

Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba

Amanda Majano-Mendoza¹, Laura Bravo-Fariñas², Anabel Fernández-Abreu², Isabel Martínez-Motas³, Fidel Núñez², Lilian M. Mederos-Cuervo², Margarita Ramírez-Álvarez², Graciela Castro-Escarpulli⁴

¹ Instituto Salvadoreño del Seguro Social, Laboratorio Clínico de la Unidad Médica Zacamil, San Salvador, El Salvador.

² Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), La Habana, Cuba. ³ Instituto Finlay, La Habana, Cuba. ⁴ Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México

RESUMEN

Introducción. Las infecciones intestinales causadas por las especies pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* constituyen un reto para las autoridades de salud pública de diversas regiones del mundo.

Objetivo. Determinar la correlación existente entre los métodos Aeroesquema y Aerokey II para la identificación fenotípica de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

Materiales y Métodos. En este trabajo se estudiaron 89 cepas de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva, aislados de heces de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Todas las cepas se clasificaron en género y especie aplicando los esquemas de identificación fenotípica "Aeroesquema" y "Aerokey II".

Resultados. Se identificaron: 37 *Aeromonas caviae*, 24 *Aeromonas hydrophila*, 9 *Aeromonas veronii* bv sobria, 2 *Aeromonas veronii* bv veronii, 1 *Aeromonas schubertii*, 9 *Vibrio cholerae* no-O1 y 7 *Plesiomonas shigelloides*.

Las especies de *Aeromonas* más frecuentemente aisladas fueron *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* bv sobria. Al aplicar el estadígrafo Kappa, se obtuvo un valor de $K=0.698630$, lo que denotó

una buena correlación entre ambos métodos.

Conclusión. Se propone la incorporación de ambos métodos establecidos en el país para la identificación de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda.

Palabras clave: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, enfermedad diarreica aguda, bacilos gramnegativos oxidasa positiva

ABSTRACT

Phenotypic characterization of Gram negative facultative anaerobic positive oxidase bacilli from patients with acute diarrhoea in Cuba

Introduction. The intestinal infections caused by the species belonging to the genera *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* are a health challenge for the public health authorities from around the world.

Objective. To determine the correlation among the methods Aeroesquema and Aerokey II used for the phenotypic identification of microorganisms belonging to the genera *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*.

Solicitud de sobretiros: Laura Bravo-Fariñas, Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), La Habana, Cuba. E-mail: laura@ipk.sld.cu

Recibido: el 29 de octubre de 2008. **Aceptado para publicación:** el 17 de marzo de 2009

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb092014.pdf>

Materials and Methods. In this work 89 of medical Gram negative anaerobic positive oxidase bacilli were studied, isolated from patients with acute diarrhoea. All the isolates were classified in the genus and species according to results from two different methods for phenotypic characterization, "Aeroesquema" and "Aerokey II".

Results. A total of 89 isolates were identified as: 37 *Aeromonas caviae*, 24 *Aeromonas hydrophila*, 9 *Aeromonas veronii* bv sobria, 2 *Aeromonas veronii* bv veronii, 1 *Aeromonas schubertii*, 9 *Vibrio cholerae* no-O1 and 7 *Plesiomonas shigelloides*. The *Aeromonas* species more frequently isolated were *A. caviae*, *A. hydrophila* and *A. veronii* bv sobria. By applying the statistical Kappa procedure, we obtained a value of $K=0.698630$, which shows a good correlation between the two methods.

Conclusions. We propose the use of both methods in the country for the identification of microorganisms belonging to the genera *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* isolated from patients with acute diarrhoea.

Keywords: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, acute diarrhoeal, gramnegative bacilli oxidase positive

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen un serio problema de salud en diversas regiones del mundo, representando en estos momentos una de las principales causas de muerte entre los niños y adultos jóvenes, particularmente para las poblaciones que habitan en los países del tercer mundo (1).

