



Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba

Laura Bravo, Anabel Fernández, Judith Ledo, Margarita Ramírez, Adalberto Aguila, Fidel A. Núñez, Luis E. Cabrera y Yanaika Cruz.

Phenotypic characteristics and virulence factors in *Aeromonas* strains isolated from patients with diarrhetic disease in Cuba

Fifty four strains of *Aeromonas* spp were isolated from patients with acute diarrhetic episodes by using Aerokey II and Aeroesquema methods. In vitro antimicrobial susceptibility and virulence factors were analyzed. The most frequently isolated specie was *Aeromonas caviae*. Over 75% of strains exhibited resistance to penicillins and cephalosporins; for the other antibiotic groups resistance was under 20%. Twenty six strains (48.1%) were multiresistant. At least one virulence factor among those evaluated in the study was present in 53 (98.1%) of the 54 strains.

Key words: *Aeromonas*, in vitro susceptibility, antibiotic resistance, virulence factors.

Palabras clave: *Aeromonas*, susceptibilidad *in vitro*, resistencia antimicrobiana, factores de virulencia.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba.

(LB, AF, JL, MR, AA, FAN, YC).
Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de Güines, La Habana, Cuba (LEC).

Recibido: (2ª versión): 29 de enero de 2010

Aceptado: 10 de febrero de 2011

Correspondencia a:

Laura Bravo
laura@ipk.sld.cu

Introducción

Los miembros del género *Aeromonas* están ubicados taxonómicamente en la familia *Aeromonadaceae*, son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, que fermentan y oxidan glucosa, no utilizan lactosa, al menos rápidamente, son oxidasa positiva y están integrados por dieciocho geno-especies o grupos de hibridación¹.

Son habitantes de ecosistemas acuáticos que incluyen aguas subterráneas, aguas potables y de tratamiento, sistemas de distribución de aguas, plantas de reservas de aguas, así como lagos y ríos contaminados. También se han encontrado en ambientes marinos con bajas concentraciones de sodio, en estuarios, en el suelo, sedimentos, en alimentos incluyendo carne, pescado, vegetales, leche natural y aves comestibles.

Este agente desempeña un papel importante como patógeno primario del tracto gastrointestinal. También es capaz de producir infecciones tales como bacteriemia, septicemia, meningitis, neumonía, peritonitis, miocarditis, síndrome hemolítico urémico (SHU), infecciones hepato-biliares, respiratorias, oculares, vaginales, fascitis necrosante de heridas y nosocomiales, las cuales en ocasiones pueden comprometer la vida del paciente².

En Cuba las bacterias más frecuentemente involucradas en diarreas son especies de *Salmonella*, *Shigella* y algunos serotipos de *Escherichia coli*³. La introducción de la prueba de oxidasa para el estudio de los bacilos gramnegativos anaerobios facultativos por parte del

Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (LNR/EDA/IPK) en todos los laboratorios de la Red Nacional de Microbiología, ha permitido agregar a esta lista los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas*, los cuales han sido reconocidos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos como patógenos emergentes y la Organización Mundial de la Salud los considera como microorganismos de riesgo II^{4,5}.

Los mecanismos de patogenicidad en las infecciones causadas por especies de este género, tales como colonización, invasión y proliferación, le confieren la habilidad para causar daño en los tejidos del hospedero, así como evadir su sistema inmune. Se ha identificado una serie de factores de virulencia como hemaglutininas y productos extracelulares (toxinas, enzimas y sideróforos, entre otros). A su vez, un gran número de estructuras de la superficie celular parece tener un papel importante en la patogénesis de las infecciones intestinales y sistémicas, haciendo más complejo el cuadro clínico del paciente⁶.

El carácter autolimitado de las infecciones entéricas provocadas por *Aeromonas* sp reserva la terapia antimicrobiana para los casos de disentería grave, diarrea de duración prolongada, pacientes inmunocomprometidos con enfermedades subyacentes y ante una evidencia de infección extra-intestinal.

Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana se realizan, además, con fines investigativos y epidemio-



lógicos⁷. Desde hace dos o tres décadas se ha reportado un incremento de la resistencia bacteriana, incluso como un fenómeno cambiante, siendo necesaria la vigilancia antimicrobiana sistemática^{8,9}. Nuestro país no está ajeno a esta situación, por lo que es de gran utilidad conocer el comportamiento de las especies del género *Aeromonas* frente a los diferentes agentes antimicrobianos.

Por lo antes expuesto y por la importancia que reviste a nivel nacional e internacional la vigilancia microbiológica y epidemiológica de los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas*, así como la emergencia y diseminación de cepas resistentes a antimicrobianos, nos propusimos realizar un estudio descriptivo con el objetivo de conocer la susceptibilidad antimicrobiana y los factores de virulencia presentes en cepas aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 54 cepas de *Aeromonas* spp. referidas al LNR/EDA/IPK desde 14 Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba y del Municipio Isla de la Juventud, durante los años 2006 y 2007. Las cepas se aislaron a partir de heces de niños bajo cinco años de edad, con un cuadro clínico de diarrea aguda.

Las cepas preservadas en el medio de conservación para enterobacterias "Pasteur", elaborado siguiendo las instrucciones del Manual de Medios y Reactivos del Instituto Pasteur (1978), se inocularon en caldo cerebrocorazón y se incubaron en aerobiosis a 37°C (18-24 h). Posteriormente, se sembró una asada del cultivo en caldo en placas de agar MacConkey y agar sangre de cordero al 5%, incubándose en las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Al día siguiente se inocularon por punción ("picadura") 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 a 24 h^{10,11}.

A todas las cepas con perfil bioquímico característico del género se les investigó la presencia de la enzima citocromo oxidasa, según el método de Kovacs, y fueron identificadas hasta el nivel de especie aplicando los esquemas Aeroesquema y Aerokey II^{12,13}.

Se determinó la susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de las cepas de *Aeromonas* spp de origen intestinal y extra-intestinal mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer). Para la lectura e interpretación de los halos de inhibición se utilizaron los protocolos recomendados por el Instituto de Normas de Laboratorio Clínico (CLSI) 2007. Los antimicrobianos estudiados y carga por disco fueron: ácido nalidixico 30 µg; amikacina 30 µg; amoxicilina 25 µg; ampicilina 10 µg; aztreonam 30 µg; carbenicilina 100 µg; cefalotina 30 µg; ceftazidima 30 µg; ceftriaxona 30 µg; ciprofloxacina 5 µg; cloranfenicol 30 µg; doxiciclina

30 µg; estreptomycin 10 µg; gentamicina 10 µg; kanamicina 30 µg; penicilina 10 µg; sulfonamida 250 µg y tetraciclina 30 µg. Multiresistencia fue definida como la resistencia a tres o más clases de antimicrobianos¹⁴.

Se buscaron los siguientes factores de virulencia: producción de enzimas extracelulares (ADNasa, gelatinasa, elastasa, lecitinasa y hemolisina), titulación de la β-hemolisina y presencia de fimbrias.

La actividad de ADNasa fue investigada según MaFaddin¹⁶. Un halo rosado alrededor de las colonias en agar ADNasa con 0,01% de azul de toluidina indicó actividad de nucleasa. La enzima elastasa se determinó por la metodología establecida por Scharman¹⁷. Se inoculó por punteo en la superficie del medio de agar elastina, y se incubó hasta siete días a 37°C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de la enzima elastasa. El estudio de la enzima gelatinasa se realizó por la técnica descrita por Blazevic¹⁸. Se inoculó por punteo en la superficie del medio agar gelatina y se incubó 24 horas a 37°C. Una opacidad alrededor de la colonia indicó producción de la enzima gelatinasa. La presencia de la enzima lecitinasa se determinó por el protocolo recomendado por Boico¹⁹. Se inoculó por punteo en la superficie del medio agar lecitina y se incubó 48 horas a 37°C. Un halo transparente alrededor de la colonia mostró la presencia de esta enzima. Para investigar la presencia de β-hemolisina, se siguió la técnica descrita por Robinson²⁰. Se tomó una asada del cultivo y se inoculó en agar triptona triptona-soya suplementado con sangre de cordero al 5%. Se incubó 24 horas a 37°C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de esta enzima. Para la titulación de la β-hemolisina, se siguió la técnica de Burke²¹. Se tomaron 100 µL de filtrado libre de células y se realizaron diluciones seriadas en solución salina en placas de microtitulación de 96 pocillos, en forma de U, y se enfrentaron a un volumen igual de una suspensión de eritrocitos de conejo al 1%. La lectura se realizó en microscopio estereoscópico. Los títulos fueron dados como la última dilución donde había 50% de hemólisis. Se consideró positiva aquella reacción con un título mayor o igual a 1:4. Para determinar la presencia de fimbrias se procedió según el método de Nishikawa²². Se preparó una suspensión bacteriana y una suspensión al 3% de eritrocitos humanos grupo O de varios donantes. Se mezcló 20 µL de ambas en una lámina, se agitó durante 5 minutos y se consideraron positivas aquellas pruebas en las que se observó aglutinación de los eritrocitos.

