



**LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE ENFERMEDADES DIARREICAS AGUDAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA INSTITUTO DE MEDICINA
TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**

**TÍTULO: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACILOS GRAM NEGATIVOS,
ANAEROBIOS FACULTATIVOS, OXIDASA POSITIVA, AISLADOS DE MUESTRAS
CLÍNICAS. WILLIAM SOLER/ IPK. MARZO - JUNIO 2019.**



**TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MÉDICO ESPECIALISTA DE PRIMER GRADO EN
MICROBIOLOGÍA**

AUTORA: DRA. OSLEIDY POMARES CÁRDENAS

La Habana, 2019

**LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE ENFERMEDADES DIARREICAS AGUDAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA INSTITUTO DE MEDICINA
TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**

**TÍTULO: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACILOS GRAM NEGATIVOS,
ANAEROBIOS FACULTATIVOS, OXIDASA POSITIVA, AISLADOS DE MUESTRAS
CLÍNICAS. WILLIAM SOLER/ IPK. MARZO - JUNIO 2019.**

**TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MÉDICO ESPECIALISTA DE PRIMER GRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**AUTORA: DRA. OSLEIDY POMARES CÁRDENAS
TUTORES: ING. ANABEL FERNÁNDEZ ABREU, MC
DRA. IRMA LUIS RICO.
ASESORA : LIC. LAURA BRAVO FARIÑAS, DRA.C**

La Habana, 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras Anabel Fernández, MC y la Dra. Irma Luis, por enseñarme a dar los primeros pasos en la investigación, por sus inestimables consejos y dedicación.

Mi asesora Laura Bravo, Dra.C por su apoyo, orientación y disposición incondicional.

Mi gratitud a Yanaika, Jenny, Brenda, Amelia y al profe Adalberto por su cooperación en el Laboratorio de EDA del IPK.

Mis agradecimientos a la Dra Isabel Martínez, MC y a la Dra Arlenis en el William Soler por acogerme como una integrante más del laboratorio y por su contribución al desarrollo de esta obra.

Gracias al profe Tony y Ana María, en el Departamento de Medios de Cultivo, sin los cuales no hubiese sido posible llevar a cabo esta investigación.

A Gilda, Dra.C en el laboratorio de Respiratorio, Islay, DrC en el laboratorio de Sífilis del IPK, gracias por su cooperación,

A la Lic. Dermis, por su ayuda desinteresada y su trabajo tan valioso.

A todos los integrantes del laboratorio del William Soler y a Yanela, por su gran ayuda.

Gracias a todos mis compañeros de residencia, en especial a Yolenni e Idorkis con las que compartí estos tres años.

A mis padres y hermanos que se han sacrificado al máximo para hacer de mí una persona de bien y a quienes les debo mi formación profesional.

A mi esposo que ha estado presente en todo momento brindándome su apoyo y cariño.

A todos los profesores, que me brindaron sus conocimientos y ayudaron a mi formación profesional.

Al Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, pilar de conocimientos, principios y aprendizaje, en especial al Departamento de Docencia y a todos los profesores al contribuir en mi formación.

A todos, gracias.

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso.

Luis Pasteur

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal durante el período de marzo-junio 2019, en el Laboratorio del Hospital Pediátrico "William Soler" y el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", se trabajaron 2691 muestras clínicas de pacientes hospitalizados y de consulta externa. De ellas, 188 muestras intestinales y 2503 extra-intestinales, con el objetivo de demostrar la circulación de bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva. De estas, seis fueron confirmadas como bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva. El mayor número se obtuvo a partir de muestras intestinales con cuatro aislados y dos de muestras extra-intestinales. Los mismos se identificaron por métodos convencionales y se determinó la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión Bauer- Kirby. Resaltó en el estudio que entre los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva solo se aisló el género *Aeromonas*. Predominó *Aeromonas hydrophila* en heces (1) y en muestras extra-intestinales como orina (1) y exudado vaginal (1) y *Aeromonas caviae* en heces (3). Se observó que los 6 aislados fueron resistentes a meropenem y ampicilina-sulbactam. La amikacina y el cloranfenicol, resultaron ser los antimicrobianos más activos in vitro. Se observó multirresistencia en cinco de los aislados estudiados, fenómeno que dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo. Los resultados del estudio señalan la necesidad de diagnosticar los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva como patógenos causantes de infecciones en la edad pediátrica.

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	6
III.1.6 Susceptibilidad antimicrobiana	8
III.1.7 Epidemiología	8
III.1.8 Patogenia	9
III.1.9 Procesos infecciosos producidos por <i>Aeromonas</i> spp.	9
III.1.10 Tratamiento	10
III.2 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	10
III.2.1 Características generales del género	10
III.2.2 Características bioquímicas	10
III.2.3 Taxonomía	10
III.2.4 Factores de virulencia	11
III.2.5 Diagnóstico de laboratorio	11
III.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana	12
III.2.7 Epidemiología	12
III.2.8 Patogenia	13
III.2.9 Procesos infecciosos producidos por <i>P. shigelloides</i>	13
III.2.10 Tratamiento	13

III.3 <i>Vibrio</i> spp.	14
III.3.1 Características generales del género	14
III.3.2 Características bioquímicas	14
III.3.3 Taxonomía	14
III.3.4 Factores de virulencia	14
III.3.5 Diagnóstico de laboratorio	15
III.3.6 Susceptibilidad antimicrobiana	17
III.3.7 Epidemiología	17
III.3.8 Patogenia	18
III.3.9 Procesos infecciosos producidos por <i>Vibrio</i> spp.	19
III.3.10 Tratamiento	19
IV. Materiales y Métodos	20
V. Resultados y Discusión	25
VI. Conclusiones	37
VII. Recomendaciones	38
VIII. Bibliografía	39
IX. Anexos	

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*

BGNOP: bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva

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

CIM: concentración mínima inhibitoria

CIN: cefsulodina-irgasan-novobiocina

CLSI: Comité Internacional de Estandarización de Laboratorio Clínico, de sus siglas en inglés

CLED: cistina lactosa electrolito deficiente

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"

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

ATMs: Antimicrobianos

ITU: Infección del tracto urinario

HWS: Hospital Pediátrico William Soler

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbimortalidad en los niños menores de cinco años y en la población general. (Morejón, 2003). Aunque estas representan un problema de salud a escala mundial, su mayor impacto se observa en la población infantil; situación que se agrava por 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* (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 positiva, 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, 2015), 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).

A pesar de los adelantos en el control de las enfermedades infecciosas, las infecciones extra-intestinales por microorganismos de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* son cada día más frecuentes y constituyen una amenaza grave para la salud de la población (Riveros M *et al.*, 2015).

Estos microorganismos se consideran oportunistas, en individuos sanos o con factores predisponentes; pueden pasar al torrente sanguíneo y producir diversas infecciones sistémicas en diferentes órganos y sistemas (meningoencefalitis, endocarditis, bacteriemia, neumonía, peritonitis, colecistitis, salpingitis, conjuntivitis, otitis, faringitis, síndrome urémico hemolítico, insuficiencia renal aguda) e infecciones intrahospitalarias, las que pueden comprometer la vida del paciente (Igbinosa IH y Okoh AL, 2012; Xia F-Q *et al.*, 2015; Doganis D *et al.*, 2016).

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 e infecciones extra-intestinales se requiere de tratamiento antimicrobiano (Janda JM *et al.*, 2010). En algunas ocasiones un caso de diarrea puede suscitar medidas de vigilancia epidemiológica ante la posibilidad de un agente potencialmente epidémico como *Vibrio cholerae* o para reducir y evitar complicaciones (Hernández C *et al.*, 2017).

Además en el género *Aeromonas* se describen la presencia de diversas betalactamasas cromosómicas inducibles, como metalobetalactamasas, cefalosporinasas de clase C y penicilinasas de clase D, que podrían conducir a un fallo terapéutico en el manejo de infecciones por este microorganismo (Ruiz-Castillo *et al.*, 2015).

La diferenciación individual de los aislados, a nivel de especie, de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, es de suma importancia clínica y epidemiológica, debido a la variación inter-especie, a sus capacidades invasoras y enterotoxigénicas, a los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana y la distribución geográfica de cada especie; por ello la aplicación de nuevas técnicas moleculares podría ser de gran ayuda en la caracterización precisa del género a nivel de especie (Chen PL *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, el ascenso de la circulación de especies de *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* en el ambiente, por lo general en el medio acuático, y el incremento del número de infecciones intestinales y extra-intestinales asociadas con estos microorganismos suscita un interés creciente, por establecer el riesgo que ellos representan para la salud pública y la gran relevancia clínica que tiene la resistencia antimicrobiana, comportamiento que dificulta el tratamiento, eleva su costo y modifica negativamente el pronóstico de los pacientes infectados por aislamientos de estos géneros (Khajanchi B.K., 2010; Esteve C., 2015; Zhou *et al.*, 2019).

Por lo antes expuesto es de gran utilidad los estudios epidemiológicos relacionados con estas afecciones, sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde las condiciones socioeconómicas y climáticas favorecen la incidencia y prevalencia de las EDA.

En Cuba existen estudios que demuestran la circulación de bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva en pacientes con EDA, así como en procesos infecciosos extra-intestinales (Bravo L *et al.*, 1993; Bravo L *et al.*, 2011; Oquendo, 2017), pero son escasos los reportes de estos agentes en muestras extra-intestinales, en la edad pediátrica. Además se desconoce cuál es la distribución y evolución de los aislados resistentes circulantes.

El diagnóstico microbiológico de estos microorganismos está implementado en toda la Red Nacional de Microbiología, aunque existen laboratorios donde la prueba de oxidasa no está ni introducida, ni sistematizada en bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva, en muestras extra-intestinales. En el Hospital Pediátrico William Soler se desconoce la circulación de estos patógenos, por lo que nos propusimos el desarrollo de la

presente investigación con el propósito de mejorar el conocimiento de la etiología de las EDA y de las infecciones extra-intestinales, beneficiando así a la población infantil que recibe atención médica en dicho centro.

1-Demostrar la circulación de bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva causantes de infección intestinal y extra-intestinal en muestras clínicas.

2-Identificar en género y especie los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva.

3-Determinar la susceptibilidad antimicrobiana y la distribución de los patrones de resistencia de los aislados investigados.

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 monótricos, aunque medio sólidos se observan también bacilos con flagelos peritricos, excepto *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas media* (especies inmóviles). Reducen los nitratos a nitritos, son anaerobios facultativos y oxidasa positiva. 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 (*Aeromonas 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 y generalmente no 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. No tienen capacidad para crecer en caldo con cloruro de sodio (NaCl) al 6,5% (Koneman EW *et al.*, 2008).

III.1.3 Taxonomía

En la taxonomía del género existen algunas diferencias en la literatura entorno a la importancia relativa de las diversas especies relacionadas con las infecciones humanas (Marques-Mendes CL *et al.*, 2013).

Según Graf y otros autores en su publicación titulada “*Aeromonas*” plantea que el estudio taxonómico de las especies de este género por su complejidad y necesidad de métodos moleculares se reserva para fines investigativos y epidemiológicos; mientras que para la evaluación de los casos en la clínica con sólo determinar la presencia del género es suficiente (Bravo L, 2005; Graf J, 2015); lo que concuerda con el consenso al que se llegó en el VIII Simposio Internacional de *Aeromonas* y *Plesiomonas* en Halifax, Canadá; que para los estudios clínicos con solo identificar hasta género en *Aeromonas* es suficiente, debido a la complejidad taxonómica de dicho género. Además se requieren de estudios moleculares con equipamientos de alta tecnología y muy

costosos (Graf J, 2015). Actualmente, se ubica en el Reino: Procariota, Orden XII: *Aeromonadales*, Familia I: *Aeromonadaceae*, Género I: *Aeromonas*.

III.1.4 Factores de virulencia

Se han identificado un gran número de factores de virulencia que parecen tener un papel importante en la patogenicidad de las infecciones intestinales y sistémicas, algunos de estos se pueden mencionar: enterotoxinas como la toxina termolábil (TL) y la conocida toxina termoestable (TE), las cuales se asocian con la producción de diarreas acuosas, (Králová S *et al.*, 2016), también las hemolisinas que se caracterizan por la formación de poros en las células del hospedero (efecto citolítico) (Abd-El-Malek AM, 2017), las proteasas, lipasas, desoxirribonucleasas que juegan un papel importante en las infecciones diarreicas y extra intestinales como las heridas en los humanos (Sun J *et al.*, 2016). Además se pueden señalar, lipopolisacáridos (LPS), capa S, adhesinas, flagelos, cápsula de polisacáridos o biofilm, proteína de membrana externa (PME) (Odeyemi OA y Ahmad A, 2017; Talagrand-Reboul E *et al.*, 2017), sistema de secreción/excreción implicados en la virulencia de *Aeromonas* (Amsaveni R *et al.*, 2016).