Actualmente, las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son responsables de una elevada morbimortalidad en los niños menores de cinco años de edad y uno de los problemas más acuciantes que enfrentan los países en vías de desarrollo (2).

Los miembros de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva, con una

gran distribución mundial y se aíslan de diversas fuentes naturales como agua, suelo y alimentos, llegando a ocasionar infecciones tanto intestinales como extraintestinales (3,4). La identificación correcta de *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* es de gran utilidad para los estudios epidemiológicos relacionados con estas afecciones, sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde las condiciones socioeconómicas favorecen la incidencia y prevalencia de las EDA. Sin embargo, existe la tendencia de enfocar el diagnóstico microbiológico principalmente hacia los patógenos clásicos: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Yersinia* (5). Por ejemplo, en la República de El Salvador el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), a través de la Dirección de Vigilancia de Salud de la Unidad de Epidemiología, en su consolidado nacional sobre el reporte epidemiológico diario de la incidencia de las principales enfermedades en vigilancia epidemiológica especial, notifica un acumulado total de 209 663 casos de diarrea y gastroenteritis en todo el país, durante el período comprendido entre el 31 de diciembre de 2006 y el 29 de diciembre de 2007 (6).

Existen diferentes métodos de identificación fenotípica de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*; entre ellos se encuentran Aerokey II y Aeroesquema. Ambas técnicas son fáciles de realizar, tienen una buena sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en la actualidad se dispone de métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis en gel de campo pulsado, microarreglos, entre otros) que complementan la identificación de estos agentes; aunque tienen el inconveniente de ser principalmente accesibles a los países desarrollados. La mayoría de los autores coinciden en señalar que los sistemas de identificación convencionales, empleando las pruebas bioquímicas y la susceptibilidad a los antimicrobianos, constituyen métodos útiles para el diagnóstico microbiológico en aquellos laboratorios clínicos donde las técnicas de avanzada no se han podido desarrollar (7-8).

Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos

La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos de América incluye a las especies del género *Aeromonas* dentro de la lista de patógenos emergentes (9); también han sido comprobadas las infecciones gastrointestinales causadas por microorganismos pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Plesiomonas*, los cuales pueden provocar síntomas disentéricos prolongados (10-11).

Este trabajo tuvo como propósito: a) Identificar en género y especies bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva, aislados de pacientes con enfermedad diarreica, b) Determinar la correlación existente entre los métodos Aeroesquema y Aerokey II, como sistemas de identificación fenotípica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Las 89 cepas clasificadas como bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos oxidasa positiva, aisladas de heces de pacientes con enfermedad diarreica aguda (EDA), procedentes de nueve Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE) del país; fueron remitidas al Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (LNR/EDA/IPK), La Habana, Cuba, para su caracterización fenotípica; en el período comprendido desde agosto de 2007 a marzo de 2008. Las 89 cepas se encontraban conservadas en el medio de conservación para enterobacterias "Pasteur", se inocularon en caldo cerebro-corazón y se incubaron en aerobiosis a 37°C, durante 18-24 horas.

Posteriormente, una asada del cultivo en caldo se sembró por agotamiento en placas de agar MacConkey y agar con 5% de sangre de carnero, incubándose en iguales condiciones que las descritas anteriormente. A las 24 horas se seleccionaron al menos tres colonias translúcidas, convexas y de bordes regulares en el agar MacConkey; del agar-sangre se tomaron tres colonias hemolíticas o no, convexas y de bordes regulares, aislamientos que

se inocularon por punción y estría en los medios de diferenciación primaria: agar-hierro y dos azúcares de Kligler (AHK) y agar-hierro-lisina (AHL), ambos se incubaron en aerobiosis a 37°C, durante 18-24 h, y transcurrido ese período de tiempo se seleccionaron los cultivos que mostraron los siguientes resultados:

En AHK: utilización de la glucosa (oxidativa y fermentativamente), presencia o no de gas, producción o no de ácido sulfhídrico, utilización o no de lactosa (oxidativa y fermentativamente).