Análisis estadístico: Se realizaron usando pruebas de proporciones para comparar los porcentajes. Para ello fue empleado el paquete de programas EPIINFO, versión 6.04¹⁵. En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de $p < 0,05$.



Resultados

Las 54 cepas estudiadas mostraron el perfil bioquímico característico, quedando ubicadas en el género *Aeromonas* familia *Aeromonadaceae*. Se identificaron las especies *Aeromonas caviae* 23 (42,6%), *Aeromonas hydrophila* 10 (18,5%), *Aeromonas veronii* biovar *sobria* 2 (3,7%), *Aeromonas veronii* biovar *veronii* 1(1,9%) y *Aeromonas* spp. 18 (33,3%)

Al analizar la susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de las 54 cepas de *Aeromonas* analizadas (Tabla 1), encontramos un predominio de cepas resistentes a penicilina, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina y cefalotina ($p < 0,01$). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de cepas resistentes y sensibles a tetraciclina y sulfonamida ($p > 0,05$).

Para el resto de los fármacos predominaron las cepas sensibles sobre las resistentes ($p < 0,01$). Es de destacar que entre estos últimos, amikacina, aztreonam, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina y gentamicina fueron

los antimicrobianos que mostraron los mayores niveles de sensibilidad, al ser la frecuencia de cepas sensibles en todos mayor a 90%.

Al comparar las frecuencias de los aislados resistentes entre *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, y *Aeromonas* spp., para cada fármaco, encontramos diferencias significativas sólo para sulfonamida ($p < 0,05$) siendo la frecuencia de aislados resistentes menor para *A. caviae*, y similar entre *A. hydrophila*, y *Aeromonas* sp ($p > 0,05$). Es necesario subrayar que en penicilina y ampicilina se encontraron los porcentajes mayores de resistencia para todas las especies mientras que los más bajos para todas especies se encontraron con ciprofloxacina, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam (Tabla 2). Del total de cepas estudiadas ($n = 54$); 26 (48,1%) resultaron multi-resistentes. Se obtuvieron 7 patrones de multi-resistencia en *A. caviae*, 6 en *Aeromonas* spp y 6 en *A. hydrophila*. Las especies *A. veronii* biovar *sobria* y *A. veronii* biovar *veronii* no presentaron multi-resistencia (Tabla 3).

Tabla 1. Susceptibilidad *in vitro* de 54 cepas de *Aeromonas* spp a antimicrobianos. Cuba 2006-2007

Antimicrobiano	Patrón de susceptibilidad <i>in vitro</i>					
	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
CAZ	52	96,3	1	1,8	1	1,8*
CRO	52	96,3	1	1,8	1	1,8*
AK	50	92,6	1	1,8	3	5,5*
ATM	50	92,6	3	5,5	1	1,8*
CIP	50	92,6	4	7,4	0	0*
G	49	90,7	3	5,5	2	3,7*
K	47	87,0	3	5,5	4	7,4*
C	44	81,5	4	7,4	6	11,1*
AN	42	77,7	0	0	12	22,2*
DO	37	68,5	9	16,7	8	14,8*
Su	29	53,7	6	11,1	19	35,2**
S	28	51,8	15	27,8	11	20,4 *
TET	28	51,8	8	14,8	18	33,3**
KF	10	18,5	2	3,7	42	77,7*
CAR	9	16,7	2	3,7	43	79,6*
AMX	2	3,7	0	0	52	96,3*
AMP	0	0	1	1,8	53	98,1*
P	0	0	0	0	54	100*

Prueba de comparación de proporciones entre las frecuencias de los aislados sensibles y los que se encontraron resistentes a *Aeromonas* para cada fármaco. * $P < 0,01$ ** $P \geq 0,05$.

