

Aeromonas sp.: patógenos emergentes a considerar en aguas. **Aeromonas sp.: emergent pathogens to considerate in waters.**

Autores: María Isabel González González
Dr. C. en Ciencias de la Salud, Investigador Auxiliar, Profesor Instructo
Teresa Torres Rojas
Dr.C. en Ciencias Técnicas, Investigador Auxiliar
Sergio Chiroles Rubalcaba
Lic. en Microbiología, Aspirante a Investigador
Magaly Valdés Águila
Téc. A en Laboratorio Sanitario
Isaida Domínguez Martínez
Téc. A en Laboratorio Sanitario.

Resumen

El hábitat de las especies de *Aeromonas* son los ecosistemas dulceacuícolas y en los últimos años se han reportado como agentes etiológicos en infecciones intestinales y extraintestinales. En este trabajo, se evaluaron 855 muestras de aguas con la incorporación de un medio de cultivo de almidón-sales biliares-verde brillante (BBGS) según Nishikawa y Kishi con el aislamiento e identificación de 1410 cepas de *Aeromonas* y además, 662 cepas identificadas procedentes de provincias por el sistema de vigilancia de *Vibrio cholerae* en aguas. Se detectaron 429 muestras positivas (50.2%) al género en las diferentes fuentes de aguas analizadas, con los mayores aislamientos en las aguas subterráneas (85.2%) y superficiales interiores (83.3%), seguida de aguas residuales (69.2%); las menores positivities fueron en aguas costeras y de yacimientos de salinas (34.0% y 15.2%, respectivamente). Se obtuvieron siete muestras positivas en aguas del sistema de distribución con ausencia de coliformes totales y fecales y presencia de cloro residual adecuado. En las muestras procesadas las especies prevalentes resultaron *A. hydrophila* (38.8%), seguida de *A. veronii* biovar *sobria* (34.8%) y *A. caviae* (24.5%), mientras que en las cepas recibidas de provincias predominó *A. caviae* (56.8%), seguido de *A. hydrophila* (30.7%) y *A. veronii* biovar *sobria* (11.9%), especies reportadas como enteropatógenas.

Abstract

The habitat of the species of *Aeromonas* is the freshwater ecosystems and in the last years, they have been reported as etiologic agents in intestinal infections and extraintestinal infections. Water samples (855) were evaluated with the incorporation of bile salts brilliant green starch agar (BBGS) according to Nishikawa and Kishi, with the isolation and identification of 1 410 strains of *Aeromonas* of these samples and 662 strains received by the surveillance system of *Vibrio cholerae* in waters. In this work, 429 positive samples were reported (50.2%) to the genus in the different sources of waters analyzed with the biggest isolations to groundwater (85.2%) and superficial water (83.3%), followed by residual waters (69.2%) and smaller, in coastal waters and saline water (34.0% and 15.2%, respectively). Seven positive samples were obtained of the water distribution system with absence of total and faecal coliforms and presence of appropriate residual chlorine. In the processed samples, the predominant species were *A. hydrophila* (38.8%), followed by *A. veronii* biovar *sobria* (34.8%) and *A. caviae* (24.5%), while in the received strains of provinces, *A. caviae* prevailed (56.8%), followed by *A. hydrophila* (30.7%) and *A. veronii* biovar *sobria* (11.9%), species reported as enteropathogens.

Palabras Clave: ECOSISTEMAS; AGUAS; AGUAS SUBTERRANEAS

Introducción

El género *Aeromonas* es autóctono de ecosistemas acuáticos dulceacuícolas causando infecciones en animales de sangre fría y caliente y en humanos; en los últimos años se reportan como agentes causales de infecciones intestinales y extraintestinales. La diarrea es considerada la más frecuente manifestación clínica, que varía desde una gastroenteritis aguda, con diarrea profusa, fiebre, dolores abdominales y cólicos con vómitos, similar a una disentería o una diarrea más leve, siendo los síntomas similares a los de otros enteropatógenos bacterianos Gram negativos. Dentro de las extraintestinales, las infecciones en heridas son las de mayor incidencia, después de un trauma en ella o por contacto con agua (Altwegg, 1994; Janda y Abbott, 1999).