En AHL: descarboxilación o no de la L-lisina, producción o no de ácido sulfhídrico (12-13).

En todas las cepas se investigó la presencia de la enzima citocromo oxidasa, según el método de Kovacs (14); conjuntamente se les realizó la tinción de Gram e inoculación en caldo triptona-soya sin NaCl (15). Aquellas cepas que resultaron ser bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva y con crecimiento en el caldo triptona-soya se sometieron al estudio fisiológico del esquema de identificación fenotípica Aeroesquema (16).

Este método consiste en la utilización de seis pruebas bioquímicas (utilización de sacarosa, esculina, indol, descarboxilación o no de la ornitina y la dihidrolación de la arginina, así como la utilización de la glucosa a través del método de Voges-Proskauer). Las cepas del género *Vibrio* se sometieron a las pruebas de tolerancia con diferentes concentraciones de NaCl (0%, 3%, 6%, 10%, 12%) (15); a las que se identificaron como *V. cholerae* se les realizó la prueba serológica de aglutinación en lámina, utilizando el antisuero polivalente de *V. cholerae* O1 y el antisuero para *V. cholerae* O139. Las que se identificaron como pertenecientes al género *Aeromonas*, también fueron sometidas al sistema de identificación fenotípica Aerokey II, método que consiste en pruebas bioquímicas (utilización de la esculina, indol, glucosa, ácido de sacarosa y arabinosa, Voges-Proskauer y sensibilidad a la cefalotina)(17); a las cepas de *Plesiomonas shigelloides* se les investigó la descarboxilación de la ornitina, dihidrolación de la arginina y sensibilidad al compuesto vibriostático O/129.

Como cepas de referencia se emplearon: *Vibrio cholerae* no-O1 (CO32) ST+, cepario IPK, *Plesiomonas shigelloides* NCTC 5132 y *A. hydrophila* 9911 Princess Margaret Hospital, Australia, y *A. hydrophila* ATCC 7614.

Análisis estadísticos

Los datos se almacenaron y procesaron en el paquete de programas EPIInfo. Los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas de proporciones para comparar los porcentajes (valores mayores de 5). La prueba exacta de Fisher se utilizó para comparar los porcentajes cuando el número de casos analizados resultó menor que 5. Para determinar el grado de concordancia entre los dos métodos, se utilizó el índice de concordancia Kappa. En caso de un acuerdo perfecto la proporción de concordancia es de 1 y si la concordancia observada es igual a la esperada, el valor resulta 0. En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor que 0.05. Todos los análisis se desarrollaron empleando el paquete de programas EPIInfo, versión 6.04 (18).

RESULTADOS

Las 89 cepas aisladas de pacientes con EDA, procedentes de 9 Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología del país y pertenecientes al cepario del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK, se encontraban viables, resultando ser bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, que se comportaron en agar-hierro-dos azúcares de Kligler utilizando la glucosa oxidativa y fermentativamente, no así la lactosa, con producción o no de gas y ácido sulfhídrico, y en el medio agar-hierro-lisina descarboxilación o no de la lisina. El 100 % de las cepas en estudio presentaron codificación genética para la enzima citocromo oxidasa.

De las 89 cepas investigadas, 73 (82.0%) correspondieron al género *Aeromonas*, 7 (7.9%) fueron *Plesiomonas shigelloides* y 9 (10.11%) *Vibrio cholerae* no-O1 (**Cuadro 1**).

Cuadro 1
Distribución en género y especie de los bacilos gramnegativos investigados

Géneros y especies	No.	%
<i>Aeromonas</i> spp.	73	82
<i>Vibrio cholerae</i> no-O1	9	10.1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	7	7.9
Total	89	100

Con la prueba de proporciones se comparó la frecuencia de los diferentes géneros y especies de las cepas investigadas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tres géneros ($p < 0.001$).

