



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Caracterización molecular de aislamientos de *Vibrio* spp., recuperados de cuerpos de agua en Colombia y recuperados a través de la vigilancia por laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS).**

**Lizeth Paola Sánchez Benavides**

Universidad Nacional de Colombia.  
Maestría en Ciencias-Microbiología.  
Bogotá, Colombia

2020



**Caracterización molecular de aislamientos de *Vibrio spp*, recuperados de cuerpos de agua en Colombia y recuperados a través de la vigilancia por laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS)**

**Lizeth Paola Sánchez Benavides**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias- Microbiología**

Director (a):

PhD. Magdalena Wiesner Reyes

Codirector (a):

Mg. Aura Lucía Leal Castro

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de Investigación:

Microbiología-Instituto Nacional de Salud

Universidad Nacional de Colombia.

Maestría en Ciencias-Microbiología.

Bogotá, Colombia

2020



# Dedicatoria

Con mucho amor y aprecio dedico todo el resultado de mi formación, primeramente, a Dios por respaldarme en cada momento de la vida, por los buenos y malos momentos que me hacen valorar aún más, lo que tengo y lo que soy, y por poner personas tan maravillosas en mi camino, que, con su amor permanente, comprensión, calidez de hogar y apoyo moral, contribuyeron con la culminación de este arduo pero hermoso camino.

*La meta final de la verdadera educación es no sólo hacer que la gente haga lo que es correcto, sino que disfrute haciéndolo; no sólo formar personas trabajadoras, sino personas que amen el trabajo; no sólo individuos con conocimientos, sino con amor al conocimiento; no sólo seres puros, sino con amor a la pureza; no sólo personas justas, sino con hambre y sed de justicia.*

*John Ruskin*



# **Agradecimientos**

Al culminar mi formación profesional solo me queda agradecer a cada una de las personas e instituciones que contribuyeron a su desarrollo.

Primordialmente agradezco a mi madre, padre, hermano y esposo (Alba Benavides, Clodomiro Sánchez, Wbeimar Sánchez y Giovanni Lugo) por brindarme su apoyo y guía incondicional y ser fuente de motivación e inspiración para cumplir mis metas.

Mi agradecimiento también va dirigido a la Universidad Nacional de Colombia y su programa de Maestría en Ciencias-Microbiología, por permitirme ser parte de ella, así como a los diferentes docentes que con su conocimiento forjaron mi aprendizaje.

Al grupo de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Salud y todos sus miembros, por acogerme y permitirme recurrir a su conocimiento y experiencia, durante el desarrollo de mi trabajo de grado, así como por confiar en mis capacidades, y de manera especial a mi Directora (Magdalena Wiesner Reyes) y Codirectora (Aura Lucia Leal) quienes con su conocimiento científico y orientaciones han logrado inculcar en mí el rigor académico necesario para culminar esta etapa académica y desear continuar por este camino.





## Resumen

El género *Vibrio* spp, ha cobrado relevancia a nivel mundial debido al incremento en ambientes acuáticos y causando casos clínicos denominados vibriosis. En la actualidad se desconoce la distribución y abundancia de este género en Colombia.

El objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar genotípicamente aislamientos de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*, recuperados de muestras ambientales (cuerpos de agua) y muestras clínicas (casos sospechosos para *Vibrio* spp.). Para ello se realiza búsqueda de las 5 especies mencionadas mediante PCR multiplex, adicionalmente se tamizaron los genes de virulencia (*ctxA*, *tcp*, *nanH*, *hlyA*), (*tdh*, *trh*), *vfh* y (*vcgC* o *vcgE*), en cada especie respectivamente y se estableció la relación clonal entre las especies mediante PFGE.

Se evaluaron 240 aislamientos: 195 de origen ambiental recolectados por INVEMAR en 2018 y 2019 y remitidos al INS de 2010 a 2019, y 45 de origen clínico remitidos al INS en el mismo periodo. Del total, 168 se identificaron y clasificaron como alguna de las 5 especies blanco. A nivel ambiental predominó *V. parahaemolyticus* (n=41) y *V. alginolyticus* (n=28), mientras que a nivel clínico predominó *V. cholerae* No O1/O139 (n=29) y *V. fluvialis* (n=23). Algunos aislamientos fueron portadores de genes de virulencia como: *nanH* (43%), *hlyA* (54.5%), *tdh* (16,4%), *vfh* (96%), *vcgC* (85.7%) o *vcgE* (14.2%). Todas las especies mostraron gran diversidad genética con presencia de algunos clones circulantes en el país. Se confirmó la presencia y distribución de 5 especies potencialmente patógenas de *Vibrio* en el país en muestras ambientales y clínicas, lo que podría considerarse como un problema de salud pública.

**Palabras clave:** Vibriosis, cuerpos de agua, PCR multiplex, genes, dinámica poblacional.

# Summary

The genus *Vibrio* spp has gained relevance worldwide due to the increase in aquatic environments and causing clinical cases called vibriosis. Currently the distribution and abundance of this genus in Colombia is unknown.

The objective of this work is to identify and genotypically characterize isolates of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* and *V. vulnificus*, recovered from environmental samples (bodies of water) and clinical samples (suspected cases for *Vibrio* spp.). To do this, the search for the 5 included species was carried out using multiplex PCR. In addition, the virulence genes (*ctxA*, *tcp*, *nanH*, *hlyA*), (*tdh*, *trh*), *vfh* and (*vcgC* or *vcgE*), in each species respectively, were screened. the clonal relationship between the species will be established using PFGE.

240 isolates were evaluated: 195 of environmental origin collected by INVEMAR in 2018 and 2019 and sent to the INS from 2010 to 2019, and 45 of clinical origin sent to the INS in the same period. Of the total, 168 were identified and classified as one of the 5 white species. At the prevailing environmental level, *V. parahaemolyticus* (n = 41) and *V. alginolyticus* (n = 28), while at the prevailing clinical level, *V. cholerae* No O1 / O139 (n = 29) and *V. fluvialis* (n = 23). Some isolates carried virulence genes such as: *nanH* (43%), *hlyA* (54.5%), *tdh* (16.4%), *vfh* (96%), *vcgC* (85.7%) or *vcgE* (14.2%). All statistical species have great genetic diversity with the presence of some circulating clones in the country. The presence and distribution of 5 potentially pathogenic *Vibrio* species in the country in environmental and clinical samples was confirmed, which could affect as a public health problem.

**Key words:** Vibriosis, water bodies, multiplex PCR, genes, population dynamics.

# Contenido

Pág.

<b>Resumen</b> .....	<b>V</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VI</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>X</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
<b>1. 1. Objetivos</b> .....	<b>7</b>
1.1    Objetivo General .....	7
1.2    Objetivos Específicos .....	7
<b>2. Marco Teórico</b> .....	<b>7</b>
2.1    Género <i>Vibrio</i> .....	7
2.1.1 <i>Vibrio cholerae</i> .....	7
2.1.2    Especies de <i>Vibrio</i> .....	9
2.2    Infecciones asociadas al género <i>Vibrio</i> . .....	11
2.2.1    Cólera.....	11
2.2.2    Vibriosis .....	12
2.3    Genes de virulencia.....	13
2.3.1 <i>Vibrio cholerae</i> .....	14
2.3.2    Especies de <i>Vibrio</i> .....	15
2.4    Técnicas para identificación de <i>Vibrio</i> spp. ....	17
2.4.1    Técnicas fenotípicas .....	17
2.4.2    Técnicas moleculares.....	18

VIII Caracterización molecular de aislamientos de *Vibrio* spp, recuperados de cuerpos de agua en Colombia y recuperados a través de la vigilancia por laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS).

---

2.5	Cólera en Colombia .....	20
2.5.1	Vigilancia Instituto Nacional de Salud.....	20
<b>3.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>23</b>
3.1	Población de estudio .....	23
3.2	Identificación de <i>Vibrio</i> spp. ....	25
3.2.1	Extracción de ADN bacteriano. ....	25
3.2.2	Protocolo general PCR .....	26
3.2.3	Identificación de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> ..	26
3.2.4	Identificación de <i>V. cholerae</i> .....	29
3.3	Identificación de Genes de virulencia.....	30
3.4	Tipificación mediante electroforesis en gel de campos pulsados. ....	32
3.5	Análisis estadístico. ....	34
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>35</b>
4.1	Identificación de <i>Vibrio</i> spp. ....	35
4.1.1	Estandarización Múltiple <i>Vibrio</i> PCR .....	35
4.1.2	Identificación de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en aislamientos clínicos y ambientales.....	38
4.2	Identificación de genes de virulencia .....	49
4.2.1	<i>V. cholerae</i> No O1/O139. ....	49
4.2.2	Especies de <i>Vibrio</i> .....	50
4.3	Tipificación mediante electroforesis en gel de campos pulsados .....	53
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>59</b>
5.1	Conclusiones .....	59
5.2	Recomendaciones.....	60
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>73</b>

## Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 2-1: Clasificación de <i>V. cholerae</i> . .....	8
Figura 2-2: Distribución de las especies causantes de vibriosis en Estados Unidos (2010-2014)..	13
Figura 3-3: Mapa de los departamentos a muestrear por INVEMAR y departamentos que remiten muestras al programa de vigilancia.....	24
Figura 4-4: Bandas amplificadas en cada PCR monoplex por especie. ....	35
Figura 4-5: Especificidad de la PCR multiplex.....	36
Figura 4-6: Límite de detección de cada iniciador a diferentes concentraciones de ADN. ....	37
Figura 4-7: Múltiple Vibrio PCR. ....	38
Figura 4-8: PCR para identificación de <i>V. cholerae</i> . ....	38
Figura 4-9: Distribución de <i>Vibrio</i> spp en Colombia, recuperado entre 2018 y 2019 por INVEMAR. ....	43
Figura 4-10: Distribución de <i>Vibrio</i> spp en Colombia, recuperado entre 2010 a 2019 en el programa de vigilancia intensificada de cólera. ....	46
Figura 4-11: Comparación de la distribución entre aislamientos remitidos por INVEMAR y aislamientos remitidos al programa de vigilancia del INS entre 2018 y 2019. ....	48
Figura 4-12: PCR para identificación de genes <i>nanH</i> y <i>hlyA</i> . ....	49
Figura 4-13: PCR para genes <i>tdh</i> y <i>trh</i> . ....	50
Figura 4-16: Dendograma aislamientos de <i>V. cholerae</i> No O1/O139. ....	54
Figura 4-17: Dendograma preliminar aislamientos de <i>V. parahaemolyticus</i> . ....	55
Figura 4-18: Dendograma de aislamientos de <i>V. alginolyticus</i> . ....	56
Figura 4-19: Dendograma de aislamientos de <i>V. fluvialis</i> . ....	57
Figura 4-20: Dendograma aislamientos de <i>V. vulnificus</i> .....	58

## Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 2-1: Asociación de especies de <i>Vibrio</i> con diferentes casos clínicos.....	12
Tabla 3-2: Características de la población estudiada. ....	25
Tabla 3.3: Iniciadores para identificación de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> y <i>V. vulnificus</i> .....	27
Tabla 3-4: Aislamientos utilizados para evaluar la especificidad de la PCR multiplex.....	28
Tabla 3-5: Iniciadores para la confirmación de <i>V. cholerae</i> , detección de toxinas y serotipificación. ....	29
Tabla 3-6: Iniciadores utilizados para identificar genes de virulencia de <i>V. cholerae</i> y 4 especies. ....	31
Tabla 3-7: Mezcla maestra para la restricción del ADN en los bloques. ....	33
Tabla 4-8: Distribución de aislamientos ambientales remitidos por INVEMAR. ....	39
Tabla 4-9: Distribución por departamento de especies de <i>Vibrio</i> spp, aisladas de INVEMAR.....	41
Tabla 4-10: Distribución de aislamientos recibidos a través del programa de vigilancia intensificada de cólera.....	44
Tabla 4-11: Distribución de especies de <i>Vibrio</i> , por departamento correspondiente a los aislamientos de programa de vigilancia intensificada.....	45

# Introducción

El género *Vibrio*, es habitante natural de ambientes acuáticos especialmente marinos, algunas especies son patógenas en humanos, ocasionando infecciones gastrointestinales o extraintestinales denominadas en conjunto como vibriosis, causadas por especies tales como; *V. cholerae* No O1/O139, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*, hasta casos más graves como cólera, causada por *Vibrio cholerae* O1/O139, tras la transmisión por consumo de agua o alimentos contaminados (Banerjee, R., Das, B., Nair, B., Basak, S., 2014).

*Vibrio* spp. ha cobrado gran relevancia a nivel mundial, debido al incremento en los últimos años en casos clínicos como en reservorios ambientales, esto como resultado de variaciones en la dinámica poblacional de estos microorganismos (Esteves et al., 2015; Johnson, 2015; Vezzulli et al., 2016; Martinelli, Lopes, Rivera, y Colwell, 2016), influidas por variables ambientales, tales como la temperatura, y la salinidad en los ecosistemas acuáticos, actualmente varios autores sostienen que las cepas persisten en diferentes nichos ambientales (Baker, Trinanes, Gonzalez y Martinez, 2017; Vezzulli, Pezzati, Brettar, Hofle y Pruzzo, 2015; Siboni, Balaraju, Carney, Labbate, y Seymour, 2016).

En el país la vigilancia intensificada del cólera, fue implementada como obligatoria desde 2010, allí se confirman rutinariamente aislamientos de muestras clínicas y de agua de interés en salud pública sospechosas de *V. cholerae*, remitidas desde los laboratorios de salud pública departamentales (LSPD) al Instituto Nacional de Salud (INS), no obstante, no ocurre lo mismo con las vibriosis, pues no son de vigilancia ni notificación obligatoria en el país, sin embargo, como resultado del programa de cólera, se han recuperado aislamientos de

otras especies de *Vibrio*, lo que plantea la existencia de reservorios ambientales de las mismas, y por ende potenciales focos de brotes, siendo esto una amenaza latente para la población colombiana. La identificación de estas especies en el laboratorio es fenotípica, se realiza aislamiento en medios selectivos, pruebas de cuerda y oxidasa e identificación presuntiva mediante VITEK o API20E, lo que plantea un problema pues esta requiere al menos 2 técnicas fenotípicas para confirmación de la especie debido a las reacciones inespecíficas que puede generar, en contraste la identificación molecular solamente se encuentra estandarizada para aislamientos de *V. cholerae*, sin embargo se considera necesario implementar metodologías moleculares con el fin de realizar una identificación más rápida y específica de especies de *Vibrio* (Instituto Nacional de Salud [INS], 2011).

El impacto de la presencia de *Vibrio* spp. en sistemas acuáticos del país está ligado a factores de riesgo, como: actividades de acuicultura, la cual es de gran importancia económica en las costas del país, intercambio comercial y turístico, que plantea riesgo de importación de casos, abastecimiento con agua no potable en algunos lugares alejados del país (INS, 2011), esto sumado a las condiciones geográficas y fronterizas y a una problemática a nivel mundial como es el cambio climático y su influencia en la dinámica poblacional de las especies mencionadas (Dickinson, Lim y Jiang, 2013; Roux et al., 2015).

Si bien otros países como USA y algunos en Europa, realizan vigilancia y monitoreo de especies de *Vibrio* a nivel ambiental y clínico, actualmente, los reservorios ambientales de *Vibrio* spp en cuerpos de agua naturales en la zona costera de Colombia son inciertos, así como su incidencia y distribución en casos clínicos por tanto, se pretende conocer su distribución y frecuencia, realizar caracterización de diferentes factores de virulencia que les confieren capacidad infecciosa y patogénica (Boucher y Stokes, 2006), además de conocer la diversidad genética de las especies y establecer la relación filogenética entre aislamientos ambientales y clínicos, todo esto con el fin de identificar potenciales focos de cólera y vibriosis en el país, y así mismo tener indicios de la actual dinámica poblacional y relación clonal de las cepas circulantes en Colombia.



## Antecedentes

Dada la emergencia de especies de *Vibrio* en infecciones humanas, se han llevado a cabo a nivel mundial diferentes investigaciones, con el fin de caracterizarlas. Entre los estudios a nivel internacional, se destacan los realizados por el grupo de Colwell, cuyo objetivo ha sido la identificación y caracterización de especies de *Vibrio*, en varios países alrededor del mundo, así como la determinación de la influencia de diversos factores ambientales en la distribución de este género bacteriano en los nichos ecológicos. En sus investigaciones, ha desarrollado la identificación de las especies mediante pruebas bioquímicas, serotipificación, técnicas moleculares, así como la caracterización de patogenicidad mediante la identificación de diferentes factores de virulencia y resistencia a antibióticos, igualmente ha determinado la epidemiología molecular y evolución filogenética de varias especies, encontrando así presencia de especies de *Vibrio*, especialmente *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, portadoras de genes de virulencia que codifican para hemolisinas, proteasas, colagenasas entre otros y que muestran resistencia a numerosos antibióticos de uso clínico (Ceccarelli et al., 2015; Chen et al., 2017; Kahler et al., 2015).

Otros estudios reportados, han sido los de Huehn y cols., desde 2014, cuyo objetivo ha sido determinar la prevalencia de *Vibrio* spp., en diferentes cuerpos de agua y alimentos marinos alrededor del mundo, así como la caracterización molecular de los aislamientos, con el fin de determinar su patogenicidad, mediante la identificación de genes de virulencia, para este fin también ha realizado la identificación de resistencia a antimicrobianos, así como el análisis de la diversidad genética y finalmente la correlación de la emergencia de estos patógenos en diferentes países, asociada con variaciones en factores medioambientales; encontrando así que efectivamente diferentes especies de *Vibrio* son ubicuas en los ambientes acuáticos y se asocian a diferentes hospederos, como ostras y camarones, entre otros, lo cual demuestra la importancia de caracterizar la virulencia y patogenicidad de las

cepas ambientales, para determinar su potencial patogénico (Koralage et al., 2012; Huehn et al., 2014; Roux et al., 2015; Tra et al., 2016; Vu, Alter y Huehn, 2018).

En Colombia, se han realizado unos pocos estudios para la identificación y caracterización de *Vibrio* spp, sin embargo, en la actualidad no se conoce la distribución, capacidad patogénica y variedad genética de los mismos. Los primeros estudios se realizaron en la década de los 90, a raíz de una ola epidémica de cólera cuyo ingreso se dio desde Perú, su dispersión se mantuvo fuertemente hasta el año 1993, y se presentaron casos aislados hasta el 2004, incluyendo el último caso en el país asociado a esta epidemia. En este periodo Valenzuela y cols, en 1997, realizaron un estudio con el fin de determinar diferentes especies de *Vibrio*, especialmente *V. cholerae*, en 11 muestras de agua de la costa pacífica y atlántica, mediante cultivo, pruebas bioquímicas, serotipificación, presencia de enterotoxina colérica, además de susceptibilidad antibiótica, encontrando así 15 aislamientos clasificados como: *V. cholerae* No O1/O139 resistente a todos los antibióticos evaluados, además de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*, las cepas encontradas en reservorios ambientales podrían representar bacterias con potencial patogénico (Valenzuela, Mantilla y Agudelo, 1997). Estudios más recientes, del 2003 realizados por Riaño y cols., sobre diversidad genética de aislamientos pertenecientes a la epidemia del cólera en Colombia, mostraron amplia diversidad genética entre las cepas evaluadas, por tanto se planteó la coexistencia de varias cepas o clones diferentes, dejando en incógnita si la población de *V. cholerae*O1/O139 perteneciente a la epidemia del país perteneció a un único clon con gran capacidad de intercambio genético o si coexistieron diferentes clones simultáneamente durante la epidemia (Riaño, Valenzuela, Mantilla y Agudelo, 2003).

Otro estudio realizado post pandemia en 1997, por Tamayo y cols., caracterizó la presencia de los genes *ctxA* y *zot* en 173 aislamientos de la epidemia, mediante PCR, hibridación y ribotipificación, encontrando presencia de los 2 genes en todos los aislamientos evaluados, así como un ribotipo predominante asociado a la epidemia, confirmando la relación genética de las cepas evaluadas (Tamayo, Koblavi, Grimont, Castaneda y Grimont, 1997).

Entre los estudios publicados recientemente, en 2006 en Cartagena, se determinó mediante cultivo y pruebas bioquímicas manuales y semiautomatizadas, ostras contaminadas por diferentes especies de *Vibrio* (30/67 ostras) correspondiente al 45%, las especies predominantes fueron: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. fluvialis*, descritas como patógenas para el humano, evidenciando así la posibilidad de transmisión a través del consumo de alimentos marinos contaminados, si son consumidos sin técnicas adecuadas de cocción (López et al., 2010).

Un estudio desarrollado en Tumaco en el 2010 por parte de Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico, evaluó la presencia de *V. cholerae* en aguas de lastre de buques con rutas internacionales que arriban al Puerto de Tumaco, para ello se muestrearon descargas de agua de 18 buques de los cuales 12 de ellos correspondiente a 67%, registró presencia de *V. cholerae*. La identificación microbiológica se realizó mediante cultivo y pruebas bioquímicas, por lo cual no fue posible realizar la diferenciación entre cepas de *V. cholerae* No O1/O139 y No O1/O139, sin embargo, si es clara la constante exposición ante eventos de movilización microbiana que pueden alterar microbiota acuática nativa resultando esto riesgoso para la salud pública del país (Rodríguez, 2011).

Uno de los antecedentes del grupo de investigación en Microbiología del INS, caracterizó diferentes cepas pertenecientes a la epidemia del 90 y algunas no epidémicas provenientes de la vigilancia por laboratorio de cólera, usando genómica comparativa, mediante secuenciación del genoma completo se logró la identificación de genes codificantes de la toxina *ctxAB*, las islas de patogenicidad VPI-I, VPI-II, VSP-I, VSP-II y WASA, además de otros elementos genéticos, encontrando así la distribución de características genéticas específicas para cada aislamiento, se logró la clasificación de aislamientos entre 1991 y 2014, en diferentes linajes de *V. cholerae*, sumado a esto se logró la identificación de cepas ambientales con elementos genéticos que en un principio se conocieron como únicos de aislamientos toxigénicos, lo que sugiere eventos de transferencia genética y adicionalmente provee información acerca de los aislamientos circulantes en nuestro país (Montaño et al., 2017; Wiesner, manuscrito en preparación).



## 1.1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Caracterizar genotípicamente aislamientos de 5 especies de *Vibrio*, de origen ambiental recuperados de cuerpos de agua de 5 departamentos de Colombia, y los recuperados a través de la vigilancia por laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS).

### 1.2 Objetivos Específicos

- Identificar *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* mediante PCR multiplex, en aislamientos del programa de vigilancia y aislamientos ambientales recuperados de cuerpos de agua.
- Determinar la presencia de genes de virulencia en aislamientos de *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* mediante PCR convencional, en aislamientos del programa de vigilancia y aislamientos ambientales recuperados de cuerpos de agua.
- Establecer la relación genética entre aislamientos recuperados de la vigilancia y aislamientos ambientales de *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).



## **2. Marco Teórico**

### **2.1 Género *Vibrio***

El género *Vibrio*, está conformado por bacilos curvos Gram negativos, cuya gran mayoría habita de manera ubicua en ambientes acuáticos marinos de manera libre o en asociación a fito/zooplancton, lo que es posible dada su resistencia a diferentes concentraciones de NaCl, otras características fisicoquímicas relevantes son: aerobiosis facultativa, catalasa y oxidasa positiva, antígeno somático O y crecimiento en un amplio rango de temperatura (García, Hernández, Herrero y Gómez, 2010).