Aeromonas es el género tipo de la recién propuesta familia *Aeromonadaceae* (Colwell et al., 1986) cuyos microorganismos pueden ser diferenciados del género *Vibrio* por pruebas específicas. La clasificación taxonómica de las especies mesófilas está aún en discusión, proponiéndose en la actualidad diferentes especies según estudios desarrollados de hibridación del DNA. De ellas, las más frecuentemente asociadas a infecciones en humanos son: *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria* (aerogénicas) y *A. caviae* (anaerogénica) (Altwegg, 1994; Janda y Abbott, 1998).

Por lo general, las aeromonas pueden crecer bien sobre los medios de cultivo convencionales en el laboratorio, tales como agar MacConkey, agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), agar *Salmonella-Shigella* (SS) y agar nutriente sin adición de sales. Diferentes medios de cultivo y métodos para el aislamiento de *Aeromonas* sp. de aguas se han propuesto (APHA, 1989; Havelaar et al., 1987; Nishikawa y Kishi, 1987; Kersters et al., 1996) con la recomendación en general del empleo del agar ampicilina dextrina (ADA), actualmente incorporado en las normativas de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 2001) y la Agencia Ambiental del Reino Unido (SCA, 2002).

El principal problema en la utilización del ADA a nivel nacional para la generalización de la técnica era la dificultad de la adquisición de la dextrina, ingrediente del mismo y que no era comercializado por la mayoría de las firmas productora de medios de cultivos, por lo que se empleó el agar verde brillante-almidón-sales biliares (BBGS) según Nishikawa y Kishi (1987) que presentaba constituyentes factibles de adquirir en el país como peptona, almidón, sales biliares y verde brillante con una fácil lectura y selección de las colonias al añadirles a los cultivos en placa una solución de lugol.

Los mecanismos de patogenicidad se han relacionado con la producción de enzimas extracelulares y toxinas (citotoxinas y enterotoxinas), además existen mecanismos de hemaglutinación y de invasividad que se han detectado fundamentalmente en las especies de *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria* y *A. caviae* (Altwegg, 1994; Janda y Abbott, 1999) por lo que resulta de utilidad su clasificación bacteriana. Hoy en día, se han propuesto esquemas con pruebas bioquímicas fundamentales para la identificación de las especies del género tales como el Aerokey II, recomendado por Carnahan et al. (1991) y una modificación de éste propuesta por Furuwatari et al. (1996).

Cada día los reportes de las especies de *Aeromonas* relacionadas con enfermedades de transmisión hídrica se incrementan a nivel internacional y nacional. En Cuba se han encontrado elevados porcentajes de aislamientos en muestras clínicas, en su mayoría a partir de heces fecales de pacientes con enfermedades diarreicas agudas y principalmente de provincias orientales (Fernández et al., 2002; Silva et al., 2002)

prevaleciendo *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. trota* y además, se ha señalado en un estudio reciente (González, 2002) su presencia notable en diferentes tipos de aguas asociada con el género *Vibrio* con un mayor frecuencia de *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria* y *A. caviae*.

El objetivo de este trabajo es evaluar los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación de *Aeromonas* sp. En diferentes tipos de aguas desde la introducción de la técnica a nivel nacional desde 1988 hasta el 2001, con vistas a destacar su actual importancia como patógeno emergente a considerar en aguas.

Materiales y Métodos.

Durante los años 1988 al 2001 se procesaron en el Laboratorio de Microbiología de Aguas del INHEM un total de 855 muestras de diferentes fuentes de aguas cuyo número y procedencia son los siguientes:

- Aguas subterráneas (pozos y manantiales), 169.
- Aguas residuales, 133
- Aguas superficiales (ríos y embalses), 48
- Aguas costeras, 402.
- Aguas de yacimientos (hipersalinas), 46
- Aguas del sistema de distribución, 57

La toma, conservación y transporte de las muestras se realizaron en frascos estériles de 1000 ml cumpliéndose con el período de tiempo recomendado entre el muestreo y el análisis. Se aplicaron el método de concentración (por filtración de membrana o hisopo de Moore) y la siembra directa de agua según el tipo de muestra acorde APHA (1989).