III.1.5 Diagnóstico de laboratorio

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). También se utilizan los medios selectivos y diferenciales como agar Mac Conkey, agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK), agar hierro lisina (AHL), agar desoxicolato, agar eosina azul de metileno y agar *Salmonella-Shigella*). El enriquecimiento en agua peptonada alcalina (APA) en muestras intestinales, aumenta la recuperación de *Aeromonas* en los portadores convalecientes y en aquellos con infecciones subclínicas (Olaniran AO *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 agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK) y agar hierro lisina (AHL), medios donde se comprueban las propiedades fisiológicas, 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 C *et al.*, 2014; Humphries RM *et al.*, 2015 a).

Identificación de las especies del género *Aeromonas*

A pesar de las dificultades que implica su caracterización fenotípica, el **Aeroesquema** es un esquema de identificación descrito por Furuwatari y colaboradores (1994), quienes proponen identificar a través de un esquema dicotómico flexible basado en la modificación del Aerokey II de Carnahan y colaboradores (1991) (Furuwatari *et al.*, 1994; Carnahan *et al.*, 1991). Las pruebas que se utilizan son: sacarosa, esculina, voges-proskauer, indol y los aminoácidos lisina, arginina y ornitina; se aplica el método de Möeller, el cual ofrece la posibilidad de identificar las siete especies de mayor importancia clínica del género *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. trota*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. veronii* biovar *veronii* y *A. veronii* biovar *sobria*), dos de *Vibrio* (*V. cholerae* y *V. mimicus*) y (*P. shigelloides*). Antes de iniciar este esquema es imprescindible hacer una identificación presuntiva del género *Aeromonas* a través de otras pruebas bioquímicas (tinción de Gram, prueba de oxidasa y la resistencia al compuesto vibriostático (O/129) (Furuwatari *et al.*, 1994).

Métodos miniaturizados y sistemas automatizados

La identificación por ambos métodos son otra alternativa para los fines diagnósticos (Bou G *et al.*, 2011). Sin embargo, se recomienda que cuando las cepas se identifiquen por un sistema miniaturizado comercial como el API o con sistemas automatizados como el Vitek, deben efectuarse también las pruebas complementarias recomendadas (tinción de Gram y detección de oxidasa). Algunos autores señalan que el método convencional de marchas técnicas que se aplica en bacteriología médica y que emplea las pruebas bioquímicas y el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana, resulta útil para los laboratorios clínicos (López-Cerero L *et al.*, 2013).

Aunque, la disposición actual de las técnicas moleculares no está al alcance de los laboratorios de diagnóstico, se aplican de forma fundamental en la investigación (López-Cerero L *et al.*, 2013). La hibridación ADN-ADN es considerada la técnica de referencia internacional para la determinar este género hasta el nivel de especies (Colston SM *et al.*, 2014). Se recomienda, que aquellos laboratorios que no sean capaces de identificar adecuadamente a través de los métodos moleculares los aislamientos obtenidos, deben referirse a los mismos como *Aeromonas* spp (Bou G *et al.*, 2011).

Tipificación

En el género *Aeromonas* la tipificación serológica se basa en la presencia del antígeno somático O. El serotipaje es de gran ayuda epidemiológica para dilucidar el papel de los patógenos en el proceso infeccioso. El género *Aeromonas* tiene 97 serogrupos: 45 fueron propuestos por Sakazaki y Shimada (1984), obteniendo su clasificación a partir de cepas de *Aeromonas* mesófilas y 52 serogrupos se clasificaron a partir de aislamientos hechos en Inglaterra, Perú, Brasil y Australia (Sakazaki R y Shimada T, 1984; Pan X *et al.*, 2017). Con estos esquemas serológicos, se definen serogrupos importantes, Ej. O:11, se relaciona con infecciones extra-intestinales (incluyen septicemia y meningitis), O:34 vinculado con infecciones de heridas y O:16 relacionado con gastroenteritis (Turska-Szewczuk A *et al.*, 2014; Austin B, 2015).

III.1.6 Susceptibilidad antimicrobiana

Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana se realizan con fines epidemiológicos e investigativos (Jenkins SG y Schuetz AN, 2012). Los antimicrobianos como cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, son activos contra la infección por *Aeromonas*. Sin embargo, ya se conoce que la lista de terapia racional para *Aeromonas* se está acortando debido al incremento de los mecanismos de resistencia sobre todo en la amplia gama de betalactámicos usados (Bustamante SI, 2015). En la actualidad se muestra una resistencia inusual relacionada de forma particular con la producción de β -lactamasas codificadas por cromosomas, descritas e identificadas en diferentes especies (Longa A *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, posibilitan un mayor contacto del hospedero con la fuente de infección (Castro G *et al.*, 2003; Galindo CL y Chopra AK, 2007). Habitan en ecosistemas acuáticos: agua subterránea, agua potable de las plantas de tratamiento, 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; Figueras MJ *et al.*, 2015). *Aeromonas* spp puede afectar a los adultos y niños, constituyendo este último el principal grupo de riesgo, la incidencia aumenta en los meses de verano (Bravo L *et al.*, 2012). La OMS considera *Aeromonas* como microorganismos pertenecientes al nivel de Riesgo II (OMS, 2017).

Distribución: mundial.

Reservorio: El ser humano, animales terrestres y marinos, aguas salobres, dulces, cloradas y estuarios marinos.

Modo de transmisión: Por ingestión de aguas o alimentos contaminados como pescado, marisco, frutas, vegetales. Las infecciones de heridas se adquieren por contacto con las aguas o suelos contaminados.

Período de incubación: Varía de 24 a 72 horas para las infecciones intestinales y hasta una semana para otros tipos de infección.

Período de transmisibilidad: Durante la fase aguda de la enfermedad y hasta que el agente infeccioso esté presente en las heces.

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 en el cual 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 similar al cólera (Kotloff KL *et al.*, 2013; Lobatón T *et al.*, 2015).

Dentro de las infecciones extra-intestinales se incluyen: infecciones de heridas, principalmente infecciones cutáneas superficiales; aunque éstas pueden llegar a complicarse y afectar tendones, músculo y hueso (Doganis D *et al.*, 2016); infecciones

del tracto respiratorio, infecciones oculares, síndrome hemolítico urémico (este es una complicación de la diarrea ocasionada por *Aeromonas* donde es necesario el trasplante renal (Figueras MJ *et al.*, 2007; Monforte Cirac ML *et al.*, 2009); septicemia asociada a enfermedades subyacentes, como la cirrosis, leucemia, cáncer y diversas infecciones asociadas a la hospitalización como: infecciones del tracto urinario, de heridas quirúrgicas, meningitis (Pampín F *et al.*, 2012), peritonitis, endocarditis, u otras infecciones graves (Wu ChJ *et al.*, 2012).

III.1.10 Tratamiento

El carácter autolimitado de las infecciones entéricas provocadas por *Aeromonas* reserva la terapia antimicrobiana para la disentería severa, enfermedad similar al cólera, los pacientes inmunocomprometidos con enfermedades subyacentes y ante una evidencia de infección extra-intestinal (Betés M y Muñoz-Navas M, 2016). En el tratamiento antimicrobiano son útiles la tetraciclina, quinolonas, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos (Rhee JY *et al.*, 2016; Wimalasena S.H *et al.*, 2017).

III.2 *Plesiomonas shigelloides*

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 monotrico (Viera DR *et al.*, 2015). La temperatura de crecimiento oscila de 8 a 45°C (mesófila), aunque se reportan cepas psicrófilas con un mínimo de crecimiento de 0°C (Rouf MA *et al.*, 1971). 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%. 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 con producción de ácido, pero no gas (Koneman EW *et al.*, 2008).

III.2.3 Taxonomía

Plesiomonas incluye una sola especie, *shigelloides*. Para determinar la especie se tuvieron en cuenta los datos de hibridación con ADN (Véron MM, 1965). Según el Manual de Bacteriología y Sistemática de Bergey, *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 bien definidos, aunque se citan: endotoxina; la cual es altamente inmunogénica y está asociada con las manifestaciones patológicas de la activación inmune, como el shock séptico (Kaszowska M *et al.*, 2013b; Aquilini E *et al.*, 2014), la citolisina juega un papel importante en la colonización e invasión de las células epiteliales (Parker JL *et al.*, 2014). La hemolisina interviene como una enterotoxina a nivel intestinal (Oldham AL, 2008), la elastasa actúa al degradar el tejido conjuntivo (Santos JA *et al.*, 1999). Además la hidrofobicidad celular y la adherencia bacteriana actúan en la infectividad al interactuar con las células del hospedero y paso previo a la colonización (Merino S *et al.*, 2015). Sin embargo la producción de exopolisacáridos para la formación de biofilm y la motilidad, facilitan la resistencia frente a los antimicrobianos (Wilhelms M *et al.*, 2013).

III.2.5 Diagnóstico de laboratorio

Las muestras a estudiar dependen de la localización de la infección, se emplean heces o muestras de otras localizaciones. 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 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 AM *et al.*, 2014).

Se utilizan para el aislamiento de *P. shigelloides*, medios de cultivo tales como agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella*, agar Hektoen y agar desoxicolato. También se emplea 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; además se utiliza el agar inositol verde brillante sales biliares y se observan a las 48 horas colonias 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 agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK) y agar hierro lisina (AHL), después 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*

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 (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 (Aquilini E *et al.*, 2013; 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, demuestran la circulación de los serotipos O93:H2, O94:H3, O95:H4 y O96:H5, los cuales fueron incluidos en el esquema de serotipificación internacional (Bravo *et al.*, 2000). En ese mismo año se descubrieron 26 nuevos antígenos O (O77-O102) y 10 nuevos antígenos H (H42-H50 y H1a1 d) (Aldová E, 2000) y en la actualidad consta de 102 antígenos O y 51 antígenos H. Tiene serotipos que presentan reacción cruzada con el género *Shigella*, como el O17:H3 (Kubler J *et al.*, 2008).

III.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana

Se emplean las fluoroquinolonas y el trimetoprim-sulfametoxazol. Aunque los patrones de susceptibilidad antimicrobiana deben estudiarse de manera individual en cada cepa (Hustedt JW y Ahmed S, 2017).

III.2.7 Epidemiología

P. shigelloides es un patógeno emergente (Stock I, 2004) y no se ha asociado a desastres naturales (Presley SM *et al.*, 2006). Es un patógeno de animales (Niskanen M *et al.*, 2000; Chen X *et al.*, 2013). Puede producir infecciones en niños y adultos. La gastroenteritis se relaciona con los hábitos dietéticos y condiciones higiénico-sanitarias (Janda JM *et al.*, 2016).

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

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

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 esté presente en las heces el agente infeccioso.

III.2.8 Patogenia: *P. shigelloides* no forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de los humanos (Chen X *et al.*, 2013). 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). Puede alcanzar el tracto gastrointestinal (intestino delgado) y ocasionar gastroenteritis, penetrar en heridas o pasar al torrente sanguíneo (bacteriemia) y diseminarse (septicemia) (Penn RG *et al.*, 1982; Janda JM *et al.*, 2016).

III.2.9 Procesos infecciosos producidos por *P. shigelloides*

Se asocia con casos esporádicos y brotes de diarreas, 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 y trasplante de hígado desde un donador (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 (endoftalmitis). Se puede presentar en meningitis, bacteriemia (Xia FQ *et al.*, 2015), peritonitis y en el síndrome urémico-hemolítico (Marshman WE *et al.*, 1998). Se notifica 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 extra-intestinales 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 simples, 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 positiva. Son sensibles al compuesto vibriostático O/129 (Rashid A *et al.*, 2013). Todas las especies del género dependen del sodio, incluso aquellas capaces de crecer en agua de peptona carente de sal, el 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). En la actualidad, según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey se ubica en el Reino: *Procariota*, Orden XI: *Vibrionales*, Familia 1: *Vibrionaceae*, Género I: *Vibrio*. Se describen 133 especies 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 se citan: *V. cholerae*, *V. chagasii*, *V. neptunius*, *V. pomeroyi*, *V. kanaloee*, *V. fluvialis*, *V. xuii*, *V. brasiliensis* (Ramamurthy T y Sharma NC, 2014).

