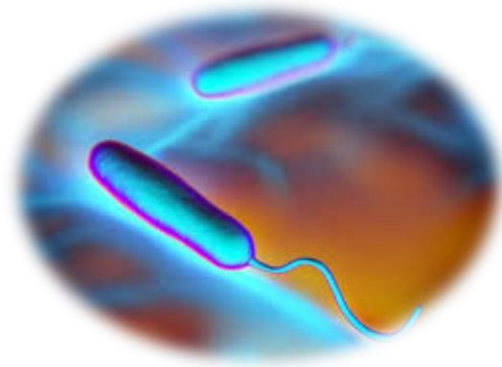


Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia
Departamento de Bacteriología-Micología



***Vibrio cholerae* en Cuba (1997-2019).**
Distribución temporo-espacial, potencial patogénico y
resistencia a los antimicrobianos

Anabel Fernández Abreu

Tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias de la Salud

La Habana

2021

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia
Departamento de Bacteriología-Micología

Vibrio cholerae en Cuba (1997-2019).
Distribución temporo-espacial, potencial patogénico y
resistencia a los antimicrobianos

Autora: Ing. Anabel Fernández Abreu, MsC

Tutoras: Prof. Laura Bravo Fariñas, Dr. C

Prof. Rosabel Falcón Marques, Dr. C

Asesora: Prof. María Eugenia Toledo Romaní, Dr. C

Tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias de la Salud

La Habana

2021

«Sería posible describir todo científicamente, pero no tendría ningún sentido; carecería de significado el que usted describiera a la sinfonía de Beethoven como una variación de la presión de la onda auditiva.»

Albert Einstein

A mi familia

Agradezco a todas las personas que, de forma directa o indirecta y aún sin saberlo, me han apoyado durante todo el camino para llegar hasta aquí.

A todos,

Gracias

ACRÓNIMOS Y SIGLAS

ACE: Enterotoxina accesorio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AHK: Agar hierro y dos azúcares de Kligler

AHL: Agar hierro y lisina

AMP: Ampicilina

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

ARNr: ARN ribosomal

ATP: Trifosfato de adenosina

AZM: Azitromicina

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido (por sus siglas en inglés)

C: Cloranfenicol

CIP: Ciprofloxacina

Citma: Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente

CLSI: Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (por sus siglas en inglés)

CMHEM: Centro Municipal de Higiene, Epidemiología y Microbiología

CN: Gentamicina

CPHEM: Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología

CTXØ: Profago de la toxina colérica

DNasa: Desoxirribonucleasa

DXT: Doxiciclina

EDA: Enfermedad diarreica aguda

GBDDC: Comité de Carga Mundial de Enfermedades Diarreicas (por sus siglas en inglés)

ICE: Elemento conjugativo integrador (por sus siglas en inglés)

IRS: Regiones espaciadoras intergénicas

K: Kanamicina

LNR/EDA/IPK: Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedad Diarreica Aguda del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

LPS: Lipopolisacárido

Minsap: Ministerio de Salud Pública

MR: Multirresistente

NaCl: Cloruro de sodio

NAG-ST: Toxina termoestable

NCCL: Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (por sus siglas en inglés)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONEI: Oficina Nacional de Estadísticas e Información

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OR: Odds ratio

PAI: Isla de patogenicidad

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

PME: Proteínas de la membrana externa

QRDR: Regiones determinantes de resistencia a quinolonas (por sus siglas en inglés)

ST: Enterotoxina termoestable (por sus siglas en inglés)

SXT: Trimetoprim/sulfametoxazol

TBE: Tris-borato-EDTA (ácido etilendiaminotretacético)

TC: Toxina colérica

TCBS: Agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa

TCP: Toxina corregulada por pili

TE: Tetraciclina

VPI: Islotes de patogenicidad de *Vibrio*

ZOT: Toxina *zonula ocludens*

SÍNTESIS

Se presenta la distribución temporo-espacial de aislados de *Vibrio cholerae* procedentes de pacientes con enfermedad diarreica aguda (EDA) en Cuba (1997-2019), el potencial patogénico y la resistencia a los antimicrobianos, así como la relación entre ambos aspectos. La distribución de este microorganismo en las últimas dos décadas sugiere un patrón de heterogeneidad espacial, con predominio de la detección en la región oriental, a partir de brotes y de casos aislados, la variación de la patogenicidad en los serogrupos de *V. cholerae* O1 y no-O1/no-O139 en los últimos ocho años, alerta sobre la presencia y diseminación de cepas más virulentas y con un elevado potencial para generar brotes epidémicos. Se evidenció un incremento en la detección de aislados resistentes y multirresistentes entre 2012-2019, la multirresistencia se asoció a la presencia de enzimas extracelulares en *V. cholerae* O1, mientras que, la capacidad de formación de biopelícula fue protectora. El estudio aporta evidencias que constituyen elementos esenciales en la prevención y control de las EDA causada por este patógeno en el país.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	2
Introducción	2
Hipótesis	6
Objetivos	6
Novedad científica	7
Valor teórico	7
Valor práctico	8
I. MARCO TEÓRICO	10
I.1 Historia	10
I.2 Aspectos microbiológicos	11
I.2.1 Características generales de <i>V. cholerae</i>	12
I.2.2 Estructura antigénica	12
I.3 Patogenia	13
I.3.1 Factores de virulencia	15
I.4 Respuesta inmunitaria	22
I.5 Cuadro clínico	23
I.6 Tratamiento	25
I.7 Aspectos epidemiológicos	25
I.7.1 Prevención y control	27
I.8 Diagnóstico microbiológico	29
I.8.1 Examen directo	29
I.8.2 Cultivo	29
I.8.2.1 Pruebas bioquímicas preliminares	30
I.8.3 Identificación de serogrupos y serotipos	30
I.8.4 Pruebas de biología molecular para diagnóstico y caracterización	31
I.9 Susceptibilidad a los antimicrobianos	32
I.9.1 Resistencia a los antimicrobianos	32
I.9.2 Mecanismo de resistencia	33
II. MATERIALES Y MÉTODOS	36
II.1 Tipo de estudio y horizonte temporal	36

II.2 Universo y muestra	36
II.3 Caracterización fenotípica	37
II.3.1 Comprobación de viabilidad	37
II.3.2 Confirmación en género y especie	38
II.3.3 Identificación de serogrupos y serotipos	39
II.4 Identificación de los factores de virulencia en <i>V. cholerae</i>	39
II.4.1 Determinación de la enzima DNasa	39
II.4.2 Determinación de la enzima gelatinasa	40
II.4.3 Determinación de la enzima lecitinasa	40
II.4.4 Determinación de la enzima elastasa	40
II.4.5 Determinación de la actividad hemolítica	40
II.4.6 Detección de la toxina colérica y la toxina corregulada por pili.	40
II.4.6.1 Extracción de ADN a partir de un aislado bacteriano	41
II.4.6.2 Cebadores utilizados y condiciones de la mezcla y amplificación	41
II.4.6.3 Electroforesis en gel de agarosa	42
II.5 Determinación de biopelícula en aislados de <i>V. cholerae</i>	42
II.6 Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos	43
II.6.1 Método de difusión en agar o Kirby-Bauer	44
II.6.2 Método de concentración mínima inhibitoria (etest)	45
II.7 Variables estudiadas	46
II.8 Análisis estadístico	47
II.9 Consideraciones éticas	47
II.10 Limitaciones de la investigación	49
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
III.1 Distribución temporo-espacial de <i>V. cholerae</i> en Cuba	51
III.2 Factores de virulencia y formación de biopelícula en los aislados estudiados	60
III.2.1 Factores de virulencia enzimáticos y presencia de toxinas en <i>V. cholerae</i>	60
III.2.2 Formación de biopelícula en la especie <i>V. cholerae</i>	66
III.3 Resistencia a los antimicrobianos y su relación con la virulencia	69
III.3.1 Relación entre la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia	85

III.4 Discusión general	92
CONCLUSIONES	97
RECOMENDACIONES	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS	
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS	

.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, sobre todo en el grupo de niños menores de cinco años (*Herrera-Benavente IF y col., 2018*). Dentro de sus agentes causales, se encuentran diferentes bacterias y entre ellas sobresale *Vibrio cholerae*, como uno de los de mayor importancia médica (*Hsueh BY y col., 2019; Parte AC, 2018*).

Desde el punto de vista morfológico, este microorganismo posee una estructura curva con la presencia de un flagelo polar (*Farmer J y col., 2015*). Basado en el antígeno O del lipopolisacárido capsular, *V. cholerae* se clasifica en más de 200 serogrupos idénticos desde el punto de vista bioquímico, dentro de los que se encuentran el O1 y O139, serogrupos epidémicos que causan el cólera (*Shin OS y col., 2011*), mientras que, los no-O1/no-O139, se consideran no epidémicos y causan brotes o casos esporádicos de diarreas, con síntomas y signos clínicos que difieren del cólera (*Parte AC, 2018*).

La distribución de *V. cholerae* es mundial y se aísla de fuentes tan diversas como el agua, el suelo y los alimentos. El ser humano es un hospedero accidental y transitorio, pero es quien lo disemina hacia el ambiente (*González LM y col., 2011; Chin J y col., 2001*). Las infecciones intestinales son las de mayor relevancia clínica,

en particular el cólera (*Olivares F y col., 2019*), sin embargo, puede ocasionar infecciones extraintestinales como las infecciones en las heridas quirúrgicas, la fascitis, la bacteriemia, la meningitis y la otitis (*Hirk S y col., 2016*).

En la región de las Américas, se notifican varios brotes de cólera, (*Domman D y col., 2017*), así como casos esporádicos de gastroenteritis o bacteriemia causados por *V. cholerae* no-O1/no-O139 (*Montero D y col., 2017; Olivares F y col., 2019; Arteaga M y col., 2020*). En la década pasada, durante el transcurso del año 2010 se produce una rápida expansión de EDA provocada por *V. cholerae* en la República de Haití (*Guillaume Y y col., 2019*). Se establece así un nuevo escenario para la reemergencia y diseminación del cólera a los países de la región del Caribe, tales como República Dominicana, Cuba y México, donde se notifican casos positivos. (*OPS, 2013, OPS, 2016*).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) alerta a los países de la región a fortalecer la vigilancia epidemiológica y la preparación nacional en función de la detección inmediata de los brotes epidémicos (*OMS, 2012*).

El potencial patogénico de un microorganismo está relacionado con los atributos de virulencia que poseen y su capacidad de supervivencia en el hospedero y en el medio ambiente (*Arteaga M et al., 2020*). Una característica distintiva de los serogrupos de *V. cholerae* causantes de epidemias, es la presencia de la toxina colérica (TC) y la toxina corregulada por pili (TCP), factores de virulencia responsables de la diarrea secretora y la colonización intestinal, respectivamente (*Dutta D y col., 2013*). Para los otros serogrupos se postula una patogenia diferente, en la que intervienen determinantes de virulencia de naturaleza muy heterogénea (*Shin OS y col., 2011*).

A pesar de los estudios escasos sobre los factores de virulencia en aislados de *V. cholerae* en América Latina y el Caribe (Arteaga M y col., 2020), en la literatura consultada describen la presencia de productos extracelulares tales como una enterotoxina termoestable NAG-ST, la TCP y la producción de las siguientes enzimas: gelatinasa, elastasa, lecitinasa y hemolisinas (Briceño I y col., 2009).

Diferente a muchos agentes bacterianos causantes de diarreas, *V. cholerae* manifiesta una prolongada supervivencia en los ambientes acuáticos durante los períodos entre epidemias y revela un rápido crecimiento dentro de su hospedero (Marrero K y col., 2011; Sánchez LM y col., 2016).

Se evidencia que, como consecuencia del cambio climático, diferentes variables influyen sobre este patógeno, en especial la temperatura del agua de las costas, que se incrementa desde cuatro hasta siete veces más en las últimas décadas. Esto conduce al aumento del número de bacterias en el medio ambiente y por lo tanto, conlleva al incremento de las enfermedades en los humanos causadas por microorganismos del género *Vibrio* (Froelich BA y col., 2020).

Para realizar su ciclo infeccioso, la bacteria utiliza la formación de biopelícula como un mecanismo de supervivencia, que le favorece evadir los mecanismos de defensa del hospedero y facilitar la transmisión oral-fecal (Silva AJ y col., 2016; Sánchez LM y col., 2016). Además, la biopelícula puede afectar la susceptibilidad de *V. cholerae* frente a los antimicrobianos administrados al hospedero durante el tratamiento (Gupta P y col., 2018).

De acuerdo a las directrices de la OMS, la rehidratación oral es la terapia de elección para las infecciones por *V. cholerae*, sin tener en cuenta el serotipo. No obstante, es común la administración de antimicrobianos para reducir la severidad

de los síntomas, la duración de la enfermedad, así como la eliminación de la bacteria en las heces. La selección de los antimicrobianos recomendados por los organismos internacionales, se realiza en correspondencia con los patrones de susceptibilidad locales (NCCL 2003; Ceccarelli D y col., 2016; CLSI 2018).

Después de la introducción de los agentes antimicrobianos, *V. cholerae* permanece con una relativa sensibilidad antibacteriana hasta finales de 1970. En la actualidad, el panorama de la susceptibilidad a los antimicrobianos con el hallazgo de aislados de *V. cholerae* resistentes, es diferente y puede atribuirse al uso indiscriminado de los mismos (Gupta P y col., 2016).

Investigaciones realizadas en diferentes áreas geográficas evidencian la resistencia a los antimicrobianos en porcentajes superiores al 50 % en aislados de *V. cholerae* frente a las fluoroquinolonas y a la tetraciclina (Sarkar A y col., 2019). También se constata una resistencia por encima del 95 % frente a las sulfonamidas y al trimetoprim/sulfametoxazol (Miwanda B y col., 2015; Eiback D y col., 2016).

El uso de los betalactámicos en esta enfermedad, contribuye al incremento continuo de aislados resistentes de *V. cholerae*, debido a la diversificación y transferencia de genes que codifican para los determinantes de resistencia (Ceccarelli D y col., 2016).

La problemática creada por el uso inadecuado de los antimicrobianos asociados a los brotes de cólera, adquiere mayor importancia a la luz del incremento de la multirresistencia en las diferentes áreas geográficas. (Rashed SM y col., 2017; Mohammed Y y col., 2018).

En Cuba, desde 1980 la vigilancia del *V. cholerae* se realiza por el Laboratorio Nacional de Referencia-EDA del Instituto "Pedro Kourí" (LNR/EDA) (Bravo L, 2002). Producto de esta vigilancia, durante el período comprendido desde 1985 hasta junio

de 1997 se evidencia una mayor circulación de los serogrupos no-O1/no-139, con predominio de toxina termoestable y la presencia del serogrupo O1 portador de la TC. Sin embargo, se desconocía la susceptibilidad antimicrobiana en los aislados circulantes en dicho período.