Después de una incubación de la muestra en agua peptonada alcalina a pH 8.6 durante 24 horas a 37°C, se tomó inóculo y se estriaron placas de agar MacConkey y agar verde brillante-almidón-sales biliares (BBGS) (Nishikawa y Kishi, 1987) las cuales se incubaron de 18-24 horas a 35°C. Al menos tres colonias características se seleccionaron de cada medio y se inocularon por punción y estría en agar Kligler con una incubación de 18 a 24 horas a 37°C. A las cepas que presentaban fondo ácido, sin producción de gas ni de H₂S y una superficie alcalina en el plano inclinado se les realizaban las pruebas bioquímicas para su identificación en género y especie (Carnahan et al., 1991; Furuwatari et al, 1994). Además, en este período se recibieron un total de 662 cepas enviadas por las provincias, a través del sistema nacional de vigilancia de *Vibrio cholerae* en aguas, las cuales se reaislaron en agar soya triptona y se siguió la anterior metodología para su caracterización e identificación con las colonias seleccionadas.

Resultados y discusión.

Muestras de aguas.

En la Tabla 1 se observan los resultados de las muestras procesadas con 429 muestras positivas para un 50.2 % del total. Los mayores recobrados se obtuvieron en aguas subterráneas (85.2%), seguido de las superficiales interiores (83.3%) y de las residuales (69.2%), con valores menores en las aguas con salinidad más elevada (costeras y salinas), lo que reitera su hábitat en ambientes dulceacuícolas.

Tabla 1. Número de muestras positivas (%) del género *Aeromonas* en las diferentes fuentes de aguas. INHEM, 1988-2001.

FUENTES	Número de muestras analizadas	No. de muestras positivas (%)
Costeras	402	137 (34.0)
Subterráneas	169	144 (85.2)
Residuales	133	92 (69.2)
Sistema de distribución	57	9 (15.8)
Superficiales (ríos y embalses)	48	40 (83.3)
Yacimientos (hipersalinas)	46	7 (15.2)
TOTAL	855	429 (50.2)

Los mayores aislamientos de *Aeromonas* sp. con relación a las muestras de aguas subterráneas procesadas, correspondieron a las fuentes de aguas mineromedicinales estudiadas, generalmente bicarbonatadas cálcicas magnésicas.

Este género no se encuentra como microflora autóctona de aguas subterráneas (Holmes et al., 1996) pero sí se ha reportado como parte de ella en fuentes de aguas minerales con un bajo número de bacterias (Mosso et al., 1994). Además, poseen la capacidad de degradar una variedad notable de compuestos carbonáceos como fuente de carbono y la temperatura influye en su crecimiento (Schubert, 1991). Por ello, algunos investigadores (Warburton et al., 1993; Warburton, 2000) propusieron la detección de *A. hydrophila* en las normativas si estas aguas eran embotelladas. En Cuba, en una revisión publicada por González (2000) sobre la microbiología del agua mineral envasada, se hacen consideraciones con respecto a los indicadores de contaminación y en especial, la inclusión futura de su determinación en este tipo de agua.

Las aguas superficiales presentan una mayor variabilidad en sus características físicas, químicas y microbiológicas que las subterráneas, con un estado de trofismo muy amplio, desde el oligotrófico hasta el hipereutrófico, y son más afectadas por las actividades humanas (Borrell et al, 1998). Además, reciben la contaminación de animales domésticos y salvajes, de ahí la necesidad de su tratamiento eficaz para evitar la transmisión de enfermedades por microorganismos patógenos de riesgo como los de los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio*, entre otros.

Con relación a las fuentes de aguas superficiales se obtuvo un 83.3%, lo que apoya lo planteado por Holmes et al. (1996), donde se destaca el aislamiento de las especies del género *Aeromonas* en diferentes fuentes de aguas superficiales con distintos estados tróficos en el ecosistema y varios grados de contaminación fecal, relacionándose con algunos indicadores de contaminación fecal tales como, los coliformes con la propuesta de su determinación en el monitoreo de aguas.

Otros estudios consideran que las aeromonas pueden ser un riesgo para los bañistas en las aguas superficiales y existen discrepancias en cuanto a la correlación con los indicadores. En Nueva York, se realizó una investigación en el río Búfalo y cuatro de sus tributarios donde se reportó una estrecha correlación entre *Aeromonas* sp. y coliformes fecales, incrementándose su presencia durante el verano, especialmente en época de lluvia intensa (Pettibone, 1998).