III.3.4 Factores de virulencia

Entre los factores de virulencia de *Vibrio* spp se encuentran: **biofilm**, estos usan superficies bióticas y abióticas para adherirse y sobrevivir ante la limitación de nutrientes en la naturaleza (Bari SM *et al.*, 2013), **pili tipo IV**; su composición es de

proteína (pilina) y es esencial para la colonización intestinal por *Vibrio cholerae* (Aagesen A *et al.*, 2012). La **enterotoxina colérica (tc)**; binaria termolábil, enzimáticamente activa, la produce *V. cholerae* O1 y O139 (Amin SM *et al.*, 2013). Las **adhesinas y las enzimas extracelulares** favorecen la adhesión de los microorganismos a las células (Boiko AV, 2000). Los **bacteriófagos** tienen un papel importante en la transferencia genética horizontal y la diseminación de la resistencia interespecies (Maina AN *et al.*, 2013). Las **toxinas relacionadas con el inhibidor de sodio** (Ceccarelli D *et al.*, 2015) y el **sistema de secreción** también intervienen en la patogenicidad de esta bacteria (Dustan RA *et al.*, 2013).

III.3.5 Diagnóstico de laboratorio

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. 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 tratados con antimicrobianos, porque el inóculo es escaso. En las situaciones anteriores puede ser recomendable la utilización de medios de enriquecimiento, el más empleado es el agua de peptona alcalina (APA) (pH 8,5) con adición de 1% de NaCl, que puede ser utilizado igualmente como medio de transporte (Dutta D *et al.*, 2013). La muestra se inocula en un volumen no inferior a 20 mL de agua de peptona alcalina (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 SN *et al.*, 2016).

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; *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio metschnikovii* que producen (colonias amarillas), de las que no poseen esta capacidad *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* (colonias verdes) (Valdés-Dapena MM, 2001). 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 que permitan la realización de la prueba de oxidasa directamente de la placa (sin carbohidratos óxido fermentables) (Zwadyk P, 1998).

Identificación del género *Vibrio*

La mayoría de las especies del género *Vibrio* no 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 De Paola A, 2004). El 0,5% de NaCl presente en el agar sangre empleado de forma común 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*: 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 hacer sospechar la presencia de bacteria halófila, es la ausencia de crecimiento en los medios de identificación utilizados de rutina. En la práctica para identificar de forma presuntiva los vibrios halófilos; puede efectuarse en los medios convencionales empleados para identificar 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 De Paola 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* y diferenciar las distintas especies de *Vibrio* entre sí. 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. 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 del test rápido (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 para declararlo como caso confirmado (Sánchez RM *et al.*, 2014).

Tipificación: Existen múltiples sistemas de clasificación para el antígeno somático O de *V. cholerae*. El sistema más empleado es el esquema de tipaje, en el cual se utilizan sueros preparados con gran cantidad de organismos inactivados por calor (Sakazaki R y Shimada T *et al.*, 1977). En base a la presencia de antígenos somáticos O, se establecen que existen más de 200 serogrupos de *Vibrio 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 (Mandal S *et al.*, 2011a).

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 investigaciones epidemiológicas (Amin SM *et al.*, 2013; Imani FA *et al.*, 2013).

III.3.6 Susceptibilidad antimicrobiana

Los estudios de sensibilidad se realizan por las técnicas habituales o por métodos automatizados o semiautomatizados. El género *Vibrio* es sensible a la tetraciclina, con porcentajes que oscilan entre el 70-100%, según las especies (Nsofor CA *et al.*, 2014).

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 microbiota con quitina. La salinidad es un factor crítico que regula la distribución de las diferentes 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. El aumento estacional 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 de cólera puede ser predictiva por el monitoreo de zooplancton en contaminaciones acuáticas (Gavilán RG y Martínez J, 2011). *V. cholerae* pertenece al grupo de riesgo biológico II (Somarriba L *et al.*, 2013). Los serogrupos O1 y O139 causan el cólera que se considera una enfermedad reemergente (Akoachere JF *et al.*, 2013b).

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 esté presente en las heces el agente infeccioso.

Susceptibilidad al huésped: Variable, producen infecciones en individuos inmunocompetentes, aunque son más frecuentes en personas con factores de riesgo e inmunodeprimidos 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.

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 toxina cólerica, siendo esta última la más efectiva.

III.3.8 Patogenia: *Vibrio* spp. penetran a través de la boca (dosis infectante de 10^8 a 10^9 UFC/ml). Son sensibles al pH ácido del estómago. 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 (Wang Y *et al.*, 2013).

III.3.9 Procesos infecciosos producidos por *Vibrio* spp.

Vibrio cholerae O1 y O139 producen diarreas agudas, con comienzo brusco, acuosas, como agua de arroz, con olor a pescado, tenesmo rectal, casi siempre sin fiebre y profusas, con moco y sin sangre, que conllevan a la deshidratación, acidosis, shock y muerte. Otras especies del género asociadas a gastroenteritis son: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. hollisae* y *V. Fluvialis* (Daniels NA y Shafie A, 2000).

Infecciones extra-intestinales: Pueden ocasionar otitis media después de la exposición a agua salada (*V. alginolyticus* y *V. vulnificus*), meningitis (*V. vulnificus*), septicemia y bacteriemias como consecuencia de éstas en *V. vulnificus*, asociadas a factores predisponentes como cirrosis hepática y cáncer. En la infección de la piel y partes blandas con antecedentes de heridas o traumatismos y contacto con agua salada o dulce. Las formas más severas son ocasionadas principalmente por *V. vulnificus* (Lan NP *et al.*, 2014).

III.3.10 Tratamiento: El antimicrobiano de elección es la tetraciclina, como alternativas se puede emplear, cloranfenicol o cotrimoxazol. 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).

IV.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en el periodo comprendido entre marzo y junio 2019 en el Hospital Pediátrico "William Soler.

IV.2 Universo y Muestra

El universo y muestra estuvo constituido por 2691 muestras clínicas de pacientes ingresados y de consulta externa. De ellas, 188 muestras intestinales y 2503 extra-intestinales (exudado vaginal, vulvar, uretral, endocervical, ótico, naso-faríngeo, conjuntival, secreción de lesiones y herida quirúrgica), contenido de punta de catéter, líquido pleural, orina, esputo, sangre).

Criterios de inclusión:

- Muestras que llegaron al laboratorio con el modelo de envío, necesarios a los efectos de los objetivos del estudio.
- Las muestras que obtuvieron crecimiento bacteriano y que el cultivo mostró aislados de bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva.

Criterios de exclusión:

Muestras que llegaron al laboratorio con planilla de recogida de datos incompleta.
Las muestras que obtuvieron cultivos contaminados, sin crecimiento bacteriano y que no obtuvieron aislados de bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva.

IV.3 Operacionalización de las variables: Ver anexo 1

IV.4 Procedimientos que permitieron cumplimentar los objetivos trazados

Las muestras recibidas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Pediátrico William Soler, fueron procesadas según la metodología establecida en dicho hospital y se utilizaron medios de enriquecimiento, universales, diferenciales y selectivos.

Tabla 1. Medios de cultivos empleados de acuerdo al tipo de muestra biológica:
Ver Anexo 2.

Las muestras se inocularon en el medio de cultivo por estrías a placas de Petri (100 x 13 mm). Después se incubaron a 37°C en aerobiosis (Incubadora Memmert, Alemania), durante 18 a 24 horas. Trascorridas 24 horas, se corroboró la pureza del cultivo y se realizó la tinción de Gram (Laboratorio de Productos Biológicos Finlay, Cuba) para la observación de sus características tintoriales, morfológicas y agrupación. De los aislamientos que resultaron bacilos gram negativos, se seleccionaron colonias translúcidas, convexas y de bordes regulares en el agar MacConkey (Biolife, Italia) y colonias hemolíticas o no, convexas y de bordes regulares en el agar sangre (BioCen)

se realizó la identificación utilizando métodos convencionales. Se inocularon por punción y estría a los medios de diferenciación primaria: agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK) (Biolife, Italia) y agar hierro lisina (AHL) (Biolife, Italia), se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas. Luego se seleccionaron los cultivos que mostraron las siguientes imágenes según (Koneman EW *et al.*, 2008):

AHK

Utilización de la glucosa oxidativa y fermentativamente

Presencia o no de gas

Producción o no de H₂S

AHL

Descarboxilación o no de la lisina

Dihidrolación de la arginina

A todos los aislados con las imágenes características se les realizó la prueba de oxidasa, según el método de Kovacs (Mc Fadding, 2006).

Aquellos aislados que se identificaron como bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva se trasladaron a temperatura ambiente en el medio de conservación Pasteur (elaborado siguiendo las instrucciones del Manual de Medios y Reactivos del Instituto Pasteur 1978), al Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas en el IPK (LNR\EDA\IPK), cumpliendo con las medidas de bioseguridad, con sistema básico de triple empaque recomendado por la OMS.

Luego, los aislados conservados se sembraron en caldo cerebro corazón y después en los medios agar Mac Conkey y agar sangre. Se confirmó la identificación y se sometieron además al estudio fisiológico de identificación fenotípica Aeroesquema (Furuwatari CH *et al.*, 1994), método que emplea ocho pruebas bioquímicas (Anexo 3).

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana in vitro:

Se determinó la susceptibilidad de los aislados de *Aeromonas* spp. frente a los agentes antimicrobianos establecidos como recomienda el Instituto de Normas de Laboratorio Clínico (CLSI, del inglés Clinical and Laboratory Standards Institute) del año 2015.M45,3 ed. para el género. En el caso de azitromicina se establecieron los puntos de corte según lo recomendado por CLSI, documento M100 para enterobacterias, ya que para el género *Aeromonas* no están instaurados los puntos de corte por parte de comités internacionales de microbiología. Se empleó el método de difusión en agar con discos Bauer- Kirby (CLSI. M100, 2019).

Tabla 2. Antimicrobianos que se emplearon en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

Agentes antimicrobianos	Contenido del disco (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
		R	I	S
Amikacina (AK)	30µg	≤14	15-16	≥17
Ampicilina-Sulbactam (AMS)	10/10µg	≤ 11	12-14	≥ 15
Azitromicina (AZM)	15µg	≥13	-	≤12
Ceftriaxona (CRO)	30µg	≤19	20-22	≥23
Ciprofloxacina (CIP)	5µg	≤15	16-20	≥21
Cloranfenicol (C)	30µg	≤12	13-17	≥18
Cefoxitin (FOX)	30µg	≤14	15-17	≥18
Meropenem (MRP)	10µg	≤19	20-22	≥23
Tetraciclina (TE)	30µg	≤11	12-14	≥15
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16

Fuente: CLSI, 2015.M45,3 ed.

µg: microgramo

Se utilizaron las siguientes cepas controles, según las recomendaciones del CLSI (2015. M45, 3ra edición):

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Escherichia coli ATCC 35218

Criterio de aislado multirresistente: Se consideró como multirresistente los aislados que mostraron resistencia a tres o más familias de antimicrobianos diferentes según lo establecido (CLSI, 2019).

Preparación y estandarización del inóculo: A partir de un cultivo puro obtenido en placas de agar Mueller Hinton (pH 7,2-7,4) (Biolife,Italia), 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 y se ajustó la suspensión bacteriana hasta obtener un patrón de turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland (10^8 - 10^9 UFC/mL).

Siembra de las placas: Después de la estandarización del inóculo y en un período no mayor de 15 minutos, se sembraron, 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.

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) .

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 a 35°C) (CLSI, 2019).

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 mostraran un desarrollo obvio a ojo desnudo. Para *Aeromonas* spp. la interpretación de la lectura se realizó según 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 aislados se clasificaron en sensibles, intermedio o resistentes (CLSI, 2015.M45).

IV.5 Análisis y procesamiento de datos

Para el procesamiento de los datos se realizó una base de datos en Microsoft Excel 2016 y los resultados se presentaron en figuras y tabla de contingencia estadística.

IV.6 Consideraciones Éticas

El estudio de las muestras se coordinó antes con la dirección del Laboratorio de Microbiología del Hospital Pediátrico “William Soler”. La carta de coordinación se anexó al documento. Se llevó a cabo una retroalimentación de los resultados en la medida que se obtuvieron los mismos para el adecuado manejo de los pacientes. La información que se obtuvo en el estudio se utilizó solo con fines investigativos y se mantuvo la confidencialidad por los investigadores.