Ácido nalidixico (AN); amikacina (AK); ampicilina (AMP); amoxicilina (AMX) aztreonam (ATM); carbenicilina (CAR); cefalotina (KF); ceftazidima (CAZ); ceftriaxona (CRO); ciprofloxacina (CIP); cloranfenicol (C); doxiciclina (DO); estreptomina (S); gentamicina (G); kanamicina (K); penicilina (P) sulfonamida (Su); tetraciclina (TET).



Tabla 2. Frecuencia de resistencia *in vitro* en 54 cepas de *Aeromonas* spp según especie. Cuba 2006-2007

Antimicrobiano	<i>Aeromonas caviae</i> (n = 23)		<i>Aeromonas</i> sp (n = 18)		<i>Aeromonas hydrophila</i> (n = 10)		<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i> (n = 2)		<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>veronii</i> (n = 1)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
SM	6	26,1	1	5,6	3	30	1	50	0	0
AK	0	0	3	16,7	0	0	0	0	0	0
K	0	0	2	11,1	2	20	0	0	0	0
G	0	0	1	5,6	1	10	0	0	0	0
P	23	100	18	100	10	100	1	50	1	100
AMX	21	91,3	17	94,4	10	100	1	50	1	100
AMP	23	100	18	100	10	100	1	50	1	100
CAR	17	73,9	13	72,2	10	100	2	100	1	100
ATM	1	4,4	0	0	0	0	0	0	0	0
KF	18	78,2	12	66,7	10	100	1	50	0	0
CAZ	0	0	1	5,5	0	0	0	0	0	0
CRO	0	0	1	5,5	0	0	0	0	0	0
DO	6	26,1	2	11,1	0	0	0	0	0	0
TET	7	30,4	7	38,9	4	40	0	0	0	0
Su	10	4,3	6	33,3	3	30	0	0	0	0
C	3	13	3	16,7	0	0	0	0	0	0
CIP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN	4	17,4	5	27,8	2	20	0	0	0	0

* Prueba de comparación de proporciones entre las frecuencias de los aislamientos resistentes de *A. caviae*, *A. hydrophila*, y *Aeromonas* sp., para cada fármaco.

Tabla 3 Patrones de multi-resistencia encontrados en cepas de *Aeromonas* spp aisladas en Cuba. Años 2006-2007

Especies	Patrones de multi-resistencia	Frecuencia/Porcentaje
<i>Aeromonas caviae</i> n = 23	AMP /TET /Su /KF*	3 (13,0%)
	SM / AMP/Su /C /AN /KF	2 (8,6%)
	SM /AMP //TET/Su /KF	2 (8,6%)
	SM /AMP /TET /Su /C /AN/KF	1 (4,3%)
	AMP /TET /Su	1 (4,3%)
	SM /AMP /ATM/DO /Su	1 (4,3%)
	AMP /AN/KF	1 (4,3%)
<i>Aeromonas</i> spp n = 18	AMP /Su /KF *	2 (11,1%)
	AMP /TET /AN /KF*	2 (11,1%)
	K /AMP /Su /C /AN /CAZ	1 (5,5%)
	AMP /TET /KF	1 (5,5%)
	CN /AMP /TET /Su /C /KF	1 (5,5%)
	AK /AMP /AN	1 (5,5%)
<i>Aeromonas hydrophila</i> n = 10	AMP /Su /KF	1 (10%)
	AMP /TET /KF	1 (10%)
	K /AMP /TET /Su /KF	1 (10%)
	SM /AMP /TET /KF	1 (10%)
	AMP /AN /KF	1 (10%)
	K /AMP / TE T /Su /AN /KF	1 (10%)

*Patrón más frecuente

De las cepas estudiadas 53/54 (98,1%) presentaron al menos un factor de virulencia, 49 (90,7%) al menos dos y 37 (68,5%) presentaron tres o más. La enzima ADNasa estuvo presente en 48 cepas (88,9%), lecitinasa en 45 (83,3%), gelatinasa en 33 (61,1%) y elastasa en 14 (25,9%). Trece cepas (24,1%) presentaron β-hemolisina cuyos títulos oscilaron entre 1:8 y 1:256; 17 cepas (31,5%) aglutinaron con los eritrocitos humanos y resultaron ser manosa sensibles.