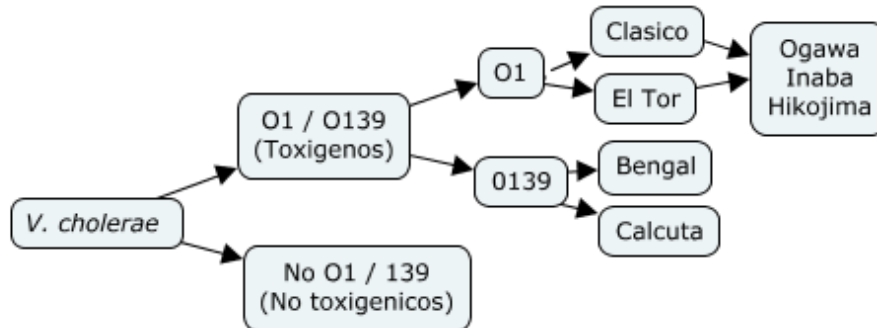
Este género comprende al menos 80 especies de las cuales 12 son patógenas para humanos entre estas; *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluviales*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. mimicus*, *V. furnisii*, *V. metschnikovii* y *V. cincinnatiensis*, *V. carchariae*, resultando de mayor importancia las 5 primeras pues se han visto implicadas a nivel mundial causando diferentes enfermedades (Morris y Achenson, 2003) como: cólera, causada por *V. cholerae* O1/O139, y un conjunto de infecciones denominadas vibriosis que abarcan cuadros de gastroenteritis, infecciones en heridas y tejidos blandos y septicemia, al menos 8 de estas especies se han visto implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Morris y Achenson, 2003).

#### **2.1.1 *Vibrio cholerae*.**

Esta especie es de vida libre en ambientes acuáticos con salinidad moderada, sin embargo, es considerada también un patógeno humano. Actualmente se conocen alrededor de 200 serogrupos que incluyen cepas toxigénicas y no toxigénicas, como detalla la figura 2-1, esta clasificación está dada con base en la presencia del polisacárido O (antígeno A), mientras

que la clasificación en serotipos depende de las combinaciones de los antígenos somáticos B y C, finalmente la clasificación de los biotipos se realiza de acuerdo con características fenotípicas específicas (Percival y Williams, 2014).

Figura 2-1: Clasificación de *V. cholerae*.



Adaptado de Banerjee et al., 2014.

- *O1/O139.*

Las cepas toxigénicas incluyen los serogrupos O1 y O139, el serogrupo O1 puede clasificarse en los biotipos clásico y el Tor, los que a su vez se dividen en serotipos: Inaba, Ogawa y Hikojima; por otra parte, el serogrupo O139 puede dividirse en serotipos Bengal y Calcuta (Faruque, Albert y Mekalanos, 1998; Faruque y Nair, 2002). En conjunto estos 2 serogrupos, son responsables de las siete pandemias ocurridas en la historia, las 6 primeras pandemias han sido causadas por *V. cholerae* O1 biotipo clásico, y por el contrario la séptima y actual pandemia es causada por el biotipo El Tor (Faruque et al., 1998).

- *No O1/O139.*

En este grupo se incluyen cerca de 200 serogrupos, todos aquellos diferentes a O1/O139, que se han denominado conjuntamente como No O1/O139, puesto que no son portadores de la toxina colérica y han sido descritos como causantes de infecciones intestinales moderadas, así como infecciones extraintestinales (Chowdhury et al., 2016). Aunque su importancia clínica se subestima, algunos aislamientos se han encontrado albergando diferentes genes



de virulencia como: *tcpA*, *rtx*, *msh*, *nanH* y *hlyA*, asociados con mayor capacidad infectiva y de colonización y otros en la supervivencia en el medio ambiente (Chakraborty et al., 2000; Chowdhury et al., 2016; Hasan et al., 2013), incluso algunos estudios han reportado aislamientos con presencia de toxina colérica aun siendo clasificados como No O1/O139 o no toxigénicos, lo que sugiere el importante papel como reservorio ambiental de genes (Dalsgaard et al., 2001; Madhusudana y Surendran, 2013).

### 2.1.2 Especies de *Vibrio*

- *V. parahaemolyticus*.

Esta especie es frecuentemente aislada en casos de gastroenteritis causada por *Vibrio* spp., su transmisión está dada por consumo de alimentos marinos contaminados, especialmente mariscos crudos (Newton et al., 2014). En los últimos años se ha observado en diferentes países, un aumento en la incidencia de infecciones por *V. parahaemolyticus*, asociado posiblemente al cambio climático y a factores ambientales (Newton et al., 2014), sumado a esto se plantea el surgimiento de serotipos con potencial pandémico, dicha clasificación basada en el antígeno O y el antígeno K, resultando así algunos de ellos más patógenos para el humano (Chowdhury et al., 2000). Esta infección se caracteriza por causar gastroenteritis leve a moderada, infección de heridas y más raramente sepsis, la gravedad del cuadro clínico estará influenciada por la presencia de diferentes factores de virulencia (Wang et al., 2015), como lo son: sistema flagelar de 2 tipos (polar y lateral), hemolisinas tales como hemolisina termolábil (TLH), hemolisina directa termoestable (TDH) y hemolisina relacionada con TDH (TRH), además de ureasas, y sistemas de secreción de tipo TTSS3 y TTSS6 (Wang et al., 2015).

- *V. vulnificus*.

Es una bacteria, habitante de ecosistemas marinos y estuarinos, su transmisión está mayormente asociada al consumo de mariscos contaminados, aunque también al consumo y contacto con agua marina (Horseman y Surani, 2011; Chen et al., 2003), las cepas pueden ser clasificadas en 3 biotipos, basado en características bioquímicas, el biotipo 1 es el

---

mayormente aislado en infecciones humanas (Oliver, 2005). La infección causada, presenta un gran espectro de manifestaciones clínicas que puede ir desde una gastroenteritis, hasta infección de piel y tejidos blandos o sepsis primaria, esta última con una tasa de mortalidad de aproximadamente 50%, especialmente en individuos con enfermedades hepáticas crónicas o alguna inmunodeficiencia (Kurdi, Mutalib, Ghani y Aldulaimi, 2014). La patogenia está influenciada por la presencia de diversos factores de virulencia como lo son: polisacárido capsular, metaloproteasa (*Vvp*), hemolisina (*Vvha*) y toxina RTX (Jones y Oliver, 2009; Kurdi et al., 2014).

- *V. alginolyticus*.

Es una bacteria, ubicua de ambiente marinos, siendo una de las más halófilas de su género, la transmisión está dada por contacto con agua de mar e ingesta de alimentos marinos contaminados, se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, y se ha observado que su prevalencia ha ido en aumento (Mustapha, Mustapha y Nozha., 2013). La fisiopatogenia no es muy clara, pues se ha encontrado asociado a diferentes tipos de infecciones, como lo son: cuadros gastrointestinales, infección de heridas, otitis, conjuntivitis y otras infecciones extraintestinales aún más raras, incluso como patógeno oportunista en individuos inmunosuprimidos (Zavala, Quiñones, y Vazquez, 2005). Se conoce que este agente infeccioso porta algunos factores de virulencia, que le confieren la capacidad patogénica tales como: Capsula, hemolisinas, proteasas, sideróforos, entre otros (Hernandez et al., 2016).

- *V. fluvialis*

Se encuentra distribuido en ambientes estuarinos y marinos, actualmente está cobrando mayor importancia clínica debido a que se considera un patógeno emergente (Igbinosa y Okoh, 2010). Posee diferentes factores de virulencia que le permiten ser un patógeno humano especialmente en casos de gastroenteritis (Ramamurthy, Chowdhury, Pazhani y Shinoda, 2014), y aunque en la actualidad no se ha dilucidado completamente su papel en

la fisiopatogenia, se ha observado la producción de citolisinas, proteasas, hemolisinas, que juegan un papel importante en la capacidad infectiva del mismo (Lockwood, Kreger y Richardson, 1982).

## **2.2 Infecciones asociadas al género *Vibrio*.**

Las infecciones causadas por este género pueden ir desde infecciones gastrointestinales asintomáticas o autolimitadas, afecciones en piel, hasta muy graves como diarrea profusa “cólera”, o casos de septicemia.

### **2.2.1 Cólera.**

El cólera es una infección gastrointestinal caracterizada por una diarrea secretora profusa con apariencia de agua de arroz, cuyo agente etiológico es *V. cholerae* de serogrupos O1/O139, causa un gran desequilibrio electrolítico que conlleva a una rápida deshidratación, de no ser tratada con rehidratación oral y tratamiento antibiótico oportuno, puede terminar en un shock hipovolémico, acidosis metabólica y posteriormente la muerte (Whitten, 2018). Su transmisión está dada a través del consumo de agua o alimentos marinos contaminados, por tanto, es común observarla en lugares con condiciones sanitarias deficientes (World Health Organization [WHO], 2018).

Históricamente se han presentado 7 pandemias mundiales de cólera, las primeras 6 pandemias fueron causadas por *V. cholerae* O1 del biotipo clásico, que inicialmente se propagó desde 1817, partiendo de la bahía de Bengala en la India, hacia otras partes del mundo, en total las 6 pandemias tuvieron una duración de aproximadamente 100 años (Banerjee, et al., 2014; Faruque et al., 1998). Posteriormente entró en curso un periodo interepidémico caracterizado por ausencia de casos de cólera a nivel mundial, mientras que la séptima pandemia fue causada por *V. cholerae* O1 biotipo el Tor a partir de 1960 en Indonesia, el cual gradualmente reemplazó a las cepas clásicas, y simultáneamente se observó la presencia de un nuevo serogrupo, intermedio entre el clásico y el Tor denominado O139 (Faruque et al., 1998). Esta última pandemia tuvo lugar en las Américas en la década de los 90 afectando así a 18 países de América Latina incluido Colombia y en 2010 ocurre

un brote en Haití lo que en conjunto dejó cerca 1.839.037 de casos de cólera reportados (Bahamonde y Stuardo, 2013). Actualmente incluso algunos autores plantean la posibilidad de estar cursando una octava pandemia caracterizada por la coexistencia de *V. cholerae* O1 el Tor y el serogrupo O139 (Banerjee et al, 2014; Hu et al, 2016).

### 2.2.2 Vibriosis

Se denomina vibriosis a todas las infecciones causadas por especies de *Vibrio*, diferentes a *V. cholerae* O1/O139 (Tabla 2-1), pueden ir desde cuadros gastrointestinales autolimitados, infecciones de heridas, hasta casos de septicemia (Raszl, Froelich, Vieira, Blackwood y Noble, 2016). Son adquiridas a través del consumo de agua, especialmente por la ingesta de alimentos marinos poco cocinados, y en menor proporción por contacto de heridas con ecosistemas marinos.

Tabla 2-1: Asociación de especies de *Vibrio* con diferentes casos clínicos.

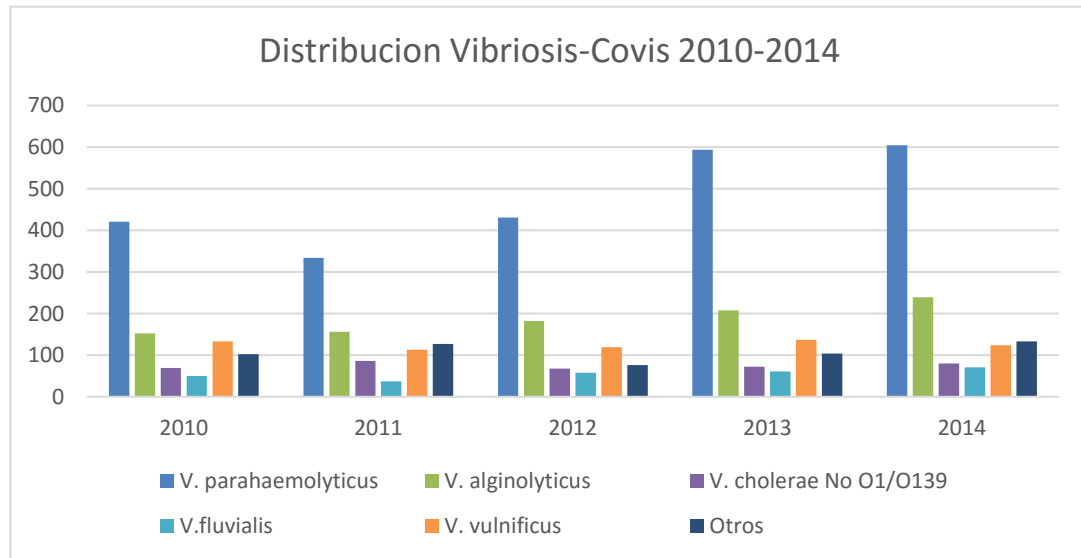
Especies de <i>Vibrio</i>	Casos clínicos		
	Gastroenteritis	Infección de heridas	Septicemia
<i>V. cholerae</i> O1	+++	-	-
<i>V. cholerae</i> No O1/O139	+++	++	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	-	+
<i>V. alginolyticus</i>	+	++	+
<i>V. fluvialis</i>	++	-	-
<i>V. vulnificus</i>	+	++	++
<i>V. mimicus</i>	++	-	-
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	-	+
<i>V. furnisii</i>	+	-	-
<i>V. damsela</i>	-	++	+
<i>V. metschnikovii</i>	+	-	+
<i>V. carchariae</i>	-	+	-

Frecuencia causando el caso clínico: (-) Ausencia, (+) Poco frecuente, (++) Frecuente, (+++) Muy frecuente.

Adaptado de: Guía para la vigilancia por laboratorio de *Vibrio cholerae*- INS (2017).

Actualmente cobran mayor importancia puesto que variaciones en diferentes condiciones ambientales han logrado un incremento en la población de estas especies en sus nichos ecológicos, representado así una reserva de potenciales patógenos para el humano (Morris y Achenson, 2003). De este modo en algunos países como Estados Unidos, este hallazgo se ha tornado notificable a nivel nacional, pues desde el año 1996 hasta el 2014 se observó un incremento en la prevalencia anual y se estima que ocurren alrededor de 1.000-1.500 casos de vibriosis cada año (Newton, Kendall, Vugia, Henao y Mahon, 2012). Informes anuales del programa de vigilancia del cólera y otras enfermedades por *Vibrio* (Centers For Disease Control And Prevention [CDC], 2016), resumen la distribución de diferentes especies de *Vibrio* causantes de infecciones humanas (Figura 2-2)

Figura 2-2: Distribución de las especies causantes de vibriosis en Estados Unidos (2010-2014).



Adaptado de: National Enteric Disease Surveillance: Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance (COVIS) Annual Summary, 2010 a 2016.

### 2.3 Genes de virulencia

La fisiopatogenia de *Vibrio* spp. esta mediada por la presencia de genes de virulencia codificantes de diferentes factores virulentos, que actúan conjuntamente para facilitar la colonización y patogenia de los mismos (Fernandez y Alonso, 2009).

### 2.3.1 *Vibrio cholerae*

- *Toxina colérica (CT).*

La toxina del cólera (CT) es producida por cepas de *V. cholerae* O1/ y O139, se compone por una subunidad A, codificada por el gen *ctxA*, y 5 subunidades B, codificadas por el gen *ctxB*, estos genes se encuentran en un profago denominado CTX  $\Phi$ , que contiene adicionalmente genes de virulencia como *zot* y *ace* (Bharati y Ganguly, 2011).

Inicialmente en el mecanismo de acción de la toxina, las subunidades B se unen a receptores monosilgángliósidos (GM1) de las microvellosidades de los enterocitos, para así dar ingreso a la subunidad A, que se escinde en los dominios A1 y A2, en donde el primero es la forma activa, una vez en el citosol conduce a la activación de la enzima adenilato ciclasa, para producir un incremento de cAMP, que conlleva al alto flujo extracelular de iones y agua, de tal modo este desequilibrio electrolítico, da lugar a la diarrea acuosa profusa característica del cólera (Whitten, 2018; Sanchez y Holmgren, 2011).

- *Pili corregulado por toxina (TCP).*

El pili tipo IV corregulado por toxina, es un factor de virulencia, que se encuentra codificado por el gen *tcpA* en la Isla de patogenicidad 1 de *V. cholerae* (VPI-1), este forma unidades de pilina que se agrupan, con el fin de agregar las células bacterianas formando microcolonias en el intestino (Krebs y Taylor, 2011), la función más importante de este factor es mediar la interacción del patógeno y la mucosa intestinal, esto con el fin de promover la colonización del epitelio por parte del patógeno, adicionalmente actúa como receptor para el fago CTX  $\Phi$ , que codifica la CT (Li et al., 2008).

- *Neuraminidasa.*

Este factor de virulencia históricamente se ha visto restringido al genoma de *V. cholerae* O1, sin embargo, ya se ha encontrado en aislamientos de *V. cholerae* No O1/O139 (Eneva,

Engibarov, Strateva, Abrashev y Abrashev, 2011), esta proteína se encuentra codificada por el gen *nanH* que está dispuesto en la Isla de patogenicidad 2 de *V. cholerae* (VPI-2), está implicada en la remoción del ácido siálico exponiendo al receptor GM1, receptor de la subunidad B de la toxina colérica (CT), otro papel es convertir sialogangliósidos a GM1 (Almagro y Boyd, 2009), por tanto estas acciones tienen un efecto sinérgico, pues al aumentarse el número de receptores, se facilita el ingreso de la subunidad A de la toxina al enterocito (Galen et al., 1992).

- *Citolisina VCC*

Esta toxina formadora de poros está codificada por el gen *hlyA*, ubicado en el cromosoma 2 de *V. cholerae*, por ello en ocasiones recibe el nombre de hemolisina *hlyA*, posee 2 variantes como son la clásica y El Tor, en donde la primera se caracteriza por una delección de 11 pares de bases dentro del gen estructural *hlyA* (Rader y Murphy, 1988), dicha hemolisina tiene gran importancia pues se considera el mejor candidato causante de la diarrea no colérica, es decir tiene mayor relevancia en aislamientos no toxigénicos, debido a su actividad vacuolizante en células intestinales humanas, que conduce a formación de poros y canales en la membrana celular, sumado a esto por el daño celular que resulta incrementando la colonización intestinal (Castañón, Enríquez y Figueroa, 2015; Olson y Gouaux, 2005).

### 2.3.2 Especies de *Vibrio*

- *Hemolisinas TLH, TDH y TRH*

*V. parahaemolyticus* posee 3 hemolisinas diferentes como son: hemolisina termolábil (TLH), presente en todos los aislamientos, la hemolisina directa termoestable (TDH), y la hemolisina relacionada con TDH (TRH), mayormente presentes en aislamientos patogénicos (Raghunath, 2015), todas ellas poseen actividad citotóxica y lítica para glóbulos rojos, y se identifican fenotípicamente mediante el fenómeno de Kanagawa que evalúa la producción de  $\beta$  hemólisis en agar Wagatsuma. y molecularmente detectando los genes que codifican las mismas *tlh*, *tdh* y *trh* respectivamente (Hossain, Kim y Kong, 2013; Wang et

al., 2015). Sin embargo, dichas hemolisinas no son exclusivas, pues estudios muestran cepas de *V. alginolyticus* portadoras de las mismas (Gargouti et al., 2015; Ren et al., 2013).

- *Hemolisina VFH*

Uno de los principales factores de virulencia de *V. fluvialis*, es una hemolisina codificada por el gen *vfh*, cuya actividad es formar poros e inducir lisis eritrocitaria, además se ha observado que posee actividad citotóxica y de vacuolización celular, y aunque no es completamente clara la fisiopatogenia de este factor de virulencia, se presume que dicho daño tisular podría mejorar la propagación del patógeno mediante la disolución de todo tejido que impida su diseminación (Chakraborty et al., 2005; Han et al., 2002), dicha hemolisina presenta una homología cerca del 80% con la hemolisina de *V. cholerae* El Tor, por lo cual se presume la importancia de su papel biológico en la fisiopatogenia de *V. fluvialis* (Kothary, Lowman, McCardell y Tall, 2003).

- *Gen correlacionado con la virulencia (vcgC y vcgE).*

Este gen se denomina gen correlacionado con la virulencia y permite distinguir entre aislamientos de *V. vulnificus* ambientales y de tipo clínico, debido a un dimorfismo presente en ese locus, de este modo se presentan los alelos *vcgC* (clínico) y *vcgE* (ambiental) (Rosche, Binder y Oliver, 2010), si bien este gen se correlaciona con la fuente de procedencia de los aislamientos, no es exclusivo de los mismos. El gen de tipo clínico *vcgC* se relaciona con mayor potencial virulento, mayor agresividad en la fisiopatogenia y por ende con casos clínicos más severos (Bier et al., 2013).



## 2.4 Técnicas para identificación de *Vibrio* spp.

### 2.4.1 Técnicas fenotípicas

La identificación de *Vibrio* spp. inicia con algunas pruebas bioquímicas que confirman el género, como crecimiento en agua peptonada alcalina pH 8,4, la prueba de la oxidasa y de la cuerda, para posteriormente confirmar la especie con métodos automatizados y semiautomatizados (INS, 2011).

El procedimiento para la identificación de *V. cholerae* en el laboratorio de microbiología descrito por la OPS, recomienda el aislamiento del microorganismo a partir de la muestra de materia fecal, la cual es enviada al laboratorio en el medio de transporte Cary-Blair que es especial para microorganismos Gram negativos entéricos. El hisopo del tubo con la muestra se introduce en 2 ml de solución salina estéril y se agita hasta disolver. De este, se toma una alícuota y se siembra en agar altamente selectivo como es el agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) por 18 horas a 37°C, que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas, además debido a la sacarosa y al pH alcalino, favorece el crecimiento de especies del género *Vibrio*. Las especies de *Vibrio* que tienen la capacidad de utilizar sacarosa como fuente de carbono se tornan de color amarillo, mientras que las especies sacarosa negativas se tornan color verde. A las colonias resultantes de color amarillo, presuntivas para *V. cholerae* se les realiza la prueba de la oxidasa que evalúa la presencia de la enzima citocromo oxidasa, que para el caso de *V. cholerae* deberá ser positiva y la prueba de la cuerda que evidencia la actividad del ácido desoxicólico únicamente sobre la pared del género *Vibrio*. Posteriormente, el serogrupo O1 y O139 se confirma con antisueros. Si el laboratorio cuenta con equipos automatizados o semiautomatizados como VITEK o API20E, se pueden utilizar a partir de la colonia purificada en TCBS para confirmación de *V. cholerae* (Organización panamericana de la Salud [OPS], 2010).

Sin embargo, contrario a lo anteriormente descrito, el procedimiento para la identificación de otras especies de *Vibrio* que causan vibriosis no se encuentra tan detallado. Gómez y Roque en 2006, mencionan que el medio de enriquecimiento más recomendado para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, es agua peptonada alcalina y luego se procede a sembrar

---

una alícuota en agar TCBS, medio selectivo comúnmente usado para aislar colonias de *Vibrio* de una gran variedad de muestras, ya sean clínicas, ambientales o de alimentos. Las colonias de color amarillo son presuntivas para especies como *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*, mientras que las colonias de color verde son presuntivas para *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. damsela* y *V. hollisae*. Existe una gran variedad de medios de cultivo para la diferenciación de especies de *Vibrio* spp., lo cual hace este procedimiento costoso y demorado. Es por esto que se utilizan los mismos sistemas VITEK o API20E que para *V. cholerae*, teniendo en cuenta las características bioquímicas específicas para cada especie (Gómez y Roque, 2006).

Pese a que el uso de los métodos de cultivo tradicionales sigue siendo el Gold estándar en la identificación de las especies de *Vibrio*, son claras las limitaciones en cuanto a tiempo de procesamiento y especificidad del resultado debido a las inconsistencia y variaciones bioquímicas de los aislamientos lo cual no permite obtención de resultados 100% fiables, por tanto, se requiere por lo menos el resultado de 2 de ellas.

## 2.4.2 Técnicas moleculares

Teniendo en cuenta algunas desventajas de los métodos fenotípicos de identificación para *Vibrio* spp., actualmente se cuenta con métodos moleculares para la confirmación de aislamientos de *Vibrio* spp, los cuales resultan más rápidos, más sensibles y específicos, e incluso permiten detección simultanea de diferentes especies, todo ello sin distinción del origen de la muestra (Wei, Zhao, Xian, Hussain y Wu, 2014; Nhung, Ohkusu, Miyasaka, Sun y Ezaki, 2007).

- *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

Es una técnica de identificación molecular, que pretende la amplificación de una secuencia dada, en múltiples copias, de modo pueda ser identificada, y permita determinar la presencia de un gen específico en un organismo (Garibyan y Avashia, 2013).