Sin embargo, en una investigación desarrollada en Cuba en aguas superficiales con fines recreativos, se detectó una correlación estadísticamente significativa e inversamente proporcional entre los coliformes fecales y *Aeromonas* sp. (González et al., 1996). Esto coincide con lo reportado por otros autores (Burke et al., 1984, Pérez-Rosas y Hazen, 1989) en que las asociaciones entre estos indicadores y la presencia de *Vibrio* o *Aeromonas* no eran efectivas en aguas tropicales.

Además, en una investigación llevada a cabo en el río Lek de Holanda durante el triatlón de las Olimpiadas, se reportaron entre los atletas algunas infecciones como gastroenteritis (la más frecuente), afecciones respiratorias e infecciones en la piel y las mucosas. La media geométrica de los indicadores fecales fue relativamente baja y no se encontraron diferencias significativas entre éstos y las bacterias patógenas analizadas, destacándose que el género *Aeromonas* alcanzó la concentración mayor con una media geométrica de 190 por 100 ml de agua. El riesgo a la salud de los nadadores por la exposición al agua superficial (sobre todo un 75% de ellos reportaron la ingestión de agua) recomendó el diseño de este estudio en las aguas que se utilicen para deportes acuáticos de este tipo (Medema et al., 1995).

Es válido destacar que aunque fue bajo el número de muestras positivas a *Aeromonas* (15,8%) en aguas del sistema de distribución, estas bacterias no deberían estar presentes y además, si se considera que no se detectaron coliformes totales, ni coliformes fecales con la presencia de cloro residual dentro de los niveles recomendados (González et al., 2002).

Los microorganismos del género *Aeromonas* se han aislado en aguas del sistema de distribución como resultado de un inadecuado tratamiento de desinfección y pueden formar parte de la película (biofilm) que se forma en las tuberías del sistema de distribución. En ella se multiplica y persiste debido a su nutrición diversa, a partir de un amplio rango de compuestos de bajo peso molecular (aminoácidos, carbohidratos y ácidos carboxílicos), péptidos y ácidos grasos en concentraciones tan bajas como 0.1 µg de carbono por litro (Holmes et al., 1996). Esto se debe considerar al evaluar las fuentes de abastecimiento de aguas (subterráneas y superficiales) para garantizar la desinfección desde la fuente al consumidor y evitar la contaminación por estas bacterias.

La presencia de *Aeromonas* en aguas residuales crudas y efluentes tratados, con un número similar a los coliformes, indica que ellas son capaces de multiplicarse en estas aguas (Araujo et al., 1991; Holmes et al., 1996). En estos resultados se encontraron 92 muestras positivas para un 69.2% con una incidencia mayor en las muestras que procedían de plantas de tratamiento. Se han reportado diferencias en la reducción de las aeromonas según el tipo de tratamiento, como por ejemplo, el estudio desarrollado por Monfort y Baleux (1990) en lagunas de tratamiento de residual del sudeste de Francia, donde se encontró un incremento de aeromonas en los meses de verano (temperatura media >20°C) y una disminución en los meses de invierno; mientras que Stecchini y Domenis (1994) en plantas de tratamiento con lodos activados detectaron una reducción de aeromonas en un 96.7%.

Es de señalar que la mayoría de las muestras de las plantas de tratamiento eran del efluente, a pesar de la dosificación de cloro. Esto pudiera explicarse por la resistencia al cloro que presentan las aeromonas, apoyada por investigaciones recientes (Massa et al., 1999; Sisti et al., 1998) que reportaron una considerable resistencia en aguas influenciadas por materia orgánica, pH, temperatura del agua y la especie y cepa de *Aeromonas*. De notable importancia a tener en cuenta, es que se demostró que cuando la temperatura era de 20°C (de verano), la eficacia de las concentraciones de cloro examinadas eran de dos a tres veces más bajas que a temperaturas de 5°C

(invernales). Si se considera que la temperatura media anual aproximada de las aguas en Cuba oscila entre 20°C y 25°C, se pudiera plantear que la dosis empleada generalmente en la dosificación de los efluentes de las plantas, perdía efectividad y no inhibía el crecimiento de las bacterias en la mayoría de las muestras analizadas.