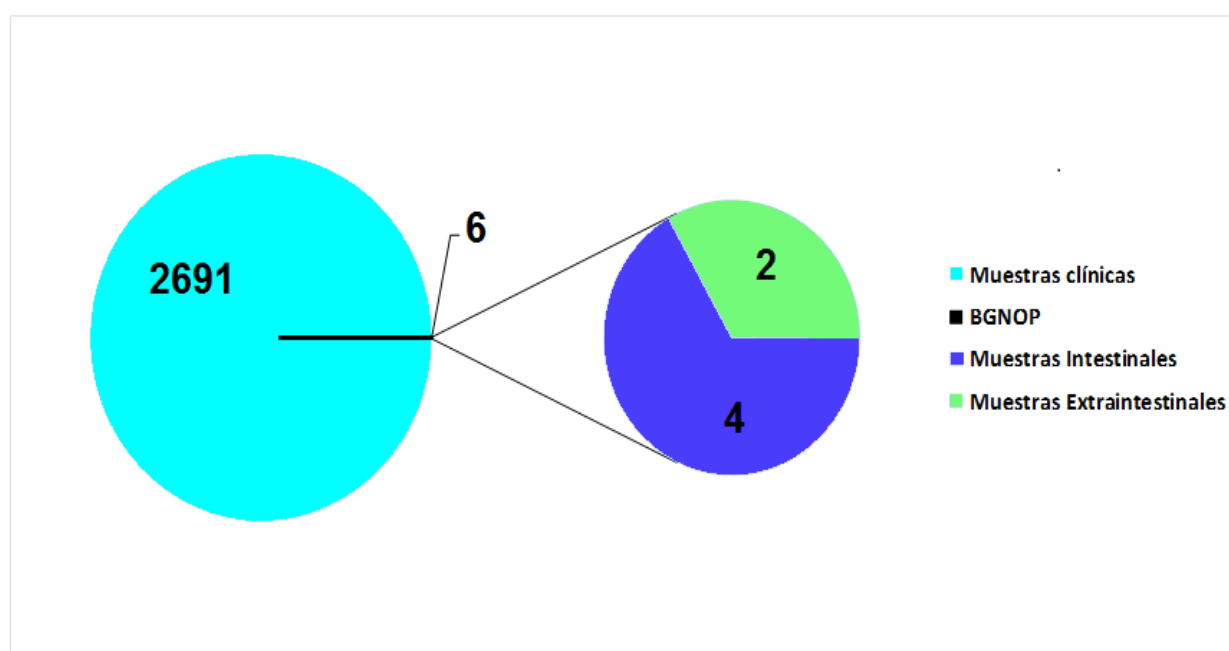
No fue necesaria la firma de un consentimiento informado de los tutores de los pacientes por no proceder en este tipo de investigación (se trabajó con muestras clínicas). Para el trabajo en el laboratorio se tuvieron en cuenta las prácticas, procedimientos y los equipos de seguridad correspondientes al nivel de seguridad biológica II, según establece la Resolución No. 103 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, de fecha 8 de octubre de 2006 (Gaceta Oficial República de Cuba, 2006).

Al analizar esta investigación desde el punto de vista bioético, la relación riesgo/beneficio se apoyó en la contribución del estudio al bienestar de la comunidad y

sus resultados serán útiles para el análisis de estos microorganismos como causantes de enfermedades intestinales y extra-intestinales.

La presente investigación básica formó parte del proyecto ramal “Estudios de caracterización fenotípica y de mecanismos de resistencia en enteropatógenos bacterianos oxidasas positivas” y contó con la aprobación de la Comisión Científica Especializada y del Comité de Ética de la Investigación del IPK con el código CEI-IPK 74-18.

En la figura 1 se refleja la distribución de las muestras clínicas obtenidas de los pacientes que acudieron al laboratorio en el periodo de estudio. Fueron trabajadas 2691, de estas seis fueron confirmadas como bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva. El mayor número se obtuvo a partir de muestras intestinales con cuatro aislados y dos de muestras extra-intestinales.



Leyenda: BGNOP (Bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva)

Figura 1. Números de aislados de BGNOP recuperados de muestras clínicas (n=2691). William Soler\IPK. Marzo - Junio 2019.

Los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva, se reconocen como agentes etiológicos de procesos infecciosos en órganos y sistemas vitales para el organismo, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, con un amplio espectro de expresiones clínicas por ejemplo (endocarditis, septicemia, bacteriemia, peritonitis, neumonía, meningoencefalitis e infección hepatobiliar, celulitis y Enfermedad Diarreica Aguda, etc.), comprometiendo en ocasiones la vida del paciente (Chen C *et al.*, 2019). A pesar de los adelantos en el control de las enfermedades transmisibles, cada día son más frecuentes las infecciones intestinales, extra-intestinales por las especies de los géneros antes descritos, constituyen una amenaza grave para la salud de la población mundial (Cabrera *et al.*, 2007).

Las condiciones de vida tales como el clima, la calidad del agua potable suministrada a la comunidad, así como el saneamiento ambiental, favorecen la infección de la población con estos microorganismos, los que, por habitar de manera natural en las aguas frescas y estancadas, contaminan con frecuencia los alimentos (Rather, 2019).

En los últimos años se incrementan las enfermedades causadas por bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva. En niños están vinculados en la mayoría de los casos con procesos diarreicos agudos, aunque de forma ocasional también se han descrito infecciones extra-intestinales (Doganis *et al.*, 2016)

Las infecciones extra-intestinales por estos patógenos se describen con mayor frecuencia en enfermos con patologías de base, especialmente neoplasias, cirrosis hepática y diabetes mellitus, y en pacientes sometidos a tratamiento inmunosupresor (Chen C *et al.*, 2019; Sirkhazi *et al.*, 2014).

El LNR/EDA/IPK realiza desde 1988 investigaciones encaminadas a mantener la vigilancia microbiológica de los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva, aislados de productos patológicos intestinales y extra-intestinales, estableciendo las pruebas bioquímicas convencionales que demuestran la circulación de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* en Cuba (Bravo *et al.*, 1993).

La baja incidencia de aislamiento e identificación de estos microorganismos puede deberse a un inadecuado diagnóstico microbiológico, por la no sistematización de la prueba de oxidasa, en ocasiones, estas bacterias son clasificadas en géneros diferentes o pueden ser confundidas con microorganismos contaminantes (Cabrera *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en los estudios realizados desde esa fecha, ratifican la importancia de mantener la vigilancia de estos agentes (Bravo *et al.*, 1993).

A pesar de que son escasos en Cuba los reportes de infecciones por bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva en muestras extra-intestinales en la edad pediátrica, el presente estudio demostró la circulación de estos agentes en diferentes muestras clínicas. Estudios puntuales realizados por Bravo y cols. en 54 muestras intestinales de niños menores de 5 años de diferentes regiones del país y Oquendo al realizar un estudio descriptivo de corte transversal, en 1396 muestras extra- intestinales de adultos, en un periodo de 7 meses demostraron la circulación de BGNOP (Bravo *et al.*, 2011; Oquendo, 2017).

Resultados similares fueron obtenidos por Verma y cols. en el norte de la India, al realizar un estudio observacional de corte transversal durante un año, en 100 niños que

fueron ingresados por diarrea, informan circulación de los patógenos anteriormente mencionados (Verma *et al.*, 2019).

De igual manera Shah y colaboradores en Kenya, al estudiar niños con EDA durante 4 años, resaltan el hallazgo de aislados correspondientes a bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva (Shah *et al.*, 2016).

Los resultados de este trabajo difieren de los obtenidos por Gutiérrez y cols. 2005, autores que al estudiar los principales patógenos causantes de EDA en una población infantil de Colombia, no refirieron aislados de microorganismos pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*. Tampoco hubo correspondencia con el estudio de Balbachan y cols. en Argentina, quienes investigaron la presencia de estos agentes en 590 muestras de heces de niños con EDA, en un periodo de un año y no obtuvieron ningún aislado (Balbachan *et al.*, 2007).

Estas diferencias podrían estar en relación con que ambos estudios fueron realizados en enero-abril, meses en los que la literatura destaca que se registran los niveles más bajos de circulación de estos microorganismos, además el área geográfica donde se realizaron los estudios y variaciones climáticas (Abbasi *et al.*, 2016).

En la figura 2 se muestran los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva identificados en género y especie, según el tipo de muestra, nótese que predominó *Aeromonas hydrophila* en heces (1) y en muestras extra-intestinales como orina (1) y exudado vaginal (1) y *A. caviae* en heces (3). Resalta en el estudio que entre los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva solo se aisló el género *Aeromonas*.

Está bien documentado en la literatura que los patógenos entéricos identificados en este estudio pueden penetrar al organismo humano a través del consumo del agua y los alimentos contaminados, además han sido asociados con infecciones de heridas, en particular después de la exposición del huésped al medio ambiente acuático (Igbinosa IH y Okoh AI,2012).

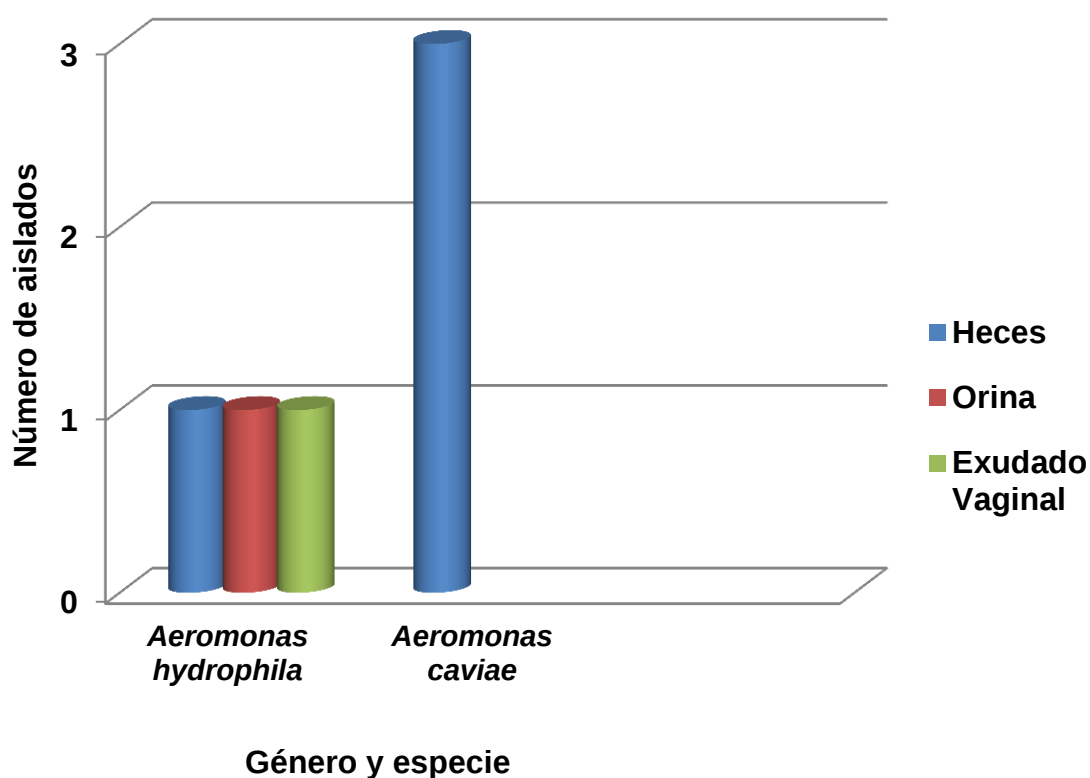


Figura 2. Aislados identificados en género y especie según tipo de muestra (n=6). William Soler\IPK. Marzo-Junio 2019.

Estos microorganismos afectan con mayor frecuencia a niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos (Janda y Abbott, 2010) y se aíslan con frecuencia de personas con procesos infecciosos intestinales y extra-intestinales (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

El actual estudio fue realizado en pacientes pediátricos, en este grupo etario no son frecuentes las enfermedades malignas, ni las enfermedades de base asociadas como enfermedades crónicas del hígado y cirrosis, lo cual podría explicar el bajo número de aislados y el predominio de estos en muestras intestinales (Quiroga M, 2009).

A pesar de las dificultades que implica su caracterización fenotípica, la diferenciación de aislados individuales de *Aeromonas* a nivel de especie es de importancia clínica y epidemiológica dada la variabilidad inter-especie en sus factores de virulencia, en los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos y en la distribución geográfica (Quiroga M, 2009).

Estudios previos realizados en el IPK reportan que el género *Aeromonas* es el que se recupera con mayor frecuencia de infecciones tanto intestinales y extra-intestinales (Cabrera *et al.*, 2007; Majano *et al.*, 2009).

Los resultados del actual estudio son similares a los obtenidos por Mbuthia y cols., autores que al describir los principales patógenos detectados por ellos como causantes de EDA en una población infantil de Kenya, reportaron 8 aislados de este género (Mbuthia *et al.*, 2018). De igual forma coincidimos con Bargui y cols., quienes en la región de Sousse, Tunez en un periodo de 5 años describen la existencia de aislados de *Aeromonas* en muestras de (heces y orina), siendo *A. hydrophila* la especie más frecuente (Bargui *et al.*, 2017).

Zhou y cols. en China, al estudiar niños con gastroenteritis, señalan al género *Aeromonas* como el principal bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, oxidasa positiva que identifican (Zhou *et al.*, 2018).