Discusión

Las especies del género *Aeromonas* pueden ser aisladas de muestras clínicas, de animales y diferentes ambientes acuáticos. La prevalencia de las diferentes especies de *Aeromonas* varía según el área geográfica y el método utilizado para su identificación²³.

La baja incidencia del aislamiento e identificación de *Aeromonas* en diferentes áreas geográficas pudieran estar influenciadas, entre otros factores, por un inadecuado diagnóstico microbiológico^{24,25}.

Empleando el esquema Aerokey II para la identi-



cación de microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas*, en la India, Sinha y cols, caracterizaron siete especies como patógeno único²⁶. Los resultados de la presente investigación están acorde a los obtenidos por estos autores, quienes identificaron *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* biovar *sobria* a partir de heces de pacientes hospitalizados con diarreas agudas.

En España, Oyvin O y cols, identificaron varias especies del género *Aeromonas* a partir de 95 muestras de heces, resultando *A. caviae* la especie identificada en mayor porcentaje, resultado que coincide con los del presente estudio²⁷.

Desde hace dos o tres décadas se ha reportado un incremento de la resistencia bacteriana, incluso como un fenómeno cambiante, por lo que es necesario la vigilancia antimicrobiana sistemática^{28,29}. Nuestro país no está ajeno a esta situación, siendo imprescindible conocer el comportamiento de estas especies frente a los diferentes antimicrobianos.

La terapia antimicrobiana está bien justificada en pacientes inmunocomprometidos, en infecciones extra-intestinales y en aquellos donde la terapia de rehidratación oral no haya sido efectiva. La elevada resistencia a β lactámicos (penicilina, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina y cefalotina) se corresponde con lo reportado en la literatura científica por diversos autores para los microorganismos de este género³¹. Es importante destacar que la escasa resistencia a quinolonas y cefalosporinas observada puede ser debido a que son antimicrobianos de nueva generación que no han tenido un uso indiscriminado por la población cubana³².

En relación a los porcentajes de resistencia obtenidos con sulfonamida, nuestros resultados difieren con los publicados por Herrera ML y cols, en Costa Rica, quienes determinaron la susceptibilidad de cepas del género *Aeromonas* aisladas de heces de niños ingresados en el Hospital Nacional, arrojando una sensibilidad a sulfonamida de 89%³³.

Resultados semejantes a los nuestros obtienen Obi CL y cols, en Sudáfrica en 104 cepas del género *Aeromonas* aisladas de 309 muestras de origen intestinal, las cuales presentaron una elevada resistencia a penicilina (100%), amoxicilina (79%) y ampicilina (79%)³⁴.

Las cepas de *Aeromonas* investigadas en este estudio mostraron un elevado porcentaje de resistencia a ampicilina, comportamiento similar al descrito en Tailandia y Filipinas, donde en una investigación llevada a cabo en el año 2005, 90% de las cepas aisladas de diversas fuentes resultaron resistentes a este antimicrobiano³⁵.

En relación a los bajos porcentajes de resistencia para ciprofloxacina, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam, los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los obtenidos por Vila J y cols, en Italia en el año 2003, Pokhrel MB y cols, en el 2004 en Nepal y con los estu-

dios más recientes publicados en Turquía por Emekdas G y cols, en el 2006 en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda³⁶⁻³⁸.

El nicho ecológico y la frecuencia de uso de antimicrobianos en una región determinada pueden afectar significativamente el perfil de susceptibilidad de las diferentes especies de *Aeromonas* de diversas áreas geográficas³⁹.