A partir de todos los antecedentes referidos, surge la necesidad de conocer: ¿Cómo se distribuyeron en las regiones geográficas del país los serogrupos y serotipos de *Vibrio cholerae* causantes de diarrea en el período 1997-2019? ¿Qué cambios se produjeron en el potencial patogénico relacionado con los factores de virulencia y la capacidad de formación de biopelícula en los aislados estudiados? ¿Cuál fue el comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos en los aislados de *Vibrio cholerae* y su relación con el potencial patogénico?

Hipótesis

Los serogrupos y serotipos de *Vibrio cholerae* responsables de enfermedad diarreica en Cuba muestran heterogeneidad espacial y cambios en el potencial patogénico y en la resistencia a los antimicrobianos, entre 1997 y 2019.

Para probar esta hipótesis se formularon los siguientes objetivos:

Objetivos

- Describir la distribución temporo-espacial de los serogrupos y serotipos de *V. cholerae* en el período de estudio.
- Explorar las variaciones en el potencial patogénico de los aislados de *V. cholerae* investigados, atendiendo a la producción de enzimas extracelulares, toxinas y la capacidad para formar biopelícula.
- Identificar cambios en la resistencia a los antimicrobianos en los aislados de *V. cholerae* y su relación con el potencial patogénico.

Novedad científica

La novedad científica de la presente investigación descansó en que la misma:

- Describió por primera vez en Cuba, la distribución temporo-espacial y el comportamiento de la resistencia frente a los antimicrobianos en los aislados objeto de estudio.
- Aportó las primeras evidencias sobre la formación de biopelícula y la presencia de enzimas extracelulares en los aislados de *V. cholerae* con potencial patogénico.
- Demostró cambios en la resistencia a los antimicrobianos e identificó la circulación de aislados con patrones de multirresistencia, que incluyen los fármacos utilizados en el tratamiento de las diarreas causada por este patógeno.
- Evidenció que la multirresistencia en *V. cholerae* O1 se asoció a la presencia de enzimas extracelulares, mientras que, la biopelícula demostró la capacidad de proteger a este microorganismo frente a la acción de los antimicrobianos.

Valor teórico

El estudio de los aislados a lo largo de 23 años aportó, por primera vez en Cuba, elementos novedosos sobre:

- La distribución temporo-espacial de los serogrupos y serotipos de *V. cholerae*.
- La detección de los factores de virulencia enzimáticos y la formación de biopelícula, elementos esenciales en el papel patogénico de este microorganismo.
- Los primeros hallazgos del comportamiento de la resistencia y de la multirresistencia en aislados de *V. cholerae*.

Valor práctico

El estudio propició la vigilancia de la resistencia antimicrobiana en la especie, lo que añadió valor al análisis de las políticas de uso de los antimicrobianos en Cuba, frente a las infecciones intestinales causadas por *V. cholerae*. De esta forma, se demostró la circulación de aislados patogénicos y multirresistentes en este país.

Las ocho publicaciones sobre el tema de la tesis en revistas internacionales y nacionales, la participación en eventos científicos (nueve en total), la docencia impartida en cursos de postgrado (Residencia en Microbiología y Maestría en Bacteriología-Micología), la presentación y aprobación de cinco Resultados Relevantes Institucionales (1997,1999, 2007, 2013,2017), de un Premio Destacado de Fórum (2015), así como la realización de siete tesis, permitieron la divulgación de los resultados obtenidos en esta investigación.

MARCO TEÓRICO

I. MARCO TEÓRICO

I.1 Historia del cólera

En el año 1817 estalla una epidemia de cólera que persiste seis años, y causa una alta mortalidad en la India, y se considera la primera pandemia. Su desarrollo en todo el mundo se relaciona con el crecimiento del capitalismo (*Schatzki S, 2015*). La segunda pandemia, ocurre entre 1826- 1851, comienza en la India, afecta a Asia, Europa, África y en 1832, emerge en el continente americano (*Sánchez RM y Pérez IA, 2014*).

La tercera pandemia, (1852-1859), afectada de nuevo a Asia, África y Europa, pero incluye a Inglaterra, los Estados Unidos, México, Venezuela, Brasil y las Islas del Caribe. La cuarta pandemia, 1863-1879, se extiende por Asia, Europa y América. La quinta pandemia (1881-1896) se expande por Europa, Asia, África y América, pero permanece confinada en Francia, Italia y España (*Sánchez RM y Pérez IA, 2014*).

La sexta pandemia, ocurre entre 1899-1923, pero no alcanza a América y es la isla de Madeira es la más afectada. Comienza en el subcontinente indio y se extiende por África, Asia Menor y Europa. Mientras que, la séptima pandemia, causada por *V.cholerae* O1 El Tor e iniciada en las Islas Célebes de Indonesia, se presenta en Asia, África, Europa y América Latina. Esta última pandemia se disemina con rapidez a partir de enero de 1991, año cuando se notifican los primeros casos en el distrito de Chancay, Perú (*Sánchez RM y Pérez IA, 2014*).

Durante el 2010, se presentan brotes en Angola, Etiopía, Somalia, Sudán, norte de Vietnam y la República de Zimbabue. En octubre del propio año, se diagnostica cólera en Haití. Ante esta situación y dado el riesgo de reintroducción del cólera a otros países de la región, la OMS recomienda redoblar los esfuerzos de vigilancia, actualizar los planes de preparación y respuesta e implementar las medidas de prevención y promoción de salud (González LM et al., 2011; Zelada A y col., 2015).

En Cuba, la primera epidemia se inicia en 1833, se expande por todo el país, con la excepción de Pinar del Río. En 1850 reinvasa a La Habana, desaparece cinco años después para reemerger en 1867. El último fallecido en La Habana, se informa en agosto de 1882 (González LM et al., 2011).

En Cuba, en 2012, el Minsap comunica el desarrollo de brotes de cólera con un total de 417 pacientes confirmados y tres fallecidos en la provincia de Granma. La cepa causante de este brote comparte el serotipo y biotipo, así como diferentes elementos genéticos y un patrón de susceptibilidad frente a los antimicrobianos similar al identificado en Haití. En agosto de 2013 se notifican nuevos brotes en las provincias de La Habana, Santiago de Cuba y Camagüey (Zelada A y col., 2015).

En la actualidad, a pesar de los conocimientos sobre la enfermedad, ocurren frecuentes epidemias en Afganistán, República Democrática del Congo, Ghana, Haití y Nigeria. (WHO, 2015; WHO, 2017).

I.2 Aspectos microbiológicos

V. cholerae es una bacteria gramnegativa ubicada por taxonomía en el Dominio Bacteria, Filo: Proteobacteria y clase Gammaproteo bacteria basada en la secuencia genómica del ARNr 16S. Pertenece al orden Vibrionales, familia Vibrionaceae y género *Vibrio*. En la actualidad están descritas 142 especies (Parte AC y col., 2018).

I.2.1 Características generales de *V. cholerae*

Es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, de forma recta o curva, con un diámetro entre 0,5 y 0,8 μm , y un largo de 1,4 a 2,6 μm . No produce esporas y es móvil por medio de un único flagelo polar. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y los valores de pH oscilan entre 7,0 y 8,0 (Zelada A y col., 2015).

El ión sodio (Na^+) estimula y favorece su crecimiento. Este requerimiento es específico e independiente de una función osmótica, dado que es difícil de reemplazar por cantidades equimolares de otros cationes monovalentes. El Na^+ actúa sobre los sistemas de permeasas existentes en la bacteria, permitiendo la entrada de sustratos exógenos (Parte AC y col., 2018). *Vibrio* se elimina con facilidad mediante el calor a la temperatura de 65 °C durante 10 min, la luz solar y la acidez. La temperatura óptima de crecimiento de las especies patógenas para el hombre, oscila entre 30 y 40°C (González MI y col., 2008).

Otras especies del género *Vibrio*, como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. mimicus* se asocian a infecciones intestinales y extraintestinales (Islam MT, 2017).

I.2.2 Estructura antigénica

- Antígeno O: este antígeno es de naturaleza lipopolisacáridica. Se identifican más de 200 serogrupos basado en la presencia de antígenos somáticos termoestables O. Solo dos se reconocen como responsables de las epidemias de cólera, el O1 y el O139. Los serogrupos no-O1/no-O139, suelen aislarse de fuentes ambientales, y pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis e infecciones extraintestinales (Hossain M y col., 2019).

El serogrupo O1 se divide en los biotipos El Tor y Clásico y se subdivide en dos serotipos principales, Inaba y Ogawa, en función de sus características genotípicas y fenotípicas. El serotipo Ogawa difiere del Inaba, por tener un grupo 2-O-metilo en el

azúcar terminal no reductor de la porción de polisacárido específico de O del lipopolisacárido (LPS); el grupo metilo está ausente en el serotipo Inaba. La prevalencia de ambos serotipos fluctúa con el tiempo en áreas endémicas y puede cambiar entre Ogawa e Inaba durante un brote de cólera (*Hossain M y col., 2019*).

- Antígeno H: el antígeno flagelar lo comparten todos los serogrupos, por lo que no se usa para distinguirlos. Es termolábil y su aglutinabilidad e inmunogenicidad se inactivan por el calentamiento a 100 °C durante 15 min y 2,5 horas, respectivamente. Aunque los serotipos deben darse sobre la base de sus antígenos O y H, los serogrupos (O) se consideran serovariedades porque todas las cepas de una especie dada comparten el mismo antígeno H y su determinación es de poco valor para la serotipificación de las especies del género *Vibrio* (*Pumarola A y col., 1987*).

- Antígeno K: es un polisacárido capsular, termolábil. Solo está presente en *V. vulnificus* y *V. cholerae* no-O1/no-O139 (*Pumarola A y col., 1987*).

I.3 Patogenia

El cólera se transmite por la ingestión de agua o los alimentos contaminados con el bacilo *V. cholerae*. Presenta un período de incubación que oscila desde las dos horas hasta los 5 o 7 días (*Azman AS y col., 2019*). En su transición desde el ambiente externo hasta el cuerpo humano, la bacteria se expone a cambios, como la temperatura, acidez y osmolaridad. Debe sobrevivir en el intestino a un ambiente enriquecido con sustancias inhibitorias del crecimiento como las sales biliares y los ácidos orgánicos, así como también resiste a los componentes antimicrobianos del sistema inmune innato (*Manneh-Roussel J y col., 2018*). Una vez en el intestino, donde coloniza mediante la expresión de la TCP, se favorece su adherencia a las células intestinales y la secreción del factor de colonización secundario TcpF, secreta la TC. La subunidad B de la toxina se une al gangliósido GM1, un complejo

glicolípido encontrado en la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino; la subunidad A atraviesa la membrana plasmática y activa a la adenilatociclasa, enzima que convierte trifosfato de adenosina (ATP) en monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). La molécula de AMPc es un nucleótido cíclico que media diferentes sistemas reguladores en la célula, incluyendo el balance iónico. Un incremento en los niveles de AMPc inducido por la enterotoxina colérica provoca la secreción de iones cloruro y bicarbonato desde las células epiteliales hacia el lumen intestinal. Este cambio en la concentración iónica conlleva a la secreción de grandes cantidades de agua hacia el lumen intestinal (*Manneh-Roussel J y col., 2018*). Muchos productos génicos de *V. cholerae* son importantes para la colonización del intestino delgado, además de la TCP, están involucrados los factores de colonización accesorios, las proteínas reguladoras y proteínas de la membrana externa (ToxR/ToxS, TcpP, TcpH y ToxT), los factores metabólicos, la biotina y el antígeno O del LPS (*Manneh-Roussel J y col., 2018*). Los pacientes con cólera pueden excretar entre 10^7 a 10^9 vibrios virulentos por mL en las heces (*Silva AJ y col., 2016*).

Los serogrupos no epidémicos de *V. cholerae* tienen potencial para producir diarreas a través de mecanismos poco conocidos. Su enteropatogenicidad parece ser de naturaleza multifactorial, también pueden presentar genes de virulencia y causar enfermedades diarreicas tan graves como el cólera. Producen su efecto por medio de factores tóxicos múltiples (enterotoxinas y exotoxinas) (*Ulloa MT y col., 2019*).

La hemolisina producida por *V. cholerae* O139 y por *V. cholerae* no-O1/no-O139 es idéntica a la hemolisina El Tor de *V. cholerae* O1. Esta se considera un factor de virulencia que interviene en la producción de diarreas cuando los aislados carecen de toxinas bien definidas, como la TC (*Ulloa MT y col., 2019*). Esta hemolisina

termoestable es la responsable del fenómeno llamado “de *Kanagawa* positivo” (reacción hemolítica alrededor de las colonias que crecen en agar sangre), aún no bien definido. En estudios de laboratorio, a la hemolisina le señalan efectos citotóxicos, cardiotóxicos y letales (*Manneh-Roussel J y col., 2018*).

En Cuba la prevalencia de *V. cholerae*-O1/no-O139 de origen clínico que porta el gen para la toxina termoestable es más alta que la notificada en otras áreas geográficas, excepto en las epidemias (*Chin J y col., 2001*).

Entre los factores de virulencia se describen productos extracelulares como las citolisinas VCC/HlyA y RTX, así como una enterotoxina termoestable NAG-ST, semejante a la producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, relacionada con la invasividad. Existe evidencia de una neuraminidasa codificada en los islotes de patogenicidad 2 (VPI-2), que separa el ácido siálico de los gangliósidos presentes en las células eucariotas, aumentando la sensibilidad de las células hospedadoras a la TC. La neuraminidasa se asocia a cepas toxigénicas; sin embargo, también se detecta en aislados no toxigénicos. Se describe la presencia de un sistema de excreción tipo III, así como de la TCP (*Hackbusch S y col., 2019*).

I.3.1 Factores de virulencia

Toxina colérica: la enterotoxina de *V. cholerae* está codificada por los genes *ctx*. El gen *ctxA* codifica la subunidad A de la toxina, y el gen *ctxB* codifica la subunidad B. Los genes se ubican en el operón *ctxAB*, que forma parte del genoma del bacteriófago filamentoso CTX, lisogenizado en la bacteria. El transcrito (ARNm) del operón *ctxAB* tiene dos sitios de unión al ribosoma (RBS), uno en el gen A y otro en el gen B. Este último es, al menos, siete veces más fuerte que el sitio de la región A. De esta forma el microorganismo es capaz de traducir más proteínas B que A, lo

cual se requiere para ensamblar la toxina en la proporción apropiada (1A:5B). Los componentes se ensamblan en el periplasma después de la traducción. La subunidad A intacta, inactiva desde el punto de vista enzimático, debe fraccionarse en los fragmentos A1 y A2, unidos mediante un puente disulfuro (*Le Roux F y col, 2015*).