En aguas costeras se obtuvieron menores aislamientos (34.0%) al igual que en aguas de yacimientos hipersalinas (15.2%), Esto se puede explicar por el incremento de la salinidad ya que este género es capaz de crecer en concentraciones de sales de hasta 3% (Holmes et al., 1996; Janda y Abbott, 1998). Los aislamientos detectados pueden estar relacionados con la probable incidencia de los vertimientos de aguas albañales en las cercanías de los puntos de muestreo, que disminuye la salinidad y aumenta la presencia de materia orgánica, favoreciendo el crecimiento de estas bacterias.

En la Tabla 2 se observan el número de cepas (1410) según las especies identificadas del género *Aeromonas* aisladas de las muestras de agua analizadas. Acorde a las pruebas bioquímicas recomendadas (Carnahan et al., 1991; Furuwatari et al., 1994; Janda y Abbott, 1999), se clasificaron las especies de *Aeromonas*, encontrándose con mayor frecuencia *Aeromonas hydrophila* con 547 cepas (38.8%), seguida de *Aeromonas veronii* biovar *sobria* con 491 cepas (34.8%) y *Aeromonas caviae* con 345 cepas (24.5%). En menor número se aislaron *Aeromonas trota* y *Aeromonas jandaei* con 14 cepas (1.0%) y 13 cepas (0.9%) respectivamente.

Tabla 2. Número de cepas aisladas y porcentaje según especies de *Aeromonas* identificadas en diferentes fuentes de agua. INHEM, 1988-2001.

ESPECIE	Subte-rránea	Resi-dual	Super-ficial	Cos-tera	Salina	Sist. distri-bución	TOTAL
<i>A. hydrophila</i>	290	71	89	89	3	5	547 (38.8)
<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	31	55	287	104	3	11	491 (34.8)
<i>A. caviae</i>	118	108	22	83	7	7	345 (24.5)
<i>A. trota</i>	6	4	-	1	-	3	14 (1.0)
<i>A. jandaei</i>	6	-	-	2	-	5	13 (0.9)
TOTAL	451	238	398	279	13	31	1410
%	32.0	16.9	28.2	19.8	0.9	2.2	100

Cepas recibidas de provincias.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las especies de *Aeromonas* identificadas de las cepas recibidas por el sistema de vigilancia de *Vibrio cholerae* en aguas.

Tabla 3. Especies identificadas y número de cepas (%) de *Aeromonas* recibidas por el sistema de vigilancia en aguas. INHEM, 1988-2001

Especies	Número de cepas (%)
<i>Aeromonas caviae</i>	376 (56.8)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	203 (30.7)
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i>	79 (11.9)
<i>Aeromonas trota</i>	2 (0.3)
<i>Aeromonas schubertii</i>	2 (0.3)
TOTAL	662 (100.0)

La especie de mayor frecuencia identificada fue *Aeromonas caviae* (56.8 %) seguido de *Aeromonas hydrophila* (30.7%) y con menor frecuencia *A. veronii* biovar sobria (11.9%), *A. trota* (0.3%) y *A. schubertii* (0.3%) (Tabla 3). Estas cepas provienen en su mayoría de aguas residuales o aguas superficiales con cierto grado de contaminación, que son las que se priorizan en este sistema de vigilancia, lo que coincide con otros autores (Araujo et al., 1991; Schubert, 1991) donde *A. caviae* se aísla con mayor porcentaje en aguas residuales o superficiales contaminadas.

Estos resultados se asocian con algunas investigaciones realizadas en diferentes tipos de agua donde se ha demostrado que la especie *Aeromonas caviae*, biotipo anaerogénico, crece mejor en aguas con alto contenido de nutrientes como son las residuales y las aguas superficiales contaminadas, mientras que los biotipos aerogénicos (*Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii* biovar sobria) prevalecen en aguas oligotróficas (Araujo et al., 1991; Holmes et al., 1996; Schubert, 1991). Estas especies se han detectado en distintos ecosistemas acuáticos y por lo general, se encuentra predominio de una especie u otra en diferentes países relacionándose con las variaciones en el clima y los niveles de contaminación de las aguas.

