O93:H2, el O23:H1 y el O54:H3 con *S. boydii* (Kubler J *et al.*, 2008).

III.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana:La diarrea aguda causada por.....*P. shigelloides* es generalmente autolimitada y no requiere de terapia antimicrobiana. Pero en algunos pacientes con infecciones intestinales

severas, ésta es beneficiosa. En estos casos las fluoroquinolonas y el trimetoprím-sulfametoxazol se consideran una buena opción y acortan el curso de la diarrea. En contraste con las infecciones intestinales, en las extraintestinales el tratamiento antimicrobiano se requiere de forma inmediata. Los patrones de susceptibilidad antimicrobiana deben estudiarse de manera individual en cada cepa. Es de especial interés investigar la CIM en *Plesiomonas*, pues se conoce que la acción de algunos β -lactámicos depende del inóculo empleado (Hustedt JW y Ahmed S, 2017).

III.2.7 Epidemiología: *P. shigelloides* es un patógeno emergente (Stock I, 2004) y no ha sido asociada a desastres naturales (Presley SM *et al.*, 2006); aunque, potencialmente pudiera estar relacionada con éstos (Kakizaki E *et al.*, 2010; Janda JM *et al.*, 2016). Es un patógeno de animales (Niskanen M *et al.*, 2000, Chen X *et al.*, 2013). Puede producir infecciones en niños y adultos y su incidencia aumenta en verano. Los casos de gastroenteritis están relacionados con los hábitos dietéticos y condiciones higiénico-sanitarias, por esa razón es reportada mayormente en el sudeste de Asia y África (Janda JM *et al.*, 2016).

Principales aspectos:(Islam A *et al.*, 2013; Joh SJ *et al.*, 2013; Hu Q *et al.*, 2014; Stenkat J *et al.*, 2014; Larsen AM *et al.*, 2014; Pakingking R *et al.*, 2015).

Distribución:Mundial, principalmente en los países tropicales y subtropicales.

Reservorio: El hombre, animales terrestres (perros, gatos, cerdos, vacas, cabras, buitres, serpientes, sapos y monos) y acuáticos (peces y mariscos); tanto de aguas salobres como dulces, cloradas y estuarios marinos.

Modo de transmisión: Por ingestión de agua y alimentos contaminados (pescados, mariscos, frutas, vegetales). Las infecciones de heridas se adquieren por exposición a agua y suelos contaminados.

Período de incubación: Variable, de 24 a 72 horas para las infecciones intestinales y hasta siete días para otros sitios de infección.

Período de transmisibilidad:Durante la fase aguda de la enfermedad y hasta que no esté presente en las heces el agente infeccioso.

Susceptibilidad y resistencia:Es un patógeno oportunista (Miller ML *et al.*, 1985), se presenta en pacientes con enfermedades de base: sicklemlia (Ampofo K *et al.*,

2001), talasemia (Auxiliadora M *et al.*, 2010), diabetes mellitus, linfomas, cirrosis, leucemias (Riley PA *et al.*, 1996; Brann OS, 2001) y esplenectomizados (Samannodi M *et al.*, 2016), así como en ancianos y malnutridos. También, ante otras inmunodepresiones (hepatopatía alcohólica y enfermedad de Hodgkin) (Clark RB *et al.*, 1991; Vitovec J *et al.*, 2001). En niños menores de cinco años es frecuente debido al sistema inmune inmaduro (Sire JM *et al.*, 2013; Xia FQ *et al.*, 2015).

III.2.8 Patogenia: *P. shigelloides* no forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de los humanos (Chen X *et al.*, 2013). Jagger TD (2000), propone que la transmisión de *Plesiomonas* sp. puede ocurrir desde hábitat acuáticos naturales (incluye ingestión de agua contaminada o contacto íntimo con la piel y las mucosas) durante la natación y desde reservorios secundarios por ingestión de alimentos (anfibios y peces). Puede alcanzar el tracto gastrointestinal (intestino delgado) y ocasionar gastroenteritis, penetrar en heridas o pasar al torrente sanguíneo (bacteriemia) y diseminarse (septicemia) (Penn R *et al.*, 1982; Janda JM *et al.*, 2016).

III.2.9 Procesos infecciosos producidos por *P. shigelloides*: La especie del género *Plesiomonas* ha surgido como un problema de salud para la población mundial, por el amplio espectro de expresiones clínicas (Wright AC *et al.*, 2013). Ha sido asociada con casos esporádicos y brotes de diarreas en diferentes partes del mundo, así como la diarrea del viajero en personas inmunocompetentes (Nwokocha AR *et al.*, 2014).

Es agente causal de infecciones extraintestinales. La septicemia es rara, sólo en presencia de enfermedades debilitantes (Chen X *et al.*, 2013; Samannodi M *et al.*, 2016) y trasplante de hígado desde un donador con *P. shigelloides* (Bonatti H *et al.*, 2012). Los abscesos cutáneos y celulitis, se muestran en traumatismos de la piel y las mucosas (Gopal V *et al.*, 1991; Herve V *et al.*, 2007). Se asocia a infecciones de los huesos (Fukushima H *et al.*, 2005; Okon E *et al.*, 2013), del tracto respiratorio e infecciones oculares (endoftalmítis). Se puede presentar en meningitis, bacteriemia (Chen X *et al.*, 2013; Xia FQ *et al.*, 2015), peritonitis y en el síndrome urémico-hemolítico (Marshman WE *et al.*, 1998). En los últimos años se

ha notificado su aislamiento en prostatitis, orquitis, cistitis y piosalpingitis (Young AZ *et al.*, 2001; Morales A y González A, 2013).

III.2.10 Tratamiento: La infección entérica por *P. shigelloides* es autolimitada y no se recomienda el uso de antimicrobianos, sólo en pacientes inmunodeprimidos o con factores predisponentes, donde se utiliza el trimetoprim-sulfametoxazol y en las infecciones extraintestinales donde se emplean cefalosporinas de segunda o tercera generación y cloranfenicol. Cuando el sitio de infección es a nivel de piel o tejido celular subcutáneo se puede aplicar curas con antisépticos y drenaje de abscesos (Janda JM *et al.*, 2016).

III.3 *Vibrio* spp.

III.3.1 Características generales del género: Los microorganismos del género *Vibrio* son bacilos gramnegativos, cortos, curvos (semejan una coma), miden de 0,3 a 0,5 µm de ancho y de 1,4 a 1,6 µm de largo. Se presentan como células en forma de S, en parejas o a veces en cadenas cortas, son móviles por la presencia de un flagelo polar, aunque en medio sólido muchos pueden producir flagelos laterales (peritricos). Reducen los nitratos a nitritos, son aerobios y anaerobios facultativos y oxidasa positivos. Son sensibles al compuesto vibriostático O/129 (Rashid A *et al.*, 2013). Todas las especies del género dependen del ion sodio, incluso aquellas capaces de crecer en agua de peptona carente de sal, el catión estimula su crecimiento (Sun S *et al.*, 2013).

III.3.2 Características bioquímicas: No fermentan lactosa, ni inositol, pero sí la glucosa, maltosa, trealosa, manitol y la sacarosa sin formación de gas, hidrolizan la esculina, producen decarboxilación de la lisina y la ornitina, no producen una reacción positiva de arginina dihidrolasa y no producen H₂S (Bahamonde C y Stuardo V, 2013).

III.3.3 Taxonomía: El género *Vibrio*, estuvo hasta años recientes considerado como sinónimo de enfermedades causadas por *V. cholerae* O1 (restringido solamente a esta especie que produce epidemias y pandemias de cólera) (Dickinson G *et al.*, 2013). Actualmente, según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey se ubica en el Reino: *Procariota*, Orden XI: *Vibrionales*,

III. MARCO TEÓRICO

Familia 1: *Vibrionaceae*, Género I: *Vibrio*, Especies: se describen 133 y alrededor de 200 serogrupos (Farmer J *et al.*, 2015). De estas especies, 12 son patógenas para el hombre y de este grupo, 10 se consideran halófilas (requieren para su crecimiento óptimo una concentración de NaCl no inferior al 1%).

Entre las especies patógenas para el hombre podemos citar: *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. chagasii*, *V. neptunius*, *V. pomeroyi*, *V. kanaloae*, *V. fluvialis*, *V. xuii* y *V. brasiliensis* (Ramamurthy T y Sharma NC, 2014).

III.3.4 Factores de virulencia: Entre los factores de virulencia se encuentran:

Pili tipo IV: Su composición es de proteína (pilina). Es un factor de colonización importante en el epitelio intestinal humano, co-regulado por toxina (*toxin-coregulated pilus*, TCP), llamado así, porque su síntesis es regulada en paralelo con la de la TC, es esencial para la colonización intestinal por *V. cholerae* (Aagesen A *et al.*, 2012).

Enterotoxina colérica (TC): Es una proteína oligomérica, binaria termolábil, semejante antigénicamente a la enterotoxina TL de *E. coli* enterotoxigénica, cuyos genes estructurales (*ctxA* y *ctxB*) codifican cincosubunidades (B), que ligan la molécula de toxina a los receptores de las células intestinales y una subunidad (A), enzimáticamente activa, la produce *V. cholerae* O1 y O139 (Amin SM *et al.*, 2013).

Toxinas relacionadas con el inhibidor de sodio: Inhiben el transporte de sodio a nivel de la membrana celular (Ceccarelli *et al.*, 2015).

Toxina ACE: Provoca un incremento de la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana de las células epiteliales (Karagozova AV y Salnikova OL, 2000).

Otras toxinas: Toxina ZOT, enterotoxina TE.

PME: Se pueden mencionar OmpV de 25 kDa, OmpW de 22 kDa, que facilitan la adherencia a las células epiteliales (Crawford JA *et al.*, 2003).

Biofilm: *Vibrio* spp. usan superficies bióticas y abióticas para adherirse y sobrevivir ante la limitación de nutrientes en la naturaleza (Bari SM *et al.*, 2013).

Adhesinas: Favorecen la adhesión de los microorganismos a las células (Boiko AV, 2000).

Enzimas extracelulares: Ej. β -hemolisina y proteasas (Boiko AV *et al.*, 2000).

Capa LPS (endotoxina) (Nesper J *et al.*, 2002).

Bacteriófagos: Tienen un papel importante en la transferencia genética horizontal y la diseminación de la resistencia interespecies (Maina AN *et al.*, 2013).

Sistema de secreción: Todas las cepas lo tienen, pero se expresan de forma diferente (Dustan RA *et al.*, 2013).

III.3.5 Diagnóstico de laboratorio

Muestras: Las muestras de heces deben recogerse al comienzo del cuadro clínico y antes de instaurar el tratamiento antibiótico. Si requieren ser transportadas o si el tiempo transcurrido entre su recogida y procesamiento es superior al establecido, se puede utilizar el medio de Cary Blair, porque la solución de glicerol tamponado no es adecuada, debido a que el glicerol es tóxico para las especies del género *Vibrio*. Las muestras rectales recogidas con hisopo son válidas en la fase aguda de la enfermedad, pero carecen de utilidad en personas convalecientes, portadores o en pacientes que han recibido tratamiento antimicrobiano, porque el inóculo es escaso. En las situaciones anteriores puede ser recomendable la utilización de medios de enriquecimiento. La muestra se inoculará en un volumen no inferior a 20 mL de agua de peptonaalcalina (APA) con 1% de NaCl, con incubación de cinco a seis horas a 35°C y subcultivo posterior en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Desai SNet *et al.*, 2016).

Aislamiento: Las muestras se siembran en medios selectivos que inhiben o retardan el crecimiento de otros microorganismos. El más empleado es el TCBS, el cual permite diferenciar las especies que fermentan la sacarosa (colonias amarillas), de las que no poseen esta capacidad (colonias verdes) (Valdés-Dapena MM, 2001), tal como se muestra en la tabla 2. Sin embargo, *V. hollisae* crece con dificultad en este medio e incluso es inhibido en él, razón que justifica la incorporación de medios no selectivos y medios que permitan la realización de la prueba de oxidasa directamente de la placa (sin carbohidratos óxido fermentables) (Zwadyk P, 1998).

III. MARCO TEÓRICO

Tabla 2. Especies de *Vibrio* fermentadores y no fermentadores de la sacarosa.

Especies que fermentan la sacarosa (colonias amarillas en TCBS)	Especies que no fermentan la sacarosa (colonias verdes en TCBS)
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Vibrio furnissii</i>	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	

Respecto a los medios de enriquecimiento, el más recomendado es el APA (pH 8,5) con adición de 1% de NaCl, que puede ser utilizado igualmente como medio de transporte (Dutta Det *al.*, 2013).

Identificación del género *Vibrio*: La mayoría de las especies del género *Vibrio* fermentan la lactosa en agar MacConkey, a excepción de *V. vulnificus* y algunas cepas de *V. metschnikovii*. Las colonias con las propiedades fisiológicas antes mencionadas se transfieren al medio de AHK y AHL. Con la imagen compatible se le realiza la prueba de oxidasa y catalasa (ambas positivas), sensibilidad al agente vibriostático O/129, utilización del manitol, no utilización del inositol y utilización de aminoácidos según el método de Möeller: decarboxilación o no de la lisina y la ornitina y dihidrolación de la arginina (Charles A y DePaola A, 2004; Koneman EW *et al.*, 2008).

El 0,5% de NaCl presente en el agar sangre comúnmente utilizado en microbiología clínica, permite el crecimiento de estas bacterias. La temperatura óptima de crecimiento es de 35°C y la incubación de 18 a 24 horas (Humphries RM *et al.*, 2015).

Identificación de las especies del género *Vibrio*: Generalmente necesitan para su crecimiento NaCl aunque se pueden diferenciar dos grupos: especies halotolerantes capaces de crecer en agua de peptona sin adición de NaCl y especies halófilas incapaces de crecer en ausencia de NaCl. Un dato que puede

III. MARCO TEÓRICO

hacer sospechar la presencia de bacteria halófila, es la ausencia de crecimiento en los medios de identificación utilizados de rutina. En la práctica, la identificación presuntiva de los vibrios halófilos puede efectuarse en los medios convencionales empleados para la identificación de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, previa adición de 1% de NaCl en todos los que carecen de sal en su composición: Voges-Proskauer, reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina y producción de indol (Charles A y DePaola A, 2004).

Los caracteres bioquímicos útiles para establecer una clave sencilla de identificación de las especies halófilas y no halófilas del género *Vibrio* son: reacción de la oxidasa y reducción de nitratos positiva y la sensibilidad al agente vibriostático O/129, esta última utilizada para separar el género *Vibrio* de *Aeromonas* diferenciar las distintas especies de *Vibrio* entre sí. Su estudio se debe efectuar en medios con baja concentración de sal porque el NaCl y el cloruro de magnesio ($MgCl_2$), pueden disminuir su acción. Un halo de inhibición alrededor del disco de O/129 de 150 mg es característico del género *Vibrio*, aunque se ha observado este mismo efecto en los géneros *Plesiomonas*, *Pasteurella* y *Actinobacillus* (Miyoshi SI, 2013).

Reacciones bioquímicas diversas: Prueba de Voges-Proskauer, producción de gas en la fermentación de la glucosa y el metabolismo de distintos azúcares, entre los que se encuentran, sacarosa, lactosa, arabinosa, manitol, inositol, celobiosa y salicina. Existen cepas salvajes de *V. vulnificus*, que en principio no utilizan la lactosa y en las cuales solo es posible detectar la fermentación de este azúcar después de 48 a 72 horas de incubación, debido a la aparición de mutantes espontáneos capaces de fermentarla. La lectura final de los caracteres bioquímicos debe realizarse a las 48 horas de incubación. La identificación se completa con el estudio de la halotolerancia, en caldo de triptona con diferentes concentraciones de NaCl (0, 3, 6, 8, 10 y 12%) (Hao Y *et al.*, 2015).

El diagnóstico de caso sospechoso de cólera es eminentemente clínico, fortalecido por la positividad de un test rápido, por ejemplo (Dipstick del Instituto Pasteur), que es válido para los serogrupos O1 y O139, diseñado para el tamizaje, pero a todos los casos positivos se les debe realizar el cultivo e identificar el vibrión del cólera

III. MARCO TEÓRICO

para declararlo como caso confirmado (Sánchez RM *et al.*, 2014). No es la única prueba rápida actualmente disponible. En los eventos de cólera en nuestro país se han utilizado, en orientación por la (OMS), el test Rapid SD Biotec, Sur Corea que cumple las siguientes características:

- . Heces
- . Detecta 10^7 ufc/mL
- . Tiempo máximo diagnóstico 20 min.
- . Mayor manipulación.

También se ha utilizado el test Rapid CTK Biotec, EE.UU, con las siguientes características:

- . Heces y Vómito.
- . Detecta 10^5 ufc/mL
- . Tiempo máximo diagnóstico 10 min.
- . Menos manipulación.

Tipificación: Existen múltiples sistemas de clasificación para el antígeno somático O de *V. cholerae*. El sistema más ampliamente usado es el esquema de tipaje de Sakazaki y cols. (1977), en el cual se utilizan sueros preparados con gran cantidad de organismos inactivados por calor. En base a la presencia de antígenos somáticos O, se han determinado que existen más de 200 serogrupos de *V. cholerae* siendo el O1 y O139 los productores del cólera (Garrity GM *et al.*, 2003). El antígeno de *V. cholerae* O1 está integrado por tres factores designados (A, B y C), que determinan tres serotipos Inaba, Ogawa e Hikojima. Se ha demostrado la interconversión de Ogawa a Inaba, pero a la inversa es rara (Mandal S *et al.*, 2011).

El antígeno H es termolábil, se inactiva por calentamiento a 100°C durante 15 minutos. Todas las cepas de una misma especie poseen los mismos antígenos H y su determinación es de poco valor para el serotipaje de las especies del género *Vibrio* (Luo Y *et al.*, 2013).

V. cholerae O1 se diferencia en dos biotipos, el clásico y El Tor, no es necesario para el control o tratamiento de los pacientes, pero es importante en epidemiología (Amin SM *et al.*, 2013; Imani FA *et al.*, 2013).

III.3.6 Susceptibilidad antimicrobiana: Vibrios halófilos crecen bien en el medio de agar Mueller-Hinton sin adición de NaCl. El exceso de sal puede alterar la actividad de ciertos antibióticos (gentamicina y colimicina) (Akoachere JF *et al.*, 2013a). Los estudios de sensibilidad se realizan por las técnicas habituales o por métodos automatizados o semiautomatizados. Todos los Vibrios implicados en la patología humana son sensibles a la tetraciclina, con porcentajes de sensibilidad entre el 70-100%, según las especies (Nsofor CA *et al.*, 2014).