Los resultados difieren de los notificados por Zhang y cols., al realizar en Kunming, China un estudio de caso-control durante un año en muestras de heces, describen que el aislamiento del género *Plesiomonas* fue mayor en niños con diarrea que en el grupo control (Zhang *et al.*, 2016). Sin embargo, en el mismo país Zheng y cols. en un periodo de 6 años, analizaron 9364 muestras de heces de pacientes con EDA de diferentes regiones de Zhejiang, estos autores identificaron a *Vibrio parahaemolyticus* como el BGNOP más frecuentemente aislado. También Schwartz y cols. quienes en Bangladesh describen, durante periodos lluviosos y no lluviosos, la circulación de los microorganismos pertenecientes al género *Vibrio* como uno de los más frecuentemente aislados en individuos con EDA. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias entre huéspedes, época del año, condiciones de cultivo y / o factores de transmisión (Abbasi *et al.*, 2016).

En la actual investigación se identificó el género *Aeromonas* y no se identificaron los microorganismos pertenecientes al género *Plesiomonas* y *Vibrio*, lo que puede estar en relación con el corto período de tiempo seleccionado para realizar el estudio, las condiciones higiénicas sanitarias de cada región, las características patogénicas propias de cada especie, así como el área geográfica, las variaciones climáticas y la época del año. Además, la principal manifestación clínica de este género es la diarrea aguda autolimitada, la cual no requiere hospitalización, por lo que en ocasiones estos casos no se registran en los sistemas de salud (Chen PL *et al.*, 2015).

La infección del tracto urinario (ITU) debido a *Aeromonas* está bien documentada a nivel mundial, en los cuales esta bacteria ha sido identificada como el agente causal (Hua *et al.*, 2004; Tena *et al.*, 2007; Mandal J *et al.*, 2010). Hussain y cols. 2018 en la India, reportaron hematuria secundaria a infección por *Aeromonas* en un receptor de trasplante renal (Hussain *et al.*, 2018). También Mohammed y cols. 2016 en Libia al investigar la prevalencia de ITU en 1153 muestras de orina obtuvieron aislados de *Aeromonas* (Mohammed *et al.*, 2016); ambos autores comparten el hecho de que esta infección afecta a pacientes con enfermedades de base, tales como dilatación renal bilateral, insuficiencia renal y diabetes mellitus (Hussain *et al.*, 2018; Mohammed *et al.*, 2016). En Cuba Cabrera y cols. al realizar en un estudio en muestras extra-intestinales identificó especies de este género en urocultivo (Cabrera *et al.*, 2007).

Es importante señalar que en el actual estudio se identificó *Aeromonas hydrophila* en un paciente con ITU, lo cual podría estar relacionada con posibles anomalías del tracto urinario y factores higiénicos inadecuados, ya que la presencia de esta bacteria en el medio ambiente acuático ha sido reconocida como un riesgo potencial para la salud y la vigilancia de este patógeno es crucial para el manejo y control exitoso de la enfermedad (Aravena M *et al.*, 2013).

Cuando se revisa la literatura científica especializada, son escasos los artículos publicados de aislados de *Aeromonas* en exudado vaginal. Sin embargo en Cuba en un estudio de aislamiento e identificación en muestras extra- intestinales, se identificó *A. caviae* en un aislado de exudado vaginal (Cabrera *et al.*, 2007). Además en un estudio realizado por Oquendo en el 2017 en muestras extra-intestinales en un periodo de 7 meses en población adulta, obtiene un aislado *Aeromonas* spp en muestra de exudado vaginal (Oquendo, 2017).

Resalta en la presente investigación que se aisló *Aeromonas hydrophila* en una muestra de exudado vaginal. Pensamos que el agua muy contaminada podría haber servido como fuente de infección ya que el género *Aeromonas* puede resistir como biopelículas durante meses después de la contaminación inicial. Esta observación coincide con estudios anteriores sobre el aislamiento e identificación de este patógeno en muestras de aguas potables (Figuera MJ *et al.*., 2017; Aravena M *et al.*, 2013), lo que pone en evidencia la importancia de la búsqueda de este género como etiología de infección vaginal, además se constata que son microorganismos que circulan en pacientes pediátricos.

La prevalencia de las diferentes especies de *Aeromonas* varía según el área geográfica y el método utilizado para su identificación. En Cuba, las EDA muestran una variedad estacional, con un incremento del número de casos durante el período lluvioso, aunque dada las condiciones climáticas que se pronostican para el futuro, algunos autores señalan su ascenso y prevalencia en diferentes fuentes de agua (Bravo *et al.*, 2011).

La identificación bioquímica de las especies causantes de EDA e infecciones extra-intestinales 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 (Bravo *et al.*, 2011).

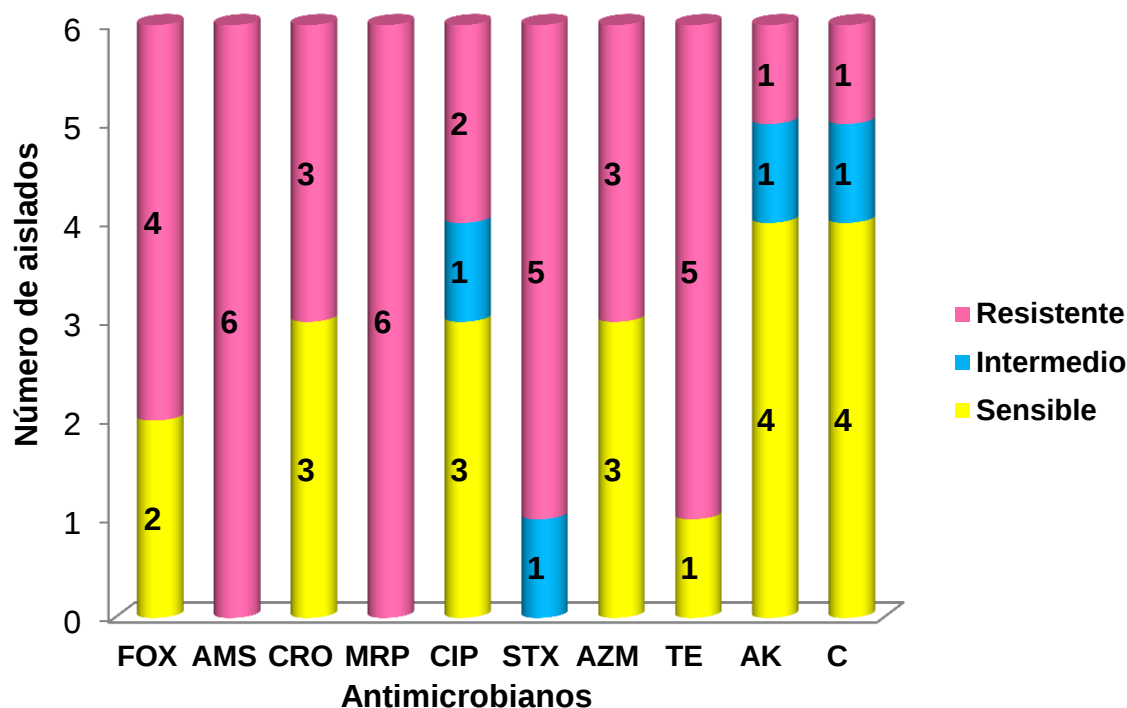
Al revisar la literatura especializada se observó que los resultados de esta investigación coincidieron con los publicados por Bravo y cols., en un estudio sobre nuevas especies de *Aeromonas* aisladas en heces de niños con EDA en Cuba. Estos autores demuestran la circulación de las especies: *A. caviae*, *A. hydrophila*, investigación que corrobora la permanencia de estas especies en Cuba (Bravo *et al.*, 1995).

También hubo concordancia con los resultados obtenidos por Assis y cols. en el sur de Brasil, autores que al describir la frecuencia de enteropatógenos bacterianos obtuvieron aislados de *Aeromonas hydrophila* asociados a gastroenteritis durante el verano (Assis *et al.*, 2014).

Además Tanaka y cols. y Miyamoto y cols., en Japón aislaron *Aeromonas hydrophila* en pacientes con choque séptico y fascitis necrotizante después de la quimioterapia por linfoma y en pacientes con enterocolitis severa, asociado a neoplasias hematopoyéticas respectivamente (Tanaka *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2017).

Sin embargo, las especies identificadas en este trabajo no se correspondieron con las descritas en una investigación que se realizó en una población infantil menor de un año con EDA en la República Checa, trabajo donde los aislados de *Aeromonas* más elevados se correspondieron con *A. veronii biovariedad veronii* (Krejčí *et al.*, 2005). Tampoco existió correlación con los resultados de Vila y cols., quienes en Barcelona, España, describen como más frecuentes aislados de *A. jandaei* en pacientes hospitalizados con el diagnóstico de diarrea del viajero (Vila *et al.*, 2003).

En cuanto al comportamiento de la susceptibilidad a los betalactámicos, en la figura 3 se puede apreciar que cuatro de los seis que se recuperaron fueron resistentes a cefoxitin y tres a ceftriaxona. Además, los seis aislados resultaron resistentes a ampicilina-sulbactam y meropenem.



Leyenda:

FOX: Cefoxitin, AMS: Ampicilina- Sulbactam, CRO: Ceftriaxona, MRP: Meropenem, CIP: Ciprofloxacina, STX: Trimetoprim- Sulfametoxazol, AZM: Azitromicina, TE: Tetraciclina, AK: Amikacina, C: Cloranfenicol

Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados intestinales y extra-intestinales de *Aeromonas* spp. identificados. HWS/IPK. Marzo-junio 2019. (n=6).

El tratamiento antibiótico no siempre está indicado en los casos de gastroenteritis aguda por *Aeromonas*, de modo que el empleo y elección del agente antimicrobiano depende de la sintomatología y la edad del paciente, de la localización de la infección (intestinal o extra-intestinal), del estado inmunológico y de la prevalencia local de los patógenos microbianos y los patrones de resistencia antibiótica (Jover *et al.*, 2017).

Es importante resaltar que en el género *Aeromonas* la expresión de betalactamasas, enzimas con actividad hidrolítica sobre los betalactámicos, es variable entre especies (Aravena-Román *et al.*, 2012). En adición, los métodos convencionales son poco

precisos, por lo que la aplicación de técnicas moleculares es de gran ayuda en la caracterización precisa del género a nivel de especie (Ruiz *et al.*, 2015).

A pesar de que los betalactámicos son ampliamente usados en pediatría por su escasa toxicidad y amplio espectro, *Aeromonas* spp. presenta diversas betalactamasas cromosómicas inducibles, como metalobetalactamasas, cefalosporinasa de clase C y penicilinasas de clase D (Chen PL *et al.*, 2012). Por otro lado, se han encontrado plásmidos con resistencia a betalactámicos en aislados clínicos y medioambientales, asimismo, en aislados de *A. salmonicida* que infecta a los peces (D' Andrea MM *et al.*, 2013; Yi SW *et al.*, 2014), que podrían conducir a una falta de eficacia terapéutica de estos antibióticos (Ruiz *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Soltan Dallal y cols. en Irán, autores que informan 100% de los aislados resistentes a ampicilina-sulbactam (Soltan Dallal *et al.*, 2016). También hubo correspondencia con el estudio de Igbinosa y Okoh, en Sudáfrica quienes obtienen 100% de los aislados resistentes ampicilina-sulbactam (Igbinosa IH y Okoh AI, 2012).

Por otra parte, en la figura 3 se muestra que del total de aislados identificados, cinco resultaron resistentes al trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina, antimicrobianos utilizados con frecuencia en infecciones por *Aeromonas* spp (Rhee JY *et al.*, 2016). Sin embargo Del Valle de Toro y cols. 2019, en España al describir las características epidemiológicas de pacientes pediátricos con diarrea causada por *Aeromonas* spp y al estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de dicho agente, durante un período de siete años obtuvieron encontraron una sensibilidad frente a trimetoprim-sulfametoxazol de 92,5% (74) de los 80 aislados estudiados. Éstas diferencias pueden deberse a la política antibiótica empleada en cada país, en la cantidad de aislados estudiados y distintas áreas geográficas, ya que la frecuencia de uso de estos antimicrobianos en una región determinada puede afectar significativamente el perfil de susceptibilidad (Del Valle de Toro *et al.*, 2019).

Se puede observar que del total de los aislados estudiados, tres resultaron resistentes a azitromicina y dos a ciprofloxacina. La azitromicina es un antimicrobiano (macrólido) recomendado para el tratamiento oral de la gastroenteritis moderada o grave, por los enteropatógenos bacterianos más frecuentes dada su cómoda posología y escasa toxicidad. No obstante, el CLSI no cuenta con puntos de corte clínicos que determinen la sensibilidad o resistencia de *Aeromonas* spp. para azitromicina (Jover-García J *et al.*, 2017).