En el género en estudio se ha identificado un gran número de estructuras y enzimas extracelulares que tienen un papel importante en la patogenicidad de las infecciones intestinales. Se han realizado numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* para identificar y caracterizar estos determinantes patogénicos. Muchas son las evidencias que correlacionan la producción de estos factores con el incremento de la patogenicidad⁴⁰.

La β hemolisina es considerada uno de los principales factores de virulencia asociados al cuadro diarreico⁴¹. Un bajo porcentaje de nuestros aislados poseían codificación genética para esta enzima; similares resultados obtuvieron Martins LM y cols, en Brasil al analizar 28 cepas del género *Aeromonas*, de las cuales 24,1% la presentó⁴². En cambio Bravo L y cols, obtuvieron 81% de actividad hemolítica en 27 cepas del género *Aeromonas* aisladas de 300 niños bajo 5 años de edad con enfermedad diarreica aguda en nuestro país, resultados que difieren de los obtenidos en el presente trabajo⁴³.

Longa A y cols, en Venezuela determinaron la presencia de β -hemolisina en 38% de las 44 cepas aisladas de 397 niños con diarreas, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio⁴¹.

Las enzimas extracelulares constituyen importantes factores de virulencia relacionados con la enteropatogenicidad de estas bacterias⁴⁰. La enzima extracelular identificada en mayor proporción en nuestro estudio resultó la ADNasa, seguida de la lecitinasa, gelatinasa y elastasa. Investigaciones realizadas por Abbott SL y cols, sobre la determinación de dichos factores de virulencia en el género *Aeromonas* evidenciaron la presencia de estas enzimas en los mismos porcentajes⁴⁴.

La técnica de la hemaglutinación reviste gran importancia en este tipo de investigaciones ya que permite detectar la presencia de fimbrias que intervienen en la adherencia de estas bacterias al enterocito⁴⁵. Sólo 31% de nuestras cepas presentaron hemaglutininas, de las cuales 100% fue sensible a manosa. Similares resultados publicaron Longa A y cols, al obtener 40% de cepas capaces de aglutinar con los eritrocitos humanos grupo O⁴¹.

En este trabajo se describen algunas propiedades de virulencia de las especies de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica en Cuba. Futuras investigaciones deberán relacionarse con los mecanismos genéticos de virulencia y de resistencia en estos microorganismos.



- 34.- Obi C L, Ramalivhana J, Igumbor E O, Samie A. *Aeromonas* species isolated from clinical samples in the Venda region of South Africa: prevalence, hemolysis, hemagglutination, beta lactamase production and antibiotic susceptibility profiles of the isolates. [8th International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Halifax: 2005].
- 35.- Petinaki E, Maniati M, Spiliopoulou I, Milona P, Spaliara L. Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp and *Plesiomonas shigelloides* isolates in the Philippines and Thailand. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 345-53.
- 36.- 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: 552-5.
- 37.- Pokherl M B, Thapa N. Prevalence of *Aeromonas* in different clinical and water samples with special reference to gastroenteritis. *Nepal Med Coll* 2004; 6 (2): 139-43.
- 38.- Emekdas G, Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Yildiz C, Ozturhan H, et al. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. *Int J Food Microbiol* 2006 April 1; 107 (3): 310-14.
- 39.- Janda J M, Abbott S L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 332-42.
- 40.- Castro-Escarpulli G, Figueras M J, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendon E, Aparicio GO, et al. Characterisation of *Aeromonas* spp isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int Food Microbiol* 2003; 4 (1): 41-9.
- 41.- Longa A, Vizcaya L, Nieves B, Bravo L, Morier L, Pérez I, et al. Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp aisladas de niños con diarrea en Mérida, Venezuela. *Rev Cub Med Trop* 2005; 57 (2): 85-91.
- 42.- Martins L M, Marquez R F, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 237-42.
- 43.- Bravo L, San German S, Monte R, Castillo A, Ramírez M, García B. Marcadores fenotípicos en cepas de *Aeromonas* aisladas en Cuba de niños con enfermedad diarreica aguda. *Rev Cub Med Trop* 1995, 47 (2): 114-7.
- 44.- Abbott S L, Ceung W K, Janda J M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (6): 2348-57.
- 45.- Bizani D, Brandelli A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Braz J Microbiol* 2001; 32 (4): 9-16.