El rápido desarrollo de la resistencia interespecies a los antimicrobianos puede ser atribuido al papel de los bacteriófagos en la transferencia horizontal de genes de resistencia o secuencias de integrones (Tamrakar AK *et al.*, 2009; Maina AN *et al.*, 2013).

III.3.7 Epidemiología: La fisiología y ecología de *V. cholerae* en las aguas está estrechamente ligada a tres factores principales: la relación de temperatura y salinidad, adherencia a superficies y colonización de la macrobiota con quitina. La salinidad es un factor crítico que regula la distribución de las distintas especies de *Vibrio* en función de su afinidad. *V. cholerae* tiene afinidad por aguas más salobres que *V. parahaemolyticus*, lo que hace que su distribución a lo largo de las zonas costeras y estuarios esté en función de los gradientes de salinidad existentes. Aumentos estacionales de temperatura del agua de mar inducen de forma directa la proliferación de éstos, siempre que los niveles de salinidad sean los óptimos para su expansión demográfica (Moore S *et al.*, 2014).

La epidemia puede ser predictiva por el monitoreo de zooplancton en contaminaciones acuáticas. Existe una relación positiva entre la abundancia de copépodos y el aumento de *V. cholerae*. En este sentido, el estudio y la vigilancia de las condiciones ambientales en una zona pueden ser aplicados para inferir el riesgo de la presencia de estos microorganismos, predecir la aparición de infecciones en el área y elaborar modelos de riesgo que son clave en las estrategias para la mitigación de esta enfermedad (Gavilán RG y Martínez J, 2011).

III. MARCO TEÓRICO

V. cholerae pertenece al grupo de riesgo biológico II (Somarriba L *et al.*, 2013). Los serogrupos O1 y O139 causan el cólera epidémico que se considera una enfermedad reemergente (Akoachere JF *et al.*, 2013b).

Principales aspectos: (Mandal S *et al.*, 2011; Kihla Jet *et al.*, 2014).

Agentes infecciosos: Se incluyen 133 especies y de éstas, 12 son patógenas para el hombre. *V. cholerae* O1 y O139 causan principalmente infecciones gastrointestinales. Las cepas de *V. cholerae* no-O1 y no-O139 producen 2 a 3% de los casos de diarreas en los países en vías de desarrollo.

Distribución: Mundial, la incidencia aumenta en verano.

Reservorio: El hombre, animales terrestres y marinos, aguas salobres, dulces, saladas y cloradas, estuarios marinos y el mar.

Modo de transmisión: Por ingestión de agua y alimentos contaminados. Las infecciones de heridas se adquieren por la exposición a agua y suelos contaminados. Dos rutas de transmisión han sido reconocidas: transmisión primaria por el contacto con reservorios acuáticos y la transmisión secundaria que ocurre por el contacto ya sea de forma directa o indirecta con heces o vómitos de pacientes infectados. La transmisión primaria inicia un brote y la transmisión secundaria causa epidemia.

Período de incubación: Variable, de 24 a 72 horas para las infecciones intestinales y hasta siete días para otros sitios de infección.

Período de transmisibilidad: Durante la fase aguda de la enfermedad y hasta que no esté presente en las heces el agente infeccioso.

Susceptibilidad y resistencia: Variable, producen infecciones en individuos inmunocompetentes, aunque son más frecuentes en personas con factores de riesgo e inmunodeprimidos, por ejemplo, aquellas que presentan diabetes mellitus, linfomas, leucemias y aclorhidria gástrica, ancianos, malnutridos y niños. El elemento de correlación inmunológica de protección contra el cólera por cepas O1 son los anticuerpos vibriocidas en el suero. Los niños con lactancia materna están protegidos. La aclorhidria gástrica intensifica el riesgo de aparición del cólera.

Medidas de control:(Tall A *et al.*, 2013).

III. MARCO TEÓRICO

Medidas preventivas: Educar a la población respecto a la importancia de lavarse las manos, así como de la eliminación sanitaria de las heces humanas. Proteger, purificar y clorar los abastecimientos públicos de agua. Mantener la limpieza al preparar y manipular los mariscos cocidos de manera que se evite la contaminación con mariscos crudos o con agua contaminada. Asegurarse que los mariscos cocidos alcancen la temperatura adecuada para destruir los microorganismos.

Control del paciente, de los contactos y del medio ambiente: Notificación a la autoridad local de salud. Aislamiento durante la fase aguda de la enfermedad, tomar precauciones entéricas, ingreso en casos graves. Desinfección concurrente de las heces, vómitos y artículos contaminados. Investigación de los contactos y de la fuente de infección (debe limitarse a las personas que manipulan alimentos, personal y niños de jardines infantiles y otras situaciones en las que sea factible la diseminación de la infección).

Vacunación: Las parenterales sólo protegen entre un 50 y 60% y tienen una efectividad entre tres y seis meses; las vacunas orales, pueden prepararse con células muertas o con células muertas más TC, siendo esta última la que más efectividad ha demostrado.

III.3.8 Patogenia: *Vibrio* spp. penetran a través de la boca (dosis infectante de 10^8 a 10^9), este inóculo es de gran tamaño comparado con el necesario para la colonización por *Shigella* spp. Sensibles al pH ácido del estómago (barrera contra la colonización). La colonización del intestino delgado depende de los factores de virulencia; la adherencia a la mucosa, es el paso previo a la producción de enterotoxina y posterior secreción de agua y electrolitos. No ocurre destrucción del borde en cepillo de los enterocitos, ni invasión de la mucosa intestinal (Somarriba L *et al.*, 2013).

Vibrio spp. se clasifican en dos grupos: los que producen cólera y los que no lo producen. Los primeros incluyen a los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae* y los últimos al no-O1 y no-O139, así como otras especies.

Las especies no productoras de cólera están definidas como emergentes y ocasionan enfermedades ya sea por la exposición de heridas abiertas y cortaduras

en ambientes acuáticos, así como por el consumo de mariscos. Algunas de estas infecciones son autolimitadas y otras requieren atención médica (Tantillo GM *et al.*, 2004).

Los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae* causan enfermedad clínica por la acción de la exotoxina que estimula la adenilciclase, aumenta la concentración de AMP cíclico intracelular y promueve la hipersecreción de agua y electrolitos hacia la luz del intestino delgado, inhibiendo la absorción de sodio. Se expulsan con las heces y sobreviven aproximadamente de dos a tres semanas en medios favorables, manteniendo su capacidad infectante. La enfermedad alcanza su máxima gravedad en 24 horas, pudiendo llegar a perderse hasta 1L de líquido/hora que causa una deshidratación grave y provoca la muerte. La letalidad en los casos no tratados oscila entre 30% y 50%, mientras que en los tratados adecuadamente con rehidratación, es menor del 1% (Wang Y *et al.*, 2013).

III.3.9 Procesos infecciosos producidos por *Vibrio* spp.: Gastroenteritis aguda: *V. cholerae* O1 y O139 producen diarreas agudas, que comienzan bruscamente, acuosas, como agua de arroz, con olor a pescado, sin ser precedidas por dolor abdominal importante o tenesmo rectal, habitualmente sin fiebre y profusas, con moco y sin sangre, que conllevan a la deshidratación, acidosis, shock y muerte. Las diarreas pueden clasificarse en citotóxicas, en las que los patógenos estimulan la función secretoria, activando las enzimas intracelulares sin dañar la capa epitelial. Las diarreas a menudo siguen poco después de los vómitos. Entre las complicaciones: desequilibrio hidroelectrolítico con hiponatremia, hipocalcemia, acidosis metabólica, insuficiencia renal aguda, convulsiones e íleo paralítico, desequilibrio iónico con arritmias cardíacas, calambres musculares y alteraciones del sensorio. Otras especies del género asociadas a gastroenteritis son: *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae* y *V. fluvialis* (Daniels NA y Shafie A, 2000; Brooks *et al.*, 2001).

Infecciones extraintestinales: Pueden ocasionar otitis media después de la exposición a agua salada (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*), meningitis (*V. vulnificus*) y septicemia, la tasa de mortalidad como consecuencia de ésta en *V. vulnificus* es superior al 50%, bacteriemias (asociadas a factores predisponentes como cirrosis

III. MARCO TEÓRICO

hepática y enfermedades hematológicas malignas)(*V. vulnificus*) (Lan NP *et al.*, 2014). En la infección de la piel y partes blandas puede haber antecedente de heridas o pequeños traumatismos y contacto con agua salada o dulce. Las formas más severas son ocasionadas principalmente por *V. vulnificus*, uno de los patógenos humanos más invasivos; la lesión se caracteriza por edema, eritema, celulitis y formación de vesículas pudiendo progresar a necrosis tisular (Strom MS y Paranjpye RN, 2000; CDC, 2014).

III.3.10 Tratamiento:En el caso de la infección intestinal por *V. cholerae* serogrupos O1 y O139, que causan el cólera epidémico, tanto la OMS como el CDC recomiendan el uso de la doxiciclina, y como alternativas la tetraciclina, azitromicina o eritromicina. Cuando el sitio de infección es a nivel de piel o tejido celular subcutáneo se puede aplicar curas con antisépticos y drenaje de abscesos (Bhattacharya SK, 2003; Somarriba L *et al.*, 2013).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Tipo de estudio: Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el período comprendido entre mayo de 2016 y junio de 2017.

IV.2 Universo: Se trabajaron 1396 muestras extraintestinales, procedentes de pacientes de la Atención Primaria de Salud (APS) del municipio 10 de Octubre, el cual está conformado por ocho áreas de salud: Policlínico (Pol) “Luís Pasteur”, Pol-Hospital “Raúl Gómez García”, Pol “Luis de la Puente Uceda”, Pol “Luis A. Turcios Lima”, Pol “Lawton”, Pol “30 de noviembre”, Pol “Luyanó”, Pol “14 de Junio” y el Centro Nacional de Cirugía de Mínimo Acceso (CNCMA), durante el período de mayo a noviembre de 2016. Los aislamientos de BGNOP obtenidos fueron trasladados al IPK para su posterior identificación y estudios de susceptibilidad antimicrobiana.

Además, se estudiaron 79 aislamientos de BGNOP procedentes de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología del país (CPHEM) de las provincias Pinar del Río, Artemisa, La Habana, Matanzas, Cienfuegos, Villa Clara, Sancti Spiritus, Ciego de Ávila, Camaguey, Las Tunas, Holguín, Granma y Guantánamo, en el período comprendido entre enero y junio de 2017.

Criterio de inclusión: Aislamientos de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivos, obtenidos de muestras clínicas.

Criterio de exclusión: Aislamientos que no cumplan con la condición anterior, además de los aislamientos no viables o contaminados.

IV.3 Aspectos Éticos: El estudio de las muestras fue coordinado previamente con la dirección del Laboratorio de Microbiología y Química Sanitaria del CMHE de 10 de Octubre. No se aplicó el consentimiento informado a los pacientes, ya que se trabajó con aislamientos clínicos. La carta de coordinación se anexó al documento. Todos los datos obtenidos se mantuvieron en el más estricto marco de confidencialidad y se cumplió el código Internacional de Ética Médica que establece: “El médico debe actuar solamente en el interés del paciente al proporcionar atención médica”. Se cumplió con los reglamentos y las normas éticas. Este trabajo fue evaluado y aprobado por la Comisión de Ética del IPK con el código CEI-IPK 13-17.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.4 Operacionalización de las variables: Para dar cumplimiento a los objetivos de la investigación se estudiaron las variables que se muestran a continuación (tabla 3):

Tabla 3. Operacionalización de las variables

Variable	Tipo de variable	Operacionalización	
		Escala	Descripción
Clasificación clínica	Cualitativa nominal politómica	Según el cuadro clínico por el que se le indicó la toma de muestra	Urosepsis, sepsis vaginal, sepsis uretral, EDA, lesiones de piel o mucosas infectadas, otorrea, conjuntivitis.
Tipo de bacilo gramnegativo anaerobio facultativo oxidasa positivo	Cualitativa nominal politómica	Según lo que se aisló	<i>Aeromonas spp, A.caviae, A.veronii bv sobria, A.hydrop hila, A. trota, Plesiomonas shigelloides y Vibrio cholerae no-O1.</i>
Respuesta antimicrobiana <i>in vitro</i> según microorganism o aislado	Cualitativa nominal politómica	Se distribuyeron las observaciones según su respuesta de S*, I*, o R* a los antimicrobianos.	Según resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana de Bauer Kirby.

Leyenda: S*: Sensible. I*: Intermedio, R*: Resistente

IV.5 Aislamiento

Las muestras fueron tomadas en el Laboratorio de Microbiología y Química Sanitaria del CMHE de 10 de Octubre. Para el aislamiento de los microorganismos pertenecientes a los géneros, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, las mismas fueron sembradas en medios universales, diferenciales y selectivos (Anzalone *Met al.*, 2004).

Se considera infección polimicrobiana aquella en la que se aísla más de un microorganismo patógeno en la misma muestra (Tena *et al.*, 2007).

Cultivo primario:

Exudado nasofaríngeo: medio de agar sangre (5% sangre de carnero).

Exudado de lesión: medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

Urocultivo: medio CLED (cistina lactosa electrolito deficiente)

Exudado vaginal: Se inoculó en solución salina y se utilizó para el cultivo el medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

Exudado ótico: medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

Exudado conjuntival: medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

Exudado uretral: medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

Exudado vulvar: medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

Espermocultivo: medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

Espudo bacteriológico: medio de agar sangre (5% sangre de carnero) y agar MacConkey.

IV.6 Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos de especies de *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*.

Identificación de género: Todos los aislamientos recibidos en el laboratorio se inocularon en caldo cerebro corazón (BIOLIFE) y se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 18 a 24 horas. Posteriormente, el inóculo obtenido se sembró por el método de agotamiento en placas de agar MacConkey (BIOLIFE) y agar sangre con

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

5% de sangre de carnero(BIOLIFE), incubándose bajo las mismas condiciones previamente descritas.Trascurridas 24 horas, se seleccionaron tres colonias translúcidas, convexas y de bordes regulares en el agar MacConkey y tres colonias hemolíticas o no, convexas y de bordes regulares en el agar sangre, aislamientos que fueron transferidos por punción y estría a los medios de diferenciación primaria: agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK)(BIOLIFE) y agar hierro lisina (AHL)(BIOLIFE) (anexo 2 y 3), incubándose ambos a 37°C durante 18 a 24 horas. Luego se seleccionaron los cultivos que mostraron las siguientes imágenes (Koneman EW *et al.*,2008):

AHK

Utilización de la glucosa oxidativa y fermentativamente

Presencia o no de gas

Producción o no de H₂S

Utilización o no de la lactosa oxidativa y fermentativamente

AHL

Descarboxilación o no de la lisina y la ornitina

Dihidrolación de la arginina

A todos los aislamientos se les investigó la presencia de la enzima citocromo-oxidasa, según el método de Kovacs (OXOID)(anexo 4). Aquellos aislamientos que resultaron bacilos gramnegativos, oxidasa positivos, se sometieron además al estudio fisiológico del esquema de identificación fenotípica Aeroesquema(Furuwatari CHet *al.*, 1994), método que emplea ocho pruebas bioquímicas (anexos 6, 8, 9, 10, 11, 12).

Los aislamientos que se identificaron como pertenecientes al género *Aeromonas* se sometieron también al sistema de identificación fenotípica Aerokey II (13) (Carnahan A *et al.*, 1991) método que emplea siete pruebas bioquímicas (anexos 6, 8, 9, 10), corroborándose así, las especies de *Aeromonas* obtenidas a través del Aeroesquema.

Las especies del género *Vibrio*, se sometieron a las pruebas de tolerancia con diferentes concentraciones de NaCl (0, 3, 6, 8, 10 y 12%) (anexo 5) para la identificación de especie. Las que se identificaron como *V. cholerae* se les realizó

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

la prueba serológica de aglutinación en lámina con el antisuero polivalente de *V. cholerae* O1/O139.

IV.7 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*: La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con discos Bauer-Kirby (Bauer AW *et al.*, 1966).

Se investigó la susceptibilidad de las cepas frente a nueve antimicrobianos (BIOLIFE) recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI, del inglés Clinical and Laboratory Standards Institute) (2017); siguiendo la metodología descrita para cada microorganismo. Las características de cada uno de los fármacos estudiados y el diámetro de la zona de inhibición se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Criterios de interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de *Aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides* y *Vibrio*.

Agentes antimicrobianos	Contenido del disco (μg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
		R	I	S
Amikacina (AK)	30 μg	≤ 14	15-16	≥ 17
Ampicilina (AMP)	10 μg	≤ 13	14-16	≥ 17
Azitromicina (AZM)	15 μg	≥ 13	-	≤ 12
Ceftriaxona (CRO)	30 μg	≤ 13	14-20	≥ 21
Ciprofloxacina (CIP)	5 μg	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol (C)	30 μg	≤ 12	13-17	≥ 18
Doxiciclina (DXT)	30 μg	≤ 10	11-13	≥ 14
Gentamicina (CN)	10 μg	≤ 12	13-14	≥ 15
Tetraciclina (TE)	30 μg	≤ 11	12-14	≥ 15
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	1.25/23.75 μg	≤ 10	11-15	≥ 16

Casa comercial BIOLIFE (Italia)

Se utilizaron las siguientes cepas controles, según las recomendaciones del CLSI (2017):

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y estandarización del inóculo: A partir de un cultivo puro obtenido en placas de agar Mueller Hinton (pH 7,2-7,4)(BIOLIFE), incubado durante 18 a 24 horas a 35°C, se seleccionaron entre 4 y 5 colonias con características similares, se resuspendieron en 3 mL de caldo Mueller Hinton, ajustándose directamente la suspensión bacteriana hasta obtener un patrón de turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) (Bauer AW *et al.*, 1966).

Siembra de las placas: Después de la estandarización del inóculo y en un período no mayor de 15 minutos, se procedió a sembrar, mediante hisopo estéril, este inóculo en las placas de agar Mueller Hinton (4 mm de grosor), garantizándose una distribución completa y homogénea del inóculo en tres direcciones diferentes (Bauer AW *et al.*, 1966).