Toxina co-regulada por pili: las cepas patógenas de *V. cholerae* producen una fimbria tipo IV, denominada pilus co-regulado con toxina, que es esencial en la colonización del epitelio intestinal y el receptor para el fago CTX (*Manneh-Roussel J y col., 2018*).

Endotoxina de *V. cholerae*: el LPS de *V. cholerae* es una molécula anfifílica compleja, con un peso molecular de 10 kDa conformada por tres componentes, el lípido A, el núcleo polisacárido y el polisacárido O. Constituye una barrera a los lisosomas y a muchos agentes antimicrobianos e impide la destrucción de la célula bacteriana por los componentes del suero y las células fagocíticas. (*Hossain M y col., 2019*).

Islas de patogenicidad: las islas patogénicas (PAI) son segmentos de ADN bacteriano que portan uno o más genes de virulencia, adquiridos en bloque a partir de una fuente externa. La isla de patogenicidad 1 de *V. cholerae* (VPI-1) posee un tamaño de 39,5 kb. Todos los genes en VPI-1 son importantes para producir la enfermedad, ya sea que tengan un rol directo en la patogénesis o indirecto en su transferencia y movilidad. El elemento de la VPI-1 contiene genes como *tcpA* que codifica un importante factor de colonización y el receptor para CTXØ, y los genes *toxT*, *tcpP* y *tcpH* que codifican factores reguladores de la virulencia (*Le Roux F y col, 2015*).

La isla de patogenicidad² de *V. cholerae* (VPI-2), es una región cromosomal de 57,3 kb. Todas las cepas toxigénicas de *V. cholerae* O1 y O139 contienen la VPI-2, mientras que los aislados no toxigénicos no incluyen esta región. La VPI-2 codifica varios grupos de genes: un sistema de restricción por modificación tipo 1, que confiere protección a la bacteria de la infección por virus; un grupo de genes nan-nag homólogos a los genes involucrados en el metabolismo del ácido siálico, el cual actúa en la obtención de la fuente de carbono y nitrógeno; así como una neuraminidasa que actúa en los gangliósidos de alto orden en el intestino para convertirlos en gangliósidos GM1 (Le Roux F y col., 2015; Hackbusch S y col., 2019).

Toxinas relacionadas con el inhibidor de sodio: inhiben el transporte de sodio en la membrana celular (Qadri F y col., 2003).

Enterotoxina accesoria (ACE): provoca un incremento de la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana de las células epiteliales. Es codificada por el gen *ace* (cBriquaire R y col., 2017).

Toxina zonula ocludens (ZOT): es una enterotoxina termolábil, actúa en las uniones intercelulares y provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana intestinal (Preeprem S y col., 2014).

Enterotoxina termoestable (ST): es la enterotoxina más estudiada de *V. cholerae* no-O1, constituida por un péptido de 17 aminoácidos, presenta similitud con la toxina termoestable de *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Yersinia enterocolítica* (Qadri F y col., 2003; Chen A y col., 2004).

Proteínas de la membrana externa: entre las que se pueden mencionar OmpV de 25 kDa y OmpW de 22 kDa que facilitan la adherencia a las células epiteliales (Mey AR y col., 2012).

Cápsula de polisacáridos: evita la fagocitosis (*Cárdenas-Perea ME y col., 2014*).

Adhesinas: favorecen la adhesión de los microorganismos a la mucosa intestinal, un paso importante en la colonización y el desarrollo del proceso infeccioso (*Cárdenas-Perea ME y col., 2014*).

Hemaglutinina-proteasa: esta proteasa tiene una destacada función lisando el moco intestinal, al romper importantes sustancias como la mucina y lactoferrina (*Basu P y col., 2017*).

Otros factores de virulencia que pueden desempeñar un papel crucial en la patogénesis (*Cárdenas-Perea ME y col., 2014*) se describen a continuación:

- a) Lecitinasa: hidroliza la lecitina, fosfolípido más abundante de la membrana celular y constituye la reserva corporal más importante de la colina, se localiza en casi todas las células corporales, pero predomina en el tejido nervioso, la bilis, la sangre y el músculo, principalmente en el cardíaco (*Cárdenas-Perea ME y col., 2014*).
- b) Desoxirribonucleasa (DNasa): despolimeriza el ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés), produciendo una mezcla de mono y polinucleótico (*Chen A y col., 2004*).
- c) Gelatinasa: hidroliza la gelatina, proteína de la membrana basal y del colágeno a péptidos y aminoácidos (*Cárdenas-Perea ME y col., 2014*).
- d) Elastasa: solubiliza la elastina, proteína del tejido conjuntivo responsable de las propiedades de la extensibilidad y el retroceso elástico de los tejidos, además degrada el colágeno I, II, III, activa el factor XII de la coagulación, se adhiere e inactiva lisozimas, se adhiere a la inmunoglobulinas IgG, IgA sérica e IgA secretora, inactiva el complemento, inhibe la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares,

inhibe la proliferación de linfocitos humanos, se adhiere a la interleucina y es inmunogénica (*Chen A y col., 2004*).

e) β -hemolisina: produce la lisis de los eritrocitos (*Ruenchit P y col., 2017*).

f) Proteasas: causan daños, afectando las células de defensa del hospedero, suministran nutrientes. Se identifican tres tipos: proteasas de serina termoestable, termolábiles y sensibles a EDTA (*Shinoda S y Miyoshi SI, 2011*).

Biopelícula: la biopelícula se define como una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Dentro de la biopelícula, las bacterias se protegen de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos (*Marrero K y col., 2011; Wang Y y col., 2015*).

El desarrollo de la biopelícula representa el crecimiento habitual de las bacterias en la naturaleza, ya que potencia su multiplicación, supervivencia, les da acceso a los nutrientes y protección ante los depredadores. De hecho, los microorganismos que forman biopelícula causan grandes problemas ambientales, industriales y clínicos (*Saxena P y col., 2018*).

Aunque la composición de la biopelícula es variable, su componente mayoritario es el agua, además de las células bacterianas. La matriz de la misma es un complejo formado por exopolisacáridos, en menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como las proteínas, el ADN y productos diversos procedentes de la lisis bacteriana (*Marrero K y col., 2011*). La composición de este exopolisacárido o glucocálix es diferente en cada bacteria y hongo, y varía desde: alginato en *Pseudomonas aeruginosa*, celulosa en *Salmonella Typhimurium* y rico en galactosa en *V. cholerae* (*Castrillon LE y col., 2010*).

La biopelícula puede ser muy heterogénea, siendo una comunidad organizada. Los factores que la afectan son las condiciones ambientales, el tipo de superficie, los factores biológicos y las propiedades físicas (*Saxena P y col., 2018*).

Junto al papel beneficioso de la biopelícula bacteriana, existen numerosas evidencias epidemiológicas que la relacionan con distintos procesos infecciosos. La característica que distingue las infecciones crónicas relacionadas con la biopelícula de las infecciones agudas es su respuesta a los tratamientos antimicrobianos. Mientras que las infecciones agudas pueden eliminarse tras la administración de un tratamiento antimicrobiano breve, las infecciones por bacterias que forman biopelícula no lo consiguen por completo y se producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias dentro de la biopelícula pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antimicrobianos (*Sanchez LM y col., 2016*).

Aquellas infecciones donde está presente la producción de biopelícula tienen una alta prevalencia y se consideran un reto importante para la comunidad médica. Algunos estudios estiman que entre el 65 al 80% de las infecciones humanas están provocadas por bacterias productoras de biopelícula (*Peach KC y col., 2013*).

La base de esta resistencia bacteriana aún se investiga. Entre las razones observadas se incluyen: la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituyen la matriz de los exopolisacáridos, el crecimiento lento de las bacterias dentro de la biopelícula, la existencia de microambientes antagonistas a la acción del antimicrobiano, la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y a la aparición de un fenotipo específico de biopelícula que combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (*Saxena P y col., 2018*).

Métodos de estudio de la biopelícula: la evolución de los métodos analíticos de los estudios de imágenes permiten diseñar diferentes estrategias para el estudio de la biopelícula, entre las cuales se encuentran varios modelos específicos como los catéteres en disco, la tira de acrílico, microplaca de titulación y biopelícula profundida, entre otros. Estos ensayos se acompañan de estudios de ultraestructura microscópica donde se puede ver en tercera dimensión la formación de la biopelícula, lo que permite la descripción de los diferentes modelos de organización entre ellos. Es reciente el desarrollo de estudios *in vivo* para la detección temprana de infecciones en los tejidos e implantes biomédicos donde está presente la biopelícula bacteriana (Saxena P y col., 2018).

Las placas de microtitulación representan una herramienta importante para el estudio de las etapas de formación de la biopelícula. Las publicaciones indican que la biopelícula formada en placas de microtitulación desarrolla algunas características de la biopelícula madura, como la tolerancia antibiótica y la resistencia al sistema inmune (O'Toole GA y col., 2011).

Variantes de este método están publicadas para el estudio de la formación de la biopelícula en varios microorganismos, dentro de ellos: *V. cholerae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., y micobacterias. En este método la formación de la biopelícula se mide utilizando el cristal violeta, aunque otros productos colorimétricos y metabólicos se emplean para la cuantificación de la biopelícula en las placas de microtitulación. La facilidad, el bajo costo y la flexibilidad de este método, lo hace una herramienta de gran utilidad en el estudio de la biopelícula (O'Toole GA y col., 2011).

I.4 Respuesta inmunitaria

Aunque los genomas de las cepas de *V. cholerae* O139 y El Tor O1 son parecidos, incluyendo genes idénticos de la TC, la infección por la cepa O1 proporciona una protección escasa contra la cepa O139, y viceversa. Del mismo modo, aunque las respuestas inmunitarias dirigidas contra la TC son frecuentes después del cólera, no proporcionan una inmunidad protectora de larga duración (*Weil AA y col., 2019*). Por tanto, parece que la inmunidad protectora contra el cólera es en gran parte independiente de la toxina y del serogrupo específico, y la especificidad del serogrupo está determinada por el antígeno O del LPS (OSP) (*Azman AS y col., 2019*). La respuesta vibriocida se usa a menudo como calibrador de la inmunidad protectora frente al cólera (*Weil AA y col., 2019*). Este análisis cuantifica una respuesta de anticuerpos bactericida dependiente del complemento en la sangre que presumiblemente es un marcador secundario de respuestas mucosas aún poco comprendidas. Cada aumento por dos en la respuesta vibriocida se asocia a una reducción aproximada del 40% en el riesgo de cólera en Bangladesh (*Waldor MK y Rya ET, 2016*). La respuesta vibriocida depende en gran medida de anticuerpos de inmunoglobulina M (IgM) dirigidos contra el LPS y las respuestas anti-LPS se relacionan a protección frente al cólera en los contactos familiares de los pacientes originalmente afectados en Bangladesh. Del mismo modo, las respuestas de células B de memoria anti-LPS se asocian a protección contra el cólera entre estos contactos familiares (*Karlsson EK y col., 2013*). Las respuestas del OSP y del LPS guardan una estrecha correlación y las respuestas vibriocidas se absorben alejándose por el OSP, lo cual sugiere la importancia del OSP en la mediación de la inmunidad protectora frente al cólera (*Weil AA y col., 2019*). Los niños pequeños desarrollan respuestas

inmunitarias después del cólera, comparables a las manifestadas en los niños mayores y en adultos (*Ritter AS y col., 2019*).

Los estudios de pacientes con cólera agudo severo han demostrado que los niveles sanguíneos de mediadores de la respuesta inmune innata, incluyendo leucotrieno B4, lactoferrina, mieloperoxidasa y óxido nítrico, están elevados en la fase inicial de la infección en ambos niños y adultos. Otros mediadores de la respuesta innata, incluidos citocinas como TNF- α e IL-1b, así como proteínas bactericidas, incluida lactoferrina, la mieloperoxidasa y las defensinas también están elevadas. Los estudios histopatológicos de biopsias duodenales demuestran que, durante la convalecencia, los neutrófilos se infiltran en la mucosa, seguido de un aumento de mastocitos desgranulados y eosinófilos (*Leung DT y col., 2012*).

La IgA secretora (sIgA) es un marcador importante de inmunidad humoral. En la superficie intestinal, sIgA es la inmunoglobulina predominante, existiendo como una forma dimérica producida en la mucosa que puede neutralizar patógenos. A nivel sistémico, los niveles de IgA aumentan progresivamente en la infancia, desde el 1 % de niveles de adultos en el recién nacido al 20 % al año, 50 % a los 5 años y 75 % a los 16 años (*Leung DT y col., 2012*).

I.5 Cuadro clínico

El cuadro clásico del cólera se caracteriza por el desarrollo brusco de una diarrea acuosa intensa, casi siempre indolora y acompañada de vómitos. Las heces son líquidas, con presencia de mucus, pero sin sangre, pero tienen un aspecto característico denominado como “heces de agua de arroz”. Estas diarreas producen una disminución del volumen sanguíneo circulante, acidosis metabólica y el agotamiento del potasio, cuyo déficit provoca, calambres musculares y arritmias

miocárdicas (*Davies HG y col., 2017*). El estado de compromiso hemodinámico establecido en pocas horas, asociado o no a los calambres abdominales, al desequilibrio ácido-básico y a la acidosis pueden llevar al paciente a un colapso vascular y, en último término, a la muerte (*Somarriba L y col., 2013*). No todas las personas infectadas desarrollan el cuadro clásico de cólera, las infecciones pueden ser asintomáticas hasta en un 75 % de los pacientes (*Davies HG y col., 2017*).

La manifestación clínica más frecuente de *V. cholerae* no-O1/no-O139 es la diarrea, bien como casos aislados o como brotes epidémicos y su espectro abarca desde la diarrea leve hasta la deposición acuosa y severa, indistinguible de la clásica diarrea colérica. Son frecuentes el dolor abdominal, las náuseas y los vómitos. Es variable la presencia de fiebre, que en algunos brotes se detecta entre el 43 a 71 % de los enfermos, un signo raro en el cólera clásico. De manera ocasional produce diarreas con sangre, hecho atribuido a la producción de toxinas disenteriformes o a su capacidad invasiva. La recuperación suele ser la norma, incluso sin el empleo de antimicrobianos, aunque estos últimos se recomiendan en los casos graves, pues disminuye la duración y severidad de la enfermedad (*Ulloa MT y col., 2019*).