Al aplicar el Aeroesquema se identificó el 100% de las especies pertenecientes al género *Aeromonas*. La distribución entre ellas resultó la siguiente: *A. hydrophila* 24 (32.9%); *A. caviae* 37 (50.7%); *A. veronii* biovariedad sobria 9 (12.3%); *A. veronii* biovariedad veronii 2 (2.7%) y *A. schubertii* 1 (1.4%) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2
Distribución de las especies identificadas correspondientes al género *Aeromonas*, aplicando el Aeroesquema

Especies de <i>Aeromonas</i>	No.	%
<i>Aeromonas caviae</i>	37	50.7
<i>Aeromonas hydrophila</i>	24	32.9
<i>Aeromonas veronii</i> bv sobria	9	12.3
<i>Aeromonas veronii</i> bv veronii	2	2.7
<i>Aeromonas schubertii</i>	1	1.4
TOTAL	73	100

Con la prueba de proporciones se comparó la frecuencia de las diferentes especies de las cepas investigadas, observándose diferencias estadísticas significativas entre las mismas ($p < 0.001$). La especie que se identificó con mayor frecuencia resultó *A. caviae* (50.7%) y la de menor frecuencia correspondió a *A. schubertii* (1.4%).

Como resultado de la aplicación del esquema Aerokey II, se identificaron las siguientes especies:

Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos

A. caviae 41 (56.2%); *A. hydrophila* 20 (27.4%); *A. veronii* biovariedad sobria 3 (4.1%); *A. veronii* biovariedad *veronii* 3 (4.1%); *A. schubertii* 3 (4.1%) y *A. trota* 3 (4.1%) (**Cuadro 3**).

Cuadro 3
Distribución de las especies identificadas correspondientes al género *Aeromonas* aplicando el Aerokey II

Especies de <i>Aeromonas</i>	No.	%
<i>Aeromonas caviae</i>	41	56.2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	20	27.4
<i>Aeromonas veronii</i> bv sobria	3	4.1
<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>veronii</i>	3	4.1
<i>Aeromonas schubertii</i>	3	4.1
<i>Aeromonas trota</i>	3	4.1
TOTAL	73	100

Cuando analizamos los resultados por el método de identificación Aerokey II se encontraron diferencias estadísticas entre las mismas ($p < 0.01$). La especie que se identificó con mayor frecuencia resultó *Aeromonas caviae* (56.2%) y con menor frecuencia la especie *A. veronii* bv sobria, *A. veronii* bv *veronii*, *A. schubertii* y *A. trota* (4.1% cada una).

En el **Cuadro 4** se describe la frecuencia de cada especie de *Aeromonas* en estudio, no encontrándose diferencias estadísticas significativas entre las frecuencias de identificación por cada esquema y para cada una de las especies de *Aeromonas* ($p > 0.05$). Excepto para la especie *A. veronii* bv sobria donde la frecuencia de detección resultó mayor con el Aeroesquema ($p < 0.05$).

Para determinar el grado de concordancia entre los dos métodos, se utilizó como estadígrafo el índice de concordancia Kappa, con el que obtuvimos un valor de $K = 0.698630$, lo que de acuerdo con la clasificación se considera como un nivel de concordancia substancial o bueno (**Cuadro 4**).

Cuadro 4
Resultados de la identificación bioquímica empleando los métodos AEROESQUEMA y AEROKEY II para las especies de *Aeromonas*

Especie de <i>Aeromonas</i>	Total*	Técnica de identificación	
		AEROESQUEMA No. (%)	AEROKEY II No. (%)
<i>A. caviae</i>	41	37 (90.2)	41 (100)
<i>A. hydrophila</i>	24	24 (100)	20 (83.3)
<i>A. schubertii</i>	3	1 (33.3)	3 (100)
<i>A. veronii</i> bv sobria	9	9 (100)	3 (33.3)**
<i>A. veronii</i> bv <i>veronii</i>	3	2 (66.7)	3 (100)
<i>A. trota</i>	3	0 (0)	3 (100)

*Identificados por cualquier método

** $P < 0.05$

DISCUSIÓN

Investigaciones realizadas en diversas regiones del mundo evidencian la presencia de las especies pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* en las personas con EDA y afecciones disentéricas prolongadas. No obstante, algunas especies se relacionan también con las infecciones extraintestinales (9).