Colocación de los discos de antimicrobianos: Con el empleo de una pinza estéril se colocaron entre 4 y 5 discos sobre la superficie de agar, conservándose las distancias recomendadas entre ellos (24 mm), así como la del borde de la placa al disco (14 mm) (Bauer AW *et al.*, 1966).

Incubación de las placas: Después de transcurridos 15 minutos de la colocación de los discos de antimicrobianos, las placas se invirtieron e incubaron en aerobiosis (18 a 24 horas, 35°C) (Bauer AW *et al.*, 1966).

Lectura e interpretación de los resultados: Se examinó y verificó la pureza del inóculo, así como el crecimiento confluyente del cultivo, comprobándose que las zonas de inhibición fueran circulares. Posteriormente, se midieron los diámetros de la zona de inhibición para cada disco, tomándose en cuenta que las mismas no mostrarán un desarrollo obvio a ojo desnudo. Para *P. shigelloides* y *Aeromonas* spp. la interpretación de la lectura se realizó según los criterios de susceptibilidad descritos para las enterobacterias. Mientras que, para *V. cholerae* se tomaron los criterios ya descritos en las normas del CLSI para este microorganismo. De acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición correspondientes a cada uno de los antimicrobianos, los aislamientos se clasificaron en sensibles, intermedio o resistentes (CLSI, 2017).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Criterio de cepa multirresistente: Aquellos aislamientos que mostraron resistencia a tres o más familias de los antimicrobianos investigados (Ruiz P y Cantón R, 2016).

IV.8 Análisis Estadístico: Para las variables cualitativas se emplearon tablas de frecuencia y fueron comparadas con pruebas de comparación de proporciones para categorías independientes. Los datos fueron almacenados y procesados por los paquetes de programas EPINFO, versión 6.04 y Epidat 3.1 para Windows. Las diferencias de porcentajes fueron consideradas significativas siempre que el valor de p fue menor que 0,05.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 64 aislamientos estudiados de pacientes con patología extraintestinal y EDA procedían del CMHE de 10 de Octubre y de los CPHE del país, respectivamente, cumplieron la condición de bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo y presentaron codificación genética para la enzima citocromo-oxidasa.

En la tabla 5 se exponen los resultados de la positividad en muestras extraintestinales trabajadas en el Laboratorio de Microbiología y Química Sanitaria del CMHE de 10 de Octubre.

Tabla 5. Resultados de la positividad en muestras extraintestinales en el CMHE de 10 de Octubre, mayo a noviembre de 2016 (n=1396).

Muestras extraintestinales	Total	Positivas		BGNOP		Polimicrobianas	
		No.	%	No.	%	No.	%
Urocultivo	696	338	48,6	1	0,3	0	0
Exudado vaginal	407	119	29,2	1	0,8	0	0
Exudado Nasofaríngeo	124	27	21,8	0	0	0	0
Exudado uretral	69	35	50,7	0	0	0	0
Espudo bacteriológico	9	4	44,4	0	0	0	0
Exudado de lesiones	61	57	93,4	3	5,3	2	3,3
Exudado ótico	14	6	42,9	0	0	0	0
Exudado conjuntival	9	3	33,3	0	0	0	0
Exudado vulvar	6	3	50	0	0	0	0
Espermocultivo	1	1	100	0	0	0	0
Total	1396	593	42,5	5	0,8	2	0,14

Fuente: CMHE de 10 de Octubre.

De 1396 muestras, 803 (57,5%) fueron negativas y 593 (42,5%) positivas, incluyendo este grupo 5 (0,8%) aislamientos correspondientes a BGNOP.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio cuando se compararon las frecuencias de aislamientos positivos a otros gérmenes entre los diferentes tipos de muestras extraintestinales se encontró que hubo diferencias entre los mismos ($p < 0,01$), siendo los de mayor porcentaje de positividad los exudados de lesiones (93,4%), el exudado uretral (50,7%) y el urocultivo (48,6%).

Numerosos trabajos avalan la circulación de especies de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* en diferentes regiones del mundo. Se reporta tanto en África (Igbiosa IH *et al.*, 2016), América (Kunkel A *et al.*, 2017), Australia (Aravena M *et al.*, 2013), Europa (Selyanskaya NA *et al.*, 2016; Doganis D *et al.*, 2016) y Asia (Young J *et al.*, 2016; Mala W *et al.*, 2017).

En el presente estudio los aislamientos procedían de diferentes orígenes clínicos, siendo los más frecuentes, exudados de lesiones (5,3%), exudado vaginal (0,8%) y urocultivo (0,3%). Desde hace varios años *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, quedaron incluidos en la lista de agentes que producen infecciones extraintestinales en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos: cirrosis hepática, leucemia, diabetes mellitus, etc (Young J *et al.*, 2016).

Llama la atención, que aparte de los exudados de lesiones, el resto de las muestras que mencionamos aquí, son del tracto genito-urinario.

Batra P y cols. en el año 2016, plantean que es conocido que *Aeromonas* spp. se relaciona con infecciones extraintestinales tales como infección del tracto urinario, empiema y peritonitis infecciones sistémicas. El síndrome urémico-hemolítico (SUH) es una rara afección que se presenta principalmente en los niños menores de 10 años, aunque puede afectar también a los ancianos y es una de las principales causas de fallo renal agudo. Esta afección se caracteriza por una anemia microangiopática hemolítica, con o sin oliguria y trombocitopenia (Kanno Y *et al.*, 2004). La etiología se atribuye principalmente a *E. coli* O157:H7, aunque, en algunos casos *Aeromonas* constituye su agente etiológico (Filler G *et al.*, 2000).

En el estudio realizado las infecciones polimicrobianas fueron detectadas en un 3,3% coincidiendo BGNOP y bacilo gramnegativo no fermentador (BGNNF); ambos identificados en dos muestras de exudados de lesiones de pacientes con enfermedad de base: uno con diabetes y otro con osteomielitis.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados son similares a los referidos por Cabrera LE y cols. en el año 2007, en Cuba, que al investigar 95 aislamientos de BGNOP estos procedían con mayor frecuencia de hemocultivos (47), exudados óticos (13), exudados de lesiones (11), urocultivos (5) y exudado conjuntival (5), entre otros. Así mismo, en el sureste de Nigeria, Anyim MC y cols. en el año 2016, estudian 51 pacientes con úlceras y conjuntamente con *Mycobacterium ulcerans* también aislan, *A. hydrophila* (13%).

Las infecciones extraintestinales por BGNOP generalmente son polimicrobianas y suelen aparecer en enfermos con patologías de base. Tena D y cols. en el año 2007, en un Hospital Universitario de Guadalajara, España, obtienen un 50% de infección polimicrobiana en 38 pacientes con infecciones extraintestinales por *Aeromonas* spp. El 76,3% de los enfermos presentaron patologías de base predisponentes, siendo las de naturaleza neoplásica las más frecuentes (34,2%), seguida de diabetes mellitus (21%). Por otra parte, Doganis D y cols. en el año 2016, en un estudio realizado en Atenas, Grecia, presentan un caso con leucemia y osteomielitis, donde se aísla en el hemocultivo *E. coli* y *A. hydrophila*. Además, Ye JJ y cols. en el año 2012, en el Hospital Unión de Pekin (China), de 20 pacientes endoftalmitis post-traumática (cirugía vítrea), 15 estuvieron infectados y en un caso se aisló *P. shigelloides*, producto de una infección intrahospitalaria.

Las condiciones de vida prevalentes tales como el clima, la calidad del agua potable, así como el saneamiento ambiental, favorecen la infección por estos microorganismos, los que, por habitar de manera natural en las aguas frescas y estancadas, contaminan con frecuencia los alimentos (CDC, 2013b). Así lo demuestran Nsofor C y cols. en el año 2014, en un estudio en la ciudad de Port-Harcourt, en Nigeria, donde aislan: *Vibrio paraheamolyticus*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovi*, *V. cholerae* y *V. mimicus* en camarones y cangrejos. Plantean que estos patógenos son comúnmente consumidos a través de los alimentos del mar y alerta de la exposición accidental a los mismos.

El LNR/EDA/IPK realiza desde 1988 investigaciones encaminadas a mantener la vigilancia microbiológica de los bacilos gramnegativos oxidasa positivos (BGNOP), aislados de productos patológicos intestinales y extraintestinales, estableciendo

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las pruebas bioquímicas convencionales que demuestran la circulación de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, en Cuba. Los resultados obtenidos en los estudios realizados desde esa fecha, ratifican la importancia de mantener la vigilancia de estos agentes (Bravo L *et al.*, 1993a; Bravo L *et al.*, 2012).

En la figura 1 se exponen los aislamientos de BGNOP obtenidos de muestras extraintestinales en el CMHE de 10 de Octubre. Tres aislamientos se correspondieron con el género *Aeromonas* spp, dos procedentes de exudados de lesiones de herida quirúrgica y el otro de un exudado vaginal y dos se correspondieron con *V. cholerae* no-O1 aislados uno de exudado de lesión en un caso de un paciente que padece de osteomielitis y el otro procedente de un urocultivo.

Estos resultados coinciden con lo publicado por Bravo L y cols. en el año 1993 y Pérez S y cols. en el año 1997, quienes en estudios realizados en Cuba en muestras extraintestinales demuestran la mayor circulación del género *Aeromonas*. También Cabrera LE y cols. en el año 2007, hacen referencia al estudiar 95 aislamientos de BGNOP a un mayor número de *Aeromonas* (85).

Coincidiendo con lo reportado en la literatura internacional el género *Aeromona* prevalece en muestras extraintestinales así lo demuestran en Korea donde aíslan en muestras de hemocultivos de 336 pacientes con infecciones hepato-biliares, peritonitis y bacteriemia primaria, *A. hydrophila* como el patógeno más común (58,9%), seguido de *A. caviae* (30,4%) (Young J *et al.*, 2016).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

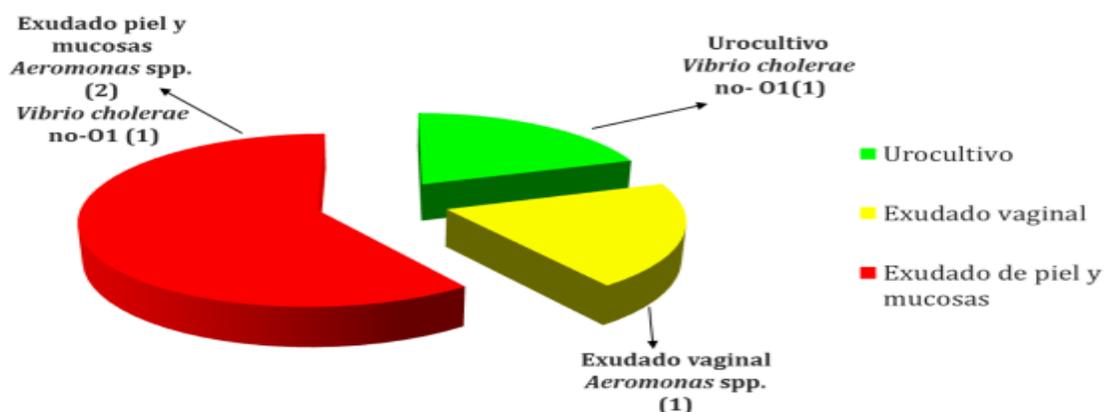


Figura1. Muestras positivas de BGNOP aislados en, urocultivo, exudado vaginal y exudados de lesión, procedentes del CMHE de 10 de Octubre, mayo a noviembre de 2016.

Fuente: CMHE de 10 de Octubre.

Leyenda: BGNOP (bacilos gramnegativos oxidasa positivo).

Durante mucho tiempo el estudio de las especies del género *Vibrio* se focalizó en los serogrupos asociados con el cólera (*V. cholerae* O1 y O139), ya que los mismos se reconocen como productores de enfermedad gastrointestinal (Clemens JD *et al.*, 2017). Sin embargo, *V. cholerae* no-O1 se reconoce como agente causal de EDA, así como el responsable de brotes esporádicos y localizados de esta enfermedad (Baron S *et al.*, 2017a; Baron S *et al.*, 2017b). *V. cholerae* no-O1/no-O139 se obtienen de diferentes nichos naturales, y usualmente causan una dolencia benigna y enfermedad intestinal autolimitada (CDC, 2014). Luo Y y cols. en el año 2013, señalan 1,2% de aislamiento de *V. cholerae* no-O1/no-O139 procedentes de pacientes hospitalizados con diarreas en la provincia de Zhejiang, China. Sin embargo, está bien documentado su capacidad potencial para causar infecciones invasivas y extraintestinales en pacientes con factores de riesgo, por ejemplo, las personas inmunocomprometidas (Kaki R *et al.*, 2017).

Con esta investigación se obtienen resultados que coinciden con Chowdury G y cols. en el año 2016, en la India, quienes reportan aislamientos de *V. cholerae* no-O1 en pacientes con infección urinaria y con celulitis hemorrágica y además

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

muestran dos casos con septicemia. En Arabia Saudita, Kaki R y cols. en el año 2017, aislan *V. cholerae* no-O1 en una muestra de hemocultivo de un paciente de 62 años, con dolor epigástrico, vómito y fiebre con antecedentes de diabetes y colecistectomía, corroborando de esta forma que *V. cholerae* no-O1 es un patógeno oportunista que ocasionalmente causa enfermedad severa. Ting Y y Jen H, 2016 en el sureste de Taiwan, describen infección urinaria por este patógeno, en una niña con antecedente de neuroblastoma y tratamiento con citostáticos.

A pesar de que Aguinaga A y cols. en el año 2009, plantean que las manifestaciones cutáneas por este microorganismo son eventos raros, ellos reportan, *V. cholerae* no-O1 en el Hospital Universitario de Navarra (España) en un caso de lesión inguinal e infección de tejidos blandos en un paciente con diabetes mellitus tipo II controlada e historia de cáncer de pene, posterior a penectomía parcial y radioterapia.

El aislamiento de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas* en los individuos con EDA tiene aún un significado clínico controversial; sin embargo, existen investigaciones epidemiológicas que señalan el aislamiento de los mismos más frecuentemente en los casos con EDA, que en los individuos sin esta sintomatología (Svenungsson B *et al.*, 2000).

La tabla 6 muestra los resultados de la vigilancia en el período de estudio. Hubo semejanza con respecto a la referencia en cuanto a *Aeromonas* spp. en un 100%; sin embargo, en cuanto a *Vibrio* spp. no hubo coincidencia, mientras *Plesiomonas* sp. sólo un 50%.

Al comparar las frecuencias de los aislamientos confirmados entre *Aeromonas* spp., *V. cholerae* no-O1 y *Plesiomonas* sp., se encontraron diferencias entre sus frecuencias ($p < 0,01$), siendo la mayor *Aeromonas* spp., y menor *Plesiomonas* sp.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Resultados de la vigilancia de BGNOP en el LNR/EDA/IPK.

Microorganismos	Aislamientos recibidos	Aislamientos confirmados	
	No.	No.	(%)
<i>Aeromonas</i> spp.	40	40	100
<i>V. cholerae</i> no-O1*	11	0	0
<i>Plesiomonas</i> sp. **	8	4	50
Total	59	44	74,5

*En realidad los 11 aislamientos se confirmaron como *Aeromonas* spp.

**El 50% (4 aislamientos), fueron confirmados como *Aeromonas* spp.

Fuente: LNR/EDA/IPK.

Aeromonas y *Vibrio* son bioquímicamente semejantes por el método de Möeller donde se emplean las pruebas de lisina, arginina y ornitina que en *Aeromonas* son variables, coincidiendo los dos géneros en manitol positivo e inositol negativo.

Los Laboratorios de Referencia tienen gran importancia en el control y la vigilancia de los BGNOP principalmente de *V. cholerae* O1 y O139 que es agente causal del cólera y que ha generado grandes epidemias, por lo que es necesario mantener un control estricto de la circulación de estos microorganismos, así como una adecuada capacitación del personal ante el aislamiento de estos bacilos.

Está bien documentado en la literatura que los patógenos entéricos identificados en este estudio penetran al organismo humano a través del consumo del agua y los alimentos contaminados. Así se demuestra con esta investigación resultados similares a los de Burchardt MA y cols. en el año 2013, en Alemania, en el que se aislaron los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* de muestras clínicas de pacientes con EDA; también en Tailandia aislaron *Aeromonas* (22,6%) obtenidas a partir de las heridas de los sobrevivientes del tsunami, constituyendo el género más identificado (Narin H *et al.*, 2005). Novoa O y cols. en el año 2016, al estudiar 1000 pacientes con gastroenteritis aguda identificaron *Aeromonas* spp. (80), *Vibrio* spp. (20) y *P. shigelloides* (20) en el Distrito Federal de México.

Los resultados de este estudio no coinciden con los de Gutiérrez M y cols. en el año 2005, autores que al describir los principales patógenos detectados por ellos

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

como causantes de EDA en una población infantil de Colombia, no obtienen aislamientos correspondientes a estos géneros.

Desde que en 1937 se documentaron aislamientos del género *Aeromonas* en muestras clínicas; la mayoría se relacionan con procesos diarreicos agudos. Sin embargo, durante mucho tiempo se ha cuestionado el papel de este microorganismo como enteropatógeno. De hecho, *Aeromonas* spp. puede formar parte de la microbiota gastrointestinal normal de personas sanas asintomáticas. Sin embargo, en modelos experimentales *in vitro* se ha demostrado el potencial enteropatógeno de algunas especies, debido a su capacidad para producir enterotoxinas y otros factores de virulencia como las citotoxinas y hemolisinas (Tena D *et al.*, 2007).

A pesar de que en la actualidad se discute el papel de *P. shigelloides* en los episodios diarreicos, por no existir un modelo animal adecuado donde se reproduzca esta enfermedad, *P. shigelloides* se considera un patógeno entérico en los individuos inmunocompetentes debido a los aislamientos obtenidos en personas con EDA (1-16%), en tanto en los individuos asintomáticos sus porcentajes de aislamiento son muy bajos (0-1%) (Humphries RM *et al.*, 2015b). Estos microorganismos se aíslan principalmente en los países tropicales y subtropicales durante los meses más cálidos (Janda JM *et al.*, 2016).

En 17 estudios de caso-control realizados en Cuba durante un período de nueve años (1984-1994), en niños menores de cinco años con EDA, *P. shigelloides* se aísla en 1-5%; mientras que, en la población infantil sin diarreas este microorganismo no fue identificado (Bravo L *et al.*, 2000).