Muchos son los estudios que han empleado la PCR para una fácil, rápida y específica identificación de aislamientos de *Vibrio* spp., así como caracterización de genes de virulencia y resistencia, aproximadamente desde los años 90 se implementó su uso especialmente para identificación de *V. cholerae* O1/O139 (Fields, Popovic, Wachsmuth y Olsvik, 1992; Shirai et al., 1991), debido a los inconvenientes de la identificación fisicoquímica, posteriormente diferentes estudios estandarizaron protocolos para la identificación de otras especies (Aono et al., 1997; Wong y Lin, 2001).

Actualmente el centro regional de referencia de la WHO Global Salm Surv para América del Sur, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán” recomienda la confirmación de los aislamientos sospechosos de cólera, con el manual de procedimientos; aislamiento, identificación y caracterización de *V. cholerae* del Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán” (Caffer et al., 2007), en el cual, además del protocolo para identificación bioquímica se encuentra un protocolo para identificación molecular de *V. cholerae*, serogrupo y presencia de toxina colérica, basado en las PCR estandarizadas por Rivera et al., que amplifican una región intergénica para *V. cholerae*, la subunidad *ctxA* de la toxina colérica y el gen *tcpA*. Sin embargo, en los últimos años se ha estandarizado en múltiples estudios, la aplicación de PCR multiplex, para la identificación simultánea de diferentes genes, esta, se ha aplicado en la identificación de otras especies de *Vibrio* spp., puesto que tiene como fin hacer más eficaz la identificación, y resulta realmente útil en muestras de origen ambiental, debido a la carga y variedad microbiana que poseen (Hossain et al., 2013; Kim, Ryu, Lee, Kim, y Kim, 2015; Wei et al., 2014).

- 3.4.2.1. *Electroforesis de campos pulsados (PFGE)*.

Es una técnica ampliamente utilizada para conocer la diversidad genética de aislamientos de una misma especie bacteriana, por tanto, es usada para comparar la huella genética en aislamientos con diferentes orígenes, mostrando así su cercanía o lejanía a nivel evolutivo. Existe un protocolo estandarizado por el programa PulseNet del CDC de Atlanta, que es una red de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos, aplicado exitosamente para *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* (Cooper et al., 2006; Kam et al., 2008), realiza análisis

---

comparativo de las huellas digitales de PFGE mostrando patrones moleculares específicos para cada una de las especies analizadas (Parsons et al., 2007), y aunque esta estandarizado solamente para estas 2 especies, existen reportes que muestran la utilidad de esta técnica frente a otras especies evidenciando la diversidad entre aislamientos (Elmahdi et al., 2018; González, Whitney, Jaykus y DePaola, 2007; Liang, Cui, Du, Kan y Liang, 2013), así como también la relación filogenética entre aislamientos ambientales (Luo et al., 2013).

## 2.5 Cólera en Colombia

El cólera es una enfermedad de notificación obligatoria internacional, debido al gran impacto a nivel de salud pública que plantea la misma, en Colombia se han presentado diferentes epidemias (Serpa, 1992), la más reciente registrada entre 1991 y 1992, cuyo ingreso al país se dio por la costa pacífica importada desde Perú, esta disminuyó gradualmente hasta que a partir del 2000 no se reportó ningún caso en el país, hasta el año 2004 en donde se reportaron los 3 últimos casos de dicha epidemia (Agudelo, 1994). El país se puso en alerta en 2010 en respuesta a la epidemia de las Américas que afectó países como Haití, República Dominicana, Cuba y México, para lo cual implementó un programa de vigilancia intensificada de cólera liderado por el Instituto Nacional de Salud (INS, 2011).

### 2.5.1 Vigilancia Instituto Nacional de Salud

En nuestro país se implementó por parte del Instituto Nacional de Salud (INS) en 2010, la vigilancia intensificada por laboratorio de cólera, que obedece a directrices emitidas por el Ministerio de salud mediante diferentes circulares (27 de 2018, 28 de 2014, 34 de 2012, 67 del 2010) (Ministerio de Salud, 2018), con el fin de implementar e intensificar en las diferentes entidades territoriales las acciones de vigilancia, atención, prevención y control de cólera a nivel nacional, y así confirmar oportunamente cualquier caso sospechoso de cólera, que incluirá todo paciente con enfermedad diarreica de inicio súbito, evacuaciones abundantes y deshidratación sin agente etiológico establecido, así como puntos de suministro de agua para consumo humano sospechosos de estar contaminados, los casos

mencionados deberán ser confirmados a nivel de género y especie por parte de los laboratorios departamentales de salud pública (LDSP), quienes remitirán las muestras al grupo de Microbiología del INS para su confirmación, serotipificación, sensibilidad antimicrobiana y detección molecular de toxinas, siguiendo los protocolos recomendados por OPS y el centro regional de referencia de la WHO Global Salm Surv para América del Sur, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, mencionados anteriormente (OPS, 2010; Caffer et al., 2007).

Así este programa de vigilancia, tiene como fin tener preparado un plan de contingencia ante un evento de reintroducción de este patógeno al país, teniendo en cuenta la fácil diseminación del patógeno y que Colombia presenta diferentes factores de riesgo para la importación de casos, dadas sus condiciones geográficas, fronterizas, actividades comerciales y turísticas. Los resultados de esta vigilancia mostraron que entre el 2010 al 2013, de los 334 aislamientos recibidos en el grupo de Microbiología del INS tanto de muestras clínicas como de agua de interés en salud pública, la especie predominante fue *V. cholerae* No O1/O139 con 35,9%, seguido de *V. alginolyticus* con 6,6% y en tercer lugar se encontró *V. fluvialis* en 6.0%. Los resultados mostraron que, aunque hasta la fecha en Colombia no circuló *V. cholerae* O1 toxigénico, los cuadros de vibriosis fueron causados por otras especies patogénicas para las cuales no existe un protocolo de vigilancia y notificación en el país (INS, 2013), sin embargo, en países como Estados Unidos, el control de estas tiene gran importancia y se tornó notificable desde 2007, pues la incidencia de casos en esta zona geográfica va en aumento (CDC, 2016, Leyva et al., 2013).

Teniendo en cuenta que como parte de la vigilancia intensificada de cólera en Colombia, se evidenció presencia de aislamientos de especies patógenas de *Vibrio* spp., tanto en casos clínicos como en muestras de agua de interés en salud pública remitidas por los LDSP (INS, 2013), así como la reciente identificación de estas mismas especies en ostras contaminadas en Cartagena, Bolívar (López et al., 2010), y la presencia de *V. cholerae* en aguas de lastre provenientes de buques con rutas internacionales que arriban al Puerto de Tumaco, Nariño (Rodríguez, 2011), resulta de interés continuar con la identificación y caracterización de aislamientos tanto de *V. cholerae* (para el cual existe un protocolo estandarizado), como para las otras especies de *Vibrio* patógenas en humanos (para las cuales no existe un protocolo

de identificación definido). Dada la evidencia reportada en las dos costas del país, es importante conocer la ubicación geográfica y distribución de aislamientos de *Vibrio* spp., en reservorios ambientales, así como su posible relación con los casos remitidos por los laboratorios de salud departamental del INS desde el 2010 al 2019.

## 3. Metodología

### 3.1 Población de estudio

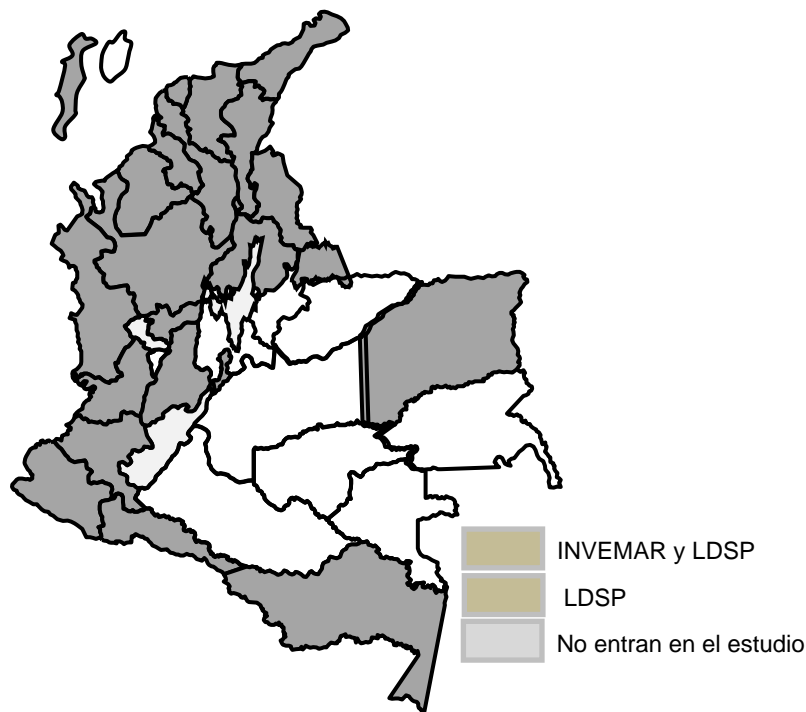
Teniendo en cuenta el desconocimiento acerca de la distribución en el país de *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, tanto en casos clínicos como en reservorios ambientales, se evaluaron 240 aislamientos sospechosos de *Vibrio* spp., divididos en dos grupos, los clínicos y ambientales (agua de interés en salud pública) remitidos al Grupo de Microbiología del INS por los LDSP a través del programa de vigilancia intensificado del cólera (n=96) y aislamientos ambientales provenientes de filtrados de muestras superficiales de cuerpos de aguas de zonas costeras (n=144), producto de 2 muestreos ambientales anuales, el primero en 2018 y el otro en 2019, que fueron remitidos por el Grupo de Calidad de Aguas Marinas y Costeras del INVEMAR, quienes en el marco del proyecto macro denominado “*Vibrio* spp en reservorios ambientales como potenciales focos de colera y vibriosis”, se encargaron del muestreo y aislamiento inicial de los morfotipos de interés. Como parte de los procedimientos del proyecto macro, la identificación fenotípica de las 5 especies se realizó con las colonias purificadas en agar TCBS, las cuales fueron evaluadas por los métodos fenotípicos como prueba de la cuerda y oxidasa para confirmación de género. La identificación presuntiva de especie se realizó mediante VITEK o API20E, siguiendo el protocolo estandarizado para *V. cholerae* (INS, 2017) y el medio CHROMOAgar™, adicionalmente se evaluó fenotípicamente la sensibilidad de frente a antibióticos como: Ampicilina (AM), Nitrofurantoina (NIT), Trimetropin Sulfa (SXT), Azitromicina (AZT), Tetraciclina (TET), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Ciprofloxacina (CIP). El criterio de inclusión es que sean aislamientos presuntivos para *Vibrio* spp, o géneros relacionados en los nichos ecológicos según las

pruebas fenotípicas preliminares realizadas en cada laboratorio, debido a las frecuentes reacciones cruzadas en la identificación.

Un criterio de exclusión fue pertenecer a aquellos aislamientos de *V. cholerae* O1 (n=4) ya confirmados y caracterizados previamente por el grupo de Microbiología. Como parte del proyecto macro los puntos de muestreo fueron georreferenciados y se determinaron diferentes variables *in situ*.

Los aislamientos remitidos por INVEMAR de cuerpos de agua candidatos como reservorios de especies de *Vibrio* spp, fueron recolectados en 2 muestreos, realizados uno en cada año 2018 (Agosto a Noviembre-Temporada lluviosa) y 2019 (Marzo a Junio-Temporada seca) en 3 a 4 estaciones seleccionadas de acuerdo a las condiciones de salinidad (marina, estuarina y continental) en departamentos costeros del país: 2 en la costa Caribe (Magdalena y Atlántico) y 3 en la costa pacífica (Chocó o Nariño, Cauca, Valle del Cauca), mientras que los aislamientos remitidos por los LDSP incluyeron 19 departamentos del país, incluidos allí los muestreados por INVEMAR, Figura 3-3.

Figura 3-3: Mapa de los departamentos a muestrear por INVEMAR y departamentos que remiten muestras al programa de vigilancia.





Las características de la población estudiada se resumen en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Características de la población estudiada.

<b>Origen de las muestras</b>	<b>Ambiental remitida por INVEMAR</b>	<b>Programa de vigilancia por laboratorio del Grupo de Microbiología del INS.</b>
Tipo de muestra	Muestras de agua (Marina, estuarina y continental).	Clínico (Materia fecal, hemocultivo, heridas) y ambiental (agua para consumo humano).
Ubicación geográfica	5 departamentos del país en cada muestreo Caribe: Magdalena y Atlántico. Pacífico: Chocó o Nariño, Cauca y Valle del Cauca.	Diferentes departamentos del país, las muestras son remitidas por los LDSP.
Periodo de tiempo	2018-2019: Un muestreo cada año, en agosto-noviembre y marzo-junio, respectivamente.	Aislamientos desde 2010 (Inicio de la vigilancia de cólera), hasta el 2019.
Cantidad de muestras	PCR convencional y PCR genes de virulencia en aproximadamente 30 a 50 aislamientos por cada muestreo. PFGE: De ser posible, 10 aislamientos de cada especie.	PCR convencional y genes de virulencia en aislamientos para confirmación por el programa de vigilancia en el periodo estipulado. PFGE: De ser posible, 10 aislamientos de cada especie.

\*El muestreo en Choco o Nariño se vio condicionado a las situaciones de orden público al momento del muestreo.

## 3.2 Identificación de *Vibrio spp.*

### 3.2.1 Extracción de ADN bacteriano.

En los aislamientos a evaluar se realizó extracción de ADN mediante ebullición, para ello se tomaron 2-3 colonias bacterianas de un crecimiento en agar TCBS de toda la noche a 37°C, se resuspendieron en 100 µl agua grado molecular en tubo de PCR y se llevó a 100°C durante 10 min, posteriormente se centrifugó 5 min, para separar el ADN (sobrenadante) de

---

los restos celulares (pellet), dicho sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo para su almacenamiento a -20°C. Para los controles positivos se realizó extracción de ADN mediante el kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo e instrucciones del fabricante. Para estandarizar las concentraciones de ADN se cuantifico en Nanodrop.

### 3.2.2 Protocolo general PCR

Inicialmente se preparó la master mix en la concentración correspondiente a cada protocolo (ver más adelante), y en relación al número de muestras a evaluar, posteriormente se realizó vortex a las muestras y se alícuotó en los tubos de PCR para cada muestra y controles positivo y negativo. En un área diferente, se adicionó el ADN a evaluar en cada tubo de reacción y se llevó al termociclador para aplicar las condiciones específicas de cada PCR. Los productos de PCR amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% (2 g agarosa en 100ml-(98 Agua MQ y 2 ml TAE 50X) + 4 µl de bromuro de etidio a 10mg/ml), en los que se cargaron 5 µl de muestra y aprox. 2 µl de buffer de carga en cada uno de los pozos. Se realizó el corrido electroforético en buffer TAE 1X, a 110V-120V, 400 mA durante 30-40 minutos y las bandas se fotografiaron bajo luz ultravioleta.

### 3.2.3 Identificación de *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Se planteó la estandarización de una PCR multiplex para la identificación de *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, que en adelante se referirá con el nombre de “múltipleVibrioPCR”. Para el diseño de la múltipleVibrioPCR, se seleccionaron blancos genéticos específicos y conservados para cada especie y se utilizaron los iniciadores reportados previamente por varios autores, excepto para *V. vulnificus* en donde se diseñaron iniciadores que amplificaran una banda de 710pb (Tabla 3-3). Inicialmente, las condiciones de amplificación fueron optimizadas para cada uno de los genes, y posteriormente en conjunto para la múltipleVibrioPCR.

Tabla 3-3: Iniciadores para identificación de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*.

<i>Vibrio</i> spp	Gen amplificado	Secuencia 5-3´	Tamaño &	Características		Referencias
				Lon g*	Tm (°C)	
<i>V. fluvialis</i>	<i>ToxR-F</i>	GACCAGGGCTTTGAGGTG GACGAC	217 pb	24	67.8	(Chakraborty et al., 2006)
	<i>ToxR-R</i>	AGGATACGGCACTTGAGT AAGACTC		25	63	
<i>V. alginolyticus</i>	<i>gyrB-F</i>	GAGAACCCGACAGAAGCG AAG	337 pb	21	61.8	(Zhou, Hou, Li, y Qin, 2007)
	<i>gyrB-R</i>	CCTAGTGCGGTGATCAGT GTTG		22	62.1	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Tlh-F</i>	AAAGCGGATTATGCAGAA GCACTG	450 pb	24	61	(Di Pinto, Ciccacese, Tantillo, Catalano y Forte, 2005)
	<i>Tlh-R</i>	GCTACTTTCTAGCATTTTC TCTGC		24	59.3	
<i>V. vulnificus</i>	<i>vvhA-F</i>	AATCGGCAACGTCAGATG GT	710 pb	20	57.3	Este estudio.
	<i>vvhA-R</i>	GCCGTAAACCGAAAACAG CG		20	59.3	

& Tamaño de banda esperada

\* Longitud en pares de bases del iniciador.

La mezcla maestra se realizó en dos modalidades con variaciones en las concentraciones de reactivos, en función del número de bandas a amplificar, pues partiendo de colonia aislada se pretende amplificar solo una banda y por el contrario en el control positivo que es una mezcla de ADN de las especies se pretende amplificación de las 4 bandas. Las mezclas se prepararon en un volumen final de 25 µl y se describen en detalle en el anexo 1. Se empleó un termociclador BioRad T100 programado de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 30 segundos y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 5 minutos. Los productos esperados son 217 pb para *V. fluvialis*, 337 pb para *V. alginolyticus*, 450 pb para *V. parahaemolyticus* y finalmente 710 pb para *V. vulnificus*.

▪ *Determinación de la especificidad de la múltiple Vibrio PCR*

Se evaluó la especificidad de los iniciadores empleados, usando ADN de *Vibrio cholerae* O1 y O139, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, así como ADN de géneros taxonómicamente relacionados que pueden encontrarse cohabitando con *Vibrio* spp en los nichos ecológicos o coinfectando en las muestras clínicas, los cuales se detallan en la tabla 3-4. Los productos de PCR amplificados para cada una de las especies fueron secuenciados para confirmar la especificidad de los blancos genéticos.

Tabla 3-4: Aislamientos utilizados para evaluar la especificidad de la PCR multiplex.

Especie bacteriana	Código aislamiento	Fuente
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	GMR-Vc-17	Colección INS
<i>Vibrio alginolyticus</i>	PV-118	INVEMAR
<i>Vibrio vulnificus</i>	GMR-Vc-16	Colección INS
<i>Vibrio fluvialis</i>	GMR-31	Colección INS
<i>Vibrio cholerae</i> No 01/0139	PV-141	Colección INS
<i>Vibrio cholerae</i> 01/0139	INS-V. Ch109	Colección INS
<i>Vibrio mimicus</i>	PV-215	INVEMAR
<i>Aeromonas salmocida</i>	PV-120	INVEMAR
<i>Shewanella algae</i>	PV-150	INVEMAR
<i>Photobacterium damsela</i>	PV168	INVEMAR
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	PV-210	INVEMAR
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Colección INS
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 14028	Colección INS
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 33114	Colección INS
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	Colección INS

▪ *Determinación del límite de detección de la múltiple Vibrio PCR*

El límite de detección se determinó con diferentes diluciones de ADN de las cepas control extraído mediante kit, partiendo de una concentración de 35ng/μl hasta 7 diluciones seriadas 1:2, cuyas concentraciones fueron 17.5 ng/μl, 8.75 ng/μl, 4.37 ng/μl, 2.18 ng/μl, 1.09 ng/μl, 0.54 ng/μl y 0.27 ng/μl, las cuales fueron confirmadas mediante cuantificación en Nanodrop.

### 3.2.4 Identificación de *V. cholerae*

Se implementó la PCR multiplex para identificación de *V. cholerae*, según el protocolo descrito en el Manual de Procedimientos; Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae* del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, en este se identifica en una PCR multiplex *V. cholerae*, así como la presencia de los dos factores de virulencia importantes CT y TCP. Los iniciadores utilizados amplifican un fragmento específico para *V. cholerae* perteneciente a una región espaciadora intergénica (IRSs) localizada entre 16S y 23S del DNA, un fragmento del gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina colérica, y un fragmento del gen *tcpA* que codifica para la proteína TCP (Caffer et al., 2007), como muestra la tabla 6. Las condiciones del Termociclador en esta PCR fueron: inicio a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 segundos, alineamiento a 60°C por 45 segundos, elongación a 72°C por 45 segundos y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 10 minutos. en este caso los productos esperados son: 300 pb para el marcador de *V. cholerae*, 451 pb para el gen *tcpA* El Tor y 564 pb para el gen *ctxA*.

Adicionalmente, también se implementó una PCR multiplex para serotipificar los aislamientos identificados como *V. cholerae*, amplificando fragmentos que flanquean el gen del locus *rfb*, de 22 kb para O1 y 35 kb para O139 (Caffer et al., 2007) (Tabla 3-5). Las condiciones del Termociclador en esta PCR fueron: inicio a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 52°C por minuto, elongación a 72°C por 90 segundos y elongación final a 72°C por 10 minutos. Los productos esperados son 647 pb para serogrupo O1 y 741 pb para serogrupo O139. Las mezclas realizadas se describen en los anexos 2 y 3.

Tabla 3-5: Iniciadores para la identificación de *V. cholerae*, detección de toxinas y serotipificación.

Iniciador	Gen amplificado	Secuencia 5-3'	Tamaño <sup>&amp;</sup>	Características		Referencias
				Long <sup>*</sup>	Tm (°C)	
pVC-F2		TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG	300 pb	22	55.6	

pVCm-R1	IRSs localizada entre 16S y 23S del DNA	AGTCACTTAACCATACAACCCG		22	58.4	(Caffer et al., 2007)
CT 94F	Fragmento del gen <i>ctxA</i>	CGCGCAGATTCTAGACCTCCTG	564 pb	22	64	
CT 614R		CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC		23	62.4	
TCP 72F	Fragmento del gen <i>tcpA</i>	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	451 pb	24	61	
TCP 477R		CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG		23	60.6	
VCO1-F2	Fragmentos flanqueante del gen <i>rfb</i> . (Específico para O1).	CAACAGAATAGACTCAAGAA	647 pb	20	51.1	
VCO1-R2		TATCTTCTGATACTTTTCTAC		21	50.1	
VCO139-F2	Fragmentos flanqueante del gen <i>rfb</i> . (Específico para O139).	TTACCAGTCTACATTGCC	741 pb	18	51.4	
VCO139-R2		CGTTTCGGTAGTTTTTCTGG		20	55.3	

& Tamaño de banda esperada\* Longitud en pares de bases del iniciador.

### 3.3 Identificación de Genes de virulencia

Como ya se mencionó para la identificación de toxinas TC y TCP se utilizó el protocolo descrito en el Manual de Procedimientos; Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae* del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Por otra parte, para la identificación de genes de virulencia en *Vibrio* spp, se estandarizaron una serie de PCRs, para ello se seleccionaron genes reportados en la literatura como los más importantes en la fisiopatogenia de cada especie de *Vibrio* spp (Tabla 3-6).

Los iniciadores descritos previamente, fueron analizados bioinformaticamente mediante BLAST para confirmar su afinidad con el factor de virulencia seleccionado. Para *V. cholerae* se amplificaron los genes *ctxA*, *tcp* (ver tabla 6), *nanH* y *hlyA* en 2 PCR multiplex, usando como control positivo las cepas secuenciadas en el Grupo de Microbiología (GenBank número de acceso: BioProject ID PRJNA523324) y la cepa ATCC 14033. Para *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* se evaluaron los genes de virulencia *tdh* y *trh* en una PCR multiplex. Para *V. fluvialis* se evaluó el gen *vfh* en PCR monoplex. Para *V. vulnificus* se evaluaron los alelos *vcgC* o *vcgE* en 2 PCR monoplex a un mismo aislamiento (Tabla 7). Adicionalmente, la presencia de toxinas CT y TCP fue evaluada en todos los aislamientos

de *Vibrio* spp por ser los genes con mayor interés clínico. Las concentraciones de la mezcla maestra se pueden ver en anexo 4.

Teniendo en cuenta el desconocimiento de la presencia de genes de virulencia en nuestros aislamientos, los controles positivos en este caso se definieron tamizando cada uno de los genes en grupos de aislamientos confirmados para cada especie, mediante la PCR multiplex. Las bandas amplificadas correspondientes al tamaño deseado y por ende al gen esperado se secuenciaron para confirmar el blanco genético.