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. Numerosos trabajos avalan la presencia de la circulación de *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* en diferentes regiones del mundo. Entre los estudios que muestran resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo, se encuentran el de Schwartz y colaboradores (2006) 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. En Estados Unidos se aíslan cepas de *Aeromonas* en muestras clínicas provenientes de pacientes con EDA que consumían agua proveniente de pozos privados (19-20). En Tailandia también notificaron aislamientos de *Aeromonas* (22.6%) obtenidos a partir de las heridas de los sobrevivientes del Tsunami, constituyendo el género

más identificado (21). En otras regiones como la de Porto Alegre (Brasil), Bizani y Brandelli (2001) aislaron en el agua de consumo (16.4%) y lavado (25.0%) utilizada en el proceso de desollado del ganado vacuno (22).

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo se describen en Kokalta, región de la India, donde en un estudio realizado durante dos años consecutivos en niños con EDA se comprueba el predominio de las siguientes especies de *Aeromonas*: *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* biovariedad sobria (23). Mientras que en México, Arteaga-Garibay y colaboradores (2006) estudian cepas provenientes de muestras clínicas diferentes (la mayoría de origen intestinal) y, al igual que en nuestro trabajo, señalan el predominio de las especies *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* biovariedad sobria (24).

Debido a la severidad del cuadro clínico que producen, durante mucho tiempo el estudio de las especies del género *Vibrio* se focalizó en los serogrupos asociados con el cólera (*V. cholerae* O1 y O139), ya que los mismos se reconocen como productores de enfermedad gastrointestinal (25). En los últimos años, se ha demostrado que las especies de mayor trascendencia clínica para el hombre son: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (3)

V. cholerae no-O1 se reconoce como agente causal de EDA, así como el responsable de brotes esporádicos y localizados de esta enfermedad (26). Los serogrupos de *V. cholerae* no-O1 se involucran con la emergencia de una nueva variante de *V. cholerae*. Esta hipótesis está sustentada por la génesis de que *V. cholerae* O139 es una cepa que puede haber evolucionado por la transferencia horizontal de genes del serogrupo O1 a los no-O1, confirmando a este último su potencial epidémico (27). Por la importancia clínica que reviste el cólera, las cepas de *V. cholerae* O1 y no-O1 se encuentran sujetas a diferentes medidas de prevención y control, vacunas, estudios clínicos-epidemiológicos, así como de sus factores de virulencia y de susceptibilidad a los antimicrobianos (28).

Estudios realizados en África por Ou y colaboradores (2003), empleando también los métodos convencionales, muestran, al igual que en este trabajo, que *V. cholerae* no-O1 se aisló de pacientes con EDA (29). También se observaron resultados similares a los descritos en un trabajo realizado en el norte de la India, donde *V. cholerae* no-O1 se aisló de pacientes con EDA (30). Además de esos trabajos, cepas de *V. cholerae* no-O1 se identificaron en individuos con síntomas diarreicos en diferentes provincias de Indonesia (31).

A pesar de que en la actualidad se discute el papel de *P. shigelloides* en los episodios diarreicos, por no existir un modelo animal adecuado donde se reproduzca esta enfermedad, *P. shigelloides* se considera un patógeno entérico en los individuos inmunocompetentes debido a su prevalencia en los aislamientos obtenidos de personas con EDA (1-16%), mientras que en los individuos asintomáticos sus porcentajes de aislamiento son muy bajos (0-1%) (32). Estos microorganismos se aíslan principalmente en los países tropicales y subtropicales durante los meses más calurosos del año (9).