No obstante, pese a la importancia que se le concede a *P. shigelloides* como agente etiológico de EDA, estos resultados difieren con algunos autores que no aíslan este género en muestras de pacientes con EDA. Tal es el caso del trabajo publicado en Corrientes (Argentina) por Balbachan S y cols. en el año 2007, que estudian la caracterización de los aislamientos obtenidos en niños menores de cinco años con EDA y no se aísla *P. shigelloides*. Sin embargo, Janda JM y cols. en el año 2016 se refieren a que las manifestaciones extraintestinales de*P. shigelloides*, son menos frecuente que las enteritis y la información

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

epidemiológica está limitada a un escaso número de reportes que incluye bacteremia, peritonitis y enfermedad hepato-biliar. Klatte JM y cols. en el año 2012, aislan *P. shigelloides* en un paciente en la ciudad de Kansas, Estados Unidos, con laceración corneal, aunque él plantea que esta bacteria rara vez causa infecciones extraintestinales.

En la tabla 7 se muestra la distribución de especies correspondientes al género *Aeromonas* una vez que fueron aplicados los esquemas de identificación Aeroesquema y Aerokey II. Se determinó *Aeromonas* spp. (48,3%), *A. caviae* (41,4%), *A. veronii* biovar *sobria* (6,9%), *A. hydrophila* (1,7%) y *A. trota* (1,7%). Es de destacar que existieron diferencias entre las frecuencias de las diferentes especies del género ($p < 0,01$), siendo las más frecuentes *Aeromonas* spp. y *A. caviae*.

Tabla 7. Distribución de las especies identificadas correspondientes al género *Aeromonas*.

Especies de <i>Aeromonas</i>	N	%
<i>Aeromonas</i> spp.	28	48,3
<i>Aeromonas caviae</i>	24	41,4
<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i>	4	6,9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,7
<i>Aeromonas trota</i>	1	1,7
Total	58	100

Fuente: LNR/EDA/IPK.

La identificación bioquímica de las especies de *Aeromonas* causantes de EDA constituye una herramienta importante para la vigilancia epidemiológica ya que permite determinar la prevalencia de una 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 (Koneman EW *et al.*, 2008).

La caracterización de las especies de *Aeromonas* basada en las reacciones bioquímicas convencionales son algunas veces imprecisas, debido a la diversidad de fenoespecies y genoespecies que existen en este género (Hassan J, 2006).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de facilitar la identificación de *Aeromonas* spp. en los laboratorios de microbiología clínica, Carnahan A y cols. en el año 1991, diseñaron un esquema denominado Aerokey II, sistema que proporciona una identificación confiable y segura de los aislamientos de importancia clínica. Posteriormente, Furuwatari CH y cols. en el año 1994, desarrollan un nuevo esquema que, además de identificar las especies de *Aeromonas*, discrimina también a *P. shigelloides* y dos especies de *Vibrio* (*V. cholerae* y *V. mimicus*).

Abbott SI y cols. en el año 2003, así como Carnahan M y Joseph SW, 2005 diseñan esquemas extensos de identificación fenotípica que permiten la clasificación de las especies de *Aeromonas*. Por otra parte, investigadores como Sinha S y cols. en el año 2004, al realizar un estudio para evaluar el Aerokey II, identifican satisfactoriamente en especie 95,3 a 98,2% de los aislamientos clínicos recibidos durante un período de dos años.

Según refiere la literatura las especies de *Aeromonas* aisladas con mayor frecuencia en humanos son: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria*. (Von A, 2007). Lobatón T y cols. en el año 2015, en un estudio realizado en el Hospital Universitario de Leuven, Bélgica, identifican dos de las especies más aisladas: *A. caviae* 28 (42,4%) y *A. veronii* biovar *sobria* 22 (33,3%), así como *A. hydrophila* 8 (12,1%) con un porcentaje inferior, coincidiendo los resultados que se muestran en la presente investigación con la referida por estos autores.

Obtuvimos un 48,3% de *Aeromonas* a las que no se les pudo identificar la especie con los métodos empleados (Aerokey II y Aeroesquema). Chen PL y cols. en el año 2016, plantean que la espectrometría de masa es la prueba de referencia para la determinación de especies de *Aeromonas*. Este es un método costoso y requiere de laboratorios especializados, así como personal entrenado.

En la tabla 8 se expone la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Aeromonas* spp. de origen extraintestinal e intestinal en el CMHE 10 de Octubre y el LNR/EDA/IPK, respectivamente entre mayo de 2016 y junio de 2017.

Cuando se compararon las frecuencias de aislamientos sensibles con los intermedios y los resistentes, se observó que para cada antimicrobiano predominaron los aislamientos sensibles sobre los resistentes. Dentro de los

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sensibles los que mayores porcentajes alcanzaron fueron amikacina, gentamicina y azitromicina ($p<0,01$); mientras que en la sensibilidad intermedia el que mayor frecuencia mostró fue el trimetoprim-sulfametoxazol ($p<0,01$). Finalmente, al comparar la frecuencia de aislamientos resistentes entre los diferentes antimicrobianos no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$).

Tabla 8. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de *Aeromonas* spp. de origen extraintestinal e intestinal en el CMHE 10 de Octubre y el LNR/EDA/IPK, respectivamente, mayo de 2016 a junio de 2017 (n=58).

Antimicrobianos	<i>Aeromonas</i> spp.		
	No (%)	No (%)	No (%)
	Sensible	Intermedio	Resistente
Trimetoprim-Sulfametoxazol	41(70,7)	13(22,4)	4(6,9)
Gentamicina	56(96,6)	1(1,7)	1(1,7)
Ciprofloxacino	54(93,2)	2(3,4)	2(3,4)
Cloranfenicol	52(89,7)	2(3,4)	4(6,9)
Azitromicina	56(96,6)	0(0)	2(3,4)
Amikacina	57(98,3)	0(0)	1(1,7)
Tetraciclina	50(86,2)	4(6,9)	4(6,9)
Doxiciclina	55(94,8)	1(1,7)	2(3,4)
Ceftriaxona	54(93,1)	0(0)	4(6,9)

Fuente: LNR/EDA/IPK, CMHE 10 de Octubre.

Spadaro S y cols. en el año 2014 en Italia, aislan *A. sobria* en un paciente con fascitis necrotizante sensible a: gentamicina, amikacina y ciprofloxacino. Bravo L y cols. en el año 2003, en Cuba, aislan en el tracto respiratorio de un paciente de 85 años *A. hydrophila*, también sensible a: tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol y gentamicina. También, Morales A y González A, 2013, en un estudio en el Hospital Clínico Quirúrgico “Arnaldo Milián Castro”, en Villa Clara, obtienen aislamientos de *Aeromonas* spp. con sensibilidad a: cloranfenicol y ciprofloxacino y resistencia a: trimetoprim-sulfametoxazol y ampicillin.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *P. shigelloides* investigados. Se observó que la totalidad de los aislamientos fueron sensibles a los antimicrobianos utilizados.

Diferimos con los resultados de Chen X y cols. en el año 2013, en un estudio realizado en el sudeste de China, donde obtiene 104 aislamientos en pacientes con diarrea aguda resistentes a los antimicrobianos: ampicilina (91,7%) y trimetoprim-sulfametoxazol (41,2%). También se difiere con lo reportado por Shah M y cols. en el año 2016, en un estudio de 1410 niños en una región suburbana de Kenya, que obtienen un 0,2% de *P. shigelloides* con una resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol de 97,6%.

En el presente estudio *V. cholerae* no-O1 mostró sensibilidad a todos los antimicrobianos investigados, con excepción de trimetoprim-sulfametoxazol uno resistente y uno con resistencia intermedia y se obtuvo dos aislamientos resistentes a la ampicilina.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se discrepa con Morales A y González A, 2013, quienes en un estudio en el Hospital Clínico Quirúrgico “Arnaldo Milián Castro”, Villa Clara, refieren un bajo nivel de resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol. También con Chowdhury G y cols. en el año 2016, que en infección extraintestinal por *V. cholerae* no-O1/no-O139 reporta una sensibilidad de 100% para trimetoprim-sulfametoxazol, en 4 casos presentados y 75% de sensibilidad para ampicilina. Sin embargo, hubo coincidencia en este último estudio en cuanto a la sensibilidad obtenida para azitromicina, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacino, gentamicina y tetraciclina (100%).

Coincidimos con lo que reporta Rezaie N y cols. en el año 2017, al estudiar 20 aislamientos de *V. cholerae* en Irán, donde obtienen 75% de ellos resistentes a trimetoprim y 60% a co-trimoxazole; aunque con respecto a la tetraciclina refiere un 50% de resistencia. Chomvarin C y cols. en el año 2014, al estudiar en Khon Kaen (Tailandia), aislamientos ambientales y clínicos (pacientes con diarreas y asintomáticos), muestran también *V. cholerae* no-O1 resistente a trimetoprim-sulfametoxazol (9,4%). No obstante, no se coincide en el hallazgo de resistencia a la tetraciclina (9,4%).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 mostraron resistencia además a ampicilina. Resultados que no coinciden con Dong C y cols. en el año 2015, quienes publican en un estudio de 4 aislamientos de un brote de cólera epidémico en Jiangsu, China, demuestran la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol del 100%. Sin embargo, no se coincide con su estudio en cuanto a la ampicilina que muestra sensibilidad en el 100%.

En este estudio *V. cholerae* no-O1 fue sensible, al resto de los antimicrobianos utilizados. Coincidiendo estos hallazgos con autores como Chomvarin C y cols. en el año 2014, quienes obtienen *V. cholerae* no-O1 sensible a ciprofloxacino (100%) y resistente a trimetoprim-sulfametoxazol (9,4%).

Selyanskaya NA y cols. en el año 2016, en un estudio comparativo de la resistencia en aislamientos de *V. cholerae* no-O1/no-O139, aislados en el territorio de Rostov, Rusia, muestran resistencia a la ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol, resultados similares a los que se exponen en este estudio, a pesar de esto, ellos resaltan, además, una resistencia intermedia a gentamicina y amikacina, con la que no coincidimos.

En el presente estudio no se encontró multiresistencia en *V. cholerae* no-O1. Sin embargo, Kokashvili T y cols. en el año 2013, en la región sur del Cáucaso, Georgia, plantean que aislamientos de *V. cholerae* O1 en aguas costeras del Mar Negro tienen elevada multiresistencia antimicrobiana comparada con los aislamientos de los serotipos no-O1/no-O139. También Mandal J y cols. en el año 2011 en aislamientos de brotes de *V. cholerae* O1 en la India, encuentran aislamientos multirresistentes a cefalosporinas de tercera generación. Lo ratifica Mahmud ZH y cols. en el año 2014, que aíslan mediante hisopado rectal *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, serotipo Ogawa, del brote de cólera de Sierra Leona, África (2012), las que fueron resistentes a eritromicina, cloranfenicol, furazolidona y trimetoprim-sulfametoxazol, así como variables en cuanto a la sensibilidad frente a la kanamicina.

La identificación correcta de los agentes etiológicos causantes de las enfermedades infecciosas siempre ha sido el eje central de las investigaciones en los laboratorios de microbiología clínica, actividad que en ocasiones se dificulta

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

por no conocer con exactitud la amplia gama de microorganismos que en un momento determinado ocasionan infecciones intestinales y extraintestinales, afecciones que sin un manejo terapéutico adecuado pueden conducir a la muerte, este es el caso de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonasy* *Vibrio*. En Cuba, gracias al esfuerzo y las investigaciones realizadas durante más de dos décadas, el LNR/EDA/IPK, ha logrado establecer la búsqueda sistemática de estos microorganismos y divulgar la multirresistencia en los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas*, contribuyendo así al mejor manejo de las enfermedades causadas por estas bacterias y orienta sobre una terapia antimicrobiana adecuada y efectiva. Los resultados obtenidos en el presente estudio dan continuidad a los ya existentes en Cuba, con relación a la identificación fenotípica convencional y al monitoreo de la resistencia antimicrobiana de estos géneros bacterianos. De este modo se sumará a los múltiples esfuerzos que se realizan en Cuba con el objetivo de hacer una identificación acertada de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*.

VI. CONCLUSIONES

1. Se evidencia que con la aplicación sistemática de la prueba de oxidasa en la identificación de los bacilos gramnegativos oxidasa positivos, se muestra la circulación de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* en muestras extraintestinales, no antes identificados en el CMHE de 10 de Octubre.
2. Se obtuvo un bajo porcentaje de identificación de especies de *Aeromonas* por los métodos fenotípicos de laboratorio empleados en el LNR/EDA del IPK, lo que motiva la implementación de nuevas técnicas de diagnóstico que complementen la mejor diferenciación en especies de los aislamientos.
3. El estudio de susceptibilidad antimicrobiana sugiere que el trimetoprim-sulfametoxazol pudiera no ser empleado en el tratamiento de las infecciones extraintestinales e intestinales causadas por el género *Aeromonas* y *Vibrio cholerae* no-O1 en Cuba.

VII. RECOMENDACIONES

- ❖ Mantener la sistematización de la prueba de oxidasa en los laboratorios de microbiología clínica, para la identificación de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, a partir de muestras extraintestinales e intestinales.
- ❖ Introducir en el LNR/EDA del IPK nuevas técnicas para la identificación fenotípica de las especies del género *Aeromonas*.
- ❖ Realizar estudios de concentración mínima inhibitoria en los aislamientos resistentes identificados.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aagesen A, Häse C. Sequence analyses of type IV pili from *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Microb Ecol.* 2012;64:509-24. doi: 10.1007/s00248-012-0021-2.
- ❖ Abbott SI, Cheung WK, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristic, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2348-57.
- ❖ Abuelsaad AS, Mohamed I, Allam G, Al-Solumani AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *LifeSci.* 2013;93:714-22. doi: 10.1016/j.lfs.2013.09.019
- ❖ Acosta J, Aguilar CR. Infección de tejidos blandos por *Aeromonas salmonicida*. Primer reporte de caso en México y revisión de la bibliografía. *Med Int Méx.* 2014;30:221-6.
- ❖ Aguinaga A, Portillo ME, Yuste JR, del Pozo JL, García E, Pérez JL, et al. Non-O1 *Vibrio cholerae* inguinal skin and soft tissue infection with bullous skin lesions in a patient with a penis squamous cell carcinoma. *Annals of Clin Microbiol and Antimicrob.* 2009;8:17. doi: 10.1186/1476-0711-8-17
- ❖ Akoachere JF, Omam LA, Masalla TN. Assessment of the relationship between bacteriological quality of dug-wells, hygiene behaviour and well characteristics in two cholera endemic localities in Douala, Cameroon. *BMC Public Health.* 2013a;13:692.
- ❖ Akoachere JF, Masalla TN, Njom HA. Multi-drug resistant toxigenic *Vibrio cholerae* O1 is persistent in water sources in New Bell-Douala Cameroon. *BMC Infect Dis.* 2013b;13:366.
- ❖ Alavandi SV, Ananthan S. Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. *Indian J Med Microbiol.* 2013;4(21): 233-8.
- ❖ Aldová E. Experiences with serology of *Plesiomonas shigelloides*. *J Hyg Epidemiol Immunol.* 1987;31:76-81.
- ❖ Aldová E, Shimada T. New O and H antigens of the international antigenic scheme for *Plesiomonas shigelloides*. *Folia Microbiol.* 2000;45:301-4.
- ❖ Al Jarousha AM, El Jarou MA, El Qouqa IA. Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. *Indian J Pediatr.* 2011;78(2):165-70. Amani J;