Puede ocasionar manifestaciones clínicas extraintestinales, como la otitis media, las infecciones del tracto biliar, apendicitis aguda, colecistitis aguda, neumonía, meningoencefalitis, septicemia, bacteriemias (asociadas a factores predisponentes como la cirrosis hepática y las enfermedades malignas hematológicas) y las celulitis inferiores (*CDC., 2014*). En la infección de la piel y las partes blandas puede haber el antecedente de heridas o pequeños traumatismos y contacto con el agua salada o dulce (*CDC., 2014*). En los seres humanos se describe el estado de portador asintomático (*Davies HG y col., 2017*).

I.6 Tratamiento

El tratamiento principal para el cólera es la rehidratación oral o intravenosa con soluciones que contienen glucosa, cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato de trisodio. Los antimicrobianos se aplican para reducir la duración de la enfermedad, en alrededor de un 50 % de los pacientes, y la liberación de *V. cholerae* en las heces. Además, disminuye la gravedad de los síntomas al reducirse el volumen de las diarreas y de esa manera la pérdida de los fluidos requeridos para mantener la hidratación del paciente (*Bhattacharya D y col., 2015*). En la actualidad, se recomienda la doxiciclina como el antimicrobiano de primera línea para el tratamiento de las infecciones por *V. cholerae* O1 u O139 en los adultos, mientras que la eritromicina o azitromicina se administran a los niños y las embarazadas. Se proponen otros antimicrobianos como la ciprofloxacina o las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima o ceftriaxona) para tratar la infección (*Ceccarelli D y col., 2016*).

El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) de 2018, recomienda algunos antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones por *V. cholerae*, los cuales no distinguen entre los serogrupos. Entre los recomendados están la ampicilina, que actúa como un inhibidor del crecimiento celular; la azitromicina, la doxiciclina y el cloranfenicol que inhiben la síntesis de las proteínas; y trimetoprim/sulfametoxazol que inhibe el metabolismo del ácido fólico (*WHO, 2015; CLSI, 2018*).

I.7 Aspectos epidemiológicos

Se demuestra que bajo ciertas condiciones de laboratorio, algunos cultivos de *V. cholerae* no-O1 pueden adquirir las propiedades antigénicas del serogrupo O1, lo que denominan fenómeno de conversión del serogrupo. Esto tiene importancia desde el

punto de vista sanitario, debido a las implicaciones que representa en la transmisión del cólera y su epidemiología a partir de los ecosistemas acuáticos (*González MI y col., 2008*). *V. cholerae* tiene una amplia distribución mundial y su presencia en el agua no siempre se asocia con la contaminación fecal. En su estado viable y cultivable estos microorganismos pueden sobrevivir en aguas dulces y marinas, así como puede, frente a las condiciones adversas convertirse en una forma viable pero no cultivable. Estudios ecológicos realizados en diferentes países muestran la influencia que ejerce el agua a una temperatura mayor de 20 °C, la salinidad entre 0,4 a 1,7 %, la concentración de sustancias orgánicas y la asociación con las superficies quitinosas de los organismos superiores, en el número de *V. cholerae* presentes en el ambiente (*Baker-Austin C y col., 2017*).

La principal fuente de transmisión es la ingesta de alimentos crudos de origen marino (*CDC, 2014*). La enfermedad es más frecuente durante el verano, lo que puede reflejar el incremento de la presencia del microorganismo en el ambiente marino durante estos meses. No obstante, los productos marinos, bien cocinados no deben presentar problemas (*González MI y col., 2008*).

La transmisión de persona a persona es poco probable que ocurra. Los brotes hospitalarios están proporcionados por comida o agua contaminada, siendo en estos casos el ser humano la única fuente de infección (*González MI y col., 2008*). Sin tratamiento, cerca del 50 % de los pacientes excretan el bacilo hasta por cinco días; sin embargo, muchos casos con manifestaciones leves o asintomáticos pueden eliminar *V. cholerae* en las heces por períodos de hasta dos semanas, cuando no se les administra terapia antimicrobiana. El portador crónico es raro (*CDC, 2014*).

I.7.1 Prevención y control

Están disponibles dos tipos de vacunas contra el cólera y todas se administran por vía oral: (i) Dukoral y (ii) Shanchol y mORCVAX. Las dos últimas se elaboran a partir de la misma cepa vacunal, pero están formuladas por dos fabricantes que utilizan diferentes métodos de obtención (OMS, 2010).

Dukoral se desarrolla en Suecia, se aprueba en 1981 y es una vacuna monovalente obtenida a partir de células enteras de *V. cholerae* O1 inactivadas con formalina y por calor (de las cepas clásicas, El Tor, Inaba y Ogawa) y la subunidad B de TC recombinada. Las vacunas se suministran en viales de una dosis, (3 mL), junto con el amortiguador de bicarbonato (OMS, 2010).

Las vacunas orales bivalentes Shanchol y mORCVAX son muy similares e incluyen los serogrupos O1 y O139. A diferencia de Dukoral, no contienen la subunidad B de la TC y, por tanto, no protegen contra *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET). De acuerdo con el fabricante, Shanchol se debe administrar por vía oral en dos dosis (OMS, 2010).

Las vacunas anticoléricas disponibles son seguras, su protección en poblaciones de zonas endémicas es superior al 50 % durante dos años. Está demostrado que Shanchol y mORCVAX protegen durante mayor plazo a los niños menores de cinco años y no requieren dosis de refuerzo cada seis meses. No obstante, en Bangladesh, en el seguimiento a los individuos ya vacunados entre 4- 6 meses con Dukoral, se observa una protección eficaz a corto plazo contra el cólera. En relación con la manipulación, la pauta de administración de las vacunas es de dos dosis (3 dosis con Dukoral para los niños de 2- 5 años) y todas requieren de cadena de frío para su transportación (OMS, 2010).

En Cuba, el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, desde 1992 inicia un proyecto de colaboración con el Instituto Finlay de Vacunas y el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, para desarrollar un candidato vacunal oral contra el cólera, basado en cepas vivas atenuadas, derivadas de *V. cholerae* serogrupo O1 aisladas en la epidemia latinoamericana de 1991. Como resultado del proyecto, se obtuvo un conjunto de cepas atenuadas, y tras su evaluación preclínica y clínica, se seleccionó la identificada como *V. cholerae* 638, por ser la más promisoría en sus resultados de seguridad, reactogenicidad, inmunogenicidad y protección frente al cólera, evidenciado en un reto con una cepa homóloga (*Zelada A y col., 2015*). La evaluación preclínica y clínica de este candidato confirma su seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad en Cuba y Mozambique (*García H y col., 2011; Díaz-Yidi M, 2012*), una región donde el cólera es endémico. No obstante, el proyecto se detiene en el 2010, dado que se requiere la evaluación de la eficacia del CV 638, mediante un ensayo clínico Fase III, en una región endémica, con la inclusión de niños y adultos. Estos requerimientos los hacen muy costoso y después de realizar negociaciones con varios países africanos, no se logra su ejecución. Se realizaron varias negociaciones con países africanos que no resultaron exitosas. Tras la introducción del cólera en el 2012, se reinicia el proyecto, con la ejecución dos ensayos clínicos: uno en niños y adolescentes (mayores de 5 años hasta 17 años) y otro en una población en régimen ambulatorio (más de 400 personas), confirmándose la seguridad e inmunogenicidad del CV 638, así como la colonización de los voluntarios (*García H, 2017*). El registro de la vacuna no fue posible, por necesitar de un ensayo de reto en humanos, encontrarse el país en una situación epidemiológica que no justifica la inversión y en consecuencia, se cancela el

proyecto en enero de 2020, recomendándose activar las negociaciones para transferir la tecnología (*Registro público cubano de ensayos clínicos, 2020*).

I.8 Diagnóstico microbiológico

Muestra: durante la fase aguda de la enfermedad la obtención, el transporte y el procesamiento de la muestra son válidos para establecer el diagnóstico a partir de las heces diarreicas, esta última debe obtenerse en el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento con los antimicrobianos. Para obtener buenos resultados debe recolectarse 1 g de heces frescas y procesarse dentro de las dos primeras horas después de ser emitidas; de no procesarse de manera inmediata deben colocarse en un medio de transporte (*Cary-Blair*), que permite la conservación de la muestras hasta cinco días, siempre mantenida en refrigeración. (*Koneman E y col., 2008*).

I.8.1 Examen directo

Dentro de los procedimientos que permiten establecer un diagnóstico rápido de presunción se utilizan: la coloración de Gram. Mediante la observación en un microscopio de fondo oscuro o de contraste de fases, se observa que los microorganismos se mueven con rapidez, como bandadas de peces. (*Koneman E y col., 2008*).

I.8.2 Cultivo

Se siembra de 0,5-1 mL o 1g de muestra de heces en 10-15 mL de medio de enriquecimiento (agua de peptona alcalina). Después de una incubación de 4 a 6 horas a 37 °C de temperatura, se inocula en el medio selectivo de agar de tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS). De forma simultánea, se siembra en los medios generales y selectivos (agar sangre, agar *MacConkey* y agar TCBS). Estos medios se incuban a 37 °C durante 18–24 horas. Posteriormente, se realiza la lectura

de las placas inoculadas y se seleccionan las colonias características del género *Vibrio* (Koneman E y col.,2008).

La concentración de sal requerida para cada especie del género *Vibrio* es diferente y constituye uno de los parámetros utilizados en su identificación (García B y col., 2014).

Las colonias representativas del género *Vibrio* se inoculan en los medios de agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK) y agar hierro y lisina (AHL). Estos se incuban a 37 °C durante 18–24 horas (Koneman E y col., 2008).

1.8.2.1 Pruebas bioquímicas preliminares

A los tubos de AHK y AHL, con las imágenes típicas del género *Vibrio* se les realizan las siguientes pruebas: oxidasa, catalasa y cuerda: positivas, sensible al compuesto vibriostático O/129, prueba de tolerancia al NaCl con crecimiento hasta la concentración de 6 % NaCl. La descarboxilación de la lisina y la ornitina, la no hidrolización de la arginina, la utilización del manitol pero no del inositol y la positividad del *Voges–Proskauer* son pruebas que forman parte del estudio fisiológico que confirman el género y la especie (Koneman E y col.,2008).

1.8.3. Identificación de los serorupos y serotipos

Una vez identificado el microorganismo dentro de la especie *V. cholerae* se realiza el estudio antigénico con el suero polivalente O1. Los aislados positivos se enfrentan a los sueros monovalentes de los serotipos Ogawa e Inaba (Koneman E y col., 2008). Aquellos aislamientos que no aglutinen con el suero polivalente O1 se enfrentan al antisuero monovalente O139, la no aglutinación permite la clasificación como *V. cholerae* no-O1/no-O139.

I.8.4. Prueba de biología molecular para el diagnóstico y la caracterización

- ❖ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): mediante el método de la PCR se confirma el diagnóstico bioquímico y serológico de *V. cholerae*. Uno de los métodos de la PCR utilizados para la confirmación es el que amplifica un fragmento específico del genoma de *V. cholerae*, perteneciente a una región del operón rRNA, de las regiones espaciadoras intergénicas (IRS), localizadas entre 16S y 23S ribosomal del rRNA (*Koneman E y col., 2008*).
- ❖ PCR múltiple: detecta la presencia de la TC y amplifica un fragmento del gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina. Por otro lado, se amplifica un fragmento del gen *tcpA* que codifica para la proteína efectora (subunidad del pili) específico del biotipo *El Tor*, ya que esta proteína es polimórfica. Si se determina la presencia de la toxina, se necesita conocer su expresión (actividad biológica) y para ello se hace un método de cultivo en tejido de células suprarrenales Y-1 de ratón y de ovario de hámster chino, donde se busca el efecto citopático característico producido por esta toxina (*Koneman E y col., 2008*).
- ❖ Electroforesis de campo pulsado: constituye un método de subtipificación molecular cuya finalidad es la obtención de patrones de restricción genómica (huellas dactilares) de los agentes causales de los brotes epidémicos. El método se reconoce como el de mayor poder discriminatorio en bacterias, además, constituye una importante herramienta para definir la posible fuente y vía de transmisión utilizada por el agente bacteriano. Mediante el análisis y la comparación de los patrones de restricción genómica obtenidos, se puede determinar la variabilidad genética circulante en el país y su relación con los aislados en otras regiones del mundo (*Sharma Ch y col., 1998*).

I.9. Susceptibilidad a los antimicrobianos

La OMS recomienda estudiar la susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae*. Los criterios interpretativos en cuanto al tamaño de la zona de inhibición alrededor del disco de antibiograma de este patógeno se establecen por el CLSI, por lo que están disponibles las directrices para la ampicilina, el cloranfenicol, las sulfonamidas, la tetraciclina, el trimetoprim/sulfametoxazol y las fluoroquinolonas. Los resultados de la susceptibilidad frente a estos antimicrobianos por el método de difusión en agar para el estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI), determinada por microdilución en caldo. Los resultados obtenidos por el método de difusión con el disco de tetraciclina pueden predecir la susceptibilidad a la doxiciclina. La resistencia frente a la azitromicina se determina mediante el método etest, empleado para predecir la CMI frente a la eritromicina. El método de etest es costoso, por lo que su uso se puede limitar a los antimicrobianos cuyos valores de susceptibilidad en disco no están establecidos (*Mohanraj RS y col., 2020*).

I.9.1 Resistencia a los antimicrobianos

Tan pronto como se descubren los antimicrobianos y su provechosa aplicación en la medicina, comienza a identificarse la resistencia en muchos microorganismos, aunque *V. cholerae* se mantiene sensible por un largo período. Un estudio realizado en 1976, en Bangladesh, muestra que, el 3 % de los aislados de *V. cholerae* son resistentes a los antimicrobianos más aplicados. Sin embargo, este escenario cambia de forma rápida, pues tres años después, la cifra de resistentes se eleva al 18 %. Se informan aislados de *V. cholerae* resistentes en Argentina, Ecuador, México, Guatemala, Brasil, Venezuela y Cuba (*Chin J y col., 2001*).

En la literatura científica se explican determinados mecanismos detrás de esta problemática, que tiene importancia global y conducen a infecciones que pueden ser

severas y difíciles de tratar. Las infecciones por microorganismos resistentes pueden conllevar a altas tasas de mortalidad, hospitalización prolongada, más probabilidad de infecciones secundarias e incremento del costo de los servicios de salud (*Marín MA y col., 2013*).

En Tailandia, *Dalsgaard y col.*, plantean una heterogénea proporción de aislados multirresistentes de *V. cholerae* no-O1/no-O139 procedentes de muestras clínicas obtenidas en niños ingresados en el Hospital Infantil de Bangkok. Los autores del trabajo recomiendan que estos serogrupos deben monitorearse para detectar la circulación de nuevas cepas con un posible potencial epidémico, y para determinar el desarrollo de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (*Dalsgaard A y col., 1999*).