Borrell et al. (1998) realizó una comparación entre las geno-especies identificadas de *Aeromonas* de muestras clínicas y ambientales y encontró que *A. veronii* biovar sobria fue la más frecuente aislada (41.5%) en lagos y reservorios y *A. hydrophila* (25.0%) en agua potable sin tratar. Estos resultados son similares a los de este estudio con respecto a las especies identificadas en las muestras de aguas superficiales y subterráneas.

Además, se han reportado como especies enteropatógenas del género, *A. hydrophila* y *A. veronii* biovar sobria, mientras que *A. caviae* no se ha aislado frecuentemente como agente causal de enfermedad diarreica aguda. Las dos primeras se asocian más con la producción de exotoxinas que incluye citoxinas, hemolisinas y enterotoxinas y mecanismos de invasividad (Altwegg, 1994; Janda y Abbott, 1996). En un estudio llevado a cabo por Monfort y Baleux (1990) en aguas residuales, se encontró que el 100% de las cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii* biovar sobria produjeron hemolisinas, mientras que el 96% de los aislamientos identificados como *A. caviae* fueron no hemolíticos.

Cada día existen más evidencias de que las infecciones por *Aeromonas* sp. en el hombre están a menudo asociadas a la exposición con el agua. En un interesante estudio llevado a cabo por Brandi et al. (1999) se demostró que cepas citotóxicas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar sobria (aisladas de muestras clínicas y ensayadas en diferentes tipos de agua), mostraban períodos de supervivencia variables acorde el tipo de agua y la especie. El mayor tiempo de supervivencia (viables hasta 100 días) se obtuvo en el agua mineral para las tres especies y algo menor en agua del grifo. En agua de mar se detectó que morían rápidamente (el 90% de reducción de células viables después de dos días), de ahí que se sugiriera que eran más sensibles al estrés de la salinidad del mar que a la cloración.

Con respecto a las especies *Aeromonas trota*, *Aeromonas jandaei* y *Aeromonas schubertii*, se identificaron con menor frecuencia. *Aeromonas trota*, especie nueva susceptible a la ampicilina; *Aeromonas jandaei*, especie nueva sacarosa negativa y *Aeromonas schubertii*, especie propuesta con manitol, sacarosa e indol negativo (Altwegg, 1994; Janda y Abbott, 1999) se han aislado en muy bajo número en muestras clínicas en infecciones extraintestinales (heridas o líquidos corporales como sangre y líquido pleural). Estas especies se han identificado por Stecchini y Domenis

(1994) en aguas residuales de plantas de tratamiento pero en general, se reportan muy pocos hallazgos en muestras ambientales.

Los resultados hallados indican la notable presencia del género *Aeromonas* en diferentes ecosistemas acuáticos cubanos y la necesidad de considerar a estas bacterias como un elemento de riesgo vinculado a la calidad de las aguas según sus usos. Se debe tener especial atención, con relación a las aguas subterráneas y superficiales que se utilicen como abastecimiento de aguas y la eficacia de su tratamiento y desinfección, así como, el sistema de distribución de agua con suministro discontinuo. Además, se deben vigilar las aguas minerales que se empleen como agua de bebida envasada, desde su captación, procesamiento y embotellado.

Bibliografía:

- Altwegg M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: Howard B, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC eds. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2ed. MO:St Louis,1994;337-82.
- American Public Health Association. *Standards Methods for the examination of water and wastewater*. 17 th ed. 1989; Washington, APHA, AWWA,JWPCF.
- Araujo R M, Arribas R M, Parés R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J Appl Bacteriol* 1991;71: 182-86.
- Borrell N, Figueras MJ, Guarro J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* 1998; 44:103-8.
- Brandi G, Sisti M, Giardini F, Schiavano GF, Albano A. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp. in different types of water. *Lett Appl Microbiol* 1999;29:211-15.
- Burke V, Robinson J, Gracey M, Peterson D, Partridge K. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:361-6.
- Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II: A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* 1991;29:2843-49.
- Colwell RR, MacDonell MT, DeLey J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Inst J Syst Bacteriol* 1986;36: 473-77.
- Environment Protection Agency. Method 1605: *Aeromonas* in finished water by membrane filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with vancomycin (ADA-V). October 2001, EPA-821-R-01-034.
- Fernández A, Bravo L, Ramírez M, Castañeda N, Cabrera R. Identificación en especie de cepas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología Suplemento* 2002;44(4):248.
- Furuwatari Ch, Kanakami Y, Akahane T, Aidaka E, Okimara Y, Nakayama J, Furihata K, Katsuyama T. Proposal of Aeroscheme (modified Aerokey II for the identification of clinical *Aeromonas* species. *Med Sci Res* 1994; 22:617-19.
- González MI, Torres T, Nolasco T. Bacterias enteropatógenas e indicadores de contaminación en aguas recreativas para campismo. En: *Serie Salud Ambiental No 4*. Cuba: ECIMED,1996;127-35.
- González MI. *Microbiología del agua mineral natural envasada: un tema en actual desarrollo*. *Alimentaria* 2000;316:85-91.
- González MI. *Aislamiento de Vibrio cholerae y especies asociadas en aguas*. Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias de la Salud, marzo 2002.
- González MI, Torres T, Chiroles S, López N, Valdés M, Domínguez I, Leyva Y. Perfeccionamiento de los métodos de evaluación microbiológica de muestras ambientales. Informe final de proyecto de investigación, diciembre 2002.
- Havelaar AH, During M, Versteegh JFM. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J Appl Bacteriol* 1987;62:279-87.
- Holmes P, Niccolls LM, Sartory DP. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. En: Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph S, eds. *The Genus Aeromonas*. United Kingdom: 1996, John Wiley & Sons, 1996: 127-50.
- Janda J M, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998;27:332-44.
- Janda JM, Abbott SL, 1999. Unusual food-borne pathogens. *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* and *Edwardsiella* species. *Clin Lab Med* 1999;19:553-82.
- Kerstens I, Smeyers N, Verstraete W. Comparison of different media for the enumeration of *Aeromonas* sp. in freshwaters. *J Appl Bacterio* 1996;81:257-61.
- Massa S, Armuzzi R, Tosques M, Cangarella F, Trovalli LD. Note: susceptibility to chlorine of *Aeromonas hydrophila* strains. *J Appl Microbiol* 1999;86:169-73.
- Medema GJ, van Asperen IA, Klokman-Houweling JM, Nooitgedagt A, vander Laar MJW, Havelaar AH. The relationship between health effects in triathletes and microbiological quality of freshwater. *Wat Sci Tech* 1995;31:19-26.

- Monfort P, Baleaux B. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl Environ Microbiol* 1990;56: 1999-2006.
- Mosso MA, de la Rosa MC, Vivar C, Medina MR. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. *J Appl Bacteriol* 1994;77:370-81.
- Nishikawa Y, Kishi T. A modification of bile salts brilliant green agar for isolation of motile *Aeromonas* from foods and environmental specimens. *Epidemiol Infect* 1987;98:331-36.
- Pérez-Rosas N, Hazen TC. In situ survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:495-9.
- Pettibone GW. Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. *J Appl Microbiol* 1998;85:723-30.
- Schubert RHW. *Aeromonads* and their significance as potential pathogens in water. *J Appl Bacteriol* 1991;70:131S-135S.
- Silva M, Selva AL, Sablón V, Díaz M, Escalante T. *Aeromonas*, retrospectiva de este microorganismo emergente en la Provincia Las Tunas. *Revista Latinoamericana de Microbiología Suplemento* 2002;44(4):267.
- Sisti M, Albano A, Brandi G. Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Lett Appl Microbiol* 1998;26:347-51.
- Standing Committee of Analysts. *The Microbiology of Drinking Water (2002)-Part 8-Methods for the isolation and enumeration of Aeromonas and Pseudomonas aeruginosa by membrane filtration. Methods for Examination of Waters and Associated Materials.* Environment Agency U.K., 2002, pp. 1-18.
- Stecchini ML, Domenis C. Incidence of *Aeromonas* species in influent and effluent of urban wastewater purification plants. *Lett Appl Microbiol* 1994;19: 237-39.
- Warburton DW. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada. Part 2. The need for more stringent standards and regulations. *Can J Microbiol* 1993;39:158-68.
- Warburton DW. The microbiological safety of bottled waters. En: Farber JM, Todd ECD, eds. *Safe Handling of Foods.* New York: Marcel Dekker, Inc., 2000;479-518.