Tabla 3-6: Iniciadores utilizados para identificación de genes de virulencia en *V. cholerae* y 4 especies.

<i>Vibrio</i>	Gen amplificado	Secuencia 5-3'	Tamaño &	Características		Referencias	
				Long. *	Tm (°C)		
<i>V. cholerae</i>	<i>nanH</i> /Neuraminidasa	F: GTTATTCGTGGATGG TCAGC	650 pb	20	57.3	(Gennari, Ghidini, Caburlotto y Lleo, 2012)	
		R: CGTTAGGCGTTGTTAGCCTC		20	59.3		
	<i>hlyA</i> /Citolisina VCC	F: AGATCAACTACGATCAAGCC	1677 pb	20	55.3		(O'Shea, Reen, Quirke y Boyd, 2004)
		R: AGAGGTTGCTATGCTTTCTAC		21	55.9		
<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh</i> /Hemolisina de <i>V. fluvialis</i>	F: GCGCGTCAGTGGTGGTGAAG	800 pb	20	63.5	(Liang et al., 2013)	
		R: TCGGTCGAACCGCTCTCGCTT		21	63.7		
<i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh</i> /Hemolisina directa termoestable	F: GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	269 pb	23	58.9	(Bej et al., 1999)	
		R: TGGATAGAACCTTCATCTTCACC		23	58.9		
	<i>trh</i> /Hemolisina relacionada con Tdh.	F: TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	500 pb	24	55.9		
		R: CATAACAAACATATGCCCATTTCCG		25	59.7		
<i>V. vulnificus</i>	Vcg-C o Vcg-E	F: AGCTGCCGATAGCGATCT	277pb	18	56	(Rosche, Yano y Oliver, 2005)	
		R: CGCTTAGGATGATCGGTG		18	56		
	Gen correlacionado con la virulencia	F: CTCAATTGACAATGATCT	277 pb	18	46.9		
		R: CGCTTAGGATGATCGGTG		18	56		

& Tamaño de banda esperada \* Longitud en pares de bases del iniciador.

Todas las amplificaciones incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos y una elongación final a 72°C por 10 minutos. Para los genes *vcgC/vcgE* se utilizó desnaturalización a 95°C, alineamiento a 55°C, elongación a 72°C por 30 segundos. Para los genes *tdh/trh* el protocolo fue desnaturalización a 95°C, alineamiento a 58°C, elongación a 72°C por 40 segundos. Para el gen *vfh* el protocolo fue desnaturalización a 95°C,

---

alineamiento a 58.6°C, elongación a 72°C por 50 segundos. Para los genes *nanH/hlyA* el protocolo fue desnaturalización a 95°C por 60 segundos, alineamiento a 54°C por 60 segundos, elongación a 72°C por 90 segundos. Estos ciclos se repitieron 30 veces. Los productos de PCR amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% (2 g agarosa en 100ml-(98 Agua MQ y 2 ml TAE 50X) + 4 µl de bromuro de etidio a 10mg/ml), en los que se cargaron 5 µl de muestra y aprox. 2 µl de buffer de carga en cada uno de los pozos. Se realizó el corrido electroforético en buffer TAE 1X, a 110V-120V, 400 mA durante 30-40 minutos y las bandas se fotografiaron bajo luz ultravioleta.

### **3.4 Tipificación mediante electroforesis en gel de campos pulsados.**

Se utilizo el protocolo estandarizado por Pulsenet: Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*.

En este se utiliza como marcador de peso molecular estandarizado la cepa *Salmonella* Braenderup H98121, así como la enzima *NotI* debido a que realiza una restricción de baja frecuencia que produce perfiles simples, de fácil análisis y comparación, de este modo se establece la similitud genética según el patrón de bandeo, la posición y el número de bandas. El análisis se realiza mediante el Software Gelcompare que utiliza el índice de coincidencia (DICE) y el algoritmo de agrupación (UPGMA). En la tipificación molecular de *Vibrio* spp la identificación de clones no tiene un punto de corte establecido sin embargo se estableció como aislamientos estrechamente relacionados aquellos con > 90% de similitud genética.

El protocolo utilizado se describe brevemente: Los aislamientos se sembraron en cultivo masivo en agar BHI incubado a 37°C toda la noche. Se realizó una suspensión celular en 2 ml de buffer de suspensión celular (BSC), ajustando una absorbancia de 0.8-1.0 a 610 nm. Se transfirieron 200 µl de las suspensiones a tubos Ependorff, y se adicionó 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a cada tubo. Para realizar los bloques, se tomó 200 µl de agarosa Seakem Gold al 1% y se adicionaron a los 200 µl de suspensión celular, se dispensó el volumen requerido en cada uno de los pozos del molde. En un tubo de 50 ml, se preparó una



mezcla de buffer de lisis celular y proteinasa k (Concentración final de 20 mg / ml), se transfirieron 2.5 ml de dicha mezcla a tubos con cada bloque correspondiente, se incubaron en baño serológico a 54-55 ° C, con agitación (150-175 rpm) durante 2 horas. Se procedió con los lavados de los bloques con 15-20 ml de agua MQ estéril (2 lavados) y buffer TE (4 lavados) durante 20 minutos a 150-175 rpm, se transfirieron los bloques a crioviales con 1.8 ml de buffer TE y se almacenaron a 4 ° C hasta su uso.

Para la restricción del ADN en los bloques se preparó una mezcla maestra. Para las muestras de *Vibrio* spp se usa enzima *NotI* y para los controles *Salmonella* Braenderup H98121 se usa la enzima *XbaI*, tal como como se muestra en la tabla 3-7:

Tabla 3-7: Mezcla maestra para la restricción del ADN en los bloques.

Reactivos	Controles	Muestras
	Volumen final	Volumen final
H2O	175 µl	174 µl
Buffer 10X	20 µl	20 µl
Enzima <i>XbaI/NotI</i> (40U/ µl)	3 µl	4 µl
BSA (10mg/ml)	2 µl	2 µl
Volumen final	200 µl	200 µl

Para la restricción se adicionaron 200 µl de la mezcla maestra a tubos ependorff, con una fracción de 2.0 mm de cada bloque, incluyendo controles, se incubó en baño serológico a 37°C para *NotI* y *XbaI* durante 4 horas. Se preparó la agarosa para el gel, al 1 % en 100 ml de 0.5X TBE para gel pequeño o 150 ml de 0.5X TBE para gel grande, se almacenó en baño serológico a 55 ° C hasta su uso. Se retiró la mezcla de restricción y se adicionaron 200 µl de buffer TBE 0.5X, con incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se dispuso cada bloque en los dientes del peine, de tal manera que el control, (*Salmonella* Braenderup H9812) quedó ubicado en los dientes (1, 5 y 10 - gel pequeño) y (1, 5, 10 y 15 - gel grande), y las muestras en los dientes restantes, se vertió la agarosa en el molde, dejando solidificar. Se corrió el gel en un CHEF-DR II de Biorad con las siguientes condiciones: (Bloque 1) Pulso inicial: 2s, pulso final: 10s, 6.0 voltios, 12.5 horas y (Bloque 2) pulso inicial: 20s, pulso final: 25s, 6.0 voltios, 5.5 horas, para *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*. Y con las condiciones: pulso inicial: 10s, pulso final: 35s, 6.0 voltios en 1 solo bloque para *V. parahaemolyticus*, en los 2 casos durante 18 horas (Gel grande) ó 17 horas

(Gel pequeño). Se tiñó el gel con una mezcla de 40 µl de bromuro de etidio (Concentración final de 10 mg/ml) y 400 ml de agua destilada durante 1 hora en agitación a 30 rpm, para desteñir el gel, se transfirió a un recipiente con 250 ml de agua destilada con agitación a 30 rpm durante 30 minutos y se repitió 1 vez más, finalmente, se capturó la imagen con un fotodocumentador Biorad y se re realizó el análisis en el software Gelcompare II. Para establecer el porcentaje de similitud entre aislamientos se utilizó el coeficiente de DICE y la matriz de agrupamiento UPGMA, con valores de tolerancia y optimización de 1.5%.

En la construcción de los dendogramas se incluyeron los datos de sensibilidad frente a diferentes antibióticos como: AM, NIT, SXT, AZT, TET, CTX, CAZ y CIP, previamente determinada en el laboratorio como parte de proyecto macro esto con el fin de analizar si hay algún tipo de relación entre la agrupación de los aislamientos y la susceptibilidad mostrada por cada uno de ellos.

### **3.5 Análisis estadístico.**

Este es un estudio de tipo descriptivo, que contempla variables cualitativas (presencia o ausencia), debido a esto se realizó análisis de la distribución de frecuencia, es decir el total de eventos dentro de cada variable.

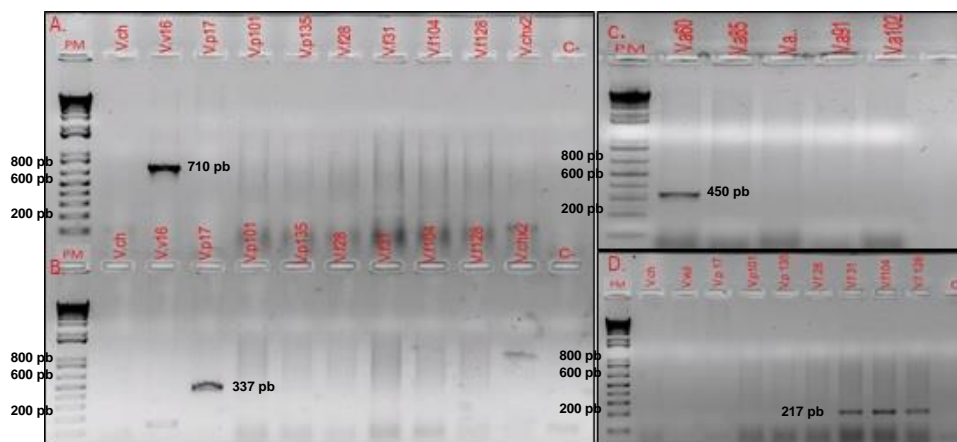
## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Identificación de *Vibrio* spp.

#### 4.1.1 Estandarización Múltiple *Vibrio* PCR

Los iniciadores diseñados para cada especie, amplificaron la banda esperada aproximada de 710 pb para *V. vulnificus*, 450 pb para *V. parahaemolyticus*, 337 pb para *V. alginolyticus* y 217 pb para *V. fluvialis*, evaluados en una PCR monoplex. La especificidad de los blancos genéticos seleccionados se evaluó contra aislamientos de las 5 especies, obteniendo resultados positivos sólo en los especie-específico, como se observa en la Figura 4-4.

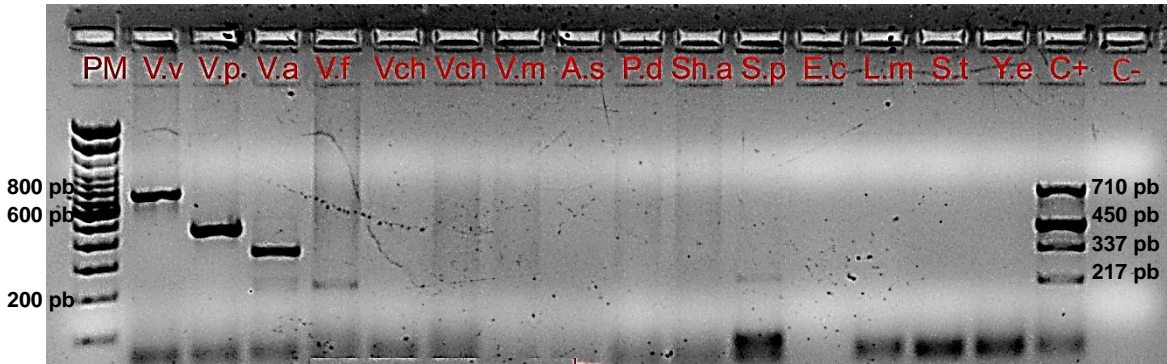
Figura 4-4: Bandas amplificadas en cada PCR monoplex por especie.



Carriles con diferentes especies de *Vibrio*. A. *vhA* (V. v: *V. vulnificus*-710pb). B. *tlh* (V.p: *V. parahaemolyticus*-450pb). C. *gyrB* (V.a: *V. alginolyticus*-337pb). D. *toxR* (V.f: *V. fluvialis*-217pb).

Se estandarizó exitosamente la múltiple *Vibrio* PCR amplificando simultáneamente las cuatro bandas esperadas. Se observó que la PCR es específica para las especies de *Vibrio* al no obtener amplificaciones con bacterias representativas de otros géneros (Figura 4-5).

Figura 4-5: Especificidad de la PCR multiplex.



Carriles 2-16: V.v: *V. vulnificus* (710pb), V.p: *V. parahaemolyticus* (450pb), V.a: *V. alginolyticus* (337pb), V.f: *V. fluvialis* (217pb), V.ch: *V. cholerae*, V.m: *V. mimicus*, A.s: *Aeromonas salmonicida*, P.d: *Photobacterium damsela*, Sh.a: *Shewanella algae*, S.p: *Sphingomonas paucimobilis*, E.c: *Escherichia coli*, L.m: *Listeria monocytogenes*, S.E: *Salmonella* Enteritidis, Y.e: *Yersinia enterocolitica*.

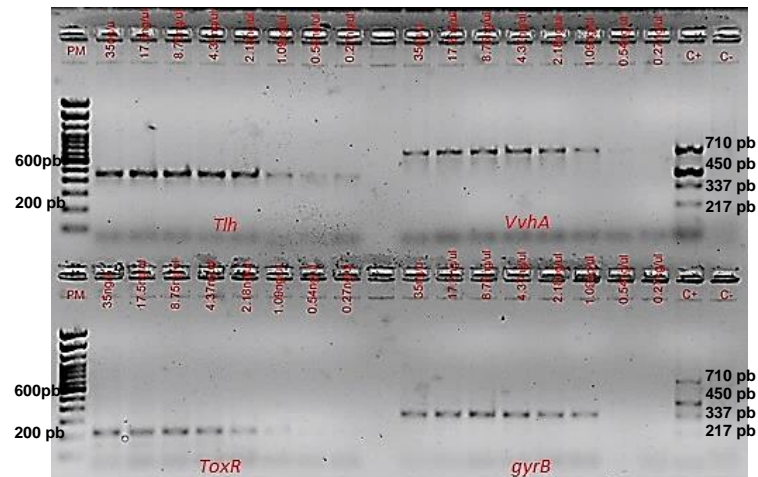
A nivel mundial estudios han planteado la identificación de múltiples especies de *Vibrio* mediante PCR, basados en las especies de importancia clínica de una zona geográfica en particular, como lo descrito por Wei et al en 2014 en donde, en vez de *V. fluvialis* se identifica *V. mimicus* o por Yin et al en 2018 que identifica solamente *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en muestras clínicas y ambientales. Este estudio, realizó por primera vez la estandarización e implementación de una PCR multiplex para la identificación de especies de *Vibrio*, útil y aplicable a la realidad de nuestro país, pues las 4 especies blanco, corresponden a las recuperadas principalmente de muestras clínicas en Colombia (INS, 2013), adicionalmente la modalidad múltiple provee a su vez una identificación más rápida que con PCR monoplex.

La estandarización de la PCR multiplex para la identificación simultánea de 4 especies de *Vibrio* fue exitosa teniendo en cuenta la especificidad frente a los blancos genéticos, y la ausencia de falsos positivos con otros géneros relacionados tanto en los nichos ecológicos en los que habitan naturalmente dichos microorganismos así como en los casos clínicos en donde pudiesen llegar a confundirse por la fisiopatología del caso clínico, adicionalmente esto fue confirmado por la secuenciación de los productos amplificados. La especificidad

evidenciada en la PCR, fue la esperada teniendo en cuenta los resultados de estudios previos utilizando los mismos iniciadores (Bej et al., 1999; Chakraborty et al., 2006; Zhou et al., 2007), así mismo se evidenció que el iniciador para *V. vulnificus* diseñado en este estudio mostró gran capacidad de detección y especificidad en la misma.

El límite de detección para los genes *tlh*, *vvhA* y *gyrB* fue de 1.09 ng/μl de ADN, mientras que para *toxR* fue de 2.18 ng/μl de ADN (Figura 4-6). Aunque varios estudios han determinado la sensibilidad de varios iniciadores en función de UFC, o copias de ADN (Neogi, 2010, Kim et al, 2015), en algunos otros los límites de detección de diferentes iniciadores en la identificación de especies de *Vibrio* spp, en promedio han sido de 0.5 a 5 ng/μL (Pinto, Baptista y Neves, 2017; Khimmakthong y Noochu, 2017), por lo que se consideró la técnica acá estandarizada como sensible teniendo en cuenta el límite de detección de 1 a 2 ng/μL. determinado para los iniciadores evaluados, valor que correspondería a 1.8-3.5 genomas x10<sup>5</sup>/μL.

Figura 4-6: Límite de detección de cada iniciador a diferentes concentraciones de ADN.

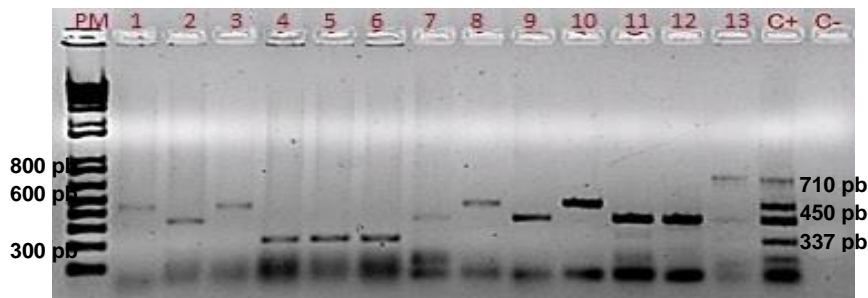


Carriles 2-17: Diferentes concentraciones de ADN. Genes *tlh* (V.p: *V. paraeolyticus*-450pb), *vvhA* (V. v: *V. vulnificus*-710pb), *toxR* (V.f: *V. fluvialis*-217pb), *gyrB* (V.a: *V. alginolyticus*-337pb).

#### 4.1.2 Identificación de *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en aislamientos clínicos y ambientales.

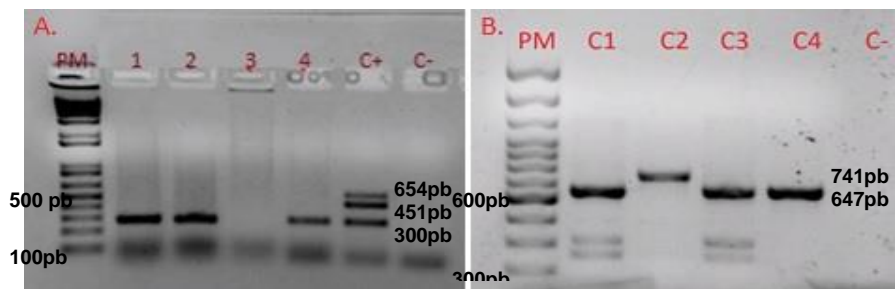
Se evaluaron 240 aislamientos sospechosos para *Vibrio* spp, mediante la implementación de la múltipleVibrioPCR y los protocolos estandarizados para *V. cholerae*, 144 aislamientos fueron recuperados a partir de cuerpos de agua, remitidos por INVEMAR como resultado de 2 muestreos uno en cada año (2018-2019) y 96 aislamientos provenientes de muestras clínicas y de agua de interés en salud pública obtenidos a través del programa de vigilancia intensificada del cólera. De tal modo se partió de colonia pura, la múltipleVibrioPCR identificó una especie por colonia evaluada en 196 aislamientos sospechosos como muestra la Figura 4-7, por otra parte 48 aislamientos sospechosos para *V. cholerae* fueron confirmados y serotipificados por PCR (Figura 4-8A y B).

Figura 4-6: MúltipleVibrioPCR.



Carriles 1 a 13: Aislamientos clínicos y ambientales. Bandas esperadas: *V. vulnificus* (710pb), *V. parahaemolyticus* (450pb), *V. alginolyticus* (337pb), *V. fluvialis* (217pb).

Figura 4-7: PCR para identificación de *V. cholerae*.



Carriles 1-4 Aislamientos de *V. cholerae*. A) Región 16s (300pb), CT (654 pb) y TCP (451 pb). B) Serogrupo O1 (647 pb) y O139 (741 pb).

Como resultado de la implementación de las dos PCR mencionadas, se clasificaron los aislamientos según su procedencia de la siguiente manera:

▪ *Identificación Aislamientos INVEMAR*

De los 144 aislamientos remitidos por INVEMAR, se logró la confirmación y clasificación de 92 aislamientos, 25 del primer muestreo (2018) y 67 del segundo (2019), distribuidos en las 5 especies objetivo (Tabla 4-8). La distribución global muestra que *V. parahaemolyticus* es el predominante con 28.5%, seguido de *V. alginolyticus* con 19.4%, especies que ya han sido reportadas como predominantes en ambientes acuáticos en Brasil (De Menezes et al., 2017), sin embargo contrario a los hallazgos de este trabajo, estudios reportan mayor presencia de *V. cholerae* en ambientes acuáticos de Georgia, el mar negro y costas de en Japón (Kokashvili et al., 2015; Uchiyama, 2000), lo que ocurrió solamente en el primer muestreo pues *V. cholerae* No O1/O139 fue el predominante, seguido de *V. alginolyticus* (Tabla 4-8). Las diferencias observadas en la distribución de las 5 especies en los 2 muestreos podrían deberse a la influencia de condiciones climáticas en cada temporada, de este modo la temporada lluviosa favoreció la presencia de *V. cholerae* No O1/O139 mientras limitó la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, en cambio en la temporada seca y más calurosa se favoreció la proliferación de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*.

Tabla 4-8: Distribución de aislamientos ambientales remitidos por INVEMAR.

Especie	Prevalencia Total	Primer muestreo (2018)	Segundo muestreo (2019)
	n (%)		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	41 (28.5)	4 (11.4)	37 (34.0)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	28 (19.4)	8 (22.8)	20 (18.3)
<i>Vibrio cholerae</i> No O1/O139	15 (10.4)	12 (34.3)	3 (2.7)
<i>Vibrio vulnificus</i>	6 (4.2)	1 (2.8)	5 (4.6)
<i>Vibrio fluvialis</i>	2 (1.4)	0 (0)	2 (1.8)
<i>Vibrio cholerae</i> O1/O139	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No amplificó en la PCR	52 (36.1)	10 (28.6)	42 (38.5)
<b>Total</b>	144 (100)	35 (100)	109 (100)

No amplificó: Pertenece a otra especie de *Vibrio*/No es *Vibrio spp.*

---

Con respecto a la distribución por departamento, en el primer muestreo se observa predominancia de *V. cholerae* No O1/O139 en Magdalena, mientras que en la Costa Pacífica solo se observa presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* y no se logró aislamiento de colonias de Atlántico y Cauca. Como resultado del segundo muestreo se observó que en los departamentos de la Costa Atlántica existe mayor variedad de especies, sin embargo, predomina *V. alginolyticus*, mientras que en los departamentos de la costa pacífica predominó *V. parahaemolyticus* (Tabla 4-9 y Figura 4-9). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en la Costa Caribe que realizó el aislamiento de *Vibrio* spp en ostras, y en donde se observó mayor prevalencia de *V. alginolyticus* además de presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus* (López et al., 2010). Por otra parte la predominancia de *V. parahaemolyticus* en la Costa Pacífica, coincide y resulta importante teniendo en cuenta que en la zona pacífica de países como Chile y Perú la industria pesquera se ve fuertemente afectada por la presencia de esta especie en ambientes acuáticos marinos, y eventualmente se han observado brotes por clones patogénicos, convirtiendo este hallazgo en un problema de salud pública (Hernández, Ulloa, Vergara, Espejo, Cabello, 2005; Rivas, Luis, Piña, Gómez y Lizárraga, 2018), y si bien este estudio no serotipificó los aislamientos de esta especie su presencia y predominancia en esta región podría representar un riesgo para la salud humana. Ya se ha discutido previamente acerca de la influencia y la manera en que resultan críticos parámetros como la salinidad y la temperatura superficial del mar en la presencia y ecología de esta especie, de tal modo se ha observado que la predominancia de *V. parahaemolyticus* se ve favorecida por temperaturas más cálidas y con salinidad moderada, condiciones que son usuales en zonas estuarinas y están ampliamente presentes en las costas de América, además se ha documentado que en la Costa Pacífica hay ciertas condiciones ambientales que favorecen la proliferación de esta especie como son: llegada de corrientes superficiales con agua más cálida e incluso que podrían propagar esta especie, así como la ocurrencia de lluvias frecuentes que mantienen moderada la salinidad de los ambientes acuáticos (Raszl et al, 2016).