I.9.2 Mecanismos de resistencia

V. cholerae se convierte en resistente a los antimicrobianos mediante el rechazo de los mismos a través de bombas de expulsión, mutaciones cromosómicas o desarrollando resistencia genética por el intercambio de plásmidos, transposones, integrones o un por elemento conjugativo integrador (*Ghosh A y col., 2011*).

➤ Mutaciones cromosómicas: la resistencia a las quinolonas está generalmente asociada a mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, llamadas regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (QRDRs) y a la actividad de bombas de eflujo (*Ghosh A y col., 2011*).

➤ Integrones: son sistemas de adquisición natural de genes que ayudan a la bacteria a capturar genes exógenos e incorporarlos a su genoma. Juegan un papel en la diseminación de la resistencia porque con frecuencia cargan genes asociados a esta junto a elementos genéticos móviles (*Feglo PK y Sewurah M, 2018*). En aislados

de *V. cholerae* O1 de Brasil y Vietnam, se encuentra un integrón *qnr* como el responsable de la resistencia a la ciprofloxacina (Ghosh A y col., 2011).

➤ Elemento conjugativo integrador (ICE): en *V. cholerae* SXT es un tipo de ICE, que carga genes de resistencia para el trimetoprim/sulfametoxazol, la estreptomina y el cloranfenicol (Ghosh Ay col., 2011).

➤ Plásmidos: confieren resistencia a la tetraciclina, la ampicilina, el cloranfenicol, la kanamicina, la gentamicina y el trimetoprim/sulfametoxazol (Ghosh A y col., 2011).

➤ Sistema de eflujo: la bacteria presenta bombas de eflujo que expulsan a los agentes antibacterianos antes de que ellos lleguen a su diana y ejerzan su efecto. En *V. cholerae* se demuestra la responsabilidad de las bombas de eflujo para la resistencia a varios antimicrobianos (Ghosh A y col., 2011).

➤ β -lactamasas de espectro extendido: en las bacterias gramnegativas el mecanismo de resistencia a los betalactámicos más común e importante es la producción de betalactamasas, enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico, inactivando a los antibióticos. Un grupo importante de estas enzimas son las BLEE (betalactamasas de espectro extendido), que tienen la capacidad de hidrolizar y causar resistencia a las penicilinas, oximino-cefalosporinas y a los monobactámicos, pero no a las cefamicinas ni a los carbapenémicos, siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan co-resistencia a otros antibacterianos como los aminoglucósidos, el trimetoprim/sulfametoxazol y las quinolonas (Francisca G y col., 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Tipo de estudio y horizonte temporal

Se realizó un estudio analítico de corte trasversal que abarcó 23 años, desde julio de 1997 hasta diciembre de 2019. El horizonte temporal del estudio se subdividió en cuatro períodos: P1: 1997-2001, P2: 2002-2006, P3: 2007-2011 y P4: 2012-2019. Para la presentación de este trabajo se siguió la metodología propuesta en la Declaración STROBE (*Vandenbroucke JP y col., 2009*).

La investigación comenzó en 1997, momento cuando se introdujeron en la vigilancia los estudios de susceptibilidad antimicrobiana y los periodos se establecieron por quinquenios, excepto en el último que se extendió a ocho años, por conveniencia para incluir los resultados más recientes.

II.2 Universo y muestra

El universo abarcó 1 483 aislados de *V. cholerae* pertenecientes a la colección de cultivos del LNR/EDA/IPK, remitidos desde los 15 Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) del país y el Centro Municipal de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CMHEM) de la Isla de la Juventud.

Desde el punto de vista geográfico, los centros emisores de los aislados se agruparon en regiones. En la región Occidental se ubicaron los CPHEM de Pinar del

Río, Artemisa, Mayabeque, La Habana, Matanzas, y el CMHEM del municipio especial Isla de la Juventud (o las provincias que ocupaban estos territorios según la división político administrativa anterior al año 2010). La Región Central abarcó a Cienfuegos, Ciego de Ávila, Villa Clara, Sancti Spíritus y Camagüey, y en la Oriental se incluyeron Las Tunas, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo.

Se estudiaron 1 060 aislados viables, a todos se les realizó la confirmación de género, especie y el serotipo. Además, se particularizó en describir los relacionados con brotes, considerando como brote aquellos donde la unidad emisora de los aislados de *V. cholerae* refirió que pertenecieron a un episodio en el cual hubo dos o más enfermos relacionados entre sí; se tuvo en cuenta el momento de inicio de los síntomas, el lugar donde ocurrieron o las características de las personas enfermas (Peláez O y Mas P, 2020).

II. 3 Caracterización fenotípica

II.3.1 Comprobación de la viabilidad

Los aislados preservados en el medio de conservación para enterobacterias "Pasteur" (Mc Faddin JF y col., 2003), se inocularon en caldo cerebro-corazón (BIOLIFE, Italia) y se incubaron en aerobiosis a 37°C, durante 18-24 h. Transcurrida la incubación, una asada del cultivo en caldo se sembró por agotamiento en placas de agar TCBS, agar MacConkey y agar sangre con un 5 % de sangre de carnero (BIOLIFE, Italia), incubándose bajo las mismas condiciones ya descritas.

Después de transcurrir 24 h de incubación, se seleccionaron al menos tres colonias según sus características en los medios correspondientes: i) convexas, de bordes regulares y fermentadores de la sacarosa en agar TCBS, ii) translúcidas, convexas y de bordes regulares en agar MacConkey y iii) hemolíticas o no, convexas y de

bordes regulares en el agar sangre. Todas las colonias se inocularon por punción y estría en los medios de diferenciación primaria: AHK (BIOLIFE, Italia), para determinar si el microorganismo utilizaba la glucosa y la lactosa oxidativa y fermentativamente, producía o no gas y sulfuro de hidrógeno, y en AHL (BIOLIFE, Italia), para conocer si decarboxilaba o no la lisina. Ambos se incubaron en aerobiosis a 37 °C, de 18 a 24 h (Koneman E y col., 2008).

Transcurrido ese período se seleccionaron los cultivos que mostraron las siguientes características (Koneman E y col., 2008, Carnahan A y Joseph S, 2005):

AHK: no oxidación ni fermentación de la lactosa, oxidación y fermentación de la glucosa, ausencia de gas y ausencia de producción de sulfuro de hidrógeno (fondo amarillo/cuña roja).

AHL: decarboxilación de la L- lisina (fondo y cuña morados).

En todos los aislados se comprobó la presencia de la enzima citocromoxidasa, según el método de Kovacs (OXOID, Estados Unidos). Los que fueron oxidasas positivas se sometieron a un estudio fisiológico complementario para su confirmación en género *Vibrio* y especie *V. cholerae*.

II.3.2 Confirmación en género y especie

El estudio incluyó la utilización de aminoácidos y carbohidratos mediante el método de Möller, las pruebas de tolerancia al NaCl y la de Voges-Proskauer (Koneman E y col., 2008, Carnahan A y Joseph S, 2005). Los aislados que presentaron las siguientes características, se identificaron como *V. cholerae*:

- ✓ Decarboxilación de la L-lisina.
- ✓ Decarboxilación de la L-ornitina.

- ✓ No dihidrolización de la L-arginina.
- ✓ Utilización del manitol.
- ✓ No utilización del inositol.
- ✓ Prueba de la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl hasta el 6 %.
(Koneman E y col., 2008, Carnahan A y Joseph S, 2005)
- ✓ Prueba de Voges–Proskauer: positiva

II.3.3 Identificación de los serogrupos y serotipos

Para la identificación de los serogrupos y serotipos de los aislados confirmados por las pruebas fenotípicas como *V. cholerae*, se utilizaron los sueros para serogrupos: monovalente O139 y polivalente O1. Los que fueron positivos a este último, se enfrentaron a los sueros monovalentes para la determinación de los serotipos Ogawa e Inaba. El estudio se realizó por el método de aglutinación en lámina portaobjeto (Koneman E y col., 2008). Aquellos que no aglutinaron con los antisueros se identificaron como *V. cholerae* no-O1/no-O139.

II.4 Identificación de los factores de virulencia

Para la identificación de las enzimas extracelulares se sembró por agotamiento una asada del microorganismo en los medios recomendados, a partir de un cultivo puro de 18 - 24 h de incubación en el medio de AHK.

II.4.1 Determinación de la enzima DNasa

Se utilizó el medio agar ADN, suplementado con el indicador azul de toluidina al 2 %, el cual se incubó 24 h a 37 °C. Se consideraron positivos aquellos aislados que, tras la incubación, se observó una zona rosada alrededor de la colonia (Karagozova A y Salnikova O, 2000).

II.4.2 Determinación de la enzima gelatinasa

Se sembró en el medio agar gelatina, incubándose 24 h a 37 °C. Se consideraron como positivos los aislados que, tras la incubación, se observó un halo transparente alrededor de la colonia (*Karagozova A y Salnikova O, 2000*).

II.4.3 Determinación de la enzima lecitinasa

Se realizó la siembra en agar lecitina, y se incubó 48 h a 37 °C. Se consideraron como positivos los aislados que, tras la incubación, se observó un halo transparente alrededor de la colonia (*Karagozova A y Salnikova O, 2000*).

II.4.4 Determinación de la enzima elastasa

Se realizó la siembra en agar elastina, y se incubó hasta siete días a 37 °C. Se consideraron como positivos los aislados que, tras la incubación, se observó un halo transparente alrededor de la colonia (*Karagozova A y Salnikova O, 2000*).

II.4.5 Determinación de la actividad hemolítica

Se sembró en agar tripton–soya suplementada con sangre de carnero al 5 %. Se incubaron las placas durante 24 h a 37 °C. Se consideraron positivos aquellos aislados, en los que tras la incubación se observó una zona clara de betahemólisis alrededor de la colonia (*Robinson J, 1986*).

II.4.6 Detección de la toxina colérica y la toxina corregulada por pili

Para la detección de los genes de virulencia de *V. cholerae* se aplicó la PCR múltiple.

Para la presencia de la TC se amplificó un fragmento del gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina. Por otro lado, se amplificó un fragmento del gen *tcpA*

que codifica para la proteína efectora (subunidad del pili) específico del biotipo El Tor.

II.4.6.1 Extracción de ADN a partir de un aislado

Para la extracción de ADN de *V. cholerae*, se utilizó el golpe térmico. Para ello se tomaron 3 o 4 colonias a partir de un aislado en una placa de agar triptonsoya, y se diluyeron en 500 µL de agua de calidad molecular en un microtubo de 1,5 mL. Esta suspensión se sometió a 100 °C durante 10 min. Después de enfriar se centrifugó para precipitar los detritos celulares y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo microtubo para la reacción de la PCR. Los templados así preparados se conservaron a -20 °C (*Caffer M y col., 2010*).

Se utilizaron las cepas controles de *V. cholerae*O1 569 B, biotipo Clásico y *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, Perú, a las que se les extrajo el ADN mediante el procedimiento descrito anteriormente. Como control negativo se utilizó el agua destilada estéril.

II.4.6.2 Cebadores utilizados y condiciones de la mezcla y amplificación

Los cebadores empleados en la amplificación se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la identificación y caracterización de *V. cholerae*

Cebadores	Secuencia (5´-3´)	Talla del Amplicon (pb)	Secuencia blanco/ referencia
TC 94F	CGCGCAGATTCTAGACCTCCTG		<i>ctxA</i>
TC614R	CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	564	(<i>Rivera IN y col., 2003</i>)
TCP-72F	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG		<i>tcpA</i>
TCP-477R	CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG	451	(<i>Rivera IN y col., 2003</i>)

Leyenda: pb: pares de bases

La preparación de la mezcla y las condiciones de reacción se aplicaron según los protocolos descritos por *Talkington D y col., 2011*. La mezcla se preparó para un volumen final de 25 μL (20 μL de mezcla más 5 μL de ADN de la muestra) conteniendo 1,25 unidades de enzima *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* (Qiagen, Alemania), 1X de tampón de PCR (2mM de MgCl_2), 0,4 μM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 94 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 45 seg, 60 °C durante 45 seg y 72 °C por 45 seg, y una extensión final a 72 °C de 10 min (*Talkington D y col., 2011*).

II.4.6.3 Electroforesis en gel de agarosa

El análisis de los fragmentos amplificados se realizó mediante la electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % con solución amortiguadora de Tris-borato-EDTA (TBE) teñida con bromuro de etidio (0,5 mg/L) en una cámara electroforética (Sigma LX300+II). Los resultados se visualizaron con un sistema de documentación de geles UVIsave D-55/20M (UVItec, Inglaterra) para el posterior análisis digitalizado.

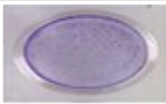
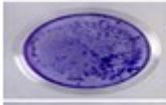
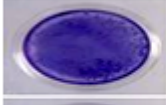
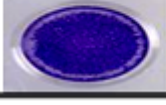
II.5 Determinación de la biopelícula en los aislados de *V. cholerae*

A partir de un cultivo puro en AHK se realizó la siembra del aislado en agar triptona soya, se incubó a 18 °C durante 24 h. A continuación, a partir del cultivo obtenido se tomó una asada con 3 o 4 colonias y se inoculó en 10 mL de caldo triptona soya, incubándose en iguales condiciones. Luego se transfirieron 3 mL del caldo por cada cepa problema a dos pocillos de una placa de 24 pocillos, incubándose a 28 °C durante 72 h.

A continuación, se retiró el medio con una pipeta y se lavaron las placas de forma manual con agua destilada, se fijó con glutaraldehído al 2,5 % durante 3 min. Se lavó con agua destilada y se añadió la solución de cristal violeta al 0,4 % de manera tal que cubriera todo el fondo del pocillo y se esperó 10 min. Luego, se desechó el exceso de colorante y se procedió a la lectura de las placas.

La aparición de color azul indicó la formación de la biopelícula. Se clasificaron en cuatro categorías desde una cruz (25 %) hasta cuatro cruces (100 %) de acuerdo al área de teñido del pocillo. Además, se estableció una correlación entre el sistema de cruces y la clasificación de formación de biopelícula en débil, moderado, fuerte y muy fuerte (figura 1) (O'Toole GA y col., 2011).