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Mirhosseini SA; Ali A, Fooladi I. A Review Approaches to Identify Enteric Bacterial Pathogens. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(2):e17473. doi: 10.5812/jjm.17473
- ❖ Amin SM, Rajabnia R, Imani Fooladi AA, Hojati Z, Moghim S, Nasr Esfahani B. Determination of ctxAB expression in *Vibrio cholerae* Classical and El Tor strains using Real-Time PCR. Int J Mol Cell Med. 2013; 2(1):9-13.
 - ❖ Ampofo K, Graham P, Ratner A, Rajagopalan L, Della P, Saiman L. *Plesiomonas shigelloides* sepsis and splenic abscess in an adolescent with sickle cell disease. J Pediatr Infect Dis. 2001;20:1178-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-200112000-00019>.
 - ❖ Anuario Estadístico de Salud 2016, Edición Especial. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. MINSAP. 2016. Disponible en:<http://www.sld.cu/sitios/dne>
 - ❖ Anzalone M, Arenas C, Ballesté R, Bazet C, Blanco J, Legnani M. Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Selección, recolección, conservación y transporte. Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas. Repartición Microbiología. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina Montevideo-Uruguay 2004.
 - ❖ Aquilini E, Merino S, Regué M, Tomás JM. Genomic and proteomic studies on *Plesiomonas shigelloides* lipopolysaccharide core biosynthesis. J Bacteriol. 2014;196:556-67.
 - ❖ Aquilini E, Merino S, Tomás JM. The *Plesiomonas shigelloides* wbO1 gene cluster and the role of O1-antigen LPS in pathogenicity. Microb Pathog. 2013;63:1-7.
 - ❖ Aravena M, Beaz R, Inglis TJ, Riley TV, Martínez AJ et al. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water in Western Australia. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63:2270-6.
 - ❖ Attéré SA, Vincent AT, Trudel MV, Chanut R, Charette SJ. Diversity and Homogeneity among Small Plasmids of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Linked with Geographical Origin. doi:10.3389/fmicb.2015.01274
 - ❖ Austin B. *Aeromonas* fish pathogens, in *Aeromonas*, ed Graf J., editor. (Storrs, CT: Caister Academic Press), 2015:45-65.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Auxiliadora M, Bellissimo F, Viana JM, Teixeira GCA, Nicolini EA, Cordeiro KSM, et al. Septic shock caused by *Plesiomonas shigelloides* in a patient with sickle beta-zero thalassemia. Heart Lung. 2010;39:335-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrtlng.2009.06.015>.
- ❖ Anyim MC, Meka AO, Chukwu JN, Nwafor CC, Oshi DC, Madichie NO, et al. Secondary bacterial isolates from previously untreated Buruli ulcer lesions and their antibiotic susceptibility patterns in Southern Nigeria. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(6):746-51. doi: 10.1590/0037-8682-0404-2016
- ❖ Bahamonde C, Stuardo V. La epidemia de cólera en América Latina: reemergencia y morbimortalidad. 2013;33(1):40-6.
- ❖ Baker C, Trinanés J, González N, Martínez J. Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. Trends in Microbiology. 2017;25(1):76-84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.008>
- ❖ Balbachan S, Merino L, Merino D, Balbachan M, Miranda O. Resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de diarreas en niños de Corrientes Argentina. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(3).
- ❖ Balsega E, Albizu I, De la Cruz M, Del Cabo E, Barberan M, Amorena B. Papel de los exopolisacáridos bacterianos en las mampitis. Infect Immun. 1993;61(11):4857-62.
- ❖ Bari SM, Roky MK, Mohiuddin M, Kamruzzaman M, Mekalanos JJ, Faruque SM. Quorum-sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in environmental water samples. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013;110:9926-31. doi: 10.1073/pnas.1307697110
- ❖ Baron S, Granier SA, Larvor E, Jouy E, Cineux M, Wilhelm A, et al. *Aeromonas* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Freshwater-An Attempt to Set Generic Epidemiological Cut-Off Values. Front Microbiol. 2017a;28(8):503. doi: 10.3389/fmicb.2017.00503.
- ❖ Baron S, Larvor E, Chevatlier S, Jouy E, Kempf I, Granier SA, et al. Antimicrobial Susceptibility among urban wastewater and wild shellfish isolated of Non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* from La rance Estuary (Brittany, France). Front Microbiol. 2017b;8:1637. doi: 10.3389/fmicb.2017.01637.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Batista N. et al. Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiología>.
- ❖ Batra P, Mathur P, Misra MC. *Aeromonas* spp. An Emerging Nosocomial Pathogen. J Lab Physicians. 2016;8(1):1-4. doi: 10.4103/0974-2727.176234
- ❖ Bhattacharya SK. An evaluation of current cholera treatment. Expert Opin Pharmacother. 2003;4(2):141-6.
- ❖ Bauer AW, Kirby WMM, Sherman TS, Turck M. Antibiotic Susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Path. 1966;45(4):494-5.
- ❖ Beaz R, Hossain MJ, Mark R, Figueras MJ. Strategies to Avoid Wrongly Labelled Genomes Using as Example the Detected Wrong Taxonomic Affiliation for *Aeromonas* Genomes in the GenBank Database. PLoS One. 2015;21doi:10.1371/journal.pone.0115813
- ❖ Beaz R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. J Fish Dis. 2013;36:371-88.
- ❖ Beltrán M. Cólera. En: Vicente E, Rodríguez AL, Sánchez E. Diagnóstico y tratamiento en Medicina Interna. ECIMED. 2012. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/libros_texto/diagnóstico_tmo_medintern/cap82.pdf.
- ❖ Bogdanovic R, Cobeljic M, Markovic V, Nikolovic V, Ognjanovic M, Sarjanovic L, et al. Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. Pediatr Nephrol. 1991;6:221-2.
- ❖ Boiko AV. Pathogenicity factors of various *Vibrios* and *Aeromonas*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2000;79(6):104-8.
- ❖ Bonatti H, Sifri C, Sawyer RG. Successful liver transplantation from donor with *Plesiomonas shigelloides* sepsis after freshwater drowning: case report and review of literature on gram-negative bacterial aspiration during drowning and utilization of organs from bacteremic donors. Surg Infect. 2012;13:114-20.
- ❖ Bong H, Yoon J, Lee Y, Sook M, Lee K. Comparison of MALDI-TOF MS, Housekeeping Gene Sequencing, and 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates. Yonsei Med J. 2015;56(2):550-5.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Brann OS. Infectious complications of cirrhosis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2001;3:285-92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11894-001-0051-2>.
- ❖ Bravo L, Cabrera LE, Castro G, Ramírez MM, Fernández A, Llop A, et al. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba. *Rev Chil Infect.* 2007;24(3):204-8.
- ❖ Bravo L, Fernández A, González D, Ramírez M, Aguila A, Cabrera N, et al. Caracterización fenotípica de cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(1):76-80.
- ❖ Bravo L, Monte RJ, Gómez M, Dumas SC. Identificación de bacilos Gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivos. *Rev Cubana Med Trop.* 1993a;45:46-8.
- ❖ Bravo L, De Paola OS, Maestre J, Ramírez M, García B. Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en *Plesiomonas shigelloides*. *Rev Cubana Med Trop.* 1998;50(3):203-6.
- ❖ Bravo L, Correa Y, Clausell JF, Fernández A, Ramírez M, Núñez F, et al. Virulence factors and in vitro susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* isolated from diarrhea episodes in Cuba. *Rev Chilena Infectol.* 2009;26(3):233-8.
- ❖ Bravo L, Cabrera L, Ramírez M, Llop Alina, Fernández A, García B, et al. *Plesiomonas shigelloides* una vibrionácea en quien pensar. *Rev Cubana Med Trop.* 2000;52(1):10-4.
- ❖ Bravo L, Morier L, Castaneda N et al. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extra-intestinal infection in Cuba. *Rev Cubana de Med Trop.* 2003;55(3):208-9.
- ❖ Bravo L, Fernández A, Núñez FA, Rivero LA, Ramírez M, Águila A, et al. *Aeromonas* spp asociada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudios de casos y controles. *Rev Chil Infect.* 2012;29(1):44-8.
- ❖ Bravo L, Valdivia I, Monte R, Ramírez M, García B. Identificación en especie de *Aeromonas* aisladas en Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 1993b;45(2):136-8.
- ❖ Bulto PL, Rivero A, Perez A, Morgado FC. La influencia de la variabilidad climática en la ocurrencia de las enfermedades digestivas en Cuba. *Revista Cubana de Meteorología.* 2006;13(1):73.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Burchard GD, Hentschke M, Weinke T, Nothdurft HD. Travelers' diarrhea. Dtsch Med Wochenschr. 2013;138(33):16-83.
- ❖ Buss SN, Leber A, Chaplin K, Fey PD, Bankowski MJ, Kones MK, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiological diagnosis of infectious gastroenteritis. J Clin Microbiol. 2015;53:915-25.
- ❖ Cabrera LE, Palma S, Ramirez M, Castro G, Cabrera R, Bravo L. Severe otitis due to *Vibrio fluvialis* in a patient with AIDS: first report in the world. Rev Cubana Med Trop. 2005;57:154-5.
- ❖ Cabrera LE, Graciela E, Ramírez A., Llop A, Llanes R, Castañeda N, et al. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba. Rev Chil Infect. 2007; 24 (3):204-8.
- ❖ Carnahan A, Behram S, Joseph S. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. J. Clin Microbiol.1991;29:2843-9.
- ❖ Carnahan A, Joseph SW. *Aeromonaceae*.In: Carrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. 2nd edit. New York: Springer- Verlag, 2005, p: 556-80.
- ❖ Castro G, Aguilera MG, Hernández CH, Arteaga NI, Carmona AA, Pérez A, et al. La identificación genética de *Aeromonas* una realidad y una necesidad en la microbiología diagnóstica. Bioquímica. 2003;28(4):11-8.
- ❖ Ceccarelli D, Chen A, Hasan, NA, Rashed SM, Huq A, Colwell RR. Non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* carrying multiple virulence factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland.Appl. Environ. Microbiol. 2015;(81):1909-91.
- ❖ Centers for Disease Control and Prevention (CDC).Principles of Epidemiology. An Introduction to Applied Epidemiology and Biostatistics. Second Edition. Atlanta, Georgia. 2013a.
- ❖ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10U.S. sites, 1996-2012. MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep. 62, 283-7. 2013b.
- ❖ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Non-O1 and Non-O139 *Vibrio cholerae* Infections. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 2014.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Disponible en: http://www.cdc.gov/Sources_of_Infection_Risk_Factors/Cholera/CDC.htm
- ❖ Chang H, Hung YS, Shie SS, Lin TL. Fulminant necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas sobria* in neutropenic patients. Intern Med. 2012;51:3287-90.
 - ❖ Chang MC, Chang SY, Chen SL, Chuang SM. Cloning and expression of *Escherichia coli* of the gene encoding an extracellular desoxyribonuclease (DNase) from *Aeromonas hydrophila*. Gene. 1992;122:75-180.
 - ❖ Chao CM, Lai CC, Gau SJ, Hsueh PR. Skin and soft tissue infection caused by *Aeromonas* species in cancer patients. J. Microbiol. Immunol. Infect.. 2013;46:144-6.
 - ❖ Charles A, De Paola A. Bacteriological analytical manual on line. May 2004. Chapter 9. 8th ed. Disponible en: <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>
 - ❖ Chen PL, Lamy B, Ko WC. *Aeromonas dhakensis*, an increasingly recognized human pathogen. 2016;7(793):3. doi:10.3389/fmicb.2016.00793.
 - ❖ Chen PL, Tsai PJ, Chen CS, Lu YC, Chen HM, Lee NY, et al. *Aeromonas stool* isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: predominance of *Aeromonas veronii*. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2015;48:618-24.
 - ❖ Chen YT, Tang HJ, Chao CM, Lai CC. Clinical manifestations of non-O1 *Vibrio cholerae* infections. PLoS One. 2015;10:e0116904. doi: 10.1371/journal.pone.0116904
 - ❖ Chen X, Chen Y, Yang Q, Kong H, Yu F, Han D, et al. *Plesiomonas shigelloides* infection in southeast China. PLoS One. 2013;8:e77877. doi: 10.1371/journal.pone.0077877
 - ❖ Ching W, Moi S, Ai Mary Anne, Tan J, Puthuchery SD, Heng K. Phenotypic and Genetic Diversity of *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Lakes in Malaysia. PLoS One. 2015.
 - ❖ Chomvarin C, Jumroenjit W, Tangkanakul W, Hasan NA, Chaicumpar K, Faksri K, Huq A. Genotype and drug resistance of clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-o1/non-o139 in northeastern Thailand Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2014 Nov;45(6):1354-64.
 - ❖ Chowdhury G, Joshi S, Bhattacharya S, Sekar U, Birajdar B, Bhattacharyya A, Shinoda S, Ramamurthy T. Extraintestinal infections caused by Non-toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139. Front. Microbiol. 2016;7:144.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Chun J, Rainey FA Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:316-24.
- ❖ Cisar CR, Henderson SK, Askew ML, Risenhoover HG, McAndrews CR, Kennedy SD, et al. Antibiotic Resistance in *Aeromonas* Upstream and Downstream a Water Resource Recovery Facility. *Water Environ Res*. 2014;86(9):835-43.
- ❖ Clark RB, Westby GR, Spector H, Soricelli RR, Young CL. Fatal. *Plesiomonas shigelloides* septicemia in a splenectomised patient. *J Infect* 1991;23:89-92.
- ❖ Clemens JD, Nair GB, Ahmed T, Qadri F, Holmgren J. Cholera. *Lancet*. 2017. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30559-7
- ❖ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI eCLIPSE. Wayne, PA 19087 USA. Clinical and Laboratory Standard Institute; January 2017.
- ❖ Colwell RR, MacDonell MT, De Ley J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1986;36:473-7.
- ❖ Crawford JA, Krukoni ES, DiRita VJ. Membrane localization of the ToxR winged-helix domain is required for TcpP-mediated virulence gene activation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2003;47(5):1459-73.
- ❖ Dallaire S, Tanaka K.H, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol*. 2014;169:1-7.
- ❖ Daniels NA and Shafie A. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infections in Medicine*. 2000;17:665-85.
- ❖ Daskalov H, The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety, *Food Control*. 2006;17(6):474-83.
- ❖ Desai SN, Pezzoli L, Martin S, Costa A, Rodriguez C, Legros D, et al. A second affordable oral cholera vaccine: implications for the global vaccine stockpile. *Lancet Glob Health*. 2016;4(4):e223-4.
- ❖ Dias C, et al. Extended-spectrum-lactamase and carbapenemase-producing *Aeromonas* species in wild animals from Portugal. *Veterinary Record*. 2014;174(21): 532. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/23/1/35.full>