Con el objetivo de facilitar la identificación de *Aeromonas* spp. en los laboratorios clínicos, Carnahan y colaboradores (1991) diseñaron un esquema denominado Aerokey II, sistema que proporciona una identificación confiable y segura de las cepas de importancia clínica (17). Posteriormente, Furawatari (1994) desarrolló un nuevo esquema que, además de identificar las especies de *Aeromonas*, discrimina también a *P. shigelloides* y dos especies de *Vibrio* (*V. cholerae* y *V. mimicus*) (16). Abbott y colaboradores (2003), así como Martin-Carnahan y Joseph (2005) diseñaron esquemas extensos de identificación fenotípica que permiten la clasificación de las especies de *Aeromonas* (10-12). Sinha y colaboradores (2004) realizaron un estudio para evaluar el Aerokey II, el cual permitió identificar satisfactoriamente en especie el 95.3-98.2% de las cepas clínicas recibidas durante un periodo de dos años (23).

Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos

Diversos estudios comparativos para la identificación en especie de los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas* han sido evaluados en otras áreas geográficas, entre los que se pueden mencionar los realizados por Longa y colaboradores (1997), en un estudio comparativo de cuatro métodos bioquímicos para la identificación de las especies del género *Aeromonas*, realizado en Mérida, Venezuela, donde demuestran que el Aerokey II en combinación con el esquema de Abbott resultó un método adecuado de identificación (33). Otro estudio realizado en México (5) utiliza la combinación de dos métodos de identificación. Estos autores emplean un sistema automatizado basado en pruebas bioquímicas (Vitek) y otro basado en técnicas de biología molecular (AFLP), demostrando una correspondencia de 38.5% entre ambos métodos (5).

De forma similar, nuestros resultados están acordes con lo publicado en la literatura especializada en relación con la utilización combinada de métodos de identificación para la determinación en especies del género *Aeromonas*, evidenciándose en esta investigación la utilidad de combinar el Aerokey II y el Aeroesquema, lo que nos permitió la identificación en especie de la totalidad de las cepas.

REFERENCIAS

1. **Organización Panamericana de la Salud.** La salud en las Américas. Washington, D. C.: OPS; Publicación Científica y Técnica No 587; 2002. p. 257-319.
2. **Freijoso E, Cires M, Silva L, Delgado I, Riverón R, Ramírez M.** Guía para la práctica de las enfermedades diarreicas agudas. Rev Cub Med Gen Integr 2003; 19:864-5.
3. **Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG.** Taxonomic outline of the Prokariotes. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd. ed. Release 4.0; Oct 2003. [Citado el 10 de febrero del 2008]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>.
4. **Figueras MJ.** Clinical relevance of *Aeromonas*. Rev Med Microbiol 2005; 16:145-153.
5. **Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Arteaga-Garibay NI, Carmona-Martínez AA, Pérez-Valdespino A, et al.** La identificación genética de *Aeromonas* una realidad y una necesidad en la Microbiología diagnóstica Bioquímica 2003; 28:11-18.
6. **Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador.** Reporte preliminar 2007. [Citado el 15 de Febrero de 2008]. Disponible en: http://www.mspas.gob.sv/vigi_epide2007/edad_consolidado2007.asp.
7. **Arbeit RD.** Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yueken RH, editors: Manual of clinical microbiology. 7a. ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p.190-208.
8. **Janda JM.** *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: Sussman M, ed. Molecular Medical Microbiology. San Diego: Academic Press; 2001. p. 1237-70.
9. **Galindo CL, Chopra AK.** *Aeromonas* and *Plesiomonas* species, En: Doyle MP and Beuch LR, editores. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington, D.C: ASM Press; 2007. p. 1-56.
10. **Brooks GF, Butel JS, Morse SA.** Microbiología Médica de Jawets, Melnick y Adelberg. 22da. ed. México: El Manual Moderno; 2001.
11. **Wong TY, Tsui HY, So MK, Lai JY, Tse CWS, Ng TK.** *Plesiomonas shigelloides* infection in Honk Kong: Retrospective study of 167 laboratory confirmed cases. Hong Kong Med J 2003; 6:375-80.
12. **Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WN, Sommers HM, Winn WC.** Diagnóstico microbiológico. 3era. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1998.
13. **Martin-Carnahan A, Joseph SW.** *Aeromonadaceae*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staly JT, Garrity GM, editors. The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2da. ed. Volumen 2. New York: Springer-Verlag; 2005. p. 557-578.
14. **Mc Faddin JF.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Baltimore: William and Wilkins; 2003.
15. **Abbot SL.** *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, y otras *Enterobacteriaceae*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgesen JH, Pfler MA, Yolken RH, eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th. ed. Washington D.C.: ASM Press; 2003. p. 684-700.
16. **Furuwatari CH, Kawakami Y, Akahame T, Hidaka E, Okimura Y, Nakayama J.** Proposal for an Aeroscheme (modified Aerokey II) for the identification of clinical *Aeromonas* species. Med Sci Res 1994; 22:617-9.
17. **Carnahan A, Behran S, Joseph S.** Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. J Clin Microbiol. 1991; 29:2843-9.
18. **Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA,**