Así las cosas se observó que variaciones de salinidad en las estaciones de muestreo influyeron en la presencia de los 92 aislamientos confirmados, de tal modo la mayoría provienen de las estaciones de agua marina (n=40), con predominancia de *V. parahaemolyticus* (n=18) y *V. alginolyticus* (n=16) y las estaciones estuarinas (n=43), con predominancia de *V. parahaemolyticus* (n=22) seguido de *V. alginolyticus* en menor proporción (n=9), lo que cobra sentido teniendo en cuenta la característica halófila de las especies de *Vibrio*, en donde particularmente *V. alginolyticus* resulta ser el más halófilo, hallazgo que ya reporta la literatura (Zavala, 2005). De la misma manera se observó una mayor presencia de *V. cholerae* No O1/O139 en estaciones continentales (n=5) y estuarinas (n=8) lo que respalda que es una de las especies menos halófilas (Percival y Willians, 2014).

Tabla 4-9: Distribución por departamento de especies de *Vibrio* spp., aisladas de INVEMAR.

Departamento	Estaciones	Tipo de Agua	Especie	2018		2019	
				(n)	Total	(n)	Total
Magdalena	Rio Piedras (RPI)	Continental	<i>V. cholerae</i>	4	4	0	0
	Playa Chengue (CHE)	Marina	<i>V. alginolyticus</i>	2	2	1	1
	Muelle Cabotaje (MC)	Marina	<i>V. alginolyticus</i>	3	3	1	2
			<i>V. parahaemolyticus</i>	0		1	
	Ciénaga Grande-Buenavista (BV)*	Estuarina	<i>V. cholerae</i>	8	10	0	0
			<i>V. parahaemolyticus</i>	1		0	
			<i>V. vulnificus</i>	1		0	
Frente a Rio Piedras (FRP)**	Estuarina	<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	1	1	
Playa Bahía Taganga (PBT)**	Marina	<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	1	1	
	<b>Total</b>			<b>19</b>		<b>5</b>	
Atlántico	Ciénaga Mallorquín (CM)	Estuarina	<i>V. alginolyticus</i>	0	0	3	5
			<i>V. parahaemolyticus</i>			2	
	Puerto Colombia (PC)	Marina	<i>V. alginolyticus</i>			3	6
			<i>V. cholerae</i>			2	
			<i>V. fluvialis</i>			1	

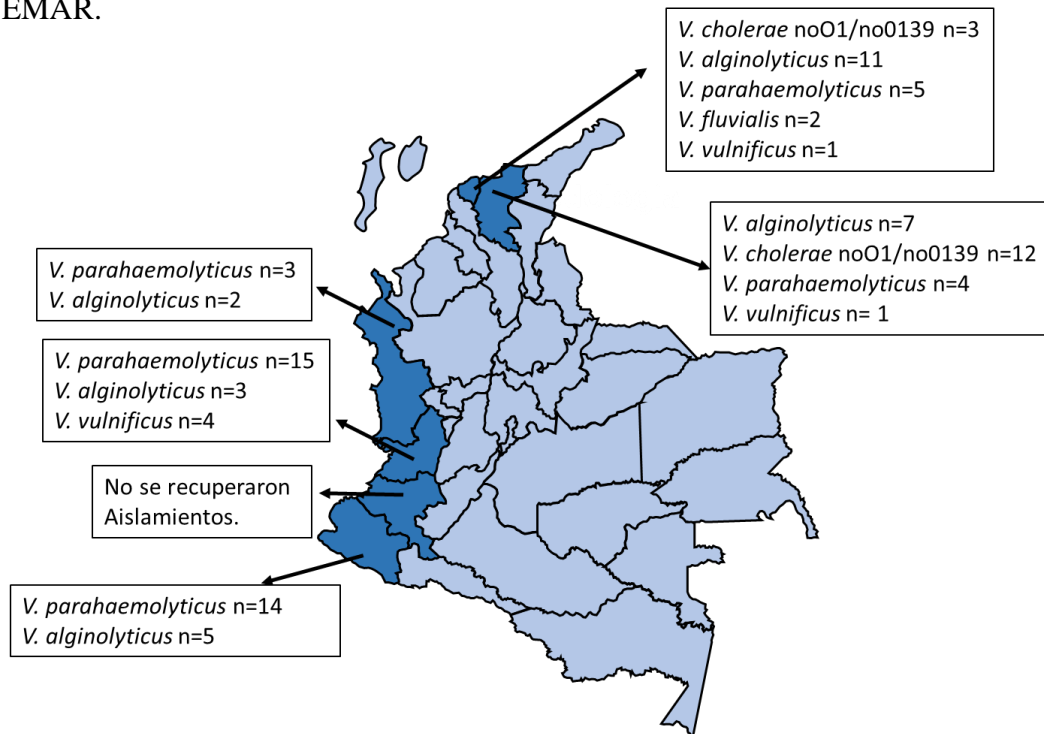
Caracterización molecular de aislamientos de *Vibrio* spp, recuperados de cuerpos de agua en Colombia y recuperados a través de la vigilancia por laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS).

	Las Flores (LF)	Continental	<i>V. alginolyticus</i>			2	3
			<i>V. cholerae</i>			1	
	Punta Roca (PR)**	Marina	<i>V. alginolyticus</i>			3	8
			<i>V. parahaemolyticus</i>			3	
			<i>V. fluvialis</i>			1	
			<i>V. vulnificus</i>			1	
<b>Total</b>				<b>0</b>	<b>22</b>		
<b>Valle del Cauca</b>	Hotel Bocana (HBO)	Estuarina	<i>V. alginolyticus</i>	1	1	1	9
			<i>V. parahaemolyticus</i>	0		5	
			<i>V. vulnificus</i>	0		3	
	Bahía de Buenaventura (BDB)	Estuarina	<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	2	2
	Rio Dagua (RDA)	Continental	<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	1	1
	Hotel Palm View (HPV)**	Marina	<i>V. alginolyticus</i>	0	0	1	9
			<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	7	
<i>V. vulnificus</i>			0	0	1		
<b>Total</b>				<b>1</b>	<b>21</b>		
<b>Chocó *</b>	Playa Almejal (AL)	Marina	<i>V. parahaemolyticus</i>	2	2	0	0
	Rio Valle (VA)	Continental	<i>V. alginolyticus</i>	1	1	0	0
	Ensenada de Utria (EU)	Estuarina	<i>V. parahaemolyticus</i>	1	2	0	0
			<i>V. alginolyticus</i>	1			
<b>Total</b>				<b>5</b>	<b>0</b>		
<b>Cauca *</b>	Playa Blanca (PBL)	Marina	No se recuperaron aislamientos.	0	0	0	0
	Rio Guapi (RGU)	Continental					
	Frente a Rio Guapi (FRG)	Estuarina					
	<b>Total</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Nariño **</b>	Estero El Pajal (EP)	Estuarina	<i>V. alginolyticus</i>	0	0	1	4
			<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	3	
	Arco el Morro (AM)	Estuarina	<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	5	5
		Marina	<i>V. alginolyticus</i>	0	0	2	6

	Playa el Morro (PM)		<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	4	
	Puente el Pindo (PP)	Estuarina	<i>V. alginolyticus</i>	0	0	2	4
			<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	2	
<b>Total</b>				<b>0</b>		<b>19</b>	
<b>Total aislamientos</b>				<b>25</b>		<b>67</b>	

\* Solamente primer muestreo, \*\* Solamente segundo muestreo.

Figura 4.8: Distribución de *Vibrio* spp en Colombia, recuperado entre 2018 y 2019 por INVEMAR.



Cabe mencionar que consideramos como una limitación con respecto a las muestras recibidas de INVEMAR en el estudio, la diferencia en la cantidad de aislamientos recuperados del primer muestreo con respecto al segundo, pues en el primer caso no se logró el aislamiento de algunas bacterias posterior al envío de los aislamientos en medio de transporte Cary Blair por INVEMAR hacia el laboratorio de microbiología del INS, lo que pudo influir y sesgar la prevalencia y distribución evidenciada en este primer muestreo, o simplemente las variaciones están dadas por las condiciones climáticas de cada época de muestreo por lo que se considera importante continuar el monitoreo.

▪ *Identificación Aislamientos INS*

Por otra parte, de los 96 aislamientos recuperados del cepario del programa de vigilancia intensificada del cólera del INS, se identificaron y clasificaron 77 de ellos como alguna de las especies blanco de *Vibrio*, de tal modo los restantes pertenecen a otros *Vibrios* no identificables mediante las PCR o a géneros relacionados. Se observó una mayor prevalencia de *Vibrio cholerae* No O1/O139 no toxígeno (30.2%), seguido de *V. fluvialis* (24.21%), dicha distribución se detalla en la Tabla 4-10.

Tabla 4-10: Distribución de aislamientos recibidos a través del programa de vigilancia intensificada de cólera.

Especie	Prevalencia Total	2010-2017	2018	2019
	n (%)			
<i>Vibrio cholerae</i> No O1/O139	29 (30.2)	15 (28.30)	4 (17.39)	10 (50.0)
<i>Vibrio fluvialis</i>	23 (24.21)	17 (32.07)	4 (17.39)	2 (10.53)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14 (14.74)	7 (13.21)	2 (8.7)	5 (26.31)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	10 (10.53)	4 (7.55)	5 (21.74)	1 (5.26)
<i>Vibrio vulnificus</i>	1 (1.05)	0 (0)	1 (4.35)	0 (0)
No amplifica en la PCR	19 (20.0)	10 (18.87)	7 (30.43)	2 (10.53)
<b>Total</b>	96 (100)	53 (100)	23 (100)	20 (100)

No amplificó: Perteneció a otra especie de *Vibrio* o no es *Vibrio* spp.

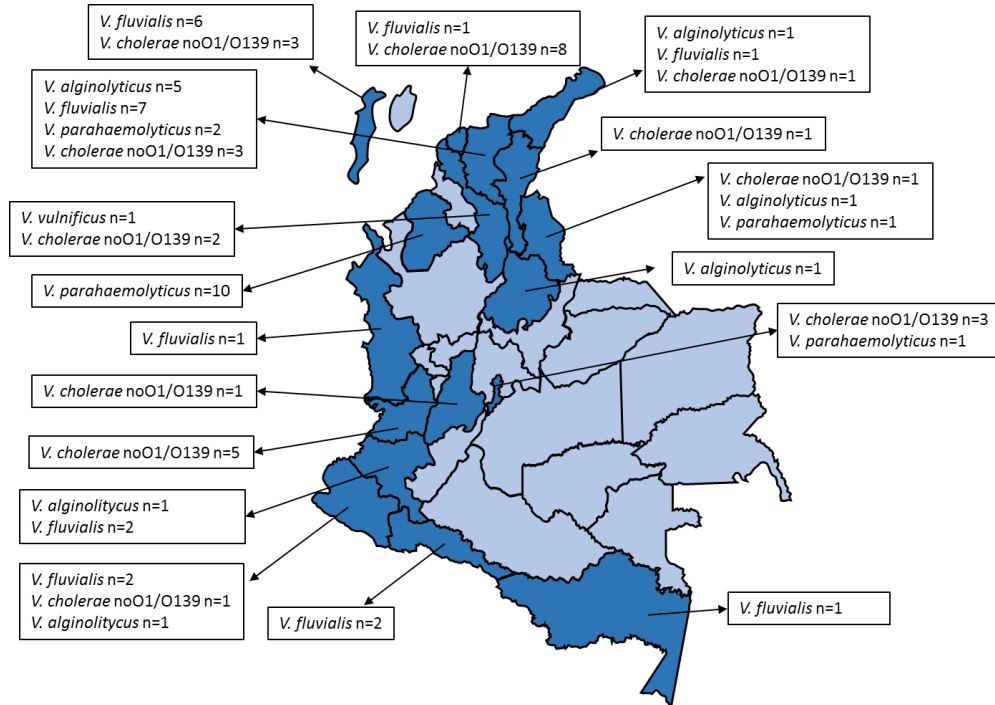
De los 77 aislamientos confirmados como alguna de las 5 especies de *Vibrio*, se observó que la mayoría provienen de departamentos como Magdalena (n=17), Córdoba (n=10) y Atlántico (n=9), así mismo la mayoría de los aislamientos tuvieron como origen muestras de agua de interés en salud pública (n=38) y materia fecal (n=32) en una proporción similar, como se detalla en la tabla 4-11 y figura 4-10, sin embargo vale la pena resaltar la presencia de esta especie en muestras de LCR y hemocultivo y si bien no es muy frecuente demuestran la importancia de estas especies más allá de infecciones gastrointestinales moderadas.

Tabla 4-11: Distribución de especies de *Vibrio*, por departamento correspondiente a los aislamientos de programa de vigilancia intensificada.

Departamento	Tipo de muestras	(n)	Total					Total
			V.p*	V.a*	V.f*	V.ch*	V.v*	
<b>Magdalena</b>	Agua	17	2	5	7	3	0	17
<b>Atlántico</b>	Agua	8	0	0	1	8	0	9
	Materia fecal	1						
<b>Valle del Cauca</b>	Materia fecal	5	0	0	0	5	0	5
<b>Nariño</b>	Agua	1	0	1	2	1	0	4
	Materia fecal	3						
<b>Cauca</b>	Agua	2	0	1	2	0	0	3
	Materia fecal	1						
<b>Chocó</b>	Materia fecal	1	0	0	1	0	0	1
<b>Bogotá</b>	Agua	1	1	0	0	3	0	4
	Materia fecal	2						
	Hemocultivo	1						
<b>Bolívar</b>	Materia fecal	2	0	0	0	2	1	3
	Hemocultivo	1						
<b>Cesar</b>	Hemocultivo	1	0	0	0	1	0	1
<b>Córdoba</b>	Materia Fecal	9	10	0	0	0	0	10
	Alimento	1						
<b>Guajira</b>	Materia Fecal	2	0	1	1	1	0	3
	Agua	1						
<b>Nte de Santander</b>	Materia Fecal	2	1	1	0	1	0	3
	Agua	1						
<b>Santander</b>	Lesión de pierna	1	0	1	0	0	0	1
<b>Tolima</b>	L. cefalorraquídeo	1	0	0	0	1	0	1
<b>Putumayo</b>	Materia Fecal	2	0	0	2	0	0	2
<b>San Andrés</b>	Materia Fecal	1	0	0	6	3	0	9
	Agua	7						
	Alimento	1						
<b>Leticia</b>	Materia Fecal	1	0	0	1	0	0	1
<b>Total</b>								<b>77</b>

\*V. p: *V. parahaemolyticus*, \*V. a: *V. alginolyticus*, \*V. f: *V. fluvialis*, \*V.ch: *V. cholerae* No O1/O139 \*V. v: *V. vulnificus*.

Figura 4-9: Distribución de *Vibrio* spp en Colombia, recuperado entre 2010 a 2019 en el programa de vigilancia intensificada de cólera.

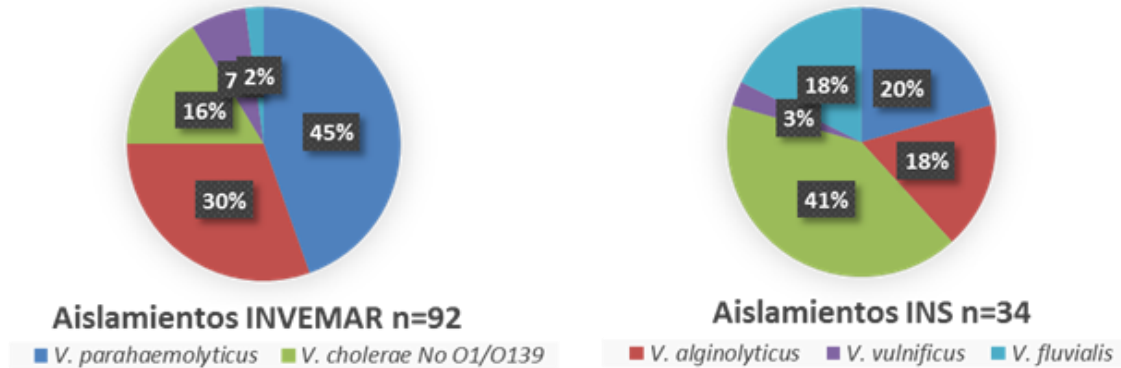


esto sin distinción del origen de la muestra (INVEMAR-INS), lo que concuerda con lo reportado por varios autores que documentan que en las últimas décadas ocurren solo brotes esporádicos de este serogrupo en lugares de África y Asia (Abana et al., 2019; Irengé et al., 2019; Rattanathumsakul et al., 2019), así como presencia de este serogrupo en entornos acuáticos que albergan dichas cepas (Taneja et al., 2019). Adicionalmente, Moore en 2014, afirma que las cepas de *V. cholerae* O1/O139 no suelen persistir en el ambiente, pues se ha observado que no es fácil que prosperen en los nichos ecológicos simultáneamente con las cepas ambientales y aunque hay ciertos focos de cepas virulentas, se deben presentar las condiciones idóneas para la proliferación o para importación de cepas patógenas (Moore, Thomson, Mutreja y Piarroux, 2014). En América el hecho más reciente fue el brote de Haití en 2010 y según monitoreos realizados hasta 2014 se encontró cepas de *V. cholerae* O1 en muestras ambientales, no obstante no se ha logrado concluir si las cepas ya han establecido un reservorio ambiental en las aguas superficiales de Haití (Alam et al., 2015).

Este trabajo evidenció que *V. cholerae* no es el único *Vibrio* patogénico de interés clínico en Colombia, pues si bien se encontraron aislamientos de *V. cholerae* No O1/O139 en muestras clínicas como ambientales, también se observó que en el país hay reservorios ambientales para otras especies que están causando enfermedad, incluso varios reportes mencionan que a través del tiempo algunas especies de *Vibrio* spp, han emergido en diferentes lugares a nivel mundial incluyendo Latinoamérica y han sido asociadas a infecciones gastrointestinales y extraintestinales e incluso brotes de ETA (Chunga, 2018; Gavilán y Martínez, 2011).

Al comparar la distribución entre los aislamientos ambientales remitidos por INVEMAR con los aislamientos remitidos al programa de vigilancia del INS en el mismo periodo de tiempo (2018 a 2019), se observó la presencia de las 5 especies objetivo, en proporciones similares (Figura 4-11), y si bien esto no es suficiente para demostrar causalidad, si es evidencia de que las especies circulantes en medio ambiente, son las mismas especies que están causando infecciones, por tanto, estos nichos ambientales podrían ser potenciales fuentes de transmisión.

Figura 4-10: Comparación de la distribución entre aislamientos remitidos por INVEMAR y aislamientos remitidos al programa de vigilancia del INS entre 2018 y 2019.



Como parte de los resultados también es importante mencionar la relación observada entre la identificación fenotípica previamente realizada en el grupo de investigación (Cobos, 2019), con respecto a la identificación molecular aquí realizada, en donde se evidenció una concordancia del 70%, pues se observaron discrepancias en la identificación cuando el aislamiento fue positivo por métodos fenotípicos para alguna de las 5 especies incluidas en este estudio, pero fue negativo por los métodos moleculares, lo que se consideró como falsos positivos por parte de los métodos fenotípicos, adicionalmente, se observaron algunos aislamientos que por fenotipo se clasificaron como género *Aeromonas* spp u otros, sin embargo, en las pruebas moleculares amplificaron alguno de los blancos genéticos evaluados, lo que se consideró como falsos negativos de los métodos fenotípicos. Actualmente ya son evidentes las ventajas que confieren los métodos moleculares con respecto a los fenotípicos pues los resultados de estos últimos son muy variables y dependerán de diferentes aspectos como por ejemplo el origen de las muestras (clínico o ambiental) (Martinez, Lozano, Viña, de Novoa y Garcia, 2006), como evidencian estudios en *V. parahaemolyticus*, en donde la identificación mediante métodos moleculares como PCR con genes específicos, provee una sensibilidad y especificidad que ronda el 100% con respecto a la fenotípica que oscila entre 70-90% (Crocì et al., 2007; Fabbro, Cataletto y Del Negro, 2010), y si bien la identificación fenotípica puede proveer una caracterización



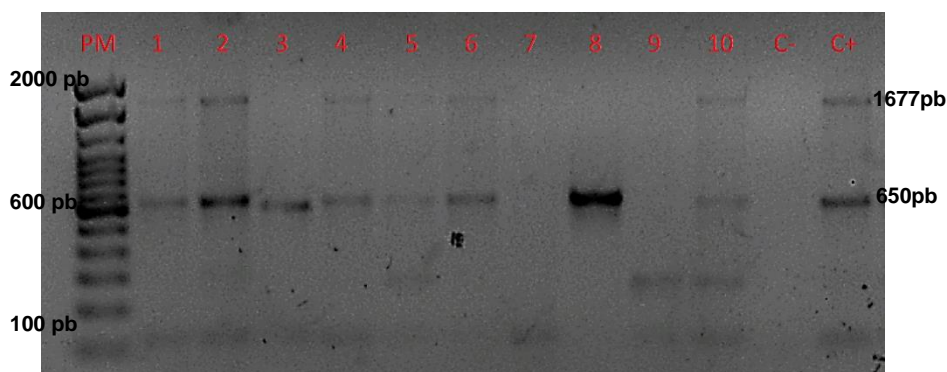
presuntiva tiene mayor validez la confirmación mediante métodos moleculares (Bou, Fernández, García, Sáez y Valdezate, 2011).

## 4.2 Identificación de genes de virulencia

### 4.2.1 *V. cholerae* No O1/O139.

Todos los aislamientos de *Vibrio* spp fueron negativos para *ctxA* y *tcp*. En los 44 aislamientos de *V. cholerae* No O1/O139, se observó presencia de los genes *nanH* y *hlyA* en un 43.2% (19/44) y 54.5% (24/44) respectivamente, este hallazgo permitió separar 4 grupos: 1) *nanH*+/*hlyA*+ con 13 aislamientos (29.5%), 4 remitidos por INVEMAR y el restante por el programa de vigilancia, 2) *nanH*+/*hlyA*- con 6 aislamientos (13.6%) todos del programa de vigilancia, 3) *nanH*-/*hlyA*+ en 11 aislamientos (25.0%), 3 remitidos por INVEMAR y los demás por el programa de vigilancia, y 4) *nanH*-/*hlyA*-, en 14 aislamientos (31.8%) 8 remitidos por INVEMAR y los restantes provenientes del programa de vigilancia. De este modo se observa que la mayoría de los aislamientos clínicos del programa de vigilancia poseen los 2 genes simultáneamente lo que podría conferirles una mayor capacidad patogénica y podría explicar su hallazgo en casos clínicos, por el contrario, la mayoría de los aislamientos sin ninguno de los genes provienen de muestras de agua tanto de INVEMAR como del programa de vigilancia, en cuanto a los otros 2 grupos no se observa predominancia de algún tipo de aislamiento. La implementación de la PCR para identificación de *nanH* y *hlyA* se muestra en la figura 4-12.

Figura 4-11: PCR para identificación de genes *nanH* y *hlyA*.



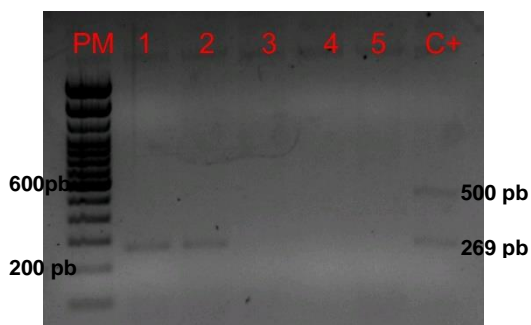
Carriles 1 a 10: Aislamientos de *V. cholerae* No O1/O139. Bandas esperadas: 650 pb (*nanH*) y 1677 pb (*hlyA*).