Sin embargo, Jover-García y cols. en un estudio que incluyó en 50 aislamientos clínicos de *A. hydrophila* procedentes de pacientes con gastroenteritis, obtienen que el 100 % de los aislados fueron sensibles a azitromicina. Por tanto, sería deseable el establecimiento, por parte de comités internacionales de microbiología de puntos de puntos de cortes del género para azitromicina, tal y como ocurre con *Salmonella/Shigella* (Jover-García J *et al.*, 2017).

Por otra parte, las fluoroquinolonas es uno de los fármacos de primera línea en el tratamiento de infecciones graves por *Aeromonas* spp (Ruiz-Castillo A *et al.*.,2015). Aunque en edad pediátrica existe restricción de uso para este grupo farmacológico podría usarse ciprofloxacina en casos seleccionados de forma racional, de acuerdo con los parámetros que se establecen en dicha restricción (Del Valle de Toro A *et al.*, 2019). En cuanto a amikacina y cloranfenicol resultaron ser los antimicrobianos con menos aislados resistentes *in vitro* (1) respectivamente. En el caso de Amikacina constituye una opción de tratamiento en las infecciones extra-intestinales, pero no así para los procesos infecciosos intestinales ya que no se elimina por esta vía. El cloranfenicol se usa de forma limitada en la edad pediátrica por múltiples reacciones adversas, se sugieren a estos antibióticos como alternativas terapéuticas frente a infecciones por *Aeromonas* spp. valorando riesgo-beneficio. Resultados similares obtienen Novoa Farías y cols. quienes al realizar un estudio de susceptibilidad antimicrobiana en aislados de *Aeromonas* productores de EDA en México, muestran alta sensibilidad de las mismas frente a cloranfenicol (Novoa Farías *et al.*, 2016). La sensibilidad de los aislados investigados en el actual trabajo de tesis coincidió también con los descritos en España, por Ruiz y cols., autores que al estudiar la sensibilidad en aislados de *Aeromonas* spp. productoras de bacteriemias encontraron un 100% de los aislados sensibles amikacina (Ruiz *et al.*, 2015).

En la tabla tres se observan los patrones de resistencia, resalta que cinco aislados fueron multirresistentes, lo que pone en evidencia el problema de la resistencia del género *Aeromonas* e impone fortalecer el monitoreo de la susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 3. Patrones de multirresistencia de los aislados intestinales y extra-intestinales de *Aeromonas* spp. identificados. HWS/IPK. Marzo-junio 2019. (n=5).

PATRONES	No	Procedencia
FOX / AMS / MRP / CRO/ STX/ AZM / TE	1	Extra-intestinal
AMS / MRP/ STX / AZM / TE	1	Intestinal
FOX / AMS / MRP / CRO / STX /CIP / TE / AK / C	1	Intestinal
FOX / AMS / MRP /STX / TE	1	Intestinal
FOX / AMS / MRP/ CRO / STX/ CIP / AZM / TE	1	Intestinal

Fuente: LNR/EDA/IPK

Leyenda:

FOX: Cefoxitin, AMS: Ampicilina- Sulbactam, MRP: Meropenem, CRO:Ceftriaxona , AZM: Azitromicina, STX: Trimetoprim- Sulfametoxazol, CIP:Ciprofloxacina, TE:Tetraciclina, AK:Amikacina, C:Cloranfenicol

La resistencia antimicrobiana es un problema global y una preocupación constante de la comunidad científica internacional (Viswanathan R *et al.*,2011). A pesar de las numerosas estrategias para su contención, en los últimos años se incrementa la aparición de microorganismos multirresistentes, lo que conlleva a la búsqueda de nuevos antibióticos y a la recuperación de otros ya olvidados (Labi AK *et al.*,2016).

Los resultados del actual estudio son similares a los obtenidos por Zhou y cols. en China, autores que al realizar un estudio de taxonomía, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana de *Aeromonas* aislados de infecciones intestinales y extraintestinales, observaron multirresistencia en los aislados identificados,siendo mayor en los extra-intestinales que intestinales. Los patrones de resistencia que se observaron ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina e imipenem. (Zhou *et al.*,2019)

También hubo correspondencia con lo reportado por Monira y cols. en Bangladesh en un estudio en niños asintomáticos aislaron *Aeromonas* spp. y en uno de ellos obtuvo

como patrón de multirresistencia: trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, ceftriaxona (Monira S *et al.*, 2017).

Guerra y cols. al realizar un estudio en pacientes pediátricos con gastroenteritis agudas al Sur de Brasil reportan en 27 aislados, multirresistencia y los patrones que predominaron: ampicilina/sulbactam, amoxicilina, cefazolina, imipenem, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol (Guerra *et al.*, 2007).

De igual manera los resultados de la actual investigación son similares al estudio publicado por Subashkumar y cols. en la India, quienes determinaron los patrones de resistencia de *Aeromonas* spp. en niños con EDA, autores que señalan como principal patrón de multirresistencia a: meropenem, cefazolina y ampicilina. Estos investigadores llegaron a la conclusión de que la elevada resistencia a estos antimicrobianos, es debido a betalactamasas cromosomales inducibles, al uso extensivo de estos y al tratamiento con otros antimicrobianos sobre todo a nivel hospitalario; fenómeno que conlleva a la multirresistencia (Subashkumar *et al.*, 2007). Otros autores como Perretta y cols., plantean que el fenómeno de multirresistencia puede deberse a la adquisición por transferencia horizontal de elementos móviles del genoma que poseen varios genes de resistencia (Perretta *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de otros autores quienes refieren que la resistencia en el género *Aeromonas* está asociado al uso indiscriminado de antimicrobianos y mediada por presión selectiva ejercida sobre las poblaciones microbianas con el empleo de estos medicamentos y un exceso de prescripciones en la comunidad como a nivel hospitalario (Maluping *et al.*, 2005; Quiroga *et al.*, 2009).

La investigación actual proporciona continuidad a los estudios ya existentes en Cuba con relación a la identificación fenotípica convencional y al monitoreo de la resistencia antimicrobiana de estos géneros bacterianos. Además se evidencia que con una definida y sistemática búsqueda de bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva es posible contribuir a la mejor etiología de los procesos infecciosos.

- ✓ La introducción y sistematización de la prueba de oxidasa permitió demostrar la circulación de bacilos gram negativos anaerobios facultativos, oxidasa positiva, lo que contribuyó al mejor conocimiento de la etiología de las EDA e infecciones extra-intestinales en la población objeto de estudio.
- ✓ Se constata la presencia de *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas caviae*, en muestras intestinales y extra-intestinales, lo que refuerza la necesidad de diagnosticar los BGNOP como patógenos causantes de infecciones en la edad pediátrica.
- ✓ La existencia de variaciones en los patrones de resistencia señala mantener la vigilancia microbiológica para un mejor control de las infecciones intestinales y extra-intestinales ocasionadas por estos microorganismos.
- ✓ La presencia de aislados multirresistentes pudiera dificultar el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Extender el estudio a otros laboratorios de microbiología de diferentes provincias del país en aras de lograr un conocimiento de la problemática a nivel nacional.
- ✓ Mantener la aplicación sistemática de la prueba de oxidasa en la identificación de estos microorganismos en muestras intestinales y extra-intestinales.
- ✓ Introducir en el LNR/EDA/IPK las técnicas de biología molecular: como Reacción en Cadena de la Polimerasa, Hibridación de ADN/ADN y microarreglos para la identificación de las especies pertenecientes al género *Aeromonas*.

- ❖ Aagesen A, Häse C. Sequence analyses of type IV pili from *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. Microb.Ecol. 2012;64: 509–524. doi: 10.1007/s00248-012-0021-2.
- ❖ Abbasi E, Khansari B, Abtahi H, Akbari M, Ghaznavi-rad E. Low Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in Infectious Diarrhea Samples of Pediatric Patients in Arak, Iran.Rep. Biochem. Mol. Biol. 2016;5(2):15-19.
- ❖ Abd-El-Malek AM. Incidence and virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in fish. Veterinary World.2017; 10(1):34-7.
- ❖ 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.
- ❖ Aldová E, Shimada T. New O and H antigens of the international antigenic scheme for *Plesiomonas shigelloides*. Folia Microbiol. 2000;45:301-304. doi: 10.1007/BF02817550.
- ❖ Amani J; Mirhosseini SA; Ali A, Fooladi I. A Review Approaches to Identify Enteric Bacterial Pathogens. Jundishapur J Microbiol. 2015 February; 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.
- ❖ Amsaveni R, Sureshkumar M, Aravinth A, Reshma Mary J, Vivekanandhan G. Production of Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS)- Dependent Siderophore by *Aeromonas* Isolates. Iran. Biomed. J. 2016; 20(4):235-40.
- ❖ Aquilini E, Merino S, Regué M, Tomás JM. Genomic and proteomic studies on *Plesiomonas shigelloides* lipopolysaccharide core biosynthesis. J Bacteriol. 2014;196:556-567.
- ❖ 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;63:2270-2276. doi: 0.1099/ijs.0.040162-0.
- ❖ Aravena-Roman M, Harnett GB, Riley TV, et al. *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as

- Aeromonas hydrophila*. J Clin Microbiol. 2011;49(8):3006–8.
- ❖ Aravena-Román M, Inglis TJ, Henderson B, Riley TV, Chang BJ. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:1110–2.
 - ❖ Assis Flávia EA , Wolf Suélen , Surek Monica , Toni Fabiana De , Souza Emanuel M, Pedrosa Fábio O, et al. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, southern Brazil .J Infect Dev Ctries. 2014; 8(12):1609-1614.
 - ❖ Austin B. *Aeromonas* fish pathogens, in *Aeromonas*, ed Graf J., editor. (Storrs, CT: Caister Academic Press), 2015:45-65.
 - ❖ Bahamonde C, Stuardo V. La epidemia de cólera en América Latina: reemergencia y morbimortalidad. 2013;33(1):40–6.
 - ❖ Balbachán S.E, Merino L.A, Merino D, Balbachán M.L, Miranda O. Resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de diarreas en niños de Corrientes, Argentina. Rev Cub Med Trop. 2007;59(3):213-7.
 - ❖ Bargui H, Marzouk M, Benhadj A, Hadj Ali M, Ben Salem Y, Boukadida J. *Aeromonas* spp. Human Infection: Retrospective Study in the region of Sousse. Tunis Med. 2017;95(4):257-261.
 - ❖ 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, 9926–9931. doi: 10.1073/pnas.1307697110.
 - ❖ Betés M, Muñoz-Navas M. Protocolo diagnóstico y tratamiento de la gastroenteritis aguda. Medicine. 2016; 12(3):147-51.
 - ❖ Bhattacharya SK. An evaluation of current cholera treatment. Expert Opin Pharmacother. 2003;4(2):141-6.
 - ❖ 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. 13:114-120. Available of: <http://dx.doi.org/10.1089/sur.2010.018>.

- ❖ Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(8):601-8.
- ❖ Bravo Fariñas L, Monte R J, Gómez M, Dumas S C. Identificación de bacilos Gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivos. *Rev Cubana Med Trop* 1993a; 45:46-8.
- ❖ Bravo L, Cabrera L, Ramírez M, Llop Alina, Fernández A, García B y Morier L. *Plesiomonas shigelloides* una vibrionácea en quien pensar. *Rev Cubana Med Trop*.2000;52(1):10-14.
- ❖ 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, Ledo J, Ramírez M, Águila A, Núñez FÁ., et al. Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Rev Chil Infect*. 2011; 28(2):159-65.
- ❖ 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. Studies on virulence determinants of *Plesiomonas shigelloides*. VIII International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. 2005 June 15-17; Halifax, Canada.
- ❖ 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;53:915-925. Available of: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02674-14>.
- ❖ Bustamante SI. Protocolo para la evaluación/comparación de la actividad antimicrobiana antibióticos genéricos y antibióticos innovadores, frente a patógenos clínicos. [Tesis para optar por el grado de Microbiólogo Industrial]. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. 2015.
- ❖ Cabrera LE, Castro E, Ramírez A, Llop A, Llanes R, Castañeda E, Fernández A. y Bravo L. 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): 204-208.
- ❖ Carnahan A, Behran S, Joseph S. Aeroquey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. J Clin Microbiol.1991;29: 2843-9.
 - ❖ 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): 1909-191. 8. doi:10.1128/AEM.03540-14.
 - ❖ Charles A, De Paola A. Bacteriological analytical manual on line. May 2004. Chapter 9. 8th ed. Disponible en URL: <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>
 - ❖ Chen C, Wang LP, Yu JX, Chen X, Wang RN, Yang XZ, et al. Prevalence of Enteropathogens in Outpatients with Acute Diarrhea from Urban and Rural Areas, Southeast China, 2010-2014. Am J Trop Med Hyg. 2019. doi: 10.4269/ajtmh.19-0171.
 - ❖ Chen PL, Ko WCh, Wu ChJ. Complexity of β -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. J Microbiol, Immunol and Infection.2012; 45:398-403.
 - ❖ 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, 618–624. doi:10.1016/j.jmii.2014.08.007.
 - ❖ Chen X, Chen Y, Yang Q, Kong H, Yu F, Han D, Zheng S, Cui D, Li L. *Plesiomonas shigelloides* infection in southeast China. PLoS One. 2013;8:778-779. doi: 10.1371/journal.pone.0077877.
 - ❖ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline- 3er Edition; M45. 2015; 35(17):16-8.
 - ❖ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Informational Supplement. CLSI document M100. 2019.