Tabla 2. Criterio de clasificación de la biopelícula, según la concordancia con el valor visual (sistema de cruces)

Tinción	Categoría en cruces	Clasificación de formación de biopelícula
	+	Débil
	++	Moderado
	+++	Fuerte
	++++	Muy Fuerte

II.6 Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos

Se determinó la susceptibilidad de cada uno de los aislados, frente a cinco antimicrobianos (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol y ciprofloxacina). En los aislados obtenidos durante el período transcurrido entre 2012-2019 se investigaron además, la susceptibilidad frente a otros cuatro antimicrobianos

(gentamicina, kanamicina, doxiciclina y azitromicina). Se utilizó el método de difusión en agar Kirby–Bauer para la ampicilina, la tetraciclina, el trimetoprim/sulfametoxazol, el cloranfenicol, la ciprofloxacina, la gentamicina y la kanamicina. Para la doxiciclina y la azitromicina se utilizó el método de dilución en agar, determinando la CMI de cada antimicrobiano mediante el sistema comercial prueba de Épsilon (etest, por sus siglas en inglés), recomendado por el CLSI (CLSI, 2018).

Criterio de multirresistencia: se consideraron como multirresistentes aquellos aislados de *V. cholerae* que mostraron resistencia a tres o más familias de antimicrobianos diferentes (CLSI, 2018).

II.6.1 Método de difusión en agar o Kirby-Bauer (Bauer A y col., 1966)

Preparación del inóculo: a partir de un cultivo puro de *V. cholerae*, mediante un asa o de una aguja se tocaron entre 4 a 5 colonias aisladas y con la misma morfología. Se inocularon en 5 mL de caldo Mueller–Hinton 2. Se incubaron a 35 °C (de 2 a 5 h) hasta la obtención de una opacidad visible. Esta opacidad se correspondió con la fase exponencial del crecimiento bacteriano y se comparó con la suspensión estándar (densidad 0,5 de la escala de MacFarland).

Siembra: se introdujo un aplicador en el tubo inoculado. Para evitar el exceso de inóculo se presionó el aplicador contra las paredes del tubo. A continuación se extendió el inóculo sobre todo el agar, girando la placa 60 grados para asegurar una siembra uniforme. Se dejó secar la placa, sin pasar de 15 min y se aplicaron los discos.

Colocación de los discos: estos se colocaron sobre el agar ayudados por una pinza, con la precaución de que los discos quedaran bien adheridos y dispuestos de tal manera que, las zonas de inhibición no se entrecuzaran (6 discos por placas).

Después de una predifusión de 15 min a la temperatura ambiente, se colocaron durante una hora en refrigeración.

Incubación: durante 18 - 24 h a 37 °C.

Lectura: se midió el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento con un pie de rey.

Para comprobar la calidad de los discos de los antimicrobianos, se emplearon las siguientes cepas controles:

Escherichia coli ATCC® 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853

Staphylococcus aureus ATCC® 25923

II.6.2 Método de concentración mínima inhibitoria (etest)

Se siguió la metodología para la preparación del inóculo y la siembra de las placas, según lo descrito en el acápite II.6.1.

Se colocaron dos tiras de etest por placas y se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 h.

Interpretación: para la interpretación de los valores de los halos de inhibición en el método de difusión en disco, se utilizaron los valores recomendados para cada antimicrobiano establecidos por el CLSI de 2010, en el documento M45_A2, 2010 para *V. cholerae* (CLSI, 2010). La medida de los diámetros de la zona de inhibición permitió definir la categoría de cepa resistente. De acuerdo con los resultados obtenidos por el método de CIM, cada aislamiento se interpretó como resistente, según los puntos de corte establecidos por el CLSI, 2018 (tabla 3).

Tabla 3. Antimicrobianos empleados en las pruebas de susceptibilidad

Familia de antimicrobianos	Antimicrobianos	Concentración Disco	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
			Resistente	
Betalactámicos	Ampicilina	10 µg	≤ 13	
Tetraciclinas	Tetraciclina	30 µg	≤ 11	
Sulfonamidas	Trimetoprim/Sulfametoxazol	1,25/ 23,75µg	≤ 10	
Fenicoles	Cloranfenicol	30 µg	≤ 12	
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	
Aminoglucósidos	Gentamicina	10 µg	≤ 12	
	Kanamicina	30 µg	≤ 13	

Familia de antimicrobianos	Antimicrobianos	Criterios de interpretación MIC (µg/mL)	
		Resistente	
Tetraciclinas	Doxiciclina	≥ 16	
Macrólidos	Azitromicina	≥ 2	

Fuente: CLSI, 2018; M45_A2, 2010

II.7 Variables estudiadas

Tabla 4. Variables utilizadas en la investigación

Variables	Tipo	Escala	Descripción	Indicador
Viabilidad	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Según resultado	Acápites II.3.1
Tiempo	Cualitativa continua	1997-2001 2002-2006 2007-2011 2012-2019	Períodos de tiempo	Frecuencia de aislamientos según períodos de tiempo
Área geográfica	Cualitativa nominal politómica	Occidental Central Oriental	Según regiones de Cuba	Frecuencia de aislamientos según regiones geográficas
Factores de virulencia (presencia de elastasa, gelatinasa, DNasa, lecitinasa, hemolisina, biopelícula)	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Según resultado de la prueba	Acápites II.3.2
Clasificación de formación de biopelícula, según intensidad de color	Cualitativa nominal politómica	Débil, Moderado, Fuerte, Muy	Según resultado de la prueba	Acápites II.3.2

Presencia de TC y TcpA	Cualitativa nominal dicotómica	fuerte. Positiva, Negativa	Según aparición o no de fragmento de 564-bp para la TC y 451 bp para TcpA	Presencia del gen de la TC y TcpA
Categoría de resistente	Cualitativa nominal dicotómica	Resistente Sensible	Según resultado de la prueba	Acápites II.3.3

II. 8 Análisis estadístico

Los datos se archivaron y procesaron en una base de datos con el uso del programa Excel de *Microsoft Office*. Se utilizaron medidas estadísticas descriptivas como la frecuencia y el porcentaje para el análisis y la presentación de los resultados. Para el análisis de las variables cualitativas se emplearon las pruebas de comparación de proporciones y chi-cuadrado (χ^2) en muestras independientes.

Para evaluar la asociación de los factores de virulencia enzimáticos, la formación de la biopelícula y el serotipo con la presencia de la multirresistencia, se realizó un análisis bivariado. Se empleó la prueba de chi cuadrado para comparar los grupos multirresistentes (MR) y no MR o la prueba exacta de Fisher, si alguna de las celdas (en las tablas tetracóricas construidas) tenía algún valor esperado menor de 5. Se calcularon los valores de odds ratio (OR) con sus intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %) para la evaluación de riesgo. Posteriormente, se realizó una regresión logística binaria para minimizar los sesgos y ver la influencia de conjunto de todas las variables estudiadas en los aislados MR.

II.9 Consideraciones éticas

Se cumplieron las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y la manipulación de los microorganismos y las muestras, según los niveles de riesgo

establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica, en correspondencia con las siguientes resoluciones:

- Resolución No. 8 de 2000 “Reglamento general de seguridad biológica para las instalaciones en las que se manipulan agentes biológicos y sus productos, organismos y fragmentos de estos con información genética”, que estableció el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (Citma), el 17 de enero de 2000 (*Gaceta Oficial de la República de Cuba, 2000*).

- Resolución N° 103 de 2002 “Reglamento para el establecimiento de los requisitos y procedimientos de seguridad biológica en las instalaciones en las que se hace uso de agentes biológicos y sus productos, organismos y fragmentos de estos con información genética” que estableció el Citma, el 9 de octubre de 2002 (*Gaceta Oficial de la República de Cuba, 2002*).

- Resolución No. 38 con la “Lista oficial de los agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas”, también del Citma del 24 de marzo de 2006 (*Gaceta Oficial de la República de Cuba, 2006*).

De igual forma, para el trabajo en el laboratorio se tuvieron en cuenta las prácticas y procedimientos establecidos y se utilizaron los equipos de seguridad que corresponden al nivel de seguridad biológica II, ya que *V. cholerae* está incluido entre los agentes biológicos que afectan al hombre en este grupo de riesgo, puesto que representa un riesgo individual moderado y comunitario limitado (Resolución N° 38, 2006).

Los experimentos se realizaron cumpliendo los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio. La ejecución de los mismos no significó un riesgo para el personal involucrado en el laboratorio ni para la comunidad. El LNR/EDA/IPK es un laboratorio convencional que satisface los requisitos mínimos indispensables para el

trabajo con gérmenes patógenos, diseñado para el trabajo con agentes de los grupos de riesgo de un nivel de bioseguridad I y II. Cuenta además, con los equipos y materiales correspondientes para el trabajo con *V. cholerae*.

En el estudio fue innecesario utilizar el consentimiento informado de los pacientes ya que se trabajó con aislados bacterianos enviados por los laboratorios de microbiología de la Red Nacional de Salud, pero se tuvieron en cuenta los principios de la bioética de beneficencia y justicia, y se cumplió el Código Internacional de la Ética Médica.

Los resultados de este estudio se procesaron por el personal del laboratorio autorizado e informado a las autoridades pertinentes. La investigación formó parte del Proyecto Asociado al Programa titulado "Estudios de caracterización fenotípica y de mecanismos de resistencia antimicrobiana en enteropatógenos oxidasa positivos" (código 1701032), y aprobado en el IPK por la Comisión Científica Especializada del Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia, y por el Comité de Ética de las Investigaciones (CEI-IPK 20-16).

II.10 Limitaciones de la investigación

La autora de la tesis reconoce la existencia de determinadas limitaciones en los estudios realizados:

- Se estudió un limitado número de factores de virulencia.
- No se incluyeron estudios genéticos de los mecanismos de virulencia y resistencia a los antimicrobianos.
- Limitada la investigación causal por ser un estudio de corte transversal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. 1 Distribución temporo-espacial de *V. cholerae* en Cuba

Los 1 060 aislados del estudio correspondieron a bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, oxidasa positiva, con reacción positiva a las pruebas de lisina y ornitina decarboxilasa y negativa para la arginina dihidrolasa. Todos crecieron en caldo triptona soya con una concentración del 6 % de NaCl, utilizaron la sacarosa y el manitol y no así el inositol, por lo que se confirmaron como *V. cholerae*.

La distribución por regiones de los aislados investigados demostró que el mayor porcentaje se correspondió al período 2012-2019, con diferencias significativas. Se evidenció además, que en todos los períodos la región oriental aportó el mayor número de aislados de *V. cholerae* (tabla 5).

Tabla 5. Distribución por regiones geográficas de los aislados de *Vibrio cholerae* confirmados. Cuba (1997-2019)

Periodos	Aislados según regiones geográficas; n (%)			Total n (%)
	Occidental	Central	Oriental	
1997-2001	20 (8,9)	105 (46,7)	100 (44,4)	225 (21,2)
2002-2006	14 (7,1)	80 (40,6)	103 (52,3)	197 (18,6)
2007-2011	8 (13,8)	14 (24,1)	36 (62,1)	58 (5,5)
2012-2019	187 (32,2)	157 (27,1)	236 (40,7)	580 (54,7)*
Total	229 (21,6)	356 (33,6)	475 (44,8)	1 060

Leyenda: * $p < 0,05$

Las especies de *Vibrio* muestran una amplia distribución en ambientes acuáticos de todo el mundo (*Baker-Austin C y col. 2010*). Se sugiere que el incremento en la temperatura de los océanos como consecuencia del cambio climático, puede ser responsable de los brotes de infección por *Vibrio* en países como Israel, Dinamarca, España, Chile y los Estados Unidos (*Di DYW y col., 2017*).

En Latinoamérica, de acuerdo con los datos publicados por el Comité de Carga Mundial de Enfermedades Diarreicas (GBDDC, por sus siglas en inglés), las EDA persisten como un problema de salud pública (*GBDDC, 2017*). Gracias a los programas de control de las EDA auspiciados por la OMS y la OPS como oficina regional, la incidencia de esta entidad mantiene una relativa estabilidad en las tres últimas décadas, y varios países disminuyen la mortalidad por diarreas durante este mismo periodo (*Herrera-Benavente IF y col., 2018*).

En la presente investigación se evidenció la circulación de aislados de *V. cholerae* procedentes de pacientes con EDA en las tres regiones del país.

Desde la década de los '80 hasta 1998 en Cuba, evidencian la circulación de *V. cholerae* no-O1/no-O139 en pacientes con EDA (*Bravo L, 2002*). Entre los años 1986 a 1997, demuestran la presencia de *V. cholerae* O1 en muestras de heces obtenidas de enfermos, en portadores, y en muestras ambientales, y con el predominio del serotipo Ogawa. Estos estudios evidencian una mayor circulación de *V. cholerae* en la región oriental y sus autores sugieren la posible existencia de un nicho ecológico que favorece la persistencia de las diarreas causadas por este agente (*Bravo L, 2002*).

Posterior a 1997, no se aísla *V. cholerae* O1 en el país hasta junio de 2012, cuando el Minsap de Cuba notifica un evento epidemiológico de esta entidad en la provincia de Granma (*Minsap, 2016*).

Según estudios internacionales, el agente causal del cólera no puede eliminarse del medio ambiente, por considerarse una especie nativa del mismo y asociarse a habitantes marinos como las algas y los crustáceos. Además, los cambios en los patrones climáticos favorecen el crecimiento de *V. cholerae* en los ecosistemas acuáticos, y por lo tanto contribuyen a la ocurrencia de brotes y epidemias (*Chowdhury FR y col., 2017; Froelich BA y col., 2020*).

En Cuba, el comportamiento de las EDA se asocia a los meses de verano, donde se observa un aumento del número de brotes y casos de diarreas influenciado por las altas temperaturas y las lluvias propias de esta estación (*Battle MC y col., 2014; Sarab K y col., 2016*). Sin embargo, no hay investigaciones en el país que evidencien el efecto de la variabilidad climática sobre el comportamiento espacio-temporal en *V. cholerae*, por lo que se sugiere incluir esta temática en futuros estudios.

De la totalidad de los aislados de *V. cholerae* estudiados, 677 (63,9 %) procedían de brotes. La figura 1 muestra la proporción en cada período, según las regiones geográficas. Para el período de 1997 a 2001 la región occidental aportó el menor porcentaje (5 %) de aislados relacionado con brotes. Sin embargo, entre los años 2012 y 2019, el mayor número de aislados causantes de eventos epidemiológicos (95 %) se identificó en esa misma región. Ambos valores fueron significativos cuando se compararon con los identificados en las regiones central y oriental ($p < 0,05$).