Dichos hallazgos se ajustan parcialmente a los de un estudio del instituto MALBRAN en Argentina que caracteriza *V. cholerae* causante de diarreas, en donde si bien el porcentaje de aislamientos con *hlyA* es mayor (91%), con respecto al aquí encontrado (54.5%), el del gen *nanH* si es muy similar (47%) y (43,2%) respectivamente, en cuyo caso se plantean 8 perfiles de virulencia basado en presencia o ausencia de esos y otros genes evaluados, así mismo se evidencia que al igual que en este estudio, hay más aislamientos portadores del gen *hlyA* que del gen *nanH* (González et al., 2009). Cabe resaltar que el iniciador aquí utilizado no discrimina entre la variante *hlyA* clásica de la variante El Tor, como se ha realizado en algunos otros estudios (Ceccarelli et al., 2015; Rivera, Chun, Huq, Sack y Colwell, 2001), lo que representaría una ventaja puesto que agrupa las 2 variantes del gen por tanto identifica la totalidad de cepas portadoras del mismo.

#### 4.2.2 Especies de *Vibrio*

En *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, se encontró que de los 55 aislamientos de *V. parahaemolyticus* evaluados, 9 (16.4%) mostraron presencia del gen *tdh* que codifica la hemolisina directa termoestable, todos de origen clínico, 8 de ellos se aislaron de materia fecal y 1 de un alimento, por el contrario, no se observó presencia del gen *trh* en ninguno de los aislamientos clínicos o ambientales. Todos los aislamientos de *V. alginolyticus* fueron negativos para los dos genes. La PCR para genes *tdh* y *trh* se muestra en la figura 4-13.

Figura 4-12: PCR para genes *tdh* y *trh*.



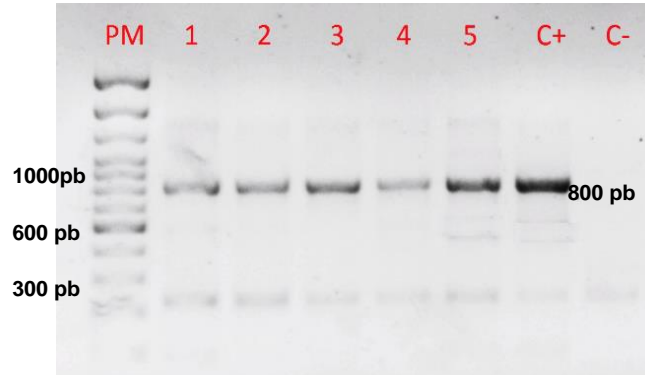
Carriles 1 a 5: Aislamientos de *V. parahaemolyticus*. Bandas esperadas: 500 pb (*trh*) y 269 pb (*tdh*).

En aislamientos ambientales de *V. parahaemolyticus* se ha reportado escasa presencia de los genes *tdh* y *trh* (Davis et al., 2017; Parveen et al., 2008; Ribeiro, Matté, Dropa, Lopes y Matté, 2011), debido probablemente a que la mayoría de los nichos ecológicos se encuentran libres de influencia antropogénica, sin embargo esto dependerá de factores como la ubicación geográfica y condiciones ambientales, como reportan Davis et al. en 2017 y Parveen et al. en 2008, en la bahía de Chesapeake en donde se encontró presencia de *V. parahaemolyticus* patogénico y si bien no es abundante esto representaría un riesgo. Los datos de Mahoney y cols en 2010, resultan similares a los hallazgos aquí expuestos pues en aislamientos ambientales no se observó presencia de ninguno de estos genes, sin embargo algunos aislamientos recuperados tanto de casos clínicos como de muestras ambientales con ausencia de estas hemolisinas, muestran presencia de factores de virulencia putativos que le proveen cierta capacidad infectiva (Mahoney, Gerding, Jones y Whistler, 2010).

Por el contrario, en aislamientos clínicos de *V. parahaemolyticus* se reporta gran presencia de los 2 genes, pues están fuertemente correlacionados con la virulencia del patógeno humano (Raghunath, 2015), tal como indica un estudio en donde se evidencia que la presencia de dichos genes podría estar influenciada por los serotipos de *V. parahaemolyticus*, pues no todos ellos portan en igual proporción genes de virulencia, por tanto no tienen el mismo potencial patogénico y pandémico (Wang, Tang, Su, Chen y Yan, 2017; Velazquez, León, Hernández y Canizalez, 2014.) y aunque en este estudio no se serotipificaron los aislamientos, esto podría respaldar la hipótesis de que los aislamientos aquí encontrados no incluyan serotipos pandémicos pero aun así tengan cierto potencial patogénico. En contraste, aunque varios reportes en la literatura indican presencia de dichos genes en aislamientos de *V. alginolyticus* (González, Blackstone y De Paola, 2006; Mustapha, Mustapha, Brahim y Cohen, 2012), otros al igual que en este trabajo, reportan baja o nula prevalencia en mencionada especie (Xie, Hu, Chen, Zhang y Ren, 2005).

El gen *vfh* se identificó en 24 (96%) de los 25 aislamientos de *V. fluvialis*, todos provenientes del programa de vigilancia tanto de muestras de agua como de materia fecal. El único aislamiento negativo es de origen ambiental remitido por INVEMAR. La PCR se muestra en la figura 4-14.

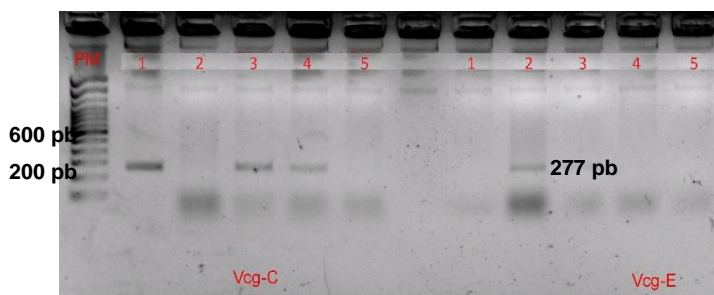
Figura 4-14: PCR para identificación del gen *vfh*.



Carriles 1 a 5: Aislamientos de *V. fluvialis*. Banda esperada: 800 pb (*vfh*).

Estudios para caracterización de *V. fluvialis* tanto en muestras clínicas como ambientales, evidencian presencia del gen *vfh* en un 90 a 100% de los aislamientos (Chowdhury et al., 2012; Liang et al., 2013). Estos resultados concuerdan con los reportados en este estudio y evidencian que este gen es conservado en la población, y estaría vinculado con la virulencia teniendo en cuenta que se recuperaron en aislados clínicos y de origen ambiental lo que podría sugerir causalidad.

Para el caso de los alelos *vcgC* y *vcgE* evaluados en los 7 aislamientos de *V. vulnificus*, se observó que 6 de ellos (85.7%) presentaron el genotipo *vcgC*, 5 de ellos remitidos por INVEMAR y 1 clínico perteneciente al programa de vigilancia, el aislamiento restante con el alelo *vcgE* es de origen ambiental. La PCR para genes *vcgC* o *vcgE* se muestra en la figura 4-15. Se han definido dos ecotipos teniendo en cuenta la presencia de uno u otro alelo de este gen de tal modo el genotipo *vcgE* se ha observado comúnmente en aislamientos de tipo ambiental y menos virulentos, mientras que el genotipo *vcgC* se ha descrito mayormente en aislamientos de tipo clínico razón por la cual se ha asociado con una mayor capacidad virulenta, y más teniendo en cuenta que *V. vulnificus* es considerado el *Vibrio* más agresivo debido la tasa de mortalidad en los casos clínicos que ronda el 50%, lo que resulta importante pues los aislamientos ambientales aquí identificados poseen el genotipo de mayor virulencia pese a su origen (Rosche et al. 2010).

Figura 4-15: PCR para identificación de alelos *vcgC* o *vcgE*.

Carriles 1 a 5: Aislamientos de *V. vulnificus*. Banda esperada: 277 pb (*vcgC* ó *vcgE*).

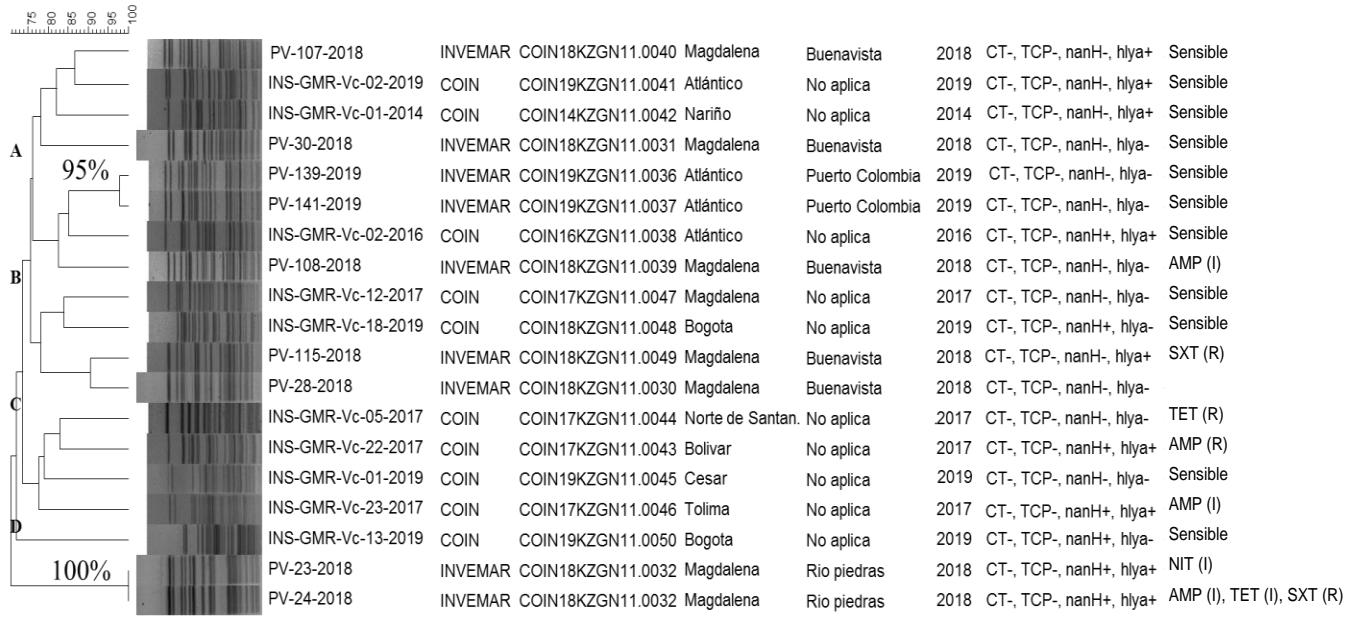
### 4.3 Tipificación mediante electroforesis en gel de campos pulsados

Se analizaron 85 aislamientos mediante PFGE de las especies *V. cholerae* No O1/O139 (n=20), *V. fluvialis* (n=20), *V. parahaemolyticus* (n=20), *V. alginolyticus* (n=20) y *V. vulnificus* (n=5). En los aislamientos analizados se observó una gran variabilidad genética entre aislamientos de la misma especie, indistintamente de su origen geográfico o tipo de muestra, sin embargo, la presencia de algunas ramas con porcentaje de similitud de entre 90 a 100% indican relación clonal entre algunos aislamientos clínicos y ambientales.

En los 20 aislamientos de *V. cholerae* No O1/O139, se observó una similitud entre 70 a 100 %, distribuidos en 18 patrones de PFGE, y agrupados en 4 clados (A-D), que incluyeron 2 pares de aislamientos con 100% de similitud, conformados en ambos casos por aislamientos de Magdalena, de muestras de agua del 2018, además se incluyó un par de aislamientos con 95% de similitud conformado por 2 aislamientos de agua de Atlántico aislados en 2019 (Figura 4-16), cabe resaltar que en los aislamientos de un mismo clon se observó congruencia en el perfil de virulencia, en este sentido y a pesar de la gran diversidad observada, la similitud entre la mayoría de aislamientos fue > 80 %, por tanto, presenta un mayor grado de relación genética. Así mismo se les realizó una comparación con la base de datos nacional de patrones de PFGE de *V. cholerae*, para la cual no se encontraron grandes similitudes, así como tampoco se agruparon con ninguno de los patrones únicos ya caracterizados. Estos resultados concuerdan con los de Viñas et al en Argentina, quienes

demonstraron gran diversidad genética entre los aislamientos de *V. cholerae* de origen clínico y ambiental, con algunas excepciones que se agruparon en un solo perfil (Viñas, 2016).

Figura 4-136: Dendograma aislamientos de *V. cholerae* No O1/O139.



Ampicilina (AM), Nitrofurantoina (NIT), Trimetropin Sulfa (SXT), Tetraciclina (TET).

En los 20 aislamientos de *V. parahaemolyticus* se observó un porcentaje de similitud entre el 40 y 100%, distribuidos en 4 clados (A-D), ninguno de ellos con características particulares, los 20 aislamientos se clasificaron en 16 patrones de PFGE. Se encontró que 2 de los 5 clados, agrupan aislamientos ambientales y clínicos con 100% de similitud, que adicionalmente tienen diferente origen geográfico y periodo de tiempo, indicando clonalidad. En el clado B, se incluyen 2 aislamientos, de Chocó (2018) y Atlántico (2019) remitidos por INVEMAR y 2 de Córdoba pertenecientes al programa de vigilancia del INS, aislados de materia fecal (2017) y un alimento (2019), sin embargo, en este grupo se observó variabilidad en los genes de virulencia a pesar de su relación, situación que ya se ha reportado como posible en otros estudios (Chen et al., 2017; Wang et al., 2017). En el clado D, se encuentra un aislamiento de Chocó remitido por INVEMAR (2018) y uno proveniente de Córdoba del programa de vigilancia del INS (2019), aislado de materia fecal, como se

observa en la figura 4-17, un hecho importante es la diferencia en la susceptibilidad a antibióticos (CTX y CIP) previamente determinada mediante métodos fenotípicos entre aislamientos de un mismo clon y aunque no se realizó búsqueda de blancos moleculares para confirmar esta resistencia, estos resultados podrían indicar que es posible la transferencia horizontal de genes lo que se analizara con la secuenciación de genoma completo que contempla el proyecto macro.

Los aislamientos de *V. parahaemolyticus*, se han reportado muy divergentes filogenéticamente, diferentes estudios utilizando PFGE, han demostrado variable similitud entre aislamientos clínicos con ambientales o de alimentos (Guin et al., 2019), y así mismo ocurre cuando se comparan solo los de origen ambiental (Chen et al., 2017), por el contrario, lo descrito por Wang et al. en 2017, demostró que hay mayor similitud entre aislamientos clínicos del mismo serotipo, debido a que la población bacteriana capaz de causar enfermedad en el humano es más reducida y por ende habrá mayor posibilidad de hallar relación filogenética entre ellos. Los resultados permitieron identificar en Colombia dos clones de *V. parahaemolyticus* en aislamientos tanto clínicos como ambientales de diferentes departamentos y costas e incluso diferentes años de aislamiento, a pesar de la población diversa observada. La identificación de estos aislamientos a través del tiempo y el espacio, evidencian la circulación de ciertos clones de *V. parahaemolyticus* en el país.

Figura 4-147: Dendograma preliminar aislamientos de *V. parahaemolyticus*.



SD: Sin dato. Cefotaxima (CTX), Cefotaxidima (CAZ).

En 20 aislamientos de *V. alginolyticus*, se observó similitud entre ellos del 60 al 100%, agrupados en 17 patrones de PFGE, se evidenció la presencia de 4 clados (A-D), en A y B se encontraron pares de aislamientos ambientales con 100% de similitud, el primero incluye un aislamiento de Chocó (2018) y uno de Atlántico (2019) ambos provenientes de muestras de agua, el segundo conformado por un aislamiento de Atlántico y otro de Nariño ambos del 2019 y provenientes de muestras de agua, y el último que incluye un aislamiento de Valle del Cauca y otro de Nariño, de igual forma aislados en 2019 y provenientes de muestras de agua y sin ninguna característica especial, como se muestra en la figura 4-18. Por otra parte, se observó que la ausencia de los genes de virulencia evaluados no es determinante en la relación entre aislamientos, así como tampoco las diferencias en susceptibilidad a CTX en los aislamientos de uno de los clones. En estudios de muestras ambientales en China se menciona diversidad entre los aislamientos, sin embargo, se observó mayor presencia de clados con 100 % de similitud (Ren et al., 2013; Ren et al., 2008), lo que concuerda con los hallazgos de este trabajo pues todos los aislamientos clonales son de tipo ambiental y al contrario de otras especies no hay relación estrecha con los aislamientos clínicos.

Figura 4-158: Dendograma de aislamientos de *V. alginolyticus*.

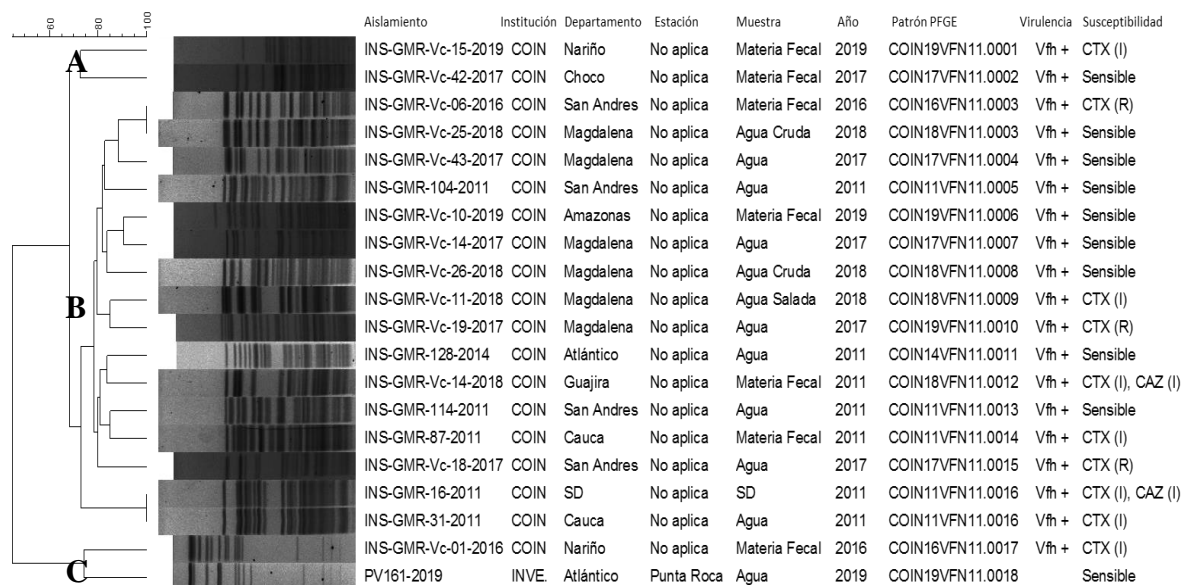


Tetraciclina (TET), Cefotaxima (CTX).



Los 20 aislamientos de *V. fluvialis*, se clasificaron en 18 patrones de PFGE, con una similitud del 50 al 100% y distribuidos en 3 clados (A-C). Se evidenció que en el clado B se agrupan y relacionan la mayoría de aislamientos, incluso 2 pares con 100 % de similitud de tipo ambiental y clínico que adicionalmente tienen diferente origen geográfico y periodo de tiempo, indicando clonalidad. Los que incluyeron 2 aislamientos de agua cruda del programa de vigilancia provenientes de San Andrés (2016) y Magdalena (2018) y por otra parte 2 aislamientos provenientes del programa de vigilancia uno de Cauca y otro de procedencia desconocida, ambos de 2011, como se muestra en la figura 4-19, resalta el hecho de la diferencia en la susceptibilidad previamente determinada mediante métodos fenotípicos frente a CTX y CAZ, y aunque no se realizó búsqueda de blancos moleculares para confirmar dicha resistencia fue evidente que es la especie que muestra más aislamientos resistentes lo que es de importancia teniendo en cuenta el aumento en la frecuencia de resistencia en especies microbianas. Para *V. fluvialis* la literatura reporta que hay gran diversidad genética, sin embargo una particularidad que mencionan estudios en la India y en China (Chowdhury et al., 2012; Liang et al., 2013), es que los clados generados se agrupan según periodicidad y también según resistencia a antibióticos lo que no se observa claramente en la población evaluada.

Figura 4-169: Dendograma de aislamientos de *V. fluvialis*.



SD: Sin dato. Cefotaxima (CTX), Cefotaxidima (CAZ).

En los 5 aislamientos de *V. vulnificus* no se observó una relación filogenética estrecha, la similitud oscilo de 70 a 90 %, y se agruparon en 5 patrones de PFGE, distribuidos en 2 clados (A-B) (Figura 4-20). Se observó la presencia de un clon con 90% de similitud que comparte características genómicas como mismo alelo de virulencia, de sensibilidad y de procedencia geográfica, en la literatura hay reportes que evidencian el alto grado de diversidad genética que presenta esta especie y la gran variedad de patrones únicos de PFGE que usualmente se presentan (Jeong, Kim, Jeon, Park y Kim, 2011; Wong et al., 2004).

Figura 4-2017: Dendograma aislamientos de *V. vulnificus*.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

- Las técnicas estandarizadas para confirmación de *Vibrio* spp. e identificación de genes de virulencia, mostraron ser específicas, sensibles y rápidas aplicables en aislamientos de origen clínico y ambiental.
- Los métodos moleculares aquí descritos mostraron mayor sensibilidad y sensibilidad que los fenotípicos pues los primeros permitieron identificar aislamientos que por métodos fenotípicos fueron incongruentes.
- Se logro identificar por primera vez 5 especies de *Vibrio* circulantes en diferentes reservorios ambientales del país, constituidos por aguas de zonas costeras y agua de interés en salud pública, estableciendo su distribución geográfica.
- Al comparar los aislamientos clínicos y ambientales en el mismo periodo de tiempo (2018-2019), se observó una distribución similar de las especies evaluadas lo que podría indicar que los reservorios ambientales podrían ser la fuente de trasmisión.
- Se confirmó como principal agente etiológico de vibriosis en el país a *V. cholerae* No O1/O139, *V. parahaemolyticus* y *V. fluvialis*, lo que evidencia que este primero no es el único *Vibrio* patogénico de interés clínico en Colombia.
- Se identificaron aislamientos portadores de genes de virulencia asociados con mayor potencial patogénico en cada una de las especies.

- Mediante PFGE se observó gran heterogeneidad genética en las 5 especies incluidas en este estudio, sin embargo, se identificaron clones circulantes que persisten a través del tiempo. Es necesario tipificar más aislamientos para determinar fuente común.

## 5.2 Recomendaciones

- Se sugiere la ejecución de vigilancia por laboratorio de otras especies de *Vibrio* a nivel clínico, dada su presencia causando casos clínicos y resulta de gran importancia conocer datos de prevalencia e incidencia y así fortalecer los datos epidemiológicos de las vibriosis, siguiendo el ejemplo de países desarrollados.
- Basados en reportes a nivel mundial sobre la influencia del cambio climático en la dinámica poblacional de *Vibrio* spp, y la evidencia aquí aportada sobre su presencia en zonas costeras del país, sería útil la implementación de monitoreo en reservorios ambientales, pues estos podrían actuar como potenciales focos de brotes, y así plantear estrategias de contención de futuras vibriosis.
- Se sugiere monitoreo a nivel industrial, dada la ausencia de un programa Nacional de vigilancia de especies de *Vibrio* especialmente *V. parahaemolyticus*, teniendo en cuenta que la zona pacífica del país posee gran actividad pesquera y la presencia de especies de *Vibrio* spp. en alimentos marinos y su entorno, eventualmente podría convertirse en un problema de salud pública, así mismo el monitoreo y análisis de las condiciones ambientales podrían ser predictivos de posibles brotes.
- Es de importancia compartir y comparar la información aquí obtenida, especialmente los datos de PULSNET, a nivel regional teniendo en cuenta nuestra participación en la red para Latinoamérica y el Caribe, lo que fortalecería la información disponible acerca de *Vibrio* spp en las Américas.