- ❖ Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Peter Gogarten J, Graf J. Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case.2014;5(6).
- ❖ D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type- β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. International Journal of Medical Microbiology.2013; 303: 305-17.
- ❖ Daniels NA and Shafie A. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. Infections in Medicine.2000;17:665-685.
- ❖ Del Valle de Toro A, et al. Descripción de datos clínico-epidemiológicos de pacientes pediátricos con diarrea por *Aeromonas* spp. y estudio de la sensibilidad antibiotic de dicho agente. Rev Argent Microbiol. 2019.<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.03.003>.
- ❖ Desai SN, Pezzoli L, Martin S, Costa A, Rodriguez C, Legros D, Perea W. A second affordable oral cholera vaccine: implications for the global vaccine stockpile. Lancet Glob Health. 2016 Apr;4(4):e223-4. doi: 10.1016/S2214-109X(16)00037-1.
- ❖ Dickinson G, Lim KY, Jiang SC. Quantitative Microbial Risk Assessment of Pathogenic Vibrios in Marine Recreational Wasters of Southern California. Appl Environ Microbiol. 2013;79(1):294-302.
- ❖ Doganis D, Baka M, Tsolia M, Pourtsidis A, Lebessi E, Varvoutsis M., et al. Multifocal *Aeromonas* Osteomyelitis in a Child with Leukemia. Case Reports in Infectious Disease. 2016:1-4. Available of: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8159048>.
- ❖ 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):303-309.
- ❖ 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):464–467. doi:10.3201/eid1903.121156.
- ❖ Esteve C, Alcaide E, Giménez M.J. Multidrug-resistant (MDR) *Aeromonas* recovered from the metropolitan area of Valencia (Spain): diseases spectrum and prevalence in the environment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34: 137-45.
- ❖ Farmer J, Janda M, Brenner FW, Cameron DN and Birkhead KM. *Vibrio*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015.1-79.
- ❖ Figueras MJ, Aldea MJ, Fernández N, Aspìroz C, Alperi A, Guarro J. *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. Diagnostic

- Microbiology and Infectious Disease. 2007; 58:231-4.
- ❖ Figueras MJ, Beaz R. *Aeromonas* infections in humans in *Aeromonas*, ed. J. Graf (Norfolk: Caister Academic Press). 2015, 65–108.
 - ❖ Figueras MJ, Latif-Eugenin F, Ballester F, et al. 'Aeromonas intestinalis' and 'Aeromonas enterica' isolated from human faeces, 'Aeromonas crassostreae' from oyster and 'Aeromonas aquatilis' isolated from lake water represent novel species. *New Microbes New Infect.* 2017;15:74–6.
 - ❖ 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 Aeroquey 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>.
 - ❖ 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. On-line version ISSN 1726-4642Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342011000100017>.
 - ❖ 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;29:107-113.Available of:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01512>.
 - ❖ Gopal V, Burns FE. Cellulitis and compartment syndrome due to *Plesiomonas shigelloides*: a case report. *Mil Med.* 1991; 156:43.
 - ❖ Graf J. *Aeromonas.* USA: Caister Academic Press; 2015.
 - ❖ Guerra I, Raquel Fadanelli, Manuela Figueiró, Fernando Schreiner, Ana Paula L. Delamare. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south brazil: Prevalence,

- virulence factors and antimicrobial resistance. Brazilian Journal of Microbiology.2007; 38,638-643.
- ❖ 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.
 - ❖ 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;35:117-119. doi: 10.1016/j.ijid.2015.05.004.
 - ❖ Hernández CR, Vásquez G, Mesa Z, Bermúdez RI, Sotolongo Y, Vázquez G. Bacterias enteropatógenas asociadas a enfermedad diarreica aguda en niños. Rev Acta Médica del Centro.2017;11(2):28-34.
 - ❖ 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>.
 - ❖ Hua HT, Bollet C, Tercian S, Drancourt M, Raoult D. *Aeromonas popoffii* urinary tract infection.J Clin Microbiol. 2004 Nov;42(11):5427-8.
 - ❖ Humphries RM, Linscott AJ. Practical guidance for Clinical Microbiology. Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. Clinical Microbiology Reviews. Jan 2015a; 28(1):3-31.Available of:<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00073-14>.
 - ❖ Hussain SS, Farhat S, Jasuja S. Hematuria secondary to *Aeromonas* infection in a kidney transplant recipient. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2018 Jul-Aug;29(4):976-978. doi:10.4103/1319-2442.2396
 - ❖ Hustedt JW, Ahmed S. *Plesiomonas shigelloides* Periprosthetic Knee Infection After Consumption of Raw Oysters.Am J Orthop (Belle Mead NJ). 2017 Jan/Feb;46(1):E32-E34. PMID:28235124.
 - ❖ Igbinosa IH y Okoh AI. Antibiotic Susceptibility Profile of *Aeromonas* Species Isolated from Wastewater Treatment Plant. The Scientific World Journal.2012;(764-563):1-6.
 - ❖ 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.
 - ❖ Janda JM, Abbott SL, Mc Iver CJ. *Plesiomonas shigelloides* revisited. Clinical Microbiology Rev. March 11, 2016; 29(2):349-374. Available of: <http://cmr.asm.org/>
 - ❖ 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.
- ❖ Janda JM., Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev. 2010;23:35-73. doi: 10.1128/CMR.00039-09.
 - ❖ Jenkins SG, Schuetz AN. Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. Mayo Clin Proc. 2012; 87(3):290-308.
 - ❖ Jover-García J, Pérez V, Colomina J. In-vitro activity of azithromycin in faecal isolates of *Aeromonas hydrophila*. An Pediatr (Barc). 2017;86: 226-7.
 - ❖ 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.
 - ❖ 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.
 - ❖ Khajanchi B.K, Fadl A.A, Borchardt M.A, Berg R.L, Horneman A.J, Stemper M.E et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. Appl. Environ. Microbiol. 2010.76 (7), 2313-2325.
 - ❖ Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, Pritt BS, Patel R, Binnicker MJ. 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. Available of: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01637-14>
 - ❖ Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WN, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. 3ra ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008.
 - ❖ 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;3(82):209-22.
 - ❖ Králová S, Staňková E, Sedláček I. Classification of *Aeromonas* spp. isolated from water and clinical sources and distribution of virulence genes. Folia Microbiol.2016;

61:513-21.

- ❖ Krejčí E, Andelová A, Porazilova I, Sedlacek I. *Aeromonas* spp. as a causative agent of acute diarrhoea in children. En: 8th International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*; 2005 Jun15-17, Halifax, Nova Scotia.p.42.
- ❖ 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;343:3123-27. Available of: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.017>.
- ❖ Labi AK, Obeng N, Bjerrum S, Enweronu C, Newman MJ. Neonatal bloodstream infections in a Ghanaian tertiary hospital: are the current antibiotic recommendations adequate? . *BMC Infect Dis*. 2016;16(4):598.
- ❖ 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):3819-3821.doi: 10.1128/JCM.01915-14.
- ❖ 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.
- ❖ 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*. January 2015;21(1). Available of: 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. December 2015: 358-362
- ❖ López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Pascual A. El laboratorio de Microbiología en la vigilancia y el control de las infecciones nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(1):44-51.
- ❖ 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;20:5729-5739.
- ❖ 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.
- ❖ 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. doi:10.3390/ijerph9082669.
 - ❖ 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.
 - ❖ Majano A, Bravo L, Fernández A, Martínez I, Núñez F, Mederos L. Rev Biomed . Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. 2009; 20(1):25-32.
 - ❖ Maluping R.P, Lavilla Pitogo C.R, Depaola A, Janda J.M, Krovacek K, Greko C. Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated in the Philippines and Thailand. Int. J. Antimicrob. Agents. 2005; 25:345–53.
 - ❖ Mandal J, Dhodapkar R, Acharya NS, Sastry A, Parija SC. Urinary tract infection due to *Aeromonas* spp., a lesser known causative bacterium. J Infect Dev Ctries. 2010 Oct 28;4(10):679-81.
 - ❖ Mandal S, Deb M, Kumar N. Cholera: a great global concern. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2011a;573-580. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60149.
 - ❖ 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;6:842–846.
 - ❖ Marques-Mendes CL, Hofer E, Cintra N. Development of duplex-PCR for identification of *Aeromonas* species. Rev Soc Bras Med Trop. 2013; 46(3):355-7.
 - ❖ Marshman WE, Lyons CJ. Congenital endophthalmitis following maternal shellfish ingestion. Aust N Z J Ophthalmol. 1998;26:161–3.
 - ❖ Matsuyama R, Kuninaga N, Morimoto T, Shibano T, Sudo A, Sudo K, Asano M, Suzuki M, Asai T. 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: 1179-1181.
 - ❖ Mbuthia O, Mathenge S, Oyaro M, Musa O. Etiology and pathogenicity of bacterial

- isolates: a cross sectional study among diarrheal children below five years in central regionsof Kenya. Pan African Medical Journal. 2018;31:88. doi:10.11604/pamj.2018.31.88.15644
- ❖ Mc Faddin JF. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.3ra edición. Cuba: Ecimed; 2006.
 - ❖ 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*. June 2015;6:649.
 - ❖ Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente. Lista Oficial de los Agentes Biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas. Gaceta Oficial República de Cuba. Resolución N° 38.; 2006. p. 999-1001.
 - ❖ Miyamoto Y, Udaka K, Sekimoto E, Shibata H, Otsuka K, Mori K3, et al Hematopoietic neoplasms accompanied by severe enterocolitis due to *Aeromonas* species. *Rinsho Ketsueki*. 2017;58(4):303-308. doi: 10.11406/rinketsu.58.303.
 - ❖ Miyoshi SI. Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *Vibrio* species, *Front Microbiol*. 2013;(4):339-345.
 - ❖ Mohammed MA, Alnour TM, Shakurfo OM, Aburass MM. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of bacterial strains isolated from patients with urinary tract infection in Messalata Central Hospital, Libya. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Aug;9(8):771-6. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.06.011.
 - ❖ Monforte Cirac ML, Palacian Ruiz MP, Aisa Iriarte ML, Espuelas Monge M. *Aeromonas* induced hemolytic uremic syndrome: A case report.*j.rce*.2009:206-7.
 - ❖ Monira S, Antara Shabnam S, Imran Ali Sk, Sadique A, Johura FT, Zillur Rahman K., et al. Multi-drug resistant pathogenic bacteria in the gut of young children in Bangladesh. *Gut Pathog*.2017; 9(19):1-8.
 - ❖ Moore S, Thomson N, Mutreja A, Piarroux R. Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of *Vibrio cholerae* clones. *Clin Microbiol Infect*. 2014 May;20(5):373-9. doi: 10.1111/1469-0691.12610. Epub 2014 Mar 29.
 - ❖ Morales A, González A. Infecciones por *Aeromonas* spp., ¿pensamos en ellas? *Rev Acta Médica del Centro*.2013; 7(3):1-3.
 - ❖ Morejón García Moisés. Actualización en antimicrobianos sistémicos.2003.
 - ❖ 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.
- ❖ 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*. August 15, 2016. doi: 10.4269/ajtmh.16-0321. Available of: <http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.16-0321>
 - ❖ 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.
 - ❖ Niskanen M, Salmela P. *Plesiomonas shigelloides*: a possible pathogen in animals. *Suomen Eläinlääkärilehti*. 2000;106:451-455.
 - ❖ Novoa-Farías O, Frati-Munari AC, Peredo MA, Flores-Juárez S, Novoa-García O, Galicia-Tapia J., et al. Susceptibility to rifaximin and other antimicrobial agents of bacteria isolated from acute gastrointestinal infections in Mexico. *Revista de Gastroenterología de México*. 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*. April 2014;6(1):13-16. Available of: <http://www.academicjournals.or/JBR>.
 - ❖ 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.
 - ❖ Odeyemi OA, Ahmad A. Population dynamics, antibiotics resistance and biofilm formation of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from aquatic sources in Northern Malaysia. *Microbial Pathogenesis*.2017; 103:178-85.
 - ❖ Okon E, Bishburg E, Ugras S, Chan T, Wang H. *Clostridium perfringens* meningitis, *Plesiomonas shigelloides* sepsis: a lethal combination. *AmJ Case Rep*. 2013;14:70-72.
 - ❖ Olaniran AO, T 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):1-10.
 - ❖ Oldham AL, Wood TA, Henderson DP. *Plesiomonas shigelloides* hug encodes an iron-regulated heme binding protein required for heme iron utilization. *Canadian Journal of Microbiology*. 2008;54(2):97-102.