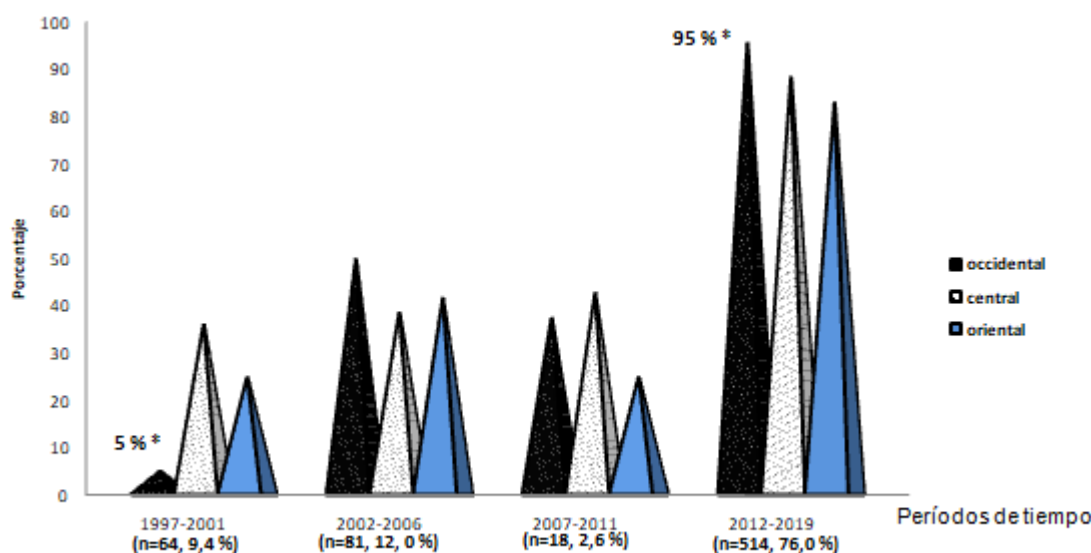


Figura 1. Proporción de los aislados de *Vibrio cholerae* procedentes de brotes de enfermedad diarreica en Cuba (1997-2019), según regiones geográficas. (n= 677)

Leyenda: (* $p < 0,05$)

Los serogrupos epidémicos *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* O139 producen la enfermedad del cólera, causante de estragos durante siglos en los países en vías de desarrollo debido a su poca infraestructura, saneamiento e insuficiente acceso a agua potable (Hsueh BY y Waters CM, 2019; OMS, 2019) mientras que los serogrupos no-O1/no-O139, se aíslan con frecuencia del medio ambiente y se

asocian a casos esporádicos de gastroenteritis e infecciones extraintestinales (*Ulloa MT y col., 2019*).

Desde el año 2012 hasta 2016 ocurren diferentes brotes en este país, asociados a la circulación de *V. cholerae* O1, serotipos Ogawa e Inaba (*Zelada A y col., 2015; Minsap, 2016*).

En el presente estudio entre los años 2012-2019, se observó un aumento de los aislados procedentes de brotes ocurridos en la región occidental de Cuba. Este comportamiento pudo relacionarse con la circulación conjunta de los serotipos epidémicos, los cuales provocan brotes de una mayor dimensión (OMS, 2019). Investigaciones realizadas en Cuba, durante el año 2012 por Romero-Placeres para conocer si las deficiencias en la calidad del agua potable y el saneamiento influyen en la carga de EDA en Cuba, evidencia la existencia de un mayor número de municipios del occidente con un alto riesgo en la ocurrencia de brotes diarreicos debido a ambos aspectos (*Romero-Placeres M, 2015*). Además, en el occidente del país está incluida La Habana, provincia con la mayor población e intercambio comercial, turístico y personal, con el interior y exterior del país. Los brotes de cólera en La Habana durante los años 2012 y 2013, se asocian a centros de venta de alimentos, donde se comprueba la presencia de portadores asintomáticos en los manipuladores de alimentos (*OPS, 2013*). También se conoce que el 96,8 % de las viviendas en la capital reciben el agua por acueducto, el servicio de suministro del agua es discontinuo y en algunos lugares con bajas presiones, lo que unido al estado actual de las redes de distribución condicionan el riesgo de contaminación del agua, que favorece la propagación de esta enfermedad (*Battle MC y col., 2014*).

En Cuba, según el censo realizado por la Oficina Nacional de Estadísticas e Información (ONEI) en el 2012, a pesar de una alta cobertura de servicios de agua y saneamiento, aún existen deficiencias por el deterioro de la infraestructura sanitaria debido a la antigüedad de las redes, con una posibilidad de contaminación microbiológica muy alta (ONEI, 2012; Romero-Placeres M, 2015).

Del total de aislados estudiados, 560 (52,8 %) no aglutinaron con el antisuero polivalente O1, ni con el antisuero O139, por lo que se identificaron como *V. cholerae* no-O1/no-O139. En los restantes, el 47,2 % se identificó como *V. cholerae* O1, 482 (96,4 %) fueron del serotipo Ogawa y 18 (3,6 %) del serotipo Inaba. Por otra parte, ninguno de los aislados se identificó como *V. cholerae* O139.

El serogrupo O1 contiene tres serotipos, aunque los más comunes Ogawa e Inaba, son capaces de producir brotes de cólera. La diferencia entre uno u otro radica en la metilación del LPS, que ocurre por la presencia de la enzima metiltransferasa la cual actúa como catalizador y es codificada por el gen *webT*. Cuando el aislado posee el LPS metilado pertenece al serotipo Ogawa y cuando no, al serotipo Inaba (Liang W y col., 2013).

En las áreas endémicas el cambio de un serotipo a otro no es un proceso aleatorio, sino que depende de varios factores (Karlsson SL y col., 2016). Estudios genéticos sugieren que los elementos móviles presentes en el genoma de *V. cholerae*, tales como los relacionados con la virulencia (CTXØ), con la resistencia a los antibióticos (SXT ICE) y a los fagos, y su consiguiente expansión clonal, pueden contribuir al predominio de un serotipo particular durante un período de tiempo determinado. Además, la presión generada por el sistema inmune puede desempeñar un papel importante en el cambio de estos, ya que la inmunidad del hospedero inducida por

un serotipo específico estará presente si el serotipo circula mucho tiempo en la población. Algunos autores plantean desconocer el impacto que ejercen los factores ambientales sobre la viabilidad de estos dos serotipos (*Baddam R y col., 2020*).

Estudios realizados en muestras de heces obtenidas de pacientes con diarreas entre los años 2006- 2016 en centros centinelas de Nepal, demuestran la circulación de *V. cholerae* O1, con predominio del serotipo Ogawa (*Rijal N y col., 2019*).

Investigaciones realizadas en Ghana durante los años 2015-2016, en muestras de heces obtenidas de pacientes con EDA y del ambiente, evidencian la presencia de *V. cholerae* O1, serotipo Ogawa, y su coexistencia con los serogrupos no-O1/O139 (*Abana D y col, 2019*). Los resultados de la presente investigación relacionados con la circulación de los serogrupos y serotipos coincidieron con los trabajos antes citados.

La figura 2 muestra la distribución temporal de los serogrupos de *V. cholerae* en el período 1997- 2019. Durante toda esta etapa se mantuvo la circulación de *V. cholerae* no-O1/no-O139. El serogrupo O1 comenzó a circular en el año 2012, y presentó un alza en los años 2013 y 2014, y desde el año 2017 no se identificó este serogrupo.

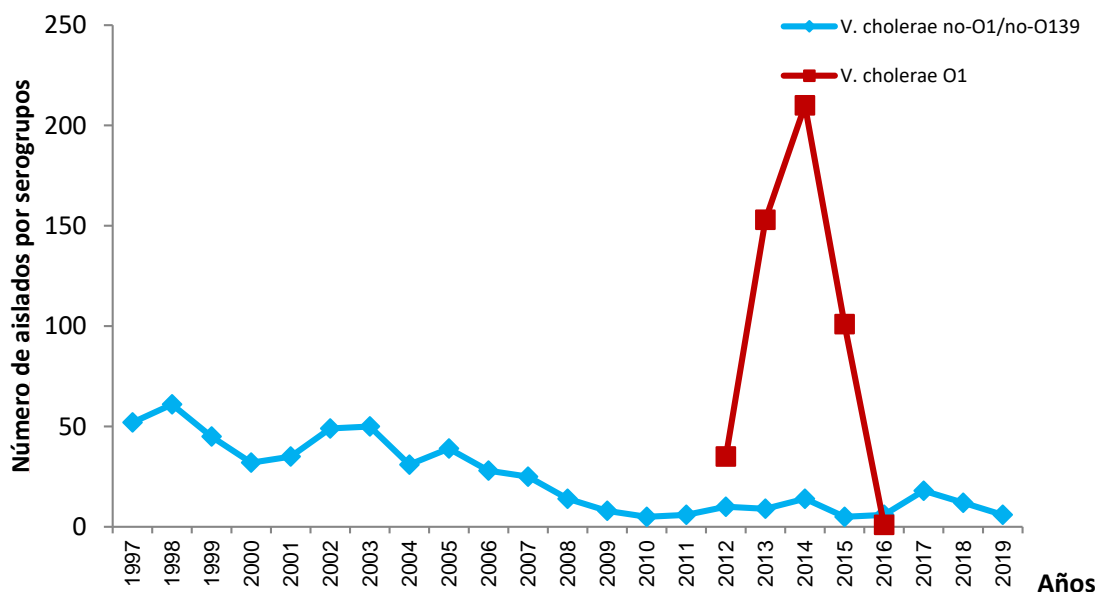


Figura 2. Distribución en el tiempo de los serogrupos de *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139 responsables de enfermedad diarreica en Cuba (1997-2019). (n= 1 060)

En enero de 1991, ocurre un brote epidémico de cólera en las costas de Perú causado por el serogrupo O1 que se extiende con rapidez a casi todos los países de América Latina. Varios años después, en octubre de 2010 este agente se introduce en Haití, y desde sus inicios hasta el año 2018 notifican casos sospechosos de esta enfermedad. Los autores plantean las pobres condiciones de saneamiento y acceso al agua potable de esa población contribuye a la persistencia de los brotes de cólera (Guillaume Y y col., 2019).

En Cuba, investigaciones realizadas en 2002, evidencian la circulación de los serorupos epidémicos y no epidémicos como agentes causales de diarreas durante de 13 años (Bravo L, 2002).

En la presente investigación científica se evidenció que, durante el período epidémico comprendido entre los años 2012-2016 se constató la circulación de V.

cholerae O1 y *V. cholerae* no-O1/no-O139, resultado que coincidió con la literatura consultada.

La figura 3 muestra la distribución porcentual de los serogrupos según regiones geográficas. Nótese que en el occidente se identificó el menor porcentaje de aislados de *V. cholerae* no-O1/no-O139 en todos los períodos, excepto durante el 2012-2019. En relación a *V. cholerae* O1 se identificó en menor porcentaje en la región central.

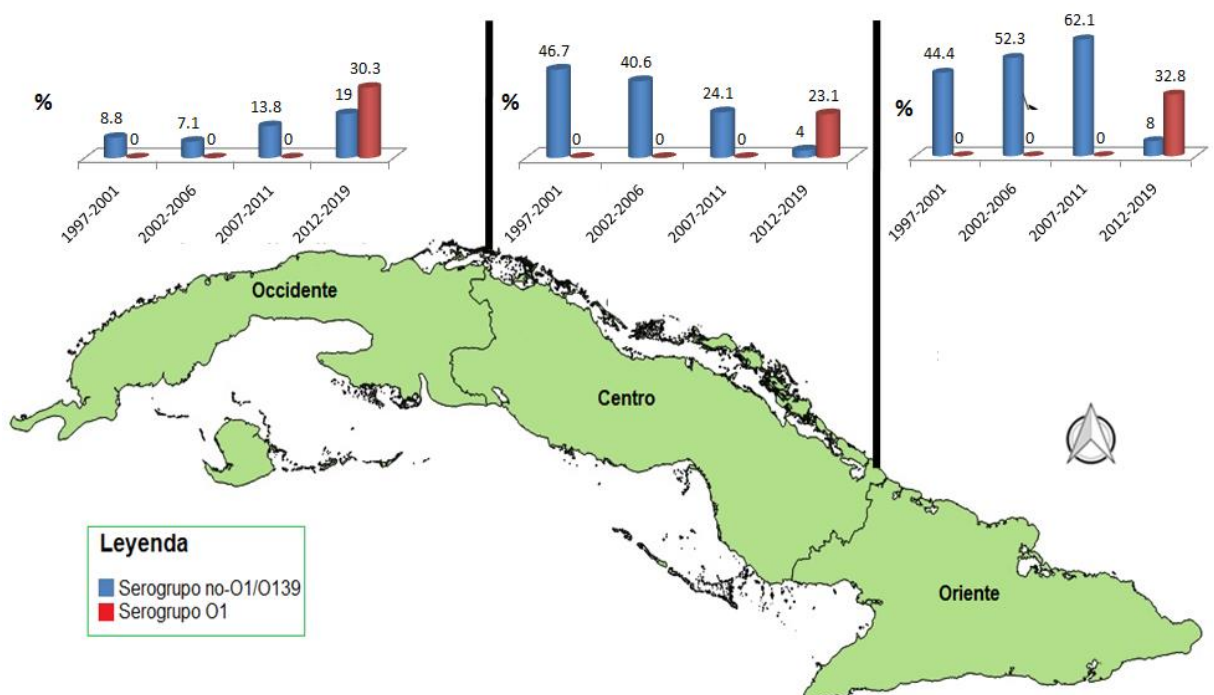


Figura 3. Distribución porcentual de los serogrupos *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139 responsables de enfermedad diarreica en Cuba (1997-2019), según regiones geográficas. (n= 1 060)

En Cuba, según los estudios realizados en la década de los 90, se demostró la circulación de los serogrupos epidémicos y no epidémicos en las tres regiones del país (Bravo L, 2002).

Como está descrito en la literatura internacional, durante los brotes de cólera circulan junto con *V. cholerae* O1, los serogrupos no epidémicos. Así lo notifican en

Tailandia, Iraq y Japón (*Wang H y col., 2020*). Los autores exponen que la coincidencia de los serogrupos toxigénicos y no toxigénicos representan una emergencia de salud para el mundo debido a la transferencia horizontal de genes que aportan virulencia y resistencia antimicrobiana entre los serogrupos de la misma especie, lo cual favorece la aparición de cepas más virulentas (*Froelich BA y col., 2020*).

III.2. Factores de virulencia y formación de biopelícula en los aislados estudiados

III. 2.1 Factores de virulencia enzimáticos y presencia de toxinas en *V. cholerae*

En todos los aislados estudiados se demostró la presencia de dos o más factores de virulencia. En la tabla 6 se muestra la frecuencia de aislados que expresaron enzimas extracelulares como atributos de virulencia, según los períodos de tiempo investigados. Las enzimas identificadas fueron DNasa, lecitinasa, gelatinasa, elastasa y hemolisina. En todos los períodos, se observó el mayor porcentaje de aislados positivos para las enzimas gelatinasa y lecitinasa. En el último período se evidenció en los serogrupos no-O1/no-O139 un incremento en la variación porcentual para todos los factores de virulencia enzimáticos.