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Dickinson G, Lim KY, Jiang SC. Quantitative Microbial Risk Assessment of Pathogenic Vibrios in Marine Recreational Waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(1):294-302.
- ❖ Dixon B. Natural disaster microbiology. *Microbe.* 2008;3:312-3.
- ❖ Doganis D, Baka M, Tsoia M, Pourtsidis A, Lebessi E, Varvoutsis M, et al. Multifocal *Aeromonas* Osteomyelitis in a Child with Leukemia. *Case Reports in Infectious Diseases.* 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8159048>
- ❖ Dong C, Zhang X, Bao C, Zhu Y, Zhuang L, Tan Z, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Vibrio cholerae* strains isolated from an outbreak of cholera epidemic in Jiangsu province. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2015;49(2):128-31.
- ❖ Duarte S, Silva FC, Zauli DA, Nicoli JR, Araújo FG. Gramnegative intestinal indigenous microbiota from two *Siluriform* fishes in a tropical reservoir. *Braz J Microbiol.* 2014;45:1283-92.
- ❖ Dustan RA, Heinz E, Wijeyewickrema LC, Pike RN, Purcell AW, Enans TJ, et al. Assembly of the Type II Secretion System such as Found in *Vibrio cholerae*. Depends on the Novel Pilotin AspS. *PLoS Pathog.* 2013;9(1):303-9.
- ❖ Dutta D, Chowdhury G, Pazhani GP, Guin S, Dutta S, Ghosh S, et al. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2013;(19):464-7.
- ❖ Estrada MU, Estrada G, Vinajera C. Cólera. Contexto clínico-epidemiológico y social. A propósito del brote epidémico en Granma, Cuba. *Multimed.* 2012;16(4). Disponible en: <http://www.multimedgrm.sld.cu/articulos/2012/v16-4/9.html>
- ❖ Farmer J, Janda M, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM. 2015. *Vibrio*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* 1-79.
- ❖ Ferguson WW, Henderson ND. Description of strain C27: a motile organism with major antigens of *Shigella sonnei*. *J Bacteriol.* 1947;54:179-81.
- ❖ Figueras MJ, Beaz R. *Aeromonas* infections in humans in *Aeromonas*, ed. J. Graf (Norfolk: Caister Academic Press). 2015,65-108.
- ❖ Filler G, Ehrich JH, Beutin L. Acute renal failure in a infant associated with cytotoxic *Aeromonas veronii* bv sobria isolated from patient's stool and from aquarium water as suspected source of infection. 2000;38:469-70.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Fukushima H, Tsunomori Y. Study of real-time PCR assays for rapid detection of food-borne pathogens. *Kansenshogaku Zasshi*. 2005;9:644-55.
- ❖ Furuwatari CH, Kawakami Y, Akahame T, Hidaka E, Okimura Y, Nakayama J. Proposal for an Aeroscheme (modified Aerokey II) for the identification of clinical *Aeromonas* species. *Med Sci Res*.1994;22:617-9.
- ❖ Galindo CL, Chopra AK. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species, En: Doyle MP and Beuch LR, edit. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, D.C: ASM Press, 2007. p.1-56.
- ❖ Garryty GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the Prokariotes.En: Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. 2 nd ed. Release 4.0;Oct 2003. [Citado el 10 de febrero del 2008].Disponible en: [URL:http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310](http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310)
- ❖ Gavilán RG, Martínez J. Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Rev Perú Med Exp Salud Publica Mar*. 2011;(28):1. Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342011000100017>
- ❖ González C, Siitonen A, Pavlova A, Ciznar I, Svenson SB, Krovacek K. Molecular evidence of *Plesiomonas shigelloides* as a possible zoonotic agent. *Folia Microbial (Praha)*. 2011;56:178-84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-011-0032-2>.
- ❖ González C, Svenson SB, Bravo L, Rosinsky J, Ciznar I, Krovacek K. Specific detection of *Plesiomonas shigelloides* isolated from aquatic environments, animals and human diarrhoeal cases by PCR based on 23S rRNA gene. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29:107-13. Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01512.x>
- ❖ Gopal V, Burns FE. Cellulitis and compartment syndrome due to *Plesiomonas shigelloides*: a case report. *Mil Med*. 1991;156:43.
- ❖ Grim CJ, Kozlova EV, Sha J, et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes. *MBio*. 2013;4:e00064-13. doi: 10.1128/mBio.00064-13
- ❖ Grim CJ, Kozlova EV, Ponnusamy D, Fitts EC, Sha J, Kirtley ML, et al. Functional genomic characterization of virulence factors from Necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2014;80:4162-83.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Guerrant RL, Gilder TV, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV. Practice guidelines for management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2001;32:331-50.
- ❖ Gutiérrez M, Urbina D, Matiz A, Puello M, Mercado M, Parra M, Trespalacios A. Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona ecuatorial. *Colombia Médica*. 2005;36(4):6-14.
- ❖ Habs H, Schubert RH. Über die biochemischen Merkmale und die taxonomische Stellung von *Pseudomonas shigelloides* (Bader). *Zentralbl Bakteriologie I Abt Orig*. 1962;186:316-27.
- ❖ Hao Y, Wang Y, Bi Z, Sun B, Jin Y, Bai Y, et al. A case of non O1/ non-O139 *Vibrio cholerae* septicemia and meningitis in a neonate. *Int. J Infect. Dis*. 2015;35:117-9.
- ❖ Hassan J. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. United States: EPA Office water; 2006.
- ❖ Herve V, Bigaillon C, Duhamel P, Petit MP, Soler C. Cutaneous abscess due to *Plesiomonas shigelloides* consecutive to a trauma in fresh water. *Med Mal Infect*. 2007; 37:840. (In French) Available of: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal2007.03.003>.
- ❖ Hiransuthikul N, Tantisiriwat W, Lertutsahakul K, Vibhagool A, Boonma P. Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. *Clin Infect Dis*. 2005;41:e936.
- ❖ Humphries RM, Linscott AJ. Practical guidance for Clinical Microbiology (Formerly cumitechs). Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. *Clinical Microbiology Reviews*. January 2015a;28(1):3-31.
- ❖ Humphries RM, Schuetz AN. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria that cause gastroenteritis. *Clin Lab Med*. 2015b; 35(2):313-31.
- ❖ Hu Q, Lin Q, Shi C, Fu X, Li N, Liu L, Wu S. Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2014;54:229-35.
- ❖ Hustedt JW, Ahmed S. *Plesiomonas shigelloides* Periprosthetic Knee Infection After Consumption of Raw Oysters. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2017;46(1):E32-E34. PMID:28235124.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Igbinosa IH, Igbinosa EO, Okoh AI. Antibiogram characterization and putative virulence genes in *Aeromonas* species isolated from pig fecal samples. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Jun;23(12):12199-205.
- ❖ Imani FA, Iman ID, Hosseini DR, Karami A, Marashi SM. Design of a multiplex PCR method for detection of toxigenic-pathogenic in *Vibrio cholerae*. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(2):115-8.
- ❖ Islam A, Labbate M, Djordjevic SP, Alam M, Darling A, Melvold J, *et al*. Indigenous *Vibrio cholerae* strains from anon-endemic region are pathogenic. *Open Biol*. 2013;120181.doi:[10.1098/rsob.120181](https://doi.org/10.1098/rsob.120181).
- ❖ Jagger TD. *Plesiomonas shigelloides*: a veterinary perspective. *Infect Dis Rev*. 2000; 2:199-210.
- ❖ Jallad MA, *et al*. Extended spectrum beta-lactamase carriage state among elderly nursing home residents in Beirut. *The Scientific World Journal*. 2015.
- ❖ Janda JM., Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:35-73. doi: [10.1128/CMR.00039-09](https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09)
- ❖ Janda JM, Abbott SL, Mc Iverc CJ. *Plesiomonas shigelloides* Revisited. *Clinical Microbiology Rev*. March 11, 2016;29(2):349-74.
- ❖ Janda JM. Genus XXVII. *Plesiomonas*, Habs and Schubert 1962, 324AL, p 740-744. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 2. Springer, New York, NY.2005.
- ❖ John N, Hatha AAM. Distribution, extracellular virulence factors and drugresistance of motile aeromonads in fresh water ornamental fishes and associated carriage water. *Int. J. Aquacult*. 2013;3:92-100. doi: [10.5376/ija.2013.03.0017](https://doi.org/10.5376/ija.2013.03.0017)
- ❖ Johnston J, Bhatt K. Not Doing Enough: Unnecessary Sickness and Death from Cholera in Haiti. *Center for Economic and Policy Research*. 2011:1-18.
- ❖ Joh SJ, Ahn EH, Lee HJ, Shin GW, Kwon JH, Park CG. Bacterial pathogens and flora isolated from farm-cultured eels (*Anguilla japonica*) and their environmental waters in Korean eel farms. *Vet Microbiol*. 2013; 163:190-195.
- ❖ Junco R, Suárez M, Weng Z, Chiroles S, González M, Díaz O, Rodríguez MC. Susceptibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Hig Sanid Ambient*.2006;6:150-159.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Kaki R, El-Hossary D, Jiman Fatani A, Al-Ghamdi R. Non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* septicaemia in a Saudi man: a case report. K JMM Case Rep. 2017 Feb 28;4(2):e005077. doi:10.1099/jmmcr.0.005077. eCollection 2017.
- ❖ Kakizaki E, Kozawa S, Matsuda H, Muraoka E, Uchiyama T, Sakai M, Yukawa N. Freshwater bacterioplankton cultured from liver, kidney and lungs of a decomposed cadaver retrieved from a sandy seashore: possibility of drowning in a river and then floating out to sea. Leg Med (Tokyo). 2010;12:195-199.
- ❖ Kanno Y, Kobayashi H, Kanno K, Obara K, Sato Y. Hemolytic uremia syndrome associated with Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection in a healthy adult woman. Inter Med. 2004 43:620-623.
- ❖ Karagozova AV, Salnikova OL. The expression of the pathogenic properties of the *Vibrio cholerae* O139 serogroup *in vitro*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2000;(3):7-10.
- ❖ Kaszowska M, Jachymek W, Lukasiewicz J, Niedziela T, Kenne L, Lugowski C. The unique structure of complete lipopolysaccharide isolated from semi-rough *Plesiomonas shigelloides* O37 (strain CNCTC 39/89) containing (2S)-O-(4-oxopentanoic acid)- α -D-Glcp (α -D-lenose). Carbohydr Res. 2013a;378:98-107.
- ❖ Kaszowska M, Jachymek W, Niedziela T, Koj S, Kenne L, Lugowski C. The novel structure of the core oligosaccharide backbone of the lipopolysaccharide from *Plesiomonas shigelloides* strain CNCTC 80/89 (serotype O13). Carbohydr Res. 2013b;380:45-50.
- ❖ Klatte JM, Daswtjerdi MH, Clark K, Harrison CJ, Grigorian F, Stahl ED. Hyperacute infectious keratitis with *Plesiomonas shigelloides* following traumatic lamellar corneal laceration. Pediatr Infect Dis J 2012;31:1200-201.
- ❖ Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, et al. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. J Clin Microbiol. 2014; 52:3667-73.
- ❖ Khan S, Kumar A, Meparambu D, Thomas S, Harichandran D, Karim S. Fatal non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* septicaemia in a patient with chronic liver disease. J. Med. Microbiol. 2013;(62):917-21.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Kihla J, Pulcherie CK. Water sources as reservoirs of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 strains in Bepanda, Douala (Cameroon): relationship between isolation and physico-chemical factors. BMC Infect Dis. 2014;14(1):421. doi: [10.1186/1471-2334-14-421](https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-421)
- ❖ Kimura M, Araoka H, Yoneyama A. *Aeromonas caviae* is the most frequent pathogen amongst cases of *Aeromonas* bacteremia in Japan. Scand J Infect Dis. 2013;45:304-9.
- ❖ Klatte JM, Dastjerdi MH, Clark K, Harrison CJ, Grigorian F, Stahl ED. Pediatr Infect Dis J. Hyperacute infectious keratitis with *Plesiomonas shigelloides* following traumatic lamellar corneal laceration. 2012;31(11):1200-1.
- ❖ Ko WC, Chuang YC: *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. Clin Infect Dis 1995;20:1298-1304.
- ❖ Kohlerschmidt DJ, Mingle LA, Dumas NB. Identification of aerobic gram-negative bacteria, p 77-92. In Goldman E, Green LH (ed), Practical handbook of microbiology, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL; 2015.
- ❖ Kokashvili T, Elbakidze T, Jaiani E, Janelidze N, Kamkamidze G, Whitehouse C, Huq A, Tediashvili M. Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia. Georgian. Med News. 2013;224:55-62.
- ❖ Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WN, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. 3^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- ❖ Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, Nataro JP, Farag TH, van Eijk A, et al The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries: epidemiologic and clinical methods of the case/control study. Clin Infect Dis. 2012;55:S232–S45.
- ❖ Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet. 2013;382:209-22.
- ❖ Kubler J, Schneerson R, Mocca C, Vinogradov E. The elucidation of the structure of the core part of the LPS from *Plesiomonas shigelloides* serotype O17 expressing O-polysaccharide chain identical to the *Shigella sonnei* O-chain. Carbohydr Res 2008;343:3123-7.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Kunkel A, Lewnard JA, Pitzer VE, Cohen T. Antimicrobial Resistance Risks of Cholera Prophylaxis for United Nations Peacekeepers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;25;61(8). doi: 10.1128/AAC.00026-17.
- ❖ Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health O, Unicef *et al.* Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One.* 2013;8(9):e72788.
- ❖ Lan NP, Nga TV, Yen NT, Dungle T, Tuyen HT, Campbell JI, et al. Two cases of bacteremia caused by non toxigenic, non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2014(52):3819-21.
- ❖ Larsen AM, Mohammed HH, Arias CR. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warm water fish species. *J Appl Microbiol.* 2014;116:1396-1404.
- ❖ Leibovici Y, Neuberger A, Bitterman R, Sinclair D, Salam M, Paul M. Antimicrobial drugs for treating cholera. *Cochrane Database of Systemic Review* 2014;6(CD008625).doi: 10.1002/14651858.CD008625.pub2
- ❖ Lilly J, Camps M. Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol. Spectr.* 2015,3. doi:10.1128/microbiolspec.plas-0029-2014.
- ❖ Lin WT, Su SY, Lai CC, *et al.* Peritonitis caused by *Aeromonas* species at a hospital in southern Taiwan. *Intern Med.* 2013;52:2517-21.
- ❖ Lobatón T, Hoffman I, Vermeire S, Ferrante M, Verhaegen J, Van Assche G. *Aeromonas* Species: An Opportunistic Enteropathogen in Patients with Inflammatory Bowel Diseases? A Single Center Cohort Study. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(1). Disponible en: www.ibdjournal.org
- ❖ Longa A, Velasco J, Camacho DG, González D, Castro-Escarpulli G. Faecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)- Producing *Aeromonas* species. *EC Microbiology* 2.4. 2015:358-62.
- ❖ Longa A, Velasco J, Camacho DG, González D, Castro G. Faecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)- Producing *Aeromonas* species. *EC Microbiology* 2.4. 2015:358-62.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Lundqvist L, Kaszowska CEM, Sandström C. NMR study of the O-specific polysaccharide and the core oligosaccharide from the lipopolysaccharide produced by *Plesiomonas shigelloides* O24:H8 (strain CNCTC 92/89). *Molecules*. 2015;20:5729-39.
- ❖ Luo Y, Ye J, Jin D, Ding G, Zhang Z, Mei L, et al. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *BMC Microbiol*. 2013;(13):52. doi:10.1186/1471-2180-13-52
- ❖ Lutz C, Erken M, Noorian P, Sun S, McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Microbiology. Aquatic Microbiology*. Dec 2013;(4):375-80.
- ❖ Luyt CD, Tandlich R, Muller WJ, Wilhelmi BS. Microbial monitoring of surface water in South Africa: an overview. *Int J Environ*. 2012;9:2669-93.
- ❖ Maina AN, Mwaura FB, Oyugi J, Goulding D, Toribio AL, Kariuki S. Characterization of *Vibrio cholerae* bacteriophages isolated from the environmental waters of the Lake Victoria region of Kenya. *Curr. Microbiol*. 2013;1-7.
- ❖ Mahmud ZH, Islam S, Zaman RU, Akter M, Talukder KA, Bardhan PK, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from the Sierra Leone cholera outbreak in 2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108(11):715-20. doi: 10.1093/trstmh/tru137
- ❖ Mala W, Faksri K, Samerpitak K, Yordpratum U, Kaewkes W, Tattawasart U, et al. Antimicrobial resistance and genetic diversity of the SXT element in *Vibrio cholerae* from clinical and environmental water samples in northeastern Thailand. *Infect Genet Evol*. 2017;52:89-95.
- ❖ Mandal S, Deb M, Kumar N. Cholera: a great global concern. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011a;573-80.
- ❖ Mandal J, Sangeetha V, Ganesan V, Parveen M. Third-Generation Cephalosporin-Resistant *Vibrio cholerae*, India. *Emerging Infectious Diseases*. [Internet]. 2011b;18(8):1326-28.
- ❖ Mansour AM, Abd Elkhalek R, Shaheen HI, et al. Burden of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea among children younger than 2 years in rural Egyptian community. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6:842-6.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Marshman WE, Lyons CJ. Congenital endophthalmitis following maternal shellfish ingestion. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1998;26:161-3.
- ❖ Matthews BG, Douglas H, Guiney DG. Production of a heat stable enterotoxin by *Plesiomonas shigelloides*. *Microbiol Pathogen*. 1988;5:207-13.
- ❖ Matsuyama R, Kuninaga N, Morimoto T, Shibano T, Sudo A, Sudo K, et al. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* from great cormorants (*Phalacrocorax carbo hanedae*) in Gifu and Shiga prefectures, Japan. *J Vet Med Sci*. 2015;77:1179-81.
- ❖ Meier JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence- based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*. 2013;14(60). Disponible en: [http://refhub.elsevier.com/S2213-5960\(15\)00070-7/rf0040](http://refhub.elsevier.com/S2213-5960(15)00070-7/rf0040)
- ❖ Menanteau S, Soliman H, Kumar G, El-Matbouli M. Use of *in vivo* induced antigen technology to identify genes from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* that are specifically expressed during infection of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *BMC Vet Res*. 2014a;10:298.
- ❖ Menanteau S, Kattlun J, Nöbauer K, El-Matbouli M. Protein expression and transcription profiles of three strains of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* under normal and iron-limited culture conditions. *Proteome Sci*. 2014b;12:29.
- ❖ Menanteau S, Kumar G, Saleh M, El-Matbouli M. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old Acquaintance. *Diseases of aquatic organisms*. 2016;120:49-68.
- ❖ Merino S, Gavín R, Vilches S, Shaw JG, Tomás JM. A colonization factor (production of lateral flagella) of *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strain. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(1):663-7.
- ❖ Merino S, Aquilini E, Fulton KM, Twine SM, Tomás JM. The polar and lateral flagella from *Plesiomonas shigelloides* are glycosylated with legionaminic acid. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:649.
- ❖ Merino S, Fulton KM, Twine SM, Wilhelms M, Molero R, Tomás JM. *Aeromonas hydrophila* flagella glycosylation: involvement of a lipid carrier. *PLoS One*. 2014; 9:e89630. doi: 10.1371/journal.pone.0089630

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Miller ML, Koburger JA. *Plesiomonas shigelloides*: an opportunistic food and waterborne pathogen. *Journal of Food Protection*. 1985;48(5):449.
- ❖ Miyoshi SI. Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *Vibrio* species, *Front Microbiol*. 2013;(4):339-45.
- ❖ Morales A, González A. Infecciones por *Aeromonas* spp., ¿pensamos en ellas? *ActaMedica*. 2013. Disponible en: http://www.actamedica.sld.cu/r3_13/editorial.htm
- ❖ Morgan DR, Johnson PC, DuPont HL, Satterwhite TK, Wood LV. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect Immun*.1985;50:62-5.
- ❖ Moore S, Thomson N, Mutreja A, Piarroux R. Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of *Vibrio cholerae* clones. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(5):373-9.
- ❖ Narin H, Worophot T, Krittavith L, Asda V y Boonma P. Sking and soft-tissue infections among Tsunami survivors in southern Thailand. *Clinical infectious disease*.2005;41:93-6.
- ❖ Naz F, Imran M, Quadri F, Shakoor S, Sow SO *et al*. *Aeromonas* Associated Diarrhea in Children Under 5 Years: The GEMS Experience. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016. doi: 10.4269/ajtmh.16-0321
- ❖ Nesper J, Schild S, Lauriano CM, Kraiss A, Klose KE, Reidl J. Role of *Vibrio cholerae* O139 surface polysaccharides in intestinal colonization. *Infect Immun*.2002;70(11):5990-6.
- ❖ Niskanen M, Salmela P. *Plesiomonas shigelloides*: a possible pathogen in animals. *Suomen Eläinlääkärilehti*. 2000;106:451-5.
- ❖ Nisha RG, Rajathi V, Manikandan R, Prabhu NM. Isolation of *Plesiomonas shigelloides* from infected cichlid fishes using 16S Rna characterization and its control with probiotic *Pseudomonas* sp. *Acta Sci Vet*. 2014;42:1-7.
- ❖ Novoa O, Frati AC, Peredo MA, Flores S, Novoa O, Galicia J, et al. Susceptibility to rifaximin and other antimicrobials of bacteria isolated in patients with acute gastrointestinal infections in Southeast Mexico. *Rev Gastroenterol Mex*. 2017. doi: S0375-0906(17)30021-6.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Novoa O, Frati AC, Peredo MA, Flores S, Novoa O, Galicia J, et al. Susceptibility of bacteria isolated from acute gastrointestinal infections to rifaximin and other antimicrobial agents in Mexico. *Rev Gastroenterol Mex.* 2016;81(1):3-10.
- ❖ Nsofor CA, Kemajou ST, Nsofor CM. Incidence and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from foods sold in Port-Harcourt, Nigeria. *Journal of Bacteriology Research.* 2014;6(1):13-6.
- ❖ Nwokocha ARC, Onyemelukwe NF. *Plesiomonas shigelloides* diarrhea in Enugu area of the southeastern Nigeria: incidence, clinical and epidemiological features. *J Dent Med Sci.* 2014;13:68-73.
- ❖ Okon E, Bishburg E, Ugras S, Chan T, Wang H. *Clostridium perfringens* meningitis, *Plesiomonas shigelloides* sepsis: a lethal combination. *AmJ Case Rep.* 2013;14:70-2.
- ❖ Olaniran AO, Nzimande SB, Mkize NG. Antimicrobial resistance and virulence signatures of *Listeria* and *Aeromonas* species recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. *BMC Microbiology.* 2015;15:234. doi:10.1186/s12866-015-0570
- ❖ Oldham AL, Wood TA, Henderson DP. *Plesiomonas shigelloides* hugZ encodes an iron-regulated heme binding protein required for heme iron utilization. *Canadian Journal of Microbiology.* 2008;54(2):97-102.
- ❖ Oliveira PH, Touchon M, Rocha EP. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:10618-31.
- ❖ Parker JL, Lowry RC, Couto NA, Wright PC, Stafford, GP, Shaw JG. Maf dependent bacterial flagellin glycosylation occurs before chaperone binding and flagellar T3SS export. *Mol. Microbiol* 2014;92:258-72.
- ❖ Pakingking R, Jr, Palma P, Usero R. Quantitative and qualitative analyses of the bacterial microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in earthen ponds in the Philippines. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015;31:265-75.
- ❖ Penn RG, Giger DK, Knoop FC, Preheim LC. *Plesiomonas shigelloides* overgrowth in the small intestine. *J Clin Microbiol.* 1982;15:869-872.
- ❖ Pérez L, Abarca ML, Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Domingo, M. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonate Risso's dolphin Grampus