- ❖ Oquendo F. *Aeromonas, Plesiomonas y Vibrio*. Agentes etiológicos de infecciones extra-intestinales e intestinales [tesis para optar por el título de máster en bacteriología-micología]. IPK. 2017.
- ❖ Organización Mundial de la Salud (2017): Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/index.html>.
- ❖ Pampín F, Bou G, Galeiras R, Freire D, Bouza MT, Zúñiga M del C. *Aeromonas* and meningitis: An unusual presentation. *Neurocirugía*.2012; 23(5):200-2.
- ❖ Pan X, Lin L, Xu Y, Yuan X, Yao J, Yin W., *et al.* Draft Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* Strain BSK 10 (Serotype O97). Isolated from *Carassius carassius* with Motile *Aeromonas* Septicemia in China. *Genome Announc.* 2017; 5(24):e00497-17.
- ❖ 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. doi: 10.1111/mmi.12549
- ❖ Penn RG, Giger DK, Knoop FC, Preheim LC. *Plesiomonas shigelloides* overgrowth in the small intestine. *J Clin Microbiol.* 1982;15:869-872.
- ❖ Perretta Alejandro , K. A., Pablo Zunino. Antimicrobial resistance in motile *Aeromonads* isolated from fishes cultured in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 2019; 55(1), 4-8.doi: 10.29155/VET.55.211.1
- ❖ Presley SM, Rainwater TR, Austin GP, Platt SG, Zak JC, Cobb GP *et al.* Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following hurricane Katrina. *Environ Sci Technol.* 2006;40:468-474.
- ❖ Puthuchery SD, Puah SM, Chua KH. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS One.* 2012;7(2):e30205.
- ❖ Quiroga M, Lezcano M.T, Talavera B. *Aeromonas* spp. involucradas en infecciones extra-intestinales. *Rev. Cienc. Tecnol.* 2009;11(12): 27–33.
- ❖ 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.
- ❖ Rhee JY, Sik Jung D, Ran Peck K. Clinical and Therapeutic Implications of *Aeromonas* Bacteremia: 14 Years Nation-Wide Experiences in Korea. *Infect*

- Chemother.2016; 48(4):274-84.
- ❖ Riveros M, Ochoa TJ. Enteropatógenos de importancia en salud pública. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2015; 32(1):157-64.
 - ❖ 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.
 - ❖ Rouf MA, Rigney MM. Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. Appl Microbiol. 1971;22:503–506.
 - ❖ Ruiz-Castillo A, et al. Influencia de la correcta identificación en la interpretación de las pruebas de sensibilidad en aislados de *Aeromonas* spp. productoras de bacteriemia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.02.020>
 - ❖ Sakazaki R, Shimada T. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. Jpn J Med Sci Biol.1984; 37:247-55.
 - ❖ Sakazaki R, Shimada T. Serovars of *Vibrio cholerae*. Jpn J Med Sci Biol.1977;30:279-82.
 - ❖ 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. August 2016; ID 1538501: 3. Available of: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1538501>.
 - ❖ Sánchez RM, Pérez IA. Cólera: historia de un gran flagelo de la humanidad. Rev Hum Med. Mayo.-ago. 2014;(14):2. Disponible en:<http://scielo.sld.cu/scielo.php?>
 - ❖ 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.
 - ❖ Shah M, Kathiiko C, Wada A, Odoyo E, Bundi M, Miringu G, et al. Prevalence seasonal variation, and antibiotic resistance pattern of enteric bacterial pathogens among hospitalized diarrheic children in suburban regions of central Kenya. Trop Med and Health. 2016; 44(39):1-8. doi: 10.1186/s41182-016-0038-1
 - ❖ Sirkhazi M, Sarriif A, Aziz NA, Almana F, Arafat O, Shorman M. Bacterial Spectrum, Isolation Sites and Susceptibility Patterns of Pathogens in Adult Febrile Neutropenic Cancer Patients at a Specialist Hospital in Saudi Arabia. World J Oncol. 2014; 5(6):196-203. doi: 10.14740/wjon850w.

- ❖ Soltan Dallal MM, Mazaheri Nezhad Fard R, Kavan Talkhabi M, Aghaiyan L, Salehipour Z. Prevalence, virulence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea. *GERMS*.2016;6(3):91-6.
- ❖ 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.
- ❖ Stock I. *Plesiomonas shigelloides*: an emerging pathogen with unusual properties. *Rev Med Microbiol*. 2004;15:129-139.
- ❖ Subashkumar R.C. Thilagavathy G. Vivekanandhan, K. Savithamani, Lakshrn P. Typing of Haemolytic and Antibiotic Resistant *Aeromonas hydrophila* Isolated from Raw Milk of Coimbatore, South India. *International Journal of Dairy Science*. 2007; 1(1), 70-83.
- ❖ Sun J, Zhang X, Gao X, Jiang Q, Wen Y, Lin L. Characterization of Virulence Properties of *Aeromonas veronii* Isolated from Diseased Gibel Carp (*Carassius gibelio*). *Int. J. Mol. Sci*.2016; 17(496):1-11.
- ❖ 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. *PLoS ONE* 8:e56338. doi:10.1371/journal.pone.0056338.
- ❖ Talagrand-Reboul E, Jumas-Bilak E, Lamy B. The Social Life of *Aeromonas* through Biofilm and Quorum Sensing Systems. *Front Microbiol*.2017; 8(37):1-19.
- ❖ 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;49:271-275. DOI: 10.1007/s12088-009-0043-8.
- ❖ Tanaka M, Watanabe N, Aota Y, Ando J, Gotoh A, Komatsu N. Septic shock and necrotizing fasciitis due to *Aeromonas hydrophila* after chemotherapy in a patient with mantle cell lymphoma accompanied by liver cirrhosis. *Rinsho Ketsueki*. 2014;55(12):2433-6. doi: 10.11406/rinketsu.55.2433.
- ❖ 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;39:117-126.
- ❖ Tena D, González A, Gimeno C, Pérez MT y Bisquert J. Infección extra-intestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. *Enferm Infecc Microbiol Cli*. 2007;25(4):235-241.

- ❖ Turska-Szewczuk A, Duda KA, Schwudke D, Pekala A, Kozinska A, Holst O. Structural Studies of the Lipopolysaccharide from the Fish Pathogen *Aeromonas veronii* Strain Bs19, Serotype O16. *Mar. Drugs*.2014; 12:1298-1316.
- ❖ 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.
- ❖ Verma S, Venkatesh V, Kumar R, Kashyap S, Kumar M, Maurya AK, et al. Etiological agents of diarrhea in hospitalized pediatric patients with special emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli* in North India. *J Lab Physicians*. 2019;11(1):68-74. doi:10.4103/JLP.JLP_123_18.
- ❖ Véron MM. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bacteries comparables. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1965;261:5243-5246.
- ❖ 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.
- ❖ 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).
- ❖ Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, et al. *Aeromonas* spp. And traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*.2003;9:552-555
- ❖ Viswanathan R, Singh AK, Mukherjee S, Mukherjee R. Aetiology and antimicrobial resistance of neonatal sepsis at a tertiary care centre in eastern India: a 3 year study. *Indian J Pediatr*. 2011;78(4):409-12.
- ❖ 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;195:3583-3589. doi: 10.1128/JB.00508-13.
- ❖ Wilhelms M, Gonzalez V, Tomás JM, Merino S. *Aeromonas hydrophila* lateral flagella gene transcriptional hierarchy. *J. Bacteriol*. 2013;195:1436-1445. doi: 10.1128/JB.01994-12.
- ❖ Wimalasena S.H.M.P., Shim GW, Hossain S, Heo GJ. Potential enterotoxicity and antimicrobial resistance pattern of *Aeromonas* species isolated from pet turtles and their environment. *J. Vet. Med. Sci*. 2017; 79(5): 921-6.
- ❖ 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 ChJ, Tsai PJ, Chen PL, Wu ICh, Lin YT, Chen YH., et al. *Aeromonas aquariorum* septicemia and enterocolitis in a cirrhotic patient. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.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.
- ❖ Yi SW, Chung TH, Joh SJ, Park Ch, Park BY, Shin GW. High Prevalence of BLACTX-M Group Genes in *Aeromonas dhakensis* Isolated from Aquaculture Fish Species in South Korea. *J. Vet. Med. Sci*.2014; 76(12): 1589-93.
- ❖ 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.
- ❖ Zhang Shun-Xian, Yang Chun-Li, Gu Wen-Peng, Ai Lin, Serrano Emmanuel, Yang Pin et al. Case–control study of diarrheal disease etiology in individuals over 5 years in southwest China.*Gut Pathog*.2016;8:58 doi 10.1186/s13099-016-0141-1
- ❖ Zheng SF, Yu F, Chen X, Cui DW, Yang XZ, Xie GL, et al. Monitoring and research on pathogen spectrum in patients with acute diarrhea from sentinel hospital of Zhejiang Province during 2009 to 2014. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2016;50(12):1084-1090. doi:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.12.012
- ❖ Zhou Y, Yu Li, Nan Z, Zhang P, Kan B, Yan D and Su J. Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC Infectious Diseases*.2019; 19:158. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3766-0>.
- ❖ Zhou Y, Zhang J, Wang S, Xu W, Liang W, Yan M, et al. Bacterial pathogen spectrum of acute diarrheal outpatients in an urbanized rural district in Southwest China. *Int J Infect Dis*. 2018;70:59-64. doi: 10.1016/j.ijid.2018.02.022.
- ❖ 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. Operacionalización de las variables

Variable	Tipo	Operacionalización de las variables	
		Categoría	Descripción
Tipo de muestra	Cualitativa nominal	Sangre Contenido de la punta de un catéter Exudado vulvar Exudado vaginal Exudado endocervical Exudado uretral Exudado conjuntival Exudado nasal y faringeo Orina Secreción de herida quirúrgica Secreción de lesiones Heces Líquido pleural Esputo	Porción o volumen de cualquier material biológico, que se obtenga del paciente. Está en dependencia del sitio anatómico o instrumental de donde se recolecte.
Procedencia de la muestra	Cualitativa nominal	Intestinal Extra-intestinal	Está en dependencia del sitio anatómico de donde se recolecte.
Tipo de bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, oxidasa positiva	Cualitativa nominal	<i>Aeromonas</i> spp, <i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Vibrio</i> spp.	Según resultados obtenidos del cultivo y pruebas de identificación
Respuesta ante cada antimicrobiano	Cualitativa nominal	Sensible Intermedia Resistente	Según la respuesta <i>in vitro</i> del microorganismo a cada antimicrobiano.

Anexo 2. Medios de cultivos empleados de acuerdo al tipo de muestra biológica

Tipo de Muestra biológica	Medios de Cultivos utilizados
Heces	Caldo Selenito(BioCen), Agua Peptona Alcalina, (BioCen), Agar Salmonella-Shigella(Biolife,Italia), Agar MacConkey (Biolife, Italia).
Exudado nasal y faríngeo	Medio de agar sangre (BioCen).
Secreción de lesiones	Caldo Tioglicolato (BioCen), medio de agar sangre (BioCen) y agar MacConkey(Biolife, Italia).
Orina	Medio CLED (cistina lactosa electrolito deficiente) (BioCen)
Exudado vaginal	Agar Chocolate (BioCen), agar sangre (BioCen) y agar MacConkey. (Biolife, Italia)
Exudado ótico	Agar Chocolate(BioCen), medio de agar sangre(BioCen). y agar MacConkey(Biolife, Italia).
Exudado conjuntival	Medio de agar sangre(BioCen) y agar MacConkey(Biolife, Italia).
Exudado uretral	Medio de agar sangre(BioCen) y agar MacConkey(Biolife, Italia)..
Exudado vulvar	Medio de agar sangre(BioCen) y agar MacConkey(Biolife, Italia).
Sangre	Medio agar chocolate(BioCen) ,medio de agar sangre(BioCen) y agar MacConkey(Biolife, Italia).
Espuito	Medio de agar sangre (BioCen) y agar MacConkey(Biolife, Italia).
Secreción Herida quirúrgica	Medio de agar sangre (BioCen) y agar MacConkey(Biolife, Italia).
Contenido de punta de catéter:	Medio de agar sangre (BioCen).
Líquido pleural	Medio de agar sangre (BioCen) y agar MacConkey (Biolife, Italia).

Fuente: Laboratorio de microbiología del hospital pediátrico William Soler

Anexo 3. Esquema de identificación fenotípica de especies. Aeroesquema

Esquema de identificación fenotípica de especies Aeroesquema.

(Furuwatari *et al.*, 1994)