- Smith DC, Burton AH, et al.** Epi Info Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta, GA: Centers for Disease Control. 1994.
19. **Schwartz B, Janson B, Ashraf I, Regina C, Sack D, Mohammad M, et al.** Diarrheal epidemics in Dhaka, Bangladesh, during three consecutive floods: 1988, 1998 and 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:1067-1073.
 20. **Borchardt MA, Stemper ME, Standridge JH.** *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 224-228.
 21. **Narin H, Worophot T, Krittavith L, Asda V y Boonma P.** Sking and soft-tissue infections among Tsunami survivors in southern Thailand. *Clin Infect Dis* 2005; 41:93-96.
 22. **Bizani D, Brandelli A.** Antimicrobial susceptibility, Hemolysis and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of bovine abattoir. *Braz J Microbiol* 2001; 32:334-339.
 23. **Sinha S, Shimada T, Ramamurty T, Bhattacharya S, Yamasaki Y and Balakrish Nair G.** Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Koalta, India. *J Med Microbiol* 2004; 53:527-534.
 24. **Arteaga-Garibay R, Aguilera-Arreola MG, Navarro A, Sanchez M, Molina J, Campos C, et al.** Serogroups, K1 antigen, and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. strains isolated from different sources in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 10:157-161.
 25. **Egli T, Koster W. and Meile L.** Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26:111-112.
 26. **Chatterjee SN, Chaudhuri K.** Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1639:65-79.
 27. **Boyd EF, Waldor MK.** Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTX Φ by bacteriophage CP-T1. *Infect Immun* 1999; 67:5898-905
 28. **Albert MJ, Siddique AK, Islam MN, Faruke AS, Ansaruzzaman M, Faruke SM, et al.** Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet* 1993; 431:704.
 29. **Ou TY, Liu JW, Leu HS.** Independent prognostic factors for fatality in patients with invasive *Vibrio cholerae* no-O1 infections. *J Microbiol Infect* 2003; 2:117-22.
 30. **Nair GB, Faruke SM, Bhuiy AN, Kamruzzaman M, Sidike AK, Sak EA.** New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor with attribute of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrheal in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3296-9.
 31. **Tjaniadi P, Lesmana M, Subeckti D, Machpud N, Komularini SH, Santoso W, et al.** Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *Am J Med Hyg* 2003; 68:666-670.
 32. **Austin B.** A brief history of ISAP. En: 8th. International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*; 2005 Jun 15-17, Halifax, Nova Scotia. p. 5.
 33. **Longa A, Bizcaya L, Nieves B, Bravo L, Bravo J.** Estudio comparativo de cuatro métodos para la identificación de especies del género *Aeromonas*. *Rev Cub Med Trop* 1997; 49: 45-47.