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- griseus from the Mediterranean Sea. Dis. Aquat. Organ. 2015;116, 69-74. doi: [10.3354/dao02899f](https://doi.org/10.3354/dao02899f)
- ❖ Perry L, Heard P, Kane M, Kim H, Savikhin S, Dominguez W, *et al.* Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction to the Detection of Pathogens in Food. J Rapid Methods Autom Microbiol. 2007;15(2):176–98..
 - ❖ Piotrowska M, Popowska M. Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. Front. Microbiol. 2015, 6:494. doi:[10.3389/fmicb.2015.00494](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00494)
 - ❖ Pitarangsi C, Echeverría P, Whitmire R, Tirapat C, Formal S, Dammin GJ, *etal.* Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: prevalence among individuals with or without diarrhea in Thailand. Infect Immun. 1982;35:666-73.
 - ❖ Ponnusamy D, Kozlova EV, Sha J, Erova TE, Azar SR, Fitts EC, *et al.* Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016;113:722–727. doi: [10.1073/pnas.1523817113](https://doi.org/10.1073/pnas.1523817113).
 - ❖ Presley SM, Rainwater TR, Austin GP, Platt SG, Zak JC, Cobb GP, Marsland EJ, Tian K, Zhang B, Anderson TA, Cox SB, Abel MT, Leftwich BD, Huddleston JR, Jeter R, Kendall RJ. Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following hurricane Katrina. Environ Sci Technol. 2006;40:468-474.
 - ❖ Puthuchery SD, Puaah SM, Chua KH. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. PLoS One 2012;7:e30205.
 - ❖ Rajpara N, Vinothkumar K, Mohanty P, Singh AK, Singh R, Sinha R, *et al.* Synergistic effect of various virulence factors leading to high. ctx gene: comparative study with clinical strains. PLoS ONE 2013;8:e76200. doi: [10.1371/journal.pone.0076200](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076200)
 - ❖ Ramamurthy Ty Sharma NC. Cholera outbreaks in India. Curr Top Microbiol Immunol. 2014a;379:49-85. doi:10.1007/82_2014_368
 - ❖ Rashid A, Haley BJ, Rajabov M, Ahmadova S, Gurbanov S, Colwell RR., *et al.* Detection of *Vibrio cholerae* in environmental waters including drinking water reservoirs of Azerbaijan. Environ. Microbiol. Rep. 2013; 5:30–38.
 - ❖ Rezaie N, Bakhshi B, Najar-Peerayeh S. Distribution of resistance genetic determinants among *Vibrio cholerae* isolates of 2012 and 2013 outbreaks in IR Iran.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Microb Pathog. 2017 Mar;104:12-16. doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.005. Epub 2017 Jan 3. PMID:28062293. DOI: [10.1016/j.micpath.2017.01.005](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.005).
- ❖ Riley PA, Parasakthi N, Abdullah WA. *Plesiomonas shigelloides* bacteremia in a child with leukemia. *Clinical Infectious Diseases*. 1996;23(1):206-7.
 - ❖ Rodríguez C, Quesada VJ, Zhurbenko R. CNB, assignee. Medio de cultivo para la detección de microorganismos Gram-negativos. Patente de Brasil No. PI 0113717-4; 2014.
 - ❖ Rodríguez CM, Barrios X, Álvarez G, Noya A, Castro N, Rivero LA, Ubaldo A *et al*. Procedimientos Técnicos en Microbiología Clínica. ECIMED. 2004. Pg 35-37.
 - ❖ Rouf MA, Rigney MM. Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. *Appl Microbiol*. 1971;22:503-6.
 - ❖ Ruiz P, Cantón R. Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29(1):21-5.
 - ❖ Sakazaki R, Shimada T. O-serogrouping scheme for hemophilic *Aeromonas* strains. *Jpn J Med Sci Biol*. 1984;37:247-55.
 - ❖ Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2. *PLoS ONE* 2013; 8:61086. doi: [10.1371/journal.pone.0061086](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061086)
 - ❖ Samannodi M, Zhao A, Nemshah Y, Shiley K. *Plesiomonas shigelloides* Septic Shock Leading to Death of Postsplenectomy Patient with Pyruvate Kinase Deficiency and Hemochromatosis. *Case Reports in Infectious Diseases*. 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1538501>
 - ❖ Sánchez RM, Pérez IA. Cólera: historia de un gran flagelo de la humanidad. *Rev Hum Med*. 2014;(14):2. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202014000200018&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 - ❖ Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev* 2013;32:188-217.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Santos JA, González CJ, López TM, Otero A, García López ML. Haemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. J Food Prot 1999;62(12):1475-7.
- ❖ Sakazaki R, Shimada T. Serovars of *Vibrio cholerae*. Jpn J Med Sci Biol 1977;30:279-82.
- ❖ Selyanskaya NA, Arkhangelskaya IV, Vodopianov AS, Vodopianov SO, Kruglikov VD, Vodyanitskaya SY, Verkina LM, Nepomnyaschaya NB. Typing of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 strains, isolated in Rostov region in 2014. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2016 Jan-Feb;(1):3-9.
- ❖ Shah M, Kathiiko C, Wada A, Odoyo E, Bundi M, Miringu G, Guyo S, Karama M, Ichinose Y. Prevalence, seasonal variation, and antibiotic resistance pattern of enteric bacterial pathogens among hospitalized diarrheic children in suburban regions of central Kenya. Trop Med Health. 2016 Nov 29;44:39.
- ❖ Shin GW, You MJ, Cho HS, Yi SW, Lee CS. Severe sepsis due to *Aeromonas aquariorum* in a patient with liver cirrhosis. Jpn J Infect Dis. 2013;66:519-22.
- ❖ Sifaw K, Ahmed SF, Cappuccinelli P, Klena JD. Genospecies and virulence factors of *Aeromonas* species in different sources in a North African country. Libyan J Med 2014, 9: 25497. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3402/ljm.v9.25497>.
- ❖ Simon P, Sweet T, Wallace MF, Lakshaman P. Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. FEMS Microbiol Lett. 1987;48:159-63.
- ❖ Sinha S, Shimada T, Ramamurty T, Bhattacharya S, Yamasaki Y and Balakrish Nair G. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Koalta India. Journal of Medical Microbiology. 2004;53:527-34.
- ❖ Sire JM, Garin B, Chartier L, Fall NK, Tall A, Seck A, Weill FX, Breurec S, Vray M. Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal. Paediatr Int Child Health. 2013;33:139-44.
- ❖ Somarriba L, Llanes R, Sánchez MJ. Cólera en Haití Lecciones aprendidas por la Brigada Médica Cubana. La Habana: ECIMED. 2013. ISBN 978-959-212-822-4.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Spadaro S, Berselli A, Marangoni E, Romanello A, Colamussi AV, Ragazzi R, Zardi S, Volta CA. *Aeromonas sobria* necrotizing fasciitis and sepsis in an immunocompromised patient: a case report and review of the literature. Journal of Medical Case Reports 2014;8:315. Disponible en: <http://www.imedicalcasereports.com/content/8/1/315>
- ❖ Stenkat J, Krautwald-Junghanns M-E, Schmitz Ornés A, Eilers A, Schmidt V. Aerobic cloacal and pharyngeal bacterial flora in six species of free-living birds. J Appl Microbiol. 2014;117:1564-71.
- ❖ Stock I. *Plesiomonas shigelloides*: an emerging pathogen with unusual properties. Rev Med Microbiol. 2004;15:129-39.
- ❖ Strom MS, Paranjpye RN. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Microbes and infections.2000;2:177-88.
- ❖ Studer N, Frey J, Vanden Bergh P. Clustering subspecies of *Aeromonas salmonicida* using IS630 typing. BMC Microbiol. 2013;13:36. doi: 10.1186/1471-2180-13-36
- ❖ Sung Q, *et al.* Varyng high levels of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in rural villages in Shandong, China: implications for global health. 2014. PloS One 9.11:e113121.
- ❖ Sun S, Kjelleberg S, McDougald D. Relative contributions of *Vibrio polysaccharide* and *quorum* sensing to the resistance of *Vibrio cholerae* to predation by heterotrophic protists. 2013. PLoSONE 8:e56338. doi:10.1371/journal.pone.0056338
- ❖ Svenungsson B, Langergren E, Ekwall B, Eampokalap S, Evengard K, Hedlund A, Karnell S, Weintraub A. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: A 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. Clinical Infectious Diseases.2000;30(5):770-8.
- ❖ Szczuka E, Kaznowski A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* spp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. J Clin Microbiol. 2014; 42:220-8.
- ❖ Tall A, Hervio D, Teillon A, Boisset C, Delesmont R, Bodilis J, *et al.* Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperatura in the eastern English Channel as determined by pyrH sequencing. J. Appl. Microbiol. 2013;114: 1713-24.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Tamura T, Hilda T. A case of endogenous *Aeromonas hydrophila* endophthalmitis. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2003;107(9):535-7.
- ❖ Tamrakar AK, Jain M, Goel AK, Kamboj DV, Singh L. Characterization of *Vibrio cholerae* from deep ground water in a cholera endemic area in Central India. Indian J Microbiol. September 2009;49:271-5.
- ❖ Tang HJ, Lai CC, Lin HL, Chao CM. Clinical manifestations of bacteremia caused by *Aeromonas* species in southern Taiwan. PLoS ONE. 2014;9:e91642. doi: 10.1371/journal.pone.0091642
- ❖ Tantillo GM, Fontanarosa M, A Di Pinto, M Musti. A review: Update perspectives on emerging vibrios associated with human infections. Letters in Applied Microbiology. 2004;39:117-26.
- ❖ Thapa S, Adhikari N, Maharjan R, Banjara MR, Rijal KR, Basnyat SR, Agrawal VP. Multidrug resistant *Vibrio cholerae* O1 from clinical and environmental samples in Kathmandu city. BMC Infectious Diseases. 2015; 15:104. doi: 10.1186/s12879-015-0844-9
- ❖ Tena D, González A, Gimeno C, Pérez MT y Bisquert J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. Enferm Infecc Microbiol Cli. 2007;25(4):235-41.
- ❖ Ting Y, Jen H. Urinary tract infection due to NonO1 *Vibrio cholerae*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2016;49:305-6.
- ❖ Tsugawa H, Ito H, Ohshima M, Okawa Y. Cell adherence promoted activity of *Plesiomonas shigelloides*. GroEL. J Med Microbiol. 2007;56:23-9.
- ❖ Tomás JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors. ISRN Microbiol. 2012;2012:256-61.
- ❖ Usó J, Tirado MD, Moreno R, Campos A. *Vibrio fluvialis* diarrhoea in an HIV infected patient. Enferm Infecc Microbiol Clin.2010;28:748-89.
- ❖ Valdés-Dapena Vivanco MM. *Vibrios*. En: Llop Hernández A, Valdés-Dapena Vivanco MM, Zuazo Silva JL, editores. Microbiología y Parasitología Médicas. Ciudad Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p. 333-9.
- ❖ Véron MM. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bacteries comparables. C R Hebd Seances Acad Sci. 1965;261:5243-6.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Viera DR, Rodríguez C, Zhurbenko R. Recuperación y diferenciación de *Aeromonas* con CromoCen AE y CromoCen AGN. Rev Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2016;35(1).
- ❖ Viera DR, Rodríguez C, Zhurbenko R, Cabrera AL, Lobaina Rodríguez T. Study of recovery and differentiation of *Aeromonas* spp. with different diagnosticians. En: Ponencia presentada en el XVI International Scientific Congress CNIC. Cuba; 2015.
- ❖ Vincent AT, Tanaka KH, Trudel MV, Frenette M, Derome N, Charette SJ. Draft genome sequences of two *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates harboring plasmids conferring antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Lett. 2015;362:1-4.
- ❖ Vitovec J, Aldova E, Vladik P, Krovacek K. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas* spp. in experimental mono-and coinfection with *Cryptosporidium parvum* in the intestine of neonatal BALB/c mice. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2001;24(1):39-55.
- ❖ Wang W, Xi H, Huang M, *et al.* Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS. J Thoracic Dis. 2014;6:524-33.
- ❖ Wang Y, Wang H, Liang W, Hay AJ, Zhong Z, Kan B. *et al.* Quorum sensing regulatory cascades control *Vibrio fluvialis* pathogenesis. J. Bacteriol. 2013;195:3583-9.
- ❖ Wilhelms M, Gonzalez V, Tomás JM, Merino S. *Aeromonas hydrophila* lateral flagella gene transcriptional hierarchy. J. Bacteriol. 2013;195:1436-45.
- ❖ Wright AC, Harwood VJ. *Vibrios*, in Food borne Infections and Intoxications, 4th Edn, eds J.M. Glenn and P. Morris (San Diego: Academic Press, 2013;113-28.
- ❖ Wu CJ, Tsai PJ, Chen PL, *et al.* *Aeromonas aquariorum* septicemia and enterocolitis in a cirrhotic patient. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74:406-8.
- ❖ Xia FQ, Liu PN, Zhou YH. Meningoencephalitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in a Chinese neonate: case report and literature review. Italian Journal of Pediatrics. 2015;41:3. doi 10.1186/s13052-014-0107-1.
- ❖ Yañez MA, Catalan V, Apraiz D, Figueras MJ, Martínez AJ. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* genes secuencias. Int J Syst Evol Microbiol.2003;53:875-883.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ye JJ, Guo LB, Wang SR, Wang WW, Min HY. Vitreal surgery and etiological diagnosis of bacterial endophthalmitis. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2012 Nov;48(11):995-1000.
- ❖ Ymele P, Houot L, Watnick PI. Mannitol and the mannitol-specific enzyme IIB subunit activate *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79:4675-83.
- ❖ Young AZ, Neujahar D, Estok L. Epididymo-orchitis and bacteremia caused by *Plesiomonas shigelloides* in an HIV-infected patient. *AIDS Read.*2001;11:617-619.
- ❖ Young J, Sik D, Ran K. Clinical and Therapeutic Implications of *Aeromonas* Bacteremia: 14 Years Nation-Wide Experiences in Korea. *Infect Chemother.* 2016 Dec;48(4):274-84.
- ❖ Yousr AH, Napis S, Rusul GRA, Son R. Detection of Aerolysin and Hemolysin genes in *Aeromonas* spp. isolated from environmental and shellfish sources by polymerase chain reaction. *ASEAN Food J.* 2007;14:115-22.
- ❖ Zwadyk P. Vibrionaceae. En: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert C, editores. *Zinsser. Microbiología.* 20ª. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1998. p. 772-84.

Anexo 1**Agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK)****(Mac Faddin, 2003)**

Principio: Determinar la capacidad de un organismo de utilizar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico con producción o no de gas, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (H₂S).

Composición	g/L
Peptona	20.0
Lactosa	10.0
glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de hierro amoniacal	0.5
Tiosulfato de sodio	0.5
Agar	15.0
Rojo fenol	12.4 mL
Agua	1000 mL
pH final (7.4-7.6)	

Preparación: Rehidratar el medio con agua destilada y calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente, dispensar 4 mL en tubos de 13x100, esterilizar a 121°C durante 15 minutos, una vez estériles dejar solidificar en forma inclinada con igual o mayor fondo que bisel.

Inoculación: Se recomienda que los tubos de AHK sean inoculados con abundante crecimiento, a partir de medios de cultivos tales como agar MacConkey y agar *Salmonella-Shigella*; este se transfiere a AHK con aguja y se punciona fondo y estría la superficie del bisel.

Incubación: 18 a 24 horas, a 37°C.

Interpretación:

1. Un bisel rojo y una base amarilla con o sin gas, indica fermentación de la pequeña cantidad de glucosa.
2. Un bisel y una base amarilla, con o sin formación de gas indica fermentación de la lactosa.
3. Un tubo que no muestre ningún cambio de coloración indica que ni la glucosa ni la lactosa han sido fermentado.

4. El oscurecimiento a lo largo de la línea de inoculación o en todo el medio indica la producción de ácido sulfídrico (H_2S).

Anexo 2**Agar Hierro y Lisina (AHL)****(Manual Merck, 1990)**

Principio: El agar hierro lisina es un medio utilizado para la diferenciación de microorganismos entéricos en base a su capacidad de descarboxilar o desaminar la lisina y producir sulfuro de hidrógeno.

Composición	g/L
Peptona	5.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	1.0
L- Lisina	10.0
Tiosulfato de sodio	0.4
Citrato de hierro amoniacal	0.5
Agar	14.5
Púrpura de bromocresol (1.6%)	1.25 mL
Agua destilada	1000 mL
pH final (6.7-6.9)	

Preparación: Rehidratar el medio con agua destilada y calentar hasta disolver, dispensar 5 mL de medio en tubos 13x100, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada para obtener una pendiente o cuña corta con un fondo de una pulgada aproximadamente.

Inoculación: Inocular con aguja recta, punzando hasta la base y estriando el bisel. Los tapones no deben apretarse a fin de permitir condiciones de aerobiosis.

Se inocula junto con AHK a partir de la misma colonia, inoculando primero el Kligler por punción y estría; luego, sin tocar nuevamente la colonia, se inocula el AHL puncionando dos veces hasta el fondo y estriando nuevamente el bisel.

Incubación: 18 a 24 horas, a 37°C.

Interpretación:

1. Positivo: Tubo completamente morado. Los microorganismos que poseen la enzima lisina descarboxilasa, descarboxilan la lisina en la amina cadaverina, una vez que han fermentado la glucosa y han acidificado el medio, esto produce un viraje al violeta del indicador de pH púrpura de bromocresol.

2. Negativo: Tubo con bisel morado y fondo amarillo. Los microorganismos que no descarboxilan la lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje a amarillo.

Anexo 3

Prueba de Oxidasa

(Mac Faddin, 2003)

Principio: Determinar la presencia de la enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa, que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como receptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

Composición: Reactivo de Kovacs (Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%).

Preparación: Pesar un gramo del reactivo de oxidasa de Kovacs, disolver en 100 mL de agua destilada, se distribuye en alícuotas de 1 mL y se conservan a -20°C.

Método directo de Kovacs sobre papel filtro: Colocar un trozo de 6 cm de papel filtro de Whatman #1 en una placa de Petri. Agregar dos o tres gotas de reactivo de Kovacs en el centro del papel. Hacer un extendido con el asa de inoculación de una colonia sospechosa, en el papel impregnado con reactivo siguiendo una línea de 3 a 6 cm. de longitud. La reacción de color positiva se produce a los 5 o 10 segundos.

Interpretación:

- Positivo: Se observa un color púrpura a negro dentro de los 10 primeros segundos.
- Negativo: No se observa cambio de color.

Precauciones:

- A. No debe intentarse realizar una prueba de oxidasa en un medio que contenga GLUCOSA, ya que su fermentación inhibirá la actividad de la enzima oxidasa, y dará posibles resultados FALSAMENTE NEGATIVOS.
- B. Se recomienda el empleo de asa o aguja de inoculación de platino para retirar las colonias para la prueba de la oxidasa. Steel afirma que la presencia de un simple vestigio de hierro puede por sí sólo catalizar la oxidación del reactivo de fenilendiamina, dando una reacción FALSAMENTE POSITIVA.
- C. No rotular simplemente como reactivo de Kovacs el de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina, sino reactivo de oxidasa de Kovacs, ya que existe también un reactivo de indol de Kovacs.

- D.** Los reactivos de oxidasa se autooxidan rápidamente y pierden su sensibilidad. La autooxidación es reducida agregando una solución de ácido ascórbico al 0.1% directamente al reactivo durante su preparación. Los reactivos se desechan si se forma un precipitado. Evitar la innecesaria exposición a la luz. El reactivo de tetrametilo de Kovacs debe ser incoloro y se desecha cuando tome un color azul intenso.