## A. Anexo1: Mezcla maestra para la múltiple Vibrio PCR.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen para 1 muestra	Control positivo
H2O PCR	-----	-----	7.95 µl	3.6 µl
Buffer	10X	1X	2.5 µl	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 µM	1.5 µM	0.75 µl	1.5 µl
dNTP's	10 µM	0.2 µM	0.5 µl	2.0 µl
Primer Forward-Tlh	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Primer Reverse-Tlh	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Primer Forward-Vvha	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Primer Reverse-Vvha	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Primer Forward-ToxR	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Primer Reverse-ToxR	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Primer Forward-gyrB	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Primer Reverse-gyrB	10 µM	0.5 µM	1.25 µl	1.25 µl
Taq polimerasa	5 U	1.5 µM	0.3 µl	0.4 µl
ADN	-----	-----	3 µl	5 µl Mix ADN.
Volumen Total			25 µl	25 µl

## B. Anexo2: Mezcla maestra para PCR para confirmación de *V. cholerae* y presencia de CT y TCP.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen para 1 muestra
<b>H2O PCR</b>	-----	-----	10.8 µl
<b>Buffer</b>	10X	1X	2,5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 µM	2.0 µM	1.0 µl
<b>dNTP's</b>	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
<b>Primer Forward-VC-F2</b>	10 µM	0.8 µM	2 µl
<b>Primer Reverse-VC-mR1</b>	10 µM	0.8 µM	2 µl
<b>Primer Forward-CT 94-F</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Primer Reverse-CT 614-R</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Primer Forward-TCP 72-F</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Primer Reverse-TCP 477-R</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Taq polimerasa</b>	5 U	1 U	0.2 µl
<b>ADN</b>	-----	-----	2 µl
<b>Volumen Total →</b>			25 µl

### **C. Anexo3: Mezcla maestra para PCR identificación de serogrupos de *V. cholerae*.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen para 1 muestra</b>
<b>H2O PCR</b>	-----	-----	15.1 µl
<b>Buffer</b>	10X	1X	2,5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 µM	1.5 µM	0.75 µl
<b>dNTP's</b>	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
<b>Primer Forward- VCO1-F2</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Primer Reverse- VCO1-R2</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Primer Forward- VCO139-F2</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Primer Reverse- VCO139-R2</b>	10 µM	0.4 µM	1 µl
<b>Taq polimerasa</b>	5 U	0.75 U	0.15 µl
<b>ADN</b>	-----	-----	2 µl
<b>Volumen Total →</b>			25 µl

## D. Anexo4: Mezcla maestra para cada PCR de genes de virulencia.

<b>PCR multiplex para genes de virulencia: tdh/trh y nanH/hlyA</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen para 1 muestra</b>
<b>H2O PCR</b>	-----	-----	10.1 µl
<b>Buffer</b>	10X	1X	2,5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 µM	2.0 µM	1.0 µl
<b>dNTP's</b>	10 µM	0.4 µM	1.0 µl
<b>Primer Forward- VCO1-F2</b>	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
<b>Primer Reverse- VCO1-R2</b>	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
<b>Primer Forward- VCO139-F2</b>	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
<b>Primer Reverse- VCO139-R2</b>	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
<b>Taq polimerasa</b>	5 U	2.0 U	0.4 µl
<b>ADN</b>	-----	-----	5 µl
<b>Volumen Total</b>			<b>25 µl</b>
<b>PCR sencilla para genes de virulencia: vfh, vcgC o vcgE.</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen para 1 muestra</b>
<b>H2O PCR</b>	-----	-----	12.7 µl
<b>Buffer</b>	10X	1X	2.5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 µM	2.0 µM	1.0 µl
<b>dNTP's</b>	10 µM	0.4 µM	1.0 µl
<b>Primer Forward</b>	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
<b>Primer Reverse</b>	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
<b>Taq polimerasa</b>	5 U	1.5 U	0.3 µl
<b>ADN</b>	-----	-----	5 µl
<b>Volumen Total</b>			<b>25 µl</b>



## E. Anexo5: Listado con resultados de aislamientos analizados.

Código	Procedencia	Departamento	Muestra	Especie	Virulencia	Patrón PFGE
PV-01	INS	Nte- Santander	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	COIN11K16N11.0013
PV-02	INS	Valla del Cauca	Materia fecal	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-03	INS	Atlántico	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN14VFN11.0011
PV-04	INS	San Andrés	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN11VFN11.0005
PV-05	INS	Cauca	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN11VFN11.0016
PV-06	INS	Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-07	INS	San Andrés	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN11VFN11.0013
PV-08	INS	SD	SD	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN11VFN11.0016
PV-09	INS	Cauca	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN11VFN11.0014
PV-10	INS	Guajira	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN11VAN11.0010
PV-11	INS	Magdalena	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN12K16N11.0008
PV-12	INS	Bogotá D.C	Alimento	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-13	INS	Cauca	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-14	INS	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-15	INS	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-16	INS	Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-17	INVEMAR	Choco	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0016
PV-18	INVEMAR	Choco	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-19	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-20	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-21	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-22	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-23	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	COIN18KZGN11.0032
PV-24	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	COIN18KZGN11.0032
PV-25	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH -hlyA -</i>	COIN18KZGN11.0029
PV-26	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18K16N11.0003
PV-27	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH -hlyA -</i>	No aplica
PV-28	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH -hlyA -</i>	COIN18KZGN11.0030
PV-29	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-30	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH -hlyA -</i>	COIN18KZGN11.0031
PV-31	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. vulnificus</i>	<i>vcgE +</i>	No aplica
PV-32	INVEMAR	SD	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18K16N11.0015
PV-35	INS	Santander	Lesión de pierna	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0012
PV-36	INS	Magdalena	Agua Salada	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18K16N11.0012
PV-41	INS	Magdalena	agua salada	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-42	INS	Magdalena	agua cruda	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-43	INS	Magdalena	agua salada	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-44	INS	Magdalena	agua salada	No amplifico	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-45	INS	Magdalena	agua salada	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-46	INS	Magdalena	agua salada	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-47	INS	Magdalena	agua salada	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN18VFN11.0009
PV-48	INS	San Andrés	SD	No amplifico	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-49	INS	San Andrés	SD	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+ hlyA-</i>	No aplica
PV-50	INS	Guajira	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN18VFN11.0012
PV-51	INS	Valle del Cauca	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	No aplica
PV-52	INS	Bolívar	Hemocultivo	<i>V. vulnificus</i>	<i>vcgC +</i>	COIN18K1RN11.0003

PV-53	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18K16N11.0010
PV-54	INS	Valle del Cauca	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	No aplica
PV-55	INS	Bogotá D.C	Materia fecal	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-57	INS	Nte. Santander	Materia fecal	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0011
PV-58	INS	Valle del Cauca	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	No aplica
PV-59	INS	Magdalena	Agua cruda	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN16VFN11.0003
PV-60	INS	Magdalena	Agua cruda	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN18VFN11.0008
PV-61	INS	Cesar	Hemocultivo	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	COIN19KZGN11.0045
PV-62	INS	Sucre	Materia fecal	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-63	INS	Sucre	Materia fecal	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-64	INS	Nte. Santander	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	COIN17KZGN11.0044
PV-65	INS	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+ hlyA-</i>	No aplica
PV-66	INS	Magdalena	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	COIN17KZGN11.0047
PV-67	INS	San Andrés	SD	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	No aplica
PV-68	INS	Bolívar	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	No aplica
PV-69	INS	Bolívar	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	COIN17KZGN11.0043
PV-70	INS	Guajira	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	No aplica
PV-71	INS	Valle del Cauca	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	No aplica
PV-72	INS	Magdalena	Materia fecal	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-73	INS	Magdalena	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	No aplica
PV-74	INS	Magdalena	Agua	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-75	INS	San Andrés	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN17VFN11.0015
PV-76	INS	Magdalena	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN19VFN11.0010
PV-78	INS	San Andrés	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	No aplica
PV-77	INS	San Andrés	Agua	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-79	INS	Guajira	Materia fecal	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-80	INS	Putumayo	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	No aplica
PV-81	INS	Putumayo	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	No aplica
PV-82	INS	Magdalena	agua salada	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN17VAN11.0001
PV-83	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	No aplica
PV-84	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	No aplica
PV-85	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	COIN17K16N11.0009
PV-86	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	No aplica
PV-87	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	No aplica
PV-88	INS	Choco	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN17VFN11.0002
PV-89	INS	Magdalena	Agua salada	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN17VAN11.0015
PV-90	INS	Nariño	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	COIN14KZGN11.0042
PV-91	INS	Magdalena	Agua salada	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	No aplica
PV-92	INS	Magdalena	Agua dulce	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN17VFN11.0007
PV-93	INS	Tolima	Líquido cefalorraquídeo	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	COIN17KZGN11.0046
PV-94	INS	Magdalena	Agua dulce	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN17VFN11.0004
PV-95	INS	Atlántico	agua cruda	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+ hlyA-</i>	No aplica
PV-96	INS	Atlántico	agua cruda	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+ hlyA-</i>	No aplica
PV-97	INS	Atlántico	agua cruda	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	No aplica
PV-98	INS	Atlántico	agua cruda	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	COIN19KZGN11.0041
PV-99	INS	Atlántico	agua cruda	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	No aplica
PV-100	INS	Atlántico	agua cruda	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	No aplica
PV-101	INS	Nariño	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN16VFN11.0017
PV-102	INS	Atlántico	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	COIN16KZGN11.0038
PV-103	INS	Bogotá D.C	SD	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	No aplica
PV-104	INS	San Andrés	SD	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	No aplica
PV-105	INS	San Andrés	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN16VFN11.0003

PV-106	INS	Valle del Cauca	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	No aplica
PV-107	INVEMAR	Magdalena	Agua estuarina	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	COIN18KZGN11.0040
PV-108	INVEMAR	Magdalena	Agua estuarina	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	COIN18KZGN11.0039
PV-109	INVEMAR	Choco	Agua marina	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18K16N11.0009
PV-110	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0004
PV-111	INVEMAR	Magdalena	Agua estuarina	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	No aplica
PV-112	INVEMAR	Choco	Agua marina	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18K16N11.0005
PV-114	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	No amplifico	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-115	INVEMAR	Magdalena	Agua estuarina	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	COIN18KZGN11.0049
PV-116	INVEMAR	Choco	Agua fluvial	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0003
PV-117	INS	Cesar	Hemocultivo	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-118	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0013
PV-120	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	No amplifico	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-122	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	No amplifico	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-123	INVEMAR	Magdalena	Agua fluvial	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	No aplica
PV-124	INVEMAR	Magdalena	Agua fluvial	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+hlyA+</i>	No aplica
PV-126	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0005
PV-127	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-128	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-129	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-130	INVEMAR	Magdalena	Agua marina	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-131	INS	Amazonas	Materia Fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN19VFN11.0006
PV-132	INS	Atlántico	Agua cruda	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA+</i>	No aplica
PV-133	INS	Caldas	Hemocultivo	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-134	INS	Bogotá D.C	Hemocultivo	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH+ hlyA-</i>	COIN19KZGN11.0050
PV-135	INS	Nariño	Agua cruda	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19VAN11.0008
PV-136	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-138	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-139	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	COIN19KZGN11.0036
PV-140	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-141	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH- hlyA-</i>	COIN19KZGN11.0037
PV-144	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-145	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-147	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-149	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-150	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-151	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-152	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-153	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN18VAN11.0003
PV-154	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-156	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19K16N11.0002
PV-157	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-158	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-159	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-160	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-161	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh -</i>	COIN19VFN11.0018
PV-162	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-163	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. vulnificus</i>	<i>vcgC +</i>	COIN19K1RN11.0005
PV-164	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19VAN11.0006
PV-165	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-167	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-168	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-169	INS	Nariño	Materia fecal	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh +</i>	COIN19VFN11.0001
PV-170	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19K16N11.0015
PV-171	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica

PV-172	INS	Bogotá D.C	Materia fecal	<i>V. cholerae</i>	<i>nanH</i> + <i>hlyA</i> -	COIN18KZGN11.0048
PV-173	INS	Córdoba	Aislamiento alimento	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> + <i>trh</i> -	COIN19K16N11.0009
PV-174	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-176	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh</i> +	No aplica
PV-177	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-178	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	COIN19VAN11.0007
PV-181	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-182	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	COIN19K16N11.0009
PV-184	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-185	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-186	INVEMAR	Atlántico	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-187	INVEMAR	Atlántico	Agua	<i>V. cholerae</i>		No aplica
PV-190	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-191	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-192	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	COIN19K16N11.0006
PV-193	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-194	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. vulnificus</i>	<i>vegC</i> +	No aplica
PV-195	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-196	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-197	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	COIN19VAN11.0002
PV-198	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-199	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-200	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-201	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-202	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-203	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-204	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-205	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. vulnificus</i>	<i>vegC</i> +	COIN19K1RN11.0001
PV-206	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. vulnificus</i>	<i>vegC</i> +	COIN19K1RN11.0002
PV-207	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. vulnificus</i>	<i>vegC</i> +	COIN19K1RN11.0004
PV-208	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. alginolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	COIN19VAN11.0014
PV-209	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-210	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-211	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-212	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	No aplica
PV-213	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	COIN19K16N11.0014

PV-214	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-215	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-216	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-217	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-219	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-220	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-221	INVEMAR	Atlántico	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19K16N11.0016
PV-222	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-223	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-226	INVEMAR	Valle del Cauca	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-227	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-228	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-229	INVEMAR	Nariño	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-230	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-231	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19VAN11.0009
PV-232	INVEMAR	Nariño	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-233	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-234	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-235	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19K16N11.0007
PV-236	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-237	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-239	INVEMAR	Nariño	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-240	INVEMAR	Nariño	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-241	INVEMAR	Nariño	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-242	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19VAN11.0006
PV-243	INVEMAR	Nariño	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-244	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-245	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-247	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-248	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-249	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-250	INVEMAR	Nariño	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-251	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-252	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-254	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-255	INVEMAR	Nariño	Agua	V. <i>alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19VAN11.0014
PV-257	INVEMAR	Magdalena	Agua	V. <i>alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-259	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-261	INVEMAR	Magdalena	Agua	V. <i>parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-263	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica
PV-264	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplifico	No aplica	No aplica

PV-265	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-266	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-267	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-269	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V.alginolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19VAN11.0017
PV-270	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	COIN19K16N11.0004
PV-271	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-273	INVEMAR	Magdalena	Agua	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh - trh -</i>	No aplica
PV-277	INVEMAR	Magdalena	Agua	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-278	INS	Bogotá D.C	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	COIN19K16N11.0001
PV-279	INS	San Andrés	Aislamiento alimento	No amplificó	No aplica	No aplica
PV-280	INS	Córdoba	Materia fecal	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh + trh -</i>	COIN19K16N11.0011

No amplificó: Pertenece a otra especie de *Vibrio* o no es *Vibrio* spp.

## E. Anexo6: Resultados secuenciación de productos de PCR.

.Gen	Iniciador	# pb secuenciadas	Secuencia Hit	% Identidad
<i>toxR</i>	<i>toxR</i> -F	193	<i>V. fluvialis</i> - <u>AF170885.1</u>	97.18
	<i>toxR</i> -R	191		98.91
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F	310	<i>V. alginolyticus</i> - <u>MN518702.1</u>	99.34
	<i>gyrB</i> -R	310		98.99
<i>tlh</i>	<i>Tlh</i> -F	424	<i>V. parahaemolyticus</i> - <u>CP031782.1</u>	98.57
	<i>Tlh</i> -R	421		99.28
<i>vvhA</i>	<i>vvhA</i> -F	1221	<i>V. vulnificus</i> - <u>CP037932.1</u>	99.70
	<i>vvhA</i> -R	1520		99.70
<i>nanH</i>	<i>nanH</i> -F	629	<i>Vibrio cholerae</i> - <u>MH513993.1</u>	95.05
	<i>nanH</i> -R	721		99.03
<i>vfh</i>	<i>vfh</i> -F	801	<i>Vibrio fluvialis</i> - <u>CP014034.2</u>	96.21
	<i>vfh</i> -R	1109		97.90
<i>vcgE</i>	<i>vcgE</i> -F	251	<i>V. vulnificus</i> -CP035784.1	98.78
	<i>vcgE</i> -R	250		98.36
<i>hlyA</i>	<i>hlyA</i> -F	1335	<i>Vibrio cholerae</i> -CP047299.1	98.33
	<i>hlyA</i> -R	1245		97.80
<i>vcgC</i>	<i>vcgC</i> -F	249	<i>V. vulnificus</i> -CP019320.1	99.58
	<i>vcgC</i> -R	252		98.38
<i>tdh</i>	<i>tdh</i> -F	240	<i>V. parahaemolyticus</i> -MN813982.1 <i>V. alginolyticus</i> -DQ440529.1	99.56
	<i>tdh</i> -R	238		93.72
<i>tlh</i>	<i>trh</i> -F	1233	<i>V. parahaemolyticus</i> -MH332788.1	99.12
		1253		98.03
	<i>trh</i> -R	1253	<i>V. alginolyticus</i> -DQ359750.1	98.26
				97.18





## Bibliografía

- Abana, D., Gyamfi, E., Dogbe, M., Opoku, G., Opare, D., Boateng, G., y Mosi, L. (2019). Investigating the virulence genes and antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 in environmental and clinical isolates in Accra, Ghana. *Bmc Infectious Diseases*, 19 (1), 76.
- Agudelo, C.A. (1994). Cólera en Colombia. *Colombia: Ciencia Y Tecnología*, 12 (4).
- Alam, M. T., Weppelmann, T.A., Longini, I., De Rochars, V.M., Morris, J.G. y Ali, A. (2015). Increased isolation frequency of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from environmental monitoring sites in Haiti. *Plos One*, 10 (4), E0124098.
- Almagro, S. y Boyd, E. (2009). Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. *Infect Immun*, 77 (9), 3807-3816.
- Aono, E., Sugita, H., Kawasaki, J., Sakakibara, H., Takahashi, T., Endo, K. y Deguchi, Y. (1997). Evaluation of the polymerase chain reaction method for identification of *Vibrio vulnificus* isolated from marine environments. *J Food Prot*, 60 (1), 81-83.
- Bahamonde, C y Stuardo, V. La epidemia de cólera en América Latina: reemergencia y morbimortalidad. 2013;33(1):40–6.
- Baker, C., Trinanes, J., Gonzalez, N. Y Martinez, J. (2017). Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends Microbiol*, 25 (1), 76-84.
- Banerjee, R., Das, B., Nair, B., Basak, S. (2014). Dynamics in Genome Evolution of *Vibrio Cholerae*. *Infect Genet Evol*, 23, 32-41.
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Jones, D.D. y Kaysner, C.A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex pcr amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods*, 36 (3), 215-225.
- Bharati, K. y Ganguly, N.K. (2011). Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein. *Indian J Med Res*, 133 (2), 179-187.
- Bier, N., Bechlars, S., Diescher, S., Klein, F., Hauk, G., Duty, O. y Dieckmann, R. (2013). Genotypic diversity and virulence characteristics of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates from the baltic sea region. *Appl Environ Microbiol*, 79 (12), 3570-3581.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29 (8), 601-608.
- Boucher, Y. y Stokes, H. (2006). The roles of lateral gene transfer and vertical descent in *Vibrio* evolution. Thompson F.L Et Al (Ed), *The Biology of Vibrios*. Washington, D.C: Asm Press.
- Caffer, M., Terragno, R., González, S., Viñas, M., Pichel, M. y Binsztein, N. (2007). Manual de procedimientos-aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*.:

- Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”: Centro Regional De Referencia Del Who Global Salm Surv Para América Del Sur. Recuperado De: [Http://Bvs.Panalimentos.Org/Local/File/Manual\\_Vibrio\\_Cholerae\\_Aislamiento\\_Caracterizaci%A2n\\_2008.Pdf](http://Bvs.Panalimentos.Org/Local/File/Manual_Vibrio_Cholerae_Aislamiento_Caracterizaci%A2n_2008.Pdf)
- Castañón, C.A., Enríquez, F. y Figueroa, P. (2015). Efecto citotóxico de la proteína VCC de *Vibrio cholerae* en células Hek-293. *Evidencia Médica E Investigación En Salud*. 8 (3), 111-116.
- Ceccarelli, D., Chen, A., Hasan, N. A., Rashed, S. M., Huq, A. y Colwell, R. R. (2015). Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* carrying multiple virulence factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. *Appl Environ Microbiol*, 81 (6), 1909-1918.
- Centers for Diseases, Control and Prevention [CDC]. (2014). *National Enteric Disease Surveillance: Covis Annual Summary, 2014*. (2016). Recuperado de: [Https://Www.Cdc.Gov/Nationalsurveillance/Pdfs/Covis-Annual-Summary-2014-508c.Pdf](https://www.Cdc.Gov/Nationalsurveillance/Pdfs/Covis-Annual-Summary-2014-508c.Pdf)
- Chakraborty, R., Chakraborty, S., Keya. D, Sinha, S., Mukhopadhyay, A.K., Khanam, J., Ramamurthy T., Takeda Y., Bhattacharya S.K. y Nair G. B. (2005). Cytotoxic and cell vacuolating activity of *Vibrio fluvialis* isolated from paediatric patients with diarrhoea. *J Med Microbiol*, 54 (8), 707-716.
- Chakraborty, R., Sinha, S., Mukhopadhyay, A., Asakura, M., Yamasaki, S., Bhattacharya, S., Nair G.B. y Ramamurthy, T. (2006). Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by pcr targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the toxR gene. *J Med Microbiol*, 55 (6), 805-808.
- Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A. K., Bhadra, R. K., Ghosh, A. N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S. . . Colwell, R. R. (2000). Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol*, 66 (9), 4022-4028.
- Chen, A., Hasan, N., Haley, B., Taviani, E., Tarnowski, M., . . . Colwell, R.R. (2017). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Chesapeake Bay, Maryland. *Front Microbiol*, 15 (8), 2460.
- Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L., . . . Tsai, S.F. (2003). Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res*, 13 (12), 2577-2587.
- Chowdhury, G., Joshi, S., Bhattacharya, S., Sekar, U., Birajdar, B., Bhattacharyya, A., Sumio, S., Y Ramamurthy, T. (2016). Extraintestinal infections caused by non-toxicogenic *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139. *Front Microbiol*, 7, 144.
- Chowdhury, G., Pazhani, G. P., Dutta, D., Guin, S., Dutta, S., Ghosh, S., . . . Ramamurthy, T. (2012). *Vibrio fluvialis* in patients with diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis*, 18 (11), 1868-1871.
- Chowdhury, N.R., Chakraborty, S., Ramamurthy, T., Nishibuchi, M., Yamasaki, S., Takeda, Y. y Nair, G.B. (2000). Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg Infect Dis*, 6 (6), 631-636.