Anexo 4**Caldos con concentraciones varias de NaCl**

Principio: Los caldos con distintas concentraciones de cloruros (0, 3, 6, 8, 10 y 12%) se utilizan para la diferenciación de las especies de los géneros *Vibrio* y para diferenciar los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

Composición	g/L
Medio base Triptona	10.0
Agua destilada	1000 mL
pH	7.3
NaCl	Según la concentración especificada.
Por ejemplo: Para la concentración final de 1%, se agregan a 100 mL de caldo base, 1g de NaCl.	

Preparación: Se disuelve completamente el NaCl en los 100 mL de medio, se distribuyen en tubos de tapón de rosca 13x100.

Inoculación: Se toma una colonia del AHKy se deposita en el caldo.

Incubación: En aerobiosis, de 35 a 37°C, durante 18 a 24 horas.

Interpretación:

- Prueba positiva: Se observa turbidez en el caldo por el crecimiento del microorganismo en estudio.
- Prueba negativa: si no se observa turbidez evidente en el medio.

Precauciones: No se deben utilizar tubos que presenten algún tipo de turbidez y se recomienda inocular los tubos de menor a mayor concentración para evitar cualquier contaminación.

Anexo 5**Utilización de Hidratos de Carbono****(Mac Faddin, 2003)**

Principio: Determinar la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas visible. Los hidratos de carbono se clasifican como: monosacáridos, aldehídos polihidroxílicos o cetonas (glucosa, galactosa, manosa); polisacáridos a oligosacáridos, producto de condensación de dos o más monosacáridos (sacarosa, maltosa, lactosa); alcoholes polihídricos e inositoles producto de la reducción de los monosacáridos (manitol, dulcitol, sorbitol). Algunas bacterias pueden fermentar anaeróbicamente la glucosa otras la oxidan y algunas pueden metabolizarla por ambos métodos. Las bacterias que fermentan un carbohidrato son por lo general anaerobios facultativos.

Composición	g/L
Peptona	10.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Indicador de Andrade	10 mL
Agua destilada	1000 mL
pH (7.1-7.2)	

Preparación: Disolver con agua destilada y calentar hasta su total disolución, ajustar el pH, agregar el carbohidrato a una concentración adecuada: manitol, glucosa y sacarosa al 1%, inositol y arabinosa al 0.5%. Luego distribuir en tubos de 13x100 a razón de 5mL (colocar un tubo Durham en el tubo que contiene glucosa para realizar la prueba de producción de gas de glucosa). Esterilizar a 121°C durante 15 minutos (sacarosa y arabinosa deben ser agregados luego de esterilizar el medio base).

Inoculación: Se incuba a partir de un cultivo puro que haya sido incubado durante 18 a 24 horas, por ejemplo, a partir de un AHK.

Incubación: En aerobiosis, de 35 a 37°C, durante 4 a 5 días examinándolos diariamente.

Interpretación:

- Positivo: Se observa la formación de ácido indicado por la aparición de un color rosado intenso a rojo, y producción de gas a través de la observación de la acumulación de gas en el tubo invertido Durhan.
- Negativo: Los tubos negativos permanecen incoloros. Ellos deben observarse con regularidad durante un total de 30 días.

Indicador de Andrade: (Gradwohl, 1983)

Este se usa para las pruebas de fermentación de hidratos de carbono.

Preparación:

1. Disolver 0.5 g de fucsina acida en 100 mL de agua destilada y luego agregar 16 mL de NaOH .
2. Puede ser necesario agregar 1 o 2 gotas de NaOH después de varias horas si la fucsina ácida no está bastante decolorada. La cantidad de álcali a usar con cualquier lote determinado de fucsina esta generalmente indicado por el fabricante en el rotulo del frasco de fucsina.
3. Usar el indicador manteniendo la siguiente relación: 10 mL por cada litro de medio de cultivo base.
4. El indicador es incoloro; la producción de ácidos en medios que contienen este indicador se muestra por el cambio de rosado a rojizo.

Anexo 6**Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS)****(Manual DIFCO 1990)**

Principio: Es un medio de cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros *Vibrios* patógenos. En este medio las bacterias entéricas tales como coliformes y *Proteus*, los que se conocen contaminan materias fecales, son inhibidos.

Composición	g/L
Extracto de levadura	5.0
Peptona	10.0
Citrato sódico	10.0
Tiosulfato sódico	10.0
Bilis de buey	8.0
Sacarosa	20.0
Cloruro de sodio	10.0
Citrato férrico	1.0
Agar	15.0
Azul de bromotimol	0.04
Azul de timol	0.04
Agua destilada	1000 mL
pH: 8.6-8.8	

Preparación: Suspender en agua destilada, calentar hasta llegar a ebullición, no autoclavar y disponer en placas estériles.

Interpretación:

- Las colonias de *V. cholerae* se observan de color amarillo por su capacidad de utilizar la sacarosa, acidificando el medio y produciendo el viraje de los indicadores.
- Aquellos *Vibrios* que no son capaces de utilizar la sacarosa se presentan translucidos o de color verde propio del medio de cultivo.

Anexo 7**Prueba de Indol****(Mac Faddin, 2003)**

Principio: Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar indol de la molécula de triptófano.

Composición	g/L
Triptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agua destilada	1000 mL
pH (7.2-7.4)	

Preparación: Disolver completamente en agua destilada. Se distribuyen en tubos con volumen aproximado de 4 mL. Luego autoclavar por 15 minutos a 121°C. Se distribuyen en tubos con volumen aproximado de 4 mL.

Inoculación: A partir de un cultivo puro de AHK.

Incubación: A 37°C de 24 a 48 h. Al cabo de este tiempo añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs, agitar suavemente.

Química de la reacción: Cuando existe indol este se combina con el aldehído que se encuentra en el reactivo de Kovacs para dar un color rojo en la capa de alcohol.

Interpretación:

- Prueba positiva: Un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica.
- Prueba negativa: No se produce anillo rojo, toma el color el reactivo de Kovacs.

Precauciones: No debe emplearse para la detección del indol un medio de peptona que contenga glucosa. El agregado de triptófano estimula la producción de indol mientras la glucosa la inhibe. La formación de indol se produce solamente con aquellos organismos capaces de fermentar los hidratos de carbono. La elevada acidez producida por la fermentación de la glucosa puede impedir el crecimiento del organismo o inhibir la enzima, produciéndose una reacción falsamente negativa.

Reactivo de Kovacs**Composición**

Composición	
Alcohol amílico o isoamílico o alcohol butílico)	150 mL
P-dimetilamino benzaldehído	10 g
Ácido clorhídrico concentrado	50 mL
pH (7.2-7.4)	

Se disuelve completamente el aldehído con el alcohol y se agrega lentamente a la mezcla el ácido clorhídrico. Luego envasar en un frasco de vidrio ámbar de boca ancha y tapón de rosca.

Anexo 8**Hidrólisis de la Esculina****(Mac Faddin, 2003)**

Principio: Determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa. La esculina reacciona con una sal de hierro (el citrato ferroso de hierro $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$) para formar un complejo castaño oscuro o negro. El citrato de hierro actúa como indicador de la hidrólisis de la esculina y de la formación de esculetina resultante.

Composición	g/L
Peptona de carne	3.0
Triptona	3.0
Esculineta	1.0
Agar	5.0
Citrato de hierro amoniacal	0.5
Agua destilada	1000 mL
pH (7,2)	

Preparación: Disolver en agua y calentar hasta su disolución total; repartir en tubos de 13x100 a un volumen de 4 mL, esterilizar a 121°C durante 15 minutos, enfriar en posición inclinada para obtener un bisel con pendiente larga.

Inoculación: A partir de un cultivo fresco de AHK tomar una asada y estriar solamente la superficie del bisel.

Incubación: En aerobiosis, a 37°C, por 48 horas.

Interpretación:

- Prueba positiva: Presencia de un color negro a castaño oscuro en el bisel. La mitad o más de la superficie aparece negra.
- Prueba negativa: No se ha producido el ennegrecimiento del medio. Se incuba hasta 7 días para informar un resultado negativo.

Anexo 9**Prueba de las descarboxilasas****(Lisina-Ornitina-Arginina)****(Mac Faddin, 2003)**

Principio: Medir la capacidad enzimática que tiene un organismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad. Las pruebas de las descarboxilasas se emplean fundamentalmente para determinar grupos bacterianos entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Los aminoácidos descarboxilados son la lisina, la ornitina y la arginina.

Composición	g/L
Peptona	5.0
Extracto de carne	5.0
Rojo cresol (0.2%)	2.5 mL
Púrpura de bromocresol (1.6%)	0.62 mL
Glucosa	0.5
Piridoxal	0.005
Agua destilada	1000 mL
pH (6.0 +/- 0.2)	

Preparación: Disolver el medio en agua destilada y calentar hasta su total disolución, el medio basal se distribuye en cuatro recipientes diferentes, uno de los cuales no se le agregara ningún aminoácido. En los tres recipientes restantes se adicionan los aminoácidos manteniendo la siguiente relación:

- 1% (10 g) de L-Lisina dihidroclorhídrica en el primer recipiente.
- 1% (10 g) de L-Arginina monohidroclorhídrica al segundo recipiente.
- 1% (10 g) de L-Ornitina dihidroclorhídrica en el tercer recipiente.

Si se utiliza la forma D de los aminoácidos, estos deben incorporarse al medio con una concentración del 2% ya que estos microorganismos son menos activos frente a la forma D de los aminoácidos. El medio ya preparado se distribuye en los tubos 13x100 mm con tapa de rosca en volúmenes de 3 ó 4 mL por tubo. Se esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

Inoculación:

- a) Crecimiento de un cultivo puro de 18 a 24 horas: AHK.
- b) Inoculo liviano.
- c) Con cada batería de aminoácidos en proceso de investigación, se inoculará un tubo de control sin aminoácido: 1-control, 2-lisina, 3-arginina, 4-ornitina.
- d) Cubrir todos los tubos incluyendo el de control, con 2 ó 3 mL de parafina o vaselina estéril. En estas condiciones el oxígeno del medio es consumido por el microorganismo y esto controla el pH.

Incubación: A 35°C, 24 horas a 4 días, con exámenes diarios. A veces se necesita una incubación prolongada de 6 a 10 días o más, para demostrar reacciones débiles debidas a la escasa actividad descarboxilasa de un organismo.

Interpretación: Cualquier aminoácido da los mismos resultados en color: por ejemplo, la lisina-descarboxilasa:

- Prueba positiva: Púrpura turbio a un púrpura amarillento apagado (producido por la cadaverina)
- Prueba negativa: Color amarillo claro y brillante (solamente fermentado por la glucosa).

Precauciones:

A) Rotular todos los tubos de descarboxilasa antes de la inoculación. La mezcla de distintos tubos de aminoácidos dará resultado sin validez para la identificación bacteriana. Se acepta como conveniente: C: control, A: arginina, L: lisina, O: ornitina.

B) El tubo de control que no contiene aminoácido debe mantener su color morado después de 18 a 24 horas de incubación, lo que indica que únicamente ha sido fermentada la glucosa. Un control positivo invalida todas las pruebas de descarboxilasa y no puede hacerse ninguna interpretación.

Rojo cresol: Este indicador de pH es una solución acuosa al 0.2%, donde 0.2 g del indicador se diluyen directamente con 100 mL de agua destilada. Este se masera vigorosamente en un mortero de porcelana procurando disolver todos los cristales de indicador. Luego se envasa en un frasco de boca ancha, color ámbar, pues es sensible a la luz. Una vez envasado su viabilidad es de un año. Su fórmula química es (C₂₁H₁₆O₅S) y nombre químico Phenolsulfonftaleína.

Púrpura de bromocresol: Este indicador de pH es una solución alcohólica al 1.6%, donde 1.6 g de indicador se diluyen en 100 mL de etanol absoluto, en un mortero de porcelana mezclando vigorosamente. Una vez ya disuelto completamente se guarda en frasco ámbar, de boca ancha, en un lugar fresco. Su viabilidad es de un año. La fórmula química de púrpura de bromocresol es $(C_{21}H_{16} Br_2O_5S)$ y su nombre químico es Cresolsulfonftaleína.

Anexo 10**Reacción de Voges-Proskauer****(Mac Faddin, 2003)**

Principio: Determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetona) a partir de la fermentación de la glucosa.

Composición	g/L
Peptona	7.0
Buffer fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	5.0
Glucosa	5.0
Agua	1000 mL
pH (6,9)	

Preparación: Disolver en agua destilada, ajustar el pH y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos, luego distribuir en tubos de 13x100.

Inoculación: A partir de un AHK.

Incubación: Durante 5 días, a 37°C, de 18 a 24 h hasta 10 días. Transcurrido el tiempo añadir 0.6 mL del reactivo de Barrit y 0.2 mL del Hidróxido de Potasio al 40%, y dejar reposar durante 1 hora.

Reactivo de Barrit**Composición**

α-naftol	5 g
tanol absoluto	100 mL

Hidróxido de potasio 40%**Composición**

Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	100 mL

Interpretación:

- Reacción Voges-Proskauer positiva: color rojo-rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina).
- Reacción Voges-Proskauer negativa: color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo), puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción es negativa (debido a la acción de los reactivos al mezclarse).

Precauciones: A veces un organismo acetoina positivo conocido no da reacción Voges-Proskauer positiva, para superar esta posibilidad, calentar suavemente el cultivo que contiene los reactivos Voges-Proskauer. Un organismo Voges-Proskauer positivo mostraría una reacción positiva (color rojo).

Anexo 11

Prueba del Agente Vibriostático

(Abbott, 2003a)

Principio: Esa técnica fue utilizada inicialmente para la diferenciación del género *Pseudomonas* de las especies del género *Vibrio*; en la actualidad se ha utilizado para diferenciar especies de *Vibrio* de las del género *Aeromonas* y para la diferenciación interespecies de *Vibrio*.

Composición: La fórmula química del agente vibriostático O/129 es: 2,4-diamino-6,7-diisopropilteridina.

Inoculación: Se prepara una suspensión al 0.5% de MacFarland del microorganismo a ser probado y se inocula una placa de agar triptona soya (TSA) en tres direcciones diferentes al igual como se hace para la prueba de difusión en disco Bauer-Kirby. Luego el disco de 150 µg se coloca en la placa.

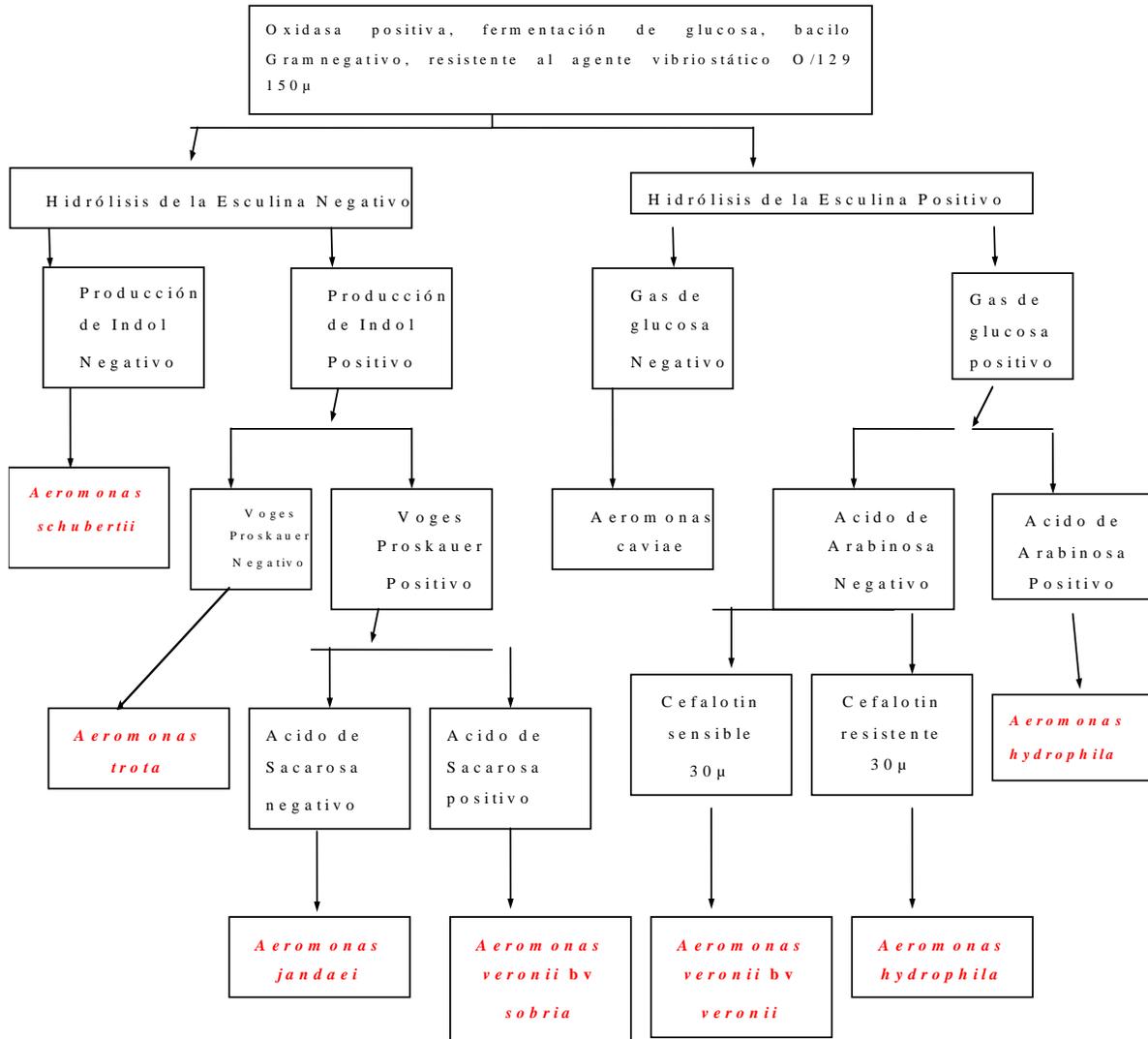
Incubación: se conservan en aerobiosis a 35-37°C, durante 18 a 24 horas.

Interpretación: Cualquier zona de inhibición alrededor del disco se considera como una prueba positiva.

Anexo 12

Esquema de identificación de especies Aerokey II.

(Carnahan et al., 1991)



Anexo 13

Esquema de identificación fenotípica de especies, Aeroesquema

(Furuwatari et al., 1994)