- Chunga, J.C. (2018). *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* toxigénicos en cuerpos de agua de Piura. (Tesis De Pregrado). Universidad Nacional De Piura, Peru.
- Chen, A. (2017). Vibrios in the environment: an investigation of environmental *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (Tesis De Doctorado). *University Of Maryland*. Estados Unidos.
- Cobos, Y.T. (2019). Caracterización fenotípica de aislamientos de *Vibrio* spp. recuperados entre los años 2016-2019 de muestras clínicas y de agua para consumo humano de la vigilancia intensificada por laboratorio, así como de cuerpos de agua en zonas costeras en Colombia. (Tesis de pregrado) Universidad Antonio Nariño, Colombia.
- Cooper, K.L., Luey, C.K., Bird, M., Terajima, J., Nair, G.B., Kam, K.M., . . . y Ribot, E.M. (2006). Development And validation of a pulsenet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog Dis*, 3 (1), 51-58.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., . . . Mioni, R. (2007). Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol*, 102 (1), 229-237.
- Dalsgaard, A., Serichantalergs, O., Forslund, A., Lin, W., Mekalanos, J., Mintz, E., . . . Wells, J. G. (2001). Clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* serogroup O141 carry the *ctx* phage and the genes encoding the toxin-coregulated pili. *J Clin Microbiol*, 39 (11), 4086-4092.
- Davis, B.J., Jacobs, J.M., Davis, M.F., Schwab, K.J., De Paola, A. y Curriero, F.C. (2017). Environmental determinants of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol*, 83 (21), E01147-17.
- De Menezes, F., Rodriguez, M., De Carvalho, F., Rebouças, R., Costa, R., De Sousa, O., . . . Vieira, R. (2017). Pathogenic *Vibrio* species isolated from estuarine environments (Ceará, Brazil) - antimicrobial resistance and virulence potential profiles. *An. Acad. Bras. Ciênc*, 89 (2), 1175-1188.
- Di Pinto, A., Ciccarese, G., Tantillo, G., Catalano, D. y Forte, V. (2005). A collagenase-targeted multiplex pcr assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot*, 68 (1), 150-153.
- Dickinson, G., Lim, K. Y., Y Jiang, S. C. (2013). Quantitative Microbial Risk Assessment of Pathogenic Vibrios In Marine Recreational Waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol*, 79 (1), 294-302.
- Elmahdi, S., Parveen, S., Ossai, S., Dasilva, L.V., Jahncke, M., Bowers, J. y Jacobs, J. (2018). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* recovered from oysters during an oyster relay study. *Appl Environ Microbiol*, 84 (3), E01790-17.
- Eneva, R., Engibarov, S., Strateva, T., Abrashev, R. y Abrashev, I. (2011). Biochemical studies on the production of neuraminidase by environmental isolates of *Vibrio cholerae* non-o1 from Bulgaria. *Can J Microbiol*, 57 (7), 606-610.
- Esteves, K., Hervio-Heath, D., Mosser, T., Rodier, C., Tournoud, M. G., Jumas-Bilak, E., . . . Monfort, P. (2015). Rapid Proliferation of *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibrio Vulnificus*, And *Vibrio Cholerae* During Freshwater Flash Floods in French Mediterranean Coastal Lagoons. *Appl Environ Microbiol*, 81 (21), 7600-7609.

- Fabbro, C., Cataletto, B. y Del Negro, P. (2010). Detection of pathogenic vibrio parahaemolyticus through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Fems Microbiol Lett*, 307 (2), 158-164.
- Faruque, S., Albert M.J. y Mekalanos, J.J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (4), 1301-1314.
- Faruque, S. M. y Nair, G. B. (2002). Molecular Ecology Of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Immunol*, 46 (2), 59-66.
- Fernández F.S., y Alonso, G. (2009). Colera Y *Vibrio cholerae*. *Inhrr*, 40 (2), 50-69.
- Fields, P., Popovic, T., Wachsmuth, K. y Olsvik, O. (1992). Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol*, 30 (8), 2118-2121.
- Galen, J.E., Ketley, J.M., Fasano, A., Richardson, S.H., Wasserman, S.S. y Kaper, J.B. (1992). Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infect Immun*, 60 (2), 406-415.
- García, E., Hernández, A., Herrero J.A. y Gómez, J. (2010). Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. *Medicine*, 10 (52), 3489-3496.
- Gargouti A.S., Ab-Rashid M.N.K., Ghazali M.F., Mitsuaki N., Haresh K.K. y Radu S. (2015). Detection of *tdh* and *trh* toxic genes in *Vibrio alginolyticus* strain from mantis shrimp (*Oratosquilla Oratoria*). *Journal Of Nutrition & Food Sciences*, 2015. 5 (5), 405.
- Garibyan, L., y Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (Pcr). *J Invest Dermatol*, 133 (3), 1-4.
- Gavilán, R.G. y Martínez, J. (2011). Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, 28 (1), 109-115.
- Gennari, M., Ghidini, V., Caburlotto, G. y Lleo, M. (2012). Virulence genes and pathogenicity islands in environmental *Vibrio* strains nonpathogenic to humans. *Fems Microbiol Ecol*, 82 (3), 563-573.
- Gomez, B. y Roque, A 2006. Isolation, enumeration, and preservation of the Vibrionaceae- Chapter 2, The Biology of Vibrios. Washington, D.C. ASM Press.
- González, S., Villagra, A., Pichel, M., Figueroa, S., Merletti, G., Caffer, M., . . . Binsztein, N. (2009). Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* No-O1, No-O139 asociados a cuadros de diarrea. *Rev. Argent. Microbiol.*, 41 (1), 111-119.
- González, N., Whitney, B., Jaykus, L. y Depaola, A. (2007). Comparison of direct genome restriction enzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Vibrio vulnificus* and their correspondence with multilocus sequence typing data. *Appl Environ Microbiol*, 73 (22), 7494-7500.
- González, N., Blackstone, G.M. y De Paola, A. (2006). Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol*, 72 (12), 7925-7929.

- Guin, S., Saravanan, M., Anjay, Chowdhury, G., Pazhani, G., Ramamurthy, T. y Das, S. (2019). Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in diarrhoeal patients, fish and aquatic environments and their potential for inter-source transmission. *Heliyon*, 5 (5), E01743.
- Han, J.H., Lee, J.H., Choi, Y.H., Park, J.H., Choi, T.J. y Kong, I.S. (2002). Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochim Biophys Acta*, 1599 (1-2), 106-114.
- Hasan, N. A., Ceccarelli, D., Grim, C. J., Taviani, E., Choi, J., Sadique, A., . . . Colwell, R. R. (2013). Distribution of virulence genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains in bangladesh, *Appl Environ Microbiol*. 79 (18), 5782-5.
- Hernández, C., Ulloa, J. Vergara, J., Espejo, R., Cabello, F. (2005). Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. *Rev Méd Chile*. 133, 1081-1088.
- Hernandez, M., Alvarez, A., Juarez, P., Bonifacio, N., Quesada, C., Vazquez, C. y Quinones, E. (2016). Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. *Int Microbiol*, 19 (4), 191-198.
- Horseman, M. y Surani, S. (2011). A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 15 (3), 157-166.
- Hossain, M.T., Kim, Y.O. y Kong, I.S. (2013). Multiplex pcr for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groel*, *tdh* and *trh* genes. *Mol Cell Probes*, 27 (5-6), 171-175.
- Hu, D., Liu, B., Feng., Ding, P., Guo, X., Wang, M., Cao, B., Reeves, P.R. y Wang, L. (2016). Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 29 (48), 7730-7739.
- Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlars, S., Bier, N., . . . Strauch, E. (2014). Pathogenic Vibrios In Environmental, Seafood and Clinical Sources in Germany. *Int J Med Microbiol*, 304 (7), 843-850.
- Igbinsa, E.O. y Okoh, A.I. (2010). *Vibrio fluvialis*: An unusual enteric pathogen of increasing public health concern. *Int J Environ Res Public Health*, 7 (10), 3628-3643.
- Instituto Nacional De Salud. (2011). Protocolo De Vigilancia En Salud Pública-Cólera. Recuperado de: [Https://Cruevalle.Org/Files/Pro-Colera.Pdf](https://Cruevalle.Org/Files/Pro-Colera.Pdf)Instit
- Instituto Nacional de Salud. (2013). Vigilancia fenotípica y genotípica de *Vibrio cholerae* 2010 – 2013. Recuperado de: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Vigilancia%20C%3%B3lera%20Colombia%202013.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. (2017). Guía para la vigilancia por laboratorio de *Vibrio cholerae*. Recuperado de: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Gu%C3%ADa%20para%20la%20vigilancia%20por%20laboratorio%20de%20Vibrio%20cholerae.pdf>
- Irengé, L., Ambroise, J., Mitangala, P., Bearzatto, B., Kabangwa, R., Durant, J. y Gala, J. (2019). Genomic analysis of pathogenic isolates of *Vibrio cholerae* from Eastern Democratic Republic of the Congo (2014-2017). *Biorxiv*, 708-735.

- Jeong, H., Kim, J., Jeon, S., Park, M. y Kim, S. (2011). Genotypic characterization of *Vibrio vulnificus* clinical isolates in Korea. *Osong Public Health Res Perspect*, 2 (1), 8-14.
- Johnson, C.N. (2015). Influence of Environmental Factors on *Vibrio* Spp. In Coastal Ecosystems. *Microbiol Spectr*, 3 (3).
- Jones, M.K. y Oliver, J.D. (2009). *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infect Immun*, 77 (5), 1723-1733.
- Kahler, A. M., Haley, B. J., Chen, A., Mull, B. J., Tarr, C. L., Turnsek, M., . . . Hill, V. R. (2015). Environmental surveillance for toxigenic *Vibrio cholerae* in surface waters of Haiti. *Am J Trop Med Hyg*, 92 (1), 118-125.
- Kam, K.M., Luey, C.K., Parsons, M.B., Cooper, K.L., Nair, G.B., Alam, M., . . . Swaminathan, B. (2008). Evaluation and validation of a pulsenet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *J Clin Microbiol*, 46 (8), 2766-2773.
- Khimmakthong, U. y Noochu, S. (2017). Detection of three pathogenic *Vibrio* species using multiplex polymerase chain reaction (Multiplex-Pcr). *Science & Technology Asia*, 22 (4).
- Kim, H.J., Ryu, J.O., Lee, S.Y., Kim, E.S. y Kim, H.Y. (2015). Multiplex pcr for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *Bmc Microbiol*, 15, 239.
- Kokashvili, T., Whitehouse, C.A., Tskhvediani, A., Grim, C.J., Elbakidze, T., Mitaishvili, N., . . . Tediashvili, M. (2015). Occurrence and diversity of clinically important *Vibrio* species in the aquatic environment of georgia. *Front Public Health*, 3, 232.
- Koralage, M.S., Alter, T., Pichpol, D., Strauch, E., Zessin, K.H. y Huehn, S. (2012). Prevalence and molecular characteristics of *Vibrio* spp. isolated from preharvest shrimp of the north western province of Sri Lanka. *Journal of Food Protection*, 75 (10), 1846-50.
- Kothary, M.H., Lowman, H., Mccardell, B.A. y Tall, B.D. (2003). Purification and characterization of enterotoxigenic el tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. *Infect Immun*, 71 (6), 3213-3220.
- Krebs, S.J. y Taylor, R.K. (2011). Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. *J Bacteriol*, 193 (19), 5260-5270.
- Kurdi, M., Mutalib, S., Ghani, M. y Aldulaimi, M. (2014). A review of important virulence factors of *Vibrio vulnificus*. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 6 (2), 76-88.
- Leyva, V., Puig, Y., Espino, M., Pereda, G., Portela, N., Morejón, P. y Roble, O. (2013). Especies patógenas de *Vibrio* aisladas en alimentos de origen marino. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 23 (1).
- Li, J., Lim, M.S., Li, S., Brock, M., Pique, M.E., Woods, V.L. y Craig, L. (2008). *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure*, 16 (1), 137-148.

- Liang, P., Cui, X., Du, X., Kan, B. y Liang, L. (2013). The virulence phenotypes and molecular epidemiological characteristics of *Vibrio fluvialis* in china. *Gut Pathogens*, 5 (1), 1-11.
- Lockwood, D.E., Kreger, A.S. y Richardson, S.H. (1982). Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*. *Infect Immun*, 35 (2), 702-708.
- Luo, Y., Ye, J., Jin, D., Ding, G., Zhang, Z., Mei, L., . . . Lan, R. (2013). Molecular analysis of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *Bmc Microbiol*, 13, 52.
- López, A., Manjarrez, G., Herrera, L., Montes, A., Olascuaga, Y., Ortega, R. (2010). Estudio piloto para el aislamiento de *Vibrio* spp en la ostras (*Crassostrea Rhizophorae*) capturadas en la ciénaga de la virgen, Cartagena, Colombia. *Rev Salud Publica Nutr*, 11, (1).
- Madhusudana, R.B. y Surendran, P.K. (2013). Detection of *ctx* gene positive Non-O1/Non-O139 *V. cholerae* in shrimp aquaculture environments. *J Food Sci Technol*, 50 (3), 496-504.
- Mahoney, J.C., Gerding, M.J., Jones, S.H. y Whistler, C.A. (2010). Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Appl Environ Microbiol*, 76 (22), 7459-7465.
- Martinelli Filho, J.E., Lopes, R.M., Rivera, I.N. y Colwell, R.R. (2016). Are natural reservoirs important for cholera surveillance? the case of an outbreak in a Brazilian estuary. *Lett Appl Microbiol*, 63 (3), 183-188.
- Martinez, J., Lozano, A., Viña, A., De Novoa, J. y Garcia, O. (2006). Differences in the api 20e biochemical patterns of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Fems Microbiol Lett*, 255 (1), 75-81.
- Ministerio de Salud. (2018). Circular externa conjunta No. 027 de 2018- Directrices para el fortalecimiento de las acciones de prevención, vigilancia, atención y control de cólera. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/circular-027-de-2018.pdf>
- Montaño, L., Díaz, P., Duarte, C., Moreno, J., Porras, P., Ríos, R., . . . Wiesner, M. (2017). *diversidad filogenética de aislamientos de Vibrio cholerae recuperados en Colombia, 1991-2014*. Bogota-Colombia. Presentaciones En Cartel. Recuperado de: <https://www.Revistabiomedica.Org/Index.Php/Biomedica/Article/View/4200/3752>
- Moore, S., Thomson, N., Mutreja, A. y Piarroux, R. (2014). Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of *Vibrio cholerae* clones. *Clin Microbiol Infect*, 20 (5), 373-379.
- Morris, J. y Achenson, D. (2003). Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clinical Infectious Diseases*, 37 (2), 272-280.
- Mustapha, S., Mustapha, E.M., Brahim, B. y Cohen, N. (2012). Characterization of *Vibrio alginolyticus* trh positive from mediterranean environment of Tamouda Bay (Morocco). *World Environment*, 2 (4), 76-80.

- Mustapha, S, Mustapha, M y Nozha. C. (2013). *Vibrio alginolyticus*: An emerging pathogen of foodborne diseases. *Maejo international journal of science and technology*. 2. 302-309.
- Neogi, S.B., Chowdhury, N., Asakura, M., Hinenoya, A., Haldar, S., Saidi, S.M., Kogure, K., Lara, R.J. y Yamasaki, S. (2010). A highly sensitive and specific multiplex pcr assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Lett Appl Microbiol*. 51 (3), 293-300.
- Newton, A.E., Garrett, N., Stroika, S.G., Halpin, J.L., Turnsek, M., Mody, R. K. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). Increase in *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of atlantic coast shellfish--2013. *Mmwr. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63 (15), 335–336.
- Newton, A., Kendall, M., Vugia, D.J., Henao, O.L. y Mahon, B.E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the united states, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems. *clinical infectious diseases: An official publication of the infectious disease's society of America*, 54 Suppl 5(0 5), S391–S395.
- Nhung, P.H., Ohkusu, K., Miyasaka, J., Sun, X.S. y Ezaki, T. (2007). Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to dnaJ gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 59 (3):271-5.
- Organizacion Panamericana de la Salud. (2010). Procedimientos para la identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio de microbiología. Recuperado de: [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Procedimiento\\_identificacion\\_V\\_cholera\\_LAB.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Procedimiento_identificacion_V_cholera_LAB.pdf)
- O'shea, Y.A., Reen, F.J., Quirke, A.M. y Boyd, E.F. (2004). Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J Clin Microbiol*, 42 (10), 4657-4671.
- Oliver, J. D. (2005). Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol Infect*, 133 (3), 383-391.
- Olson, R. y Gouaux, E. (2005). Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J Mol Biol*, 350 (5), 997-1016.
- Parsons, M.B., Cooper, K.L., Kubota, K.A., Puhr, N., Simington, S., Calimlim, P. S., . . . Ribot, E. M. (2007). Pulsenet usa standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathog Dis*, 4 (3), 285-292.
- Parveen, S., Hettiarachchi, K.A., Bowers, J.C., Jones, J.L., Tamplin, M.L., Mckay, R., . . . Depaola, A. (2008). Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int J Food Microbiol*, 128 (2), 354-361.
- Percival, S., y Williams, D. (2014). Chapter Twelve - *Vibrio*. (Eds.), *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)* (Pp. 237-248). London: Academic Press.



- Pinto, M.F., Baptista, T. y Neves, C.C. (2017). Development of a new multiplex-pcr tool for the simultaneous detection of the fish pathogens *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* and *Edwardsiella tarda*. *Aquat. Living Resour*, 30, 4.
- Rader, A.E. y Murphy, J.R. (1988). Nucleotide sequences and comparison of the hemolysin determinants of *Vibrio cholerae* El Tor Rv79(Hly+) and Rv79(Hly-) and classical 569b(Hly-). *Infect Immun*, 56(6), 1414-1419.
- Raghunath P. (2015). Roles of thermostable direct hemolysin (*tdh*) and *tdh*-related hemolysin (*trh*) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 805.
- Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G. P. y Shinoda, S. (2014). *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. *Front Microbiol*, 5 (91).
- Raszl, S.M., Froelich, B.A., Vieira, C.R., Blackwood, A.D. y Noble, R.T. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. *J Appl Microbiol*, 121(5), 1201-1222.
- Rattanathumsakul, T., Suwanchairob, O., Hannarong, S., Wijit, W., Laosiritaworn, Y. y Swaddiwudhipong, W. (2019). Sequential clusters of multidrug-resistant cholera cases in the thai-myanmar border, 2015. *Outbreak, Surveillance, Investigation & Response*, 12 (2).
- Ren, C., Hu, C., Jiang, X., Sun, H., Zhao, Z., Chen, C., y Luo, P. (2013). Distribution and pathogenic relationship of virulence associated genes among *Vibrio alginolyticus* from the mariculture systems. *Mol Cell Probes*, 27 (3-4), 164-168.
- Ren, C., Hu, C., Luo, P., Chen, C., Jiang, X. y Wang, Q. (2008). Genotyping of *Vibrio alginolyticus* isolates from daya bay by infrequent-restriction-site pcr and pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Cell Probes*, 22 (4), 267-271.
- Riaño, D., Valenzuela, E., Mantilla, J. Y Agudelo, C. (2003). Diversidad Genética Y Estructura De La Población De *Vibrio Cholerae* En Colombia. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 1 (1), 36-44.
- Rivas, A., Luis, I., Piña, P., Gomez, B. y Lizárraga, M. (2018). Spatiotemporal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in relation to environmental parameters in a coastal lagoon on the Pacific coast of northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*. 44. 141-153.
- Ribeiro, M., Matté, M., Dropa, M., Lopes, M. y Matté, G. (2011). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 53 (4), 201-5.
- Rivera, I.N., Chun, J., Huq, A., Sack, R.B. y Colwell, R.R. (2001). Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol*, 67 (6), 2421-2429.
- Rodríguez, D. (2011). Determinación de *Vibrio cholerae* en tanques de aguas de lastre de buques internacionales que arribaron al terminal ultiboyas de ecopetrol y al puerto de Tumaco. *Boletín Científico Cioh*, 29 (0120-0542), 104-109.
- Rosche, T., Yano, Y. y Oliver, J. (2005). A rapid and simple pcr analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiol Immunol*, 49(4), 381-389.
- Rosche, T.M., Binder, E.A. y Oliver, J.D. (2010). *Vibrio vulnificus* genome suggests two distinct ecotypes. *Environ Microbiol Rep*, 2 (1), 128-132.

- Roux, F. L., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C., . . . Huehn, S. (2015). The Emergence of *Vibrio* Pathogens in Europe: Ecology, Evolution, And Pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Front Microbiol*, 6, 830.
- Sanchez, J. y Holmgren, J. (2011). Cholera toxin - A foe and a friend. *Indian J Med Res*, 133 (2), 153–163.
- Serpa, F. (1992). Historia Del Cólera En Colombia. *Biomedica*, 12 (3-4), 95-101.
- Shirai, H., Nishibuchi, M., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Pal, S.C. y Takeda, Y. (1991). Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol*, 29 (11), 2517-2521.
- Siboni, N., Balaraju, V., Carney, R., Labbate, M. Y Seymour, J. R. (2016). Spatiotemporal Dynamics of *Vibrio* Spp. Within the Sydney Harbour Estuary. *Front Microbiol*, 7, 460.
- Tamayo, M., Koblavi, S., Grimont, F., Castaneda, E. Y Grimont, P. A. (1997). Molecular Epidemiology Of *Vibrio Cholerae* O1 Isolates From Colombia. *J Med Microbiol*, 46 (7), 611-616.
- Taneja, N., Mishra, A., Batra, N., Gupta, P., Mahindroo, J. y Mohan, B. (2019). Inland cholera in freshwater environs of North India. *Vaccine*. 68 (1), 63-72.
- Tra, V. T., Meng, L., Pichpol, D., Pham, N. H., Baumann, M., Alter, T. Y Huehn, S. (2016). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Spp. In Retail Shrimps in Vietnam. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 129 (1-2), 48-51.
- Uchiyama, H. (2000). Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar. *Environ Health Prev Med*, 4 (4), 199-204.
- Valenzuela, E., Mantilla, J. A. Y Agudelo, C. (1997). *Vibrio Cholerae* Non-O1 In Colombia. *Water Research*, 31 (12), 3175-3177.
- Velazquez, J., León, N., Hernández, L., y Canizalez, A. (2014). Pandemic *Vibrio Parahaemolyticus* O3:K6 On the American Continent. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 110.
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Helaouet, P., Edwards, M., Hofle, M. G., . . . Pruzzo, C. (2016). Climate Influence on *Vibrio* and Associated Human Diseases During the Past Half-Century in The Coastal North Atlantic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (34), 5062-5071.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Brettar, I., Hofle, M. Y Pruzzo, C. (2015). Effects of Global Warming on *Vibrio* Ecology. *Microbiol Spectr*, 3 (3).
- Viñas, M.R. (2016). *Vibrio cholerae* No-O1 asociado a diarreas: factores de virulencia y diversidad genética de un patógeno emergente en Latinoamérica. (Maestría Microbiología Molecular). Universidad Nacional De San Martín, Argentina.
- Vu, T. T., Alter, T. Y Huehn, S. (2018). Prevalence of *Vibrio* Spp. In Retail Seafood in Berlin, Germany. *J Food Prot*, 81 (4), 593-597.
- Wang, H., Tang, X., Su, Y.C., Chen, J. y Yan, J. (2017). Characterization of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains in Zhoushan, China, from 2013 To 2014. *Plos One*, 12 (7), E0180335.
- Wang, R., Zhong, Y., Gu, X., Yuan, J., Saeed, A. y Wang, S. (2015). The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol*, 6, 144.

- Wei, S., Zhao, H., Xian, Y., Hussain, M. y Wu, X. (2014). Multiplex pcr assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79 (2), 115-118.
- Whitten, R. (2018). *Vibrio cholerae*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/Nbk526099/>
- Wiesner, M., Porras, P., Díaz, P., Díaz, R., Montañó, L.A., Díaz, L., Tuduri, R., Reyes, J., Campos, J., Moreno, J. y Duarte, C. (Manuscrito en preparación). Genome diversity of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1/non-O139 isolates from Colombia in two periods.
- Wong, H., Chen, S., Chen, M., Oliver, J., Hor, L. y Tsai, W. (2004). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Vibrio vulnificus* strains isolated from Taiwan and the United States. *Appl Environ Microbiol*, 70 (9), 5153-5158.
- Wong, H. y Lin, C. (2001). Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three pcr methods using specific primers. *J Clin Microbiol*, 39 (12), 4233-40.
- World Health Organization [WHO]. (2018). Cholera. Recuperado De: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cholera>.
- Xie, Z., Hu, C., Chen, C., Zhang, L. y Ren, C. (2005). Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. *Letters in Applied Microbiology*, 41 (2), 202-7.
- Yin, J.F., Wang, M.Y., Chen, Y. J., Yin, H.Q., Wang, Y., Lin, M.Q., . . . Hu, C.J. (2018). Direct detection of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from clinical and environmental samples by a multiplex touchdown polymerase chain reaction assay. *Surg Infect (Larchmt)*, 19 (1), 48-53.
- Zavala, A., Quiñones, E. y Vazquez, C. (2005). La vida oscura de *Vibrio alginolyticus*. *Revista Digital Universitaria-Unam*, 6 (4).
- Zhou, S., Hou, Z., Li, N. y Qin, Q. (2007). Development of a sybr green i real-time pcr for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *J Appl Microbiol*, 103 (5), 1897-1906.