Tabla 6. Variación porcentual de positividad para la presencia de las enzimas extracelulares en los aislados de *Vibrio cholerae*. Cuba. 1997-2019.

Factores de Virulencia	<i>V. cholerae</i> no-O1/no-139							<i>V. cholerae</i> O1
	P1 N=225 n (%)	P2 N=197 n (%)	Δ P1;P2	P3 N=58 n (%)	Δ P2;P3	P4 N=80 n (%)	Δ P3;P4	P4 N=500 n (%)
DNasa	138 (61,3)	118 (59,8)	-14,6 %	34 (58,6)	-71,1 %	61 (76,2)	79,4 %	390 (78,0)
Lecitinasa	175 (77,7)	153 (77,6)	-12,6 %	45 (77,5)	-70,6 %	76 (95,0)	69,1 %	475 (95,0)
Gelatinasa	203 (90,2)	178 (90,3)	-12,3 %	52 (89,6)	-70,8 %	75 (93,7)	44,2 %	480 (96,0)
Elastasa	110 (48,9)	96 (48,7)	-12,8 %	28 (48,2)	-70,9 %	37 (46,2)	32,2 %	240 (48,0)
Hemolisina	139 (61,7)	120 (60,9)	-13,6 %	35 (60,3)	-70,8 %	64 (80,0)	83,0 %	410 (82,0)

Los aislados de *V. cholerae* no-O1/no-O139, a pesar de no poseer los genes que codifican para la toxina colérica, son capaces de causar enfermedad en el humano mediante la colonización del intestino delgado y la producción de enzimas extracelulares tales como las hemolisinas, lecitinas, elastasa, DNasa y gelatinasa, entre otras, todas involucradas en su patogenicidad (Valariková J y col., 2019).

Pionero en esta área, el grupo de Mekalanos, describe por primera vez en el año 2002 una cepa de origen clínico de *V. cholerae* no-O1/no-O139 que portaba en su genoma un segmento homólogo de la isla de patogenicidad VPal-7 de *V. parahaemolyticus*. Este segmento génico codifica para un sistema de secreción tipo III (T3SS) funcional, descrito como un importante factor de virulencia (Shin OS y col., 2011; Alam A y col., 2015). Se describen en este segmento una serie de genes denominados "*Vibrio cholerae secretion*" (vcs), que codifican para varios componentes estructurales del sistema de secreción tipo III (T3SS), que en su conjunto otorgan un mayor grado de virulencia (Shin OS y col., 2011). Además, el

gen denominado *vopF*, localizado también en la misma isla, juega un papel importante en el fenómeno de la colonización intestinal por parte de *V. cholerae* no-O1/ no-O139 (*Shin OS y col., 2011*).

En la presente investigación el estudio de las enzimas extracelulares evidenció que los factores de virulencia gelatinasa y lecitinasa estuvieron presentes en la mayor cantidad de aislados, seguidos de las hemolisinas, DNasa y elastasa.

En Cuba, varios estudios evidencian la presencia de enzimas extracelulares en los aislados de *V. cholerae* no-O1/no-O139. Pérez. C y col. en 2013 demuestra que la mayoría de los aislados no toxigénicos de esta especie producen la enzima gelatinasa (*Pérez C y col., 2013*).

De igual forma, Cabrera y col. en el año 2006, en un estudio realizado a 65 aislados procedentes de muestras de heces obtenidas de pacientes con EDA, informan al menos dos factores de virulencia presentes en todos los aislados, donde el 100 % de los mismos son positivos a las enzimas hemolisina y gelatinasa; seguido de DNasa (73,8 %), lecitinasa (80 %) y elastasa (86,1 %) (*Cabrera LE, 2008*). Por otro lado, Bueno en 2011 obtiene de igual manera, un mayor porcentaje para las enzimas gelatinasa y hemolisina en aislados de *V. cholerae* no-O1/no-O139 obtenidos de pacientes con diarreas en el país (*Bueno Y, 2011*).

La presencia de enzimas extracelulares en los aislados estudiados entre 1997-2019, obtenidos en la presente investigación, coincidieron con los mencionados en los artículos anteriores.

Saleh y col., encuentran en Iraq durante el período 2007-2009, que el 100 % de los aislados de *V. cholerae* no-O1 obtenidos de pacientes con EDA producían lecitinasa (*Saleh TH y col., 2011*). Por otra parte, Bidinost y col., en Argentina, publican que, en

un total de 15 aislados de *V. cholerae* no-O1/no-O139, el 100 % producen hemolisinas (*Bidinost C y col., 2004*).

Los resultados de la presente investigación se correspondieron con los ya expuestos en diferentes áreas geográficas.

Al revisar la bibliografía científica internacional, se describe que en el género *Vibrio*, están presentes enzimas extracelulares y citotoxinas, implicadas en la aparición de hemorragia, edema y la alteración de los sistemas de defensa en el organismo (*Cárdenas-Perea ME y col., 2014*).

El resultado en esta investigación referente a la presencia de los factores de virulencia enzimáticos en los aislados puede vincularse con la posibilidad que tienen estos microorganismos de producir varias proteínas extracelulares e intracelulares para invadir el sistema inmunológico del hospedero y lograr su colonización, ya que *V. cholerae* tiene varias “herramientas” en su arsenal que le permiten colonizar e infectar al hospedero. Además de la TC, numerosas son las proteínas extracelulares e intracelulares responsables de la virulencia/patogenicidad/citotoxicidad de los aislados de *V. cholerae* (*Lackova D y Sojka M, 2018*).

Está demostrado que la circulación de aislados de *V. cholerae* no-O1/O139 causantes de brotes de gastroenteritis y casos esporádicos de diarreas, representan un problema para la salud pública (*Arteaga M y col., 2020*), lo cual justifica la permanente vigilancia de este patógeno en Cuba.

El porcentaje de las enzimas extracelulares detectadas en el presente estudio coincidieron con los obtenidos por Francisca y *col.*, durante 2017 en Brasil, quienes demuestran que el 100 % de los aislados de *V. cholerae* O1 estudiados, presentan codificación genética para las enzimas gelatinasa, elastasa y la betahemolisina (*Francisca G y col., 2017*).

Las frecuencias de las enzimas extracelulares identificadas en esta investigación mostraron un porcentaje inferior al descrito por Motaweq y col en 2017, en Najaf (India), quienes al estudiar 27 aislados procedentes de muestras clínicas obtienen un 100 % de positividad a la betahemolisina (Motaweq Z, 2017).

En los aislados de *V. cholerae* O1 correspondientes al período 2012-2016, se evidenció que el 100 % presentó codificación genética para la TC y la Tcp.

V. cholerae O1 y O139 son los serotipos reconocidos como epidémicos por tener la capacidad de expresar factores de virulencia extracelulares, la TC y el Tcp, entre otros, que son los responsables del cuadro clínico de la enfermedad del cólera. El gen que codifica para la TC se encuentra en un fago que puede transferirse de manera vertical, mientras que el Tcp es un pilus tipo IV, cuyos genes se encuentran en la isla de patogenicidad de *V. cholerae* y dentro de sus funciones está la de colonizar el intestino y es el receptor del fago que contiene la TC (Abana D y col., 2019).

La presencia de TC en los aislados del presente estudio, es de gran valor (microbiológico, clínico, epidemiológico), por coincidir con los resultados descritos por Bravo en Cuba, que demuestra por primera vez en este país la presencia de la TC en *V. cholerae* O1 procedentes de muestras ambientales y humanos, sin existir notificación de la enfermedad del cólera (Bravo L., 2002).

Estos resultados, son similares a los publicados en Ghana, Irán y Haití, donde evidencian la presencia de TC en aislados de *V. cholerae* O1 procedentes de pacientes con diarreas y de muestras ambientales (Naha A y col., 2012; Abana D, y col, 2019).

De manera general, en la especie se reconocen a la TC y Tcp como los principales factores de virulencia (Zeb S y col., 2019; Froelich BA y Daines DA, 2020).

Estudios recientes constatan la circulación de aislados de *V. cholerae* que albergan el gen de *tcpA* de ambos biotipos El Tor y Clásico (Das A, y col., 2016). Se conoce que el biotipo El Tor tiene una mejor adaptabilidad en el medio ambiente y mayor capacidad y efectividad de colonización que el biotipo Clásico. Sin embargo, el biotipo Clásico puede causar mayor acumulación de líquido en el desarrollo de la enfermedad. Los aislados que poseen ambos genes, se conocen también como "híbrido de El Tor" y son más virulentos (Eiback D y col., 2014; Ramamurthy T y col., 2019). Además, la adquisición del bacteriófago que codifica el gen *ctx* puede asociarse con la derivación de aislados toxigénicos de *V. cholerae* de progenitores no toxigénicos. De ahí que, cuanto mayor sea la presencia del gen *ctx* en ambos biotipos circulantes, es probable la aparición de brotes de cólera donde los pacientes presenten un cuadro clínico grave (Abana D y col., 2019).

Estudios realizados en Bangladesh durante 2018, en aislados de *V. cholerae* O1 procedentes de muestras clínicas y ambientales circulantes entre los años 2015-2016 en ese país. Los autores de este estudio evidencian la presencia de ambos factores de virulencia (TC y Tcp) (Rahman Z y col., 2018).

El hecho de que en Cuba se demostró la presencia de *V. cholerae* O1, con codificación genética para la TC y la Tcp entre los años 2012 al 2016, pudo relacionarse con varios factores. En primer lugar, hay que considerar las condiciones epidemiológicas de la región ya mencionadas. Dentro de dichas condiciones, fue determinante la circulación del serogrupo en varios países, con gran peso en Haití, por la cercanía geográfica y el elevado intercambio humano y comercial de ese país

con Cuba. En segundo lugar, las condiciones ambientales difieren de un año a otro, debido al cambio climático experimentado en el mundo. Cuando se revisó la literatura científica internacional, varios artículos refieren que el calentamiento global provoca un aumento de la temperatura oceánica (Halpern BS y col., 2019; IPCC, 2019). Se reconoce a su vez, que este aumento puede relacionarse con el incremento de las infecciones causadas por *Vibrio* spp., ya que el hombre interactúa cada vez más con el océano para satisfacer fines comerciales y de recreo (Logar-Herderson, C y col., 2019; Froelich BA y Daines DA, 2020).

III.2.2 Formación de biopelícula en la especie *V. cholerae*

En relación con la formación de biopelícula, en las cuatro etapas estudiadas el porcentaje de positividad superó el 54 % (figura 4), aunque el mayor número de aislados con esta capacidad correspondió al período del 2012- 2019, con un incremento en la variación porcentual de 18,1 %. En dicho período, este factor de virulencia se identificó en el 67,5 % de los serogrupos no epidémicos, mientras que, en el serogrupo O1, la formación de biopelícula se identificó en el 54,6 %.

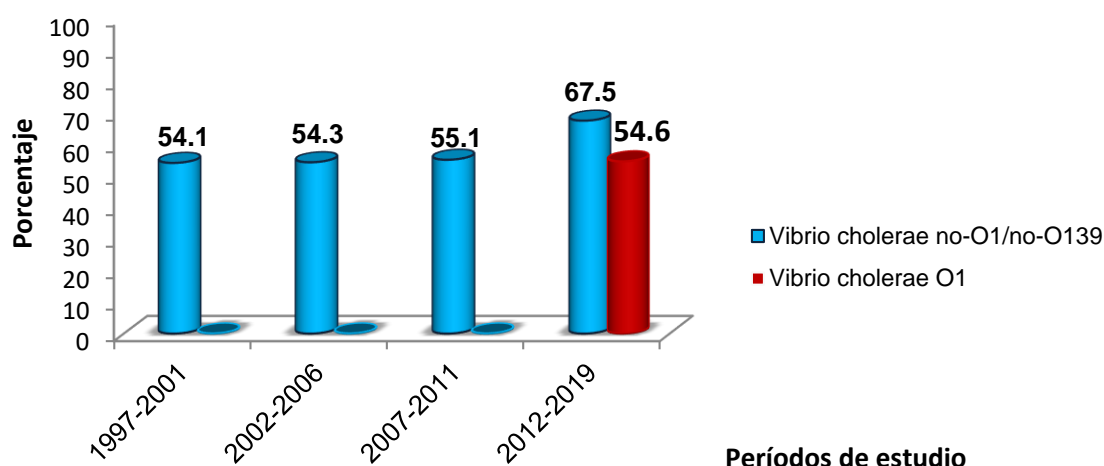


Figura 4. Proporción de aislados de *Vibrio cholerae* con capacidad de formación de biopelícula. Cuba. 1997-2019 (n=1 060)

Un factor clave para la supervivencia ambiental y transmisión de *V. cholerae* es su capacidad para formar biopelícula. La formación de esta estructura está bien estudiada, tanto en los ambientes naturales como en las condiciones de laboratorio (Jung JC y col., 2019). Diferentes investigaciones sugieren que el desarrollo de la biopelícula por *V. cholerae* puede ser importante durante el desarrollo de la infección en los humanos (Fong JC y col., 2010; Almagro-Moreno A y col., 2015).

Se reconoce que *V. cholerae* asociado a la biopelícula exhibe una hipervirulencia y aptitud superior de supervivencia contra las condiciones adversas durante su ciclo infeccioso. Las investigaciones resaltan la importancia de estudiar las relaciones entre el mecanismo de regulación del desarrollo de la biopelícula y su adaptación ambiental en el nicho del hospedero y el hábitat acuático (Wang Q y col., 2017).

Está documentado que una vez formada la biopelícula, los microorganismos resisten a la acción de las defensas inmunes del hospedero y a la acción de los antibióticos, haciendo recurrente la infección (Kaur S y col., 2018).

La capacidad de *V. cholerae* de causar epidemias, está unida a su habilidad para sobrevivir por largos períodos de tiempo en los ambientes acuáticos. Se propone que la biopelícula es crucial para su supervivencia en estos ambientes, en los períodos entre las epidemias, así como para la transmisión de hospedero a hospedero durante ellas (Hsieh ML y col., 2018).

Estudios realizados en Alemania, Austria y Eslovaquia ponen de manifiesto que la presencia de biopelícula es más común en los serogrupos no epidémicos (Fong JC y col. 2010; Schirmeister F y col., 2014; Valáriková J y col., 2019).

Los resultados obtenidos en la presente investigación se correspondieron con los antes mencionados.

De igual forma, coincidieron con los resultados descritos por Rahman M y col., en Haití quienes obtienen un 46,5 % de los aislados positivos a la formación de biopelícula (Rahman M y col., 2014).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no se correspondieron con los encontrados en una investigación realizada en la India, donde al estudiar aislados clínicos de *V. cholerae* encuentran una positividad del 77,4 % (Balaji K y col., 2013).

En la tabla 7 se presenta la distribución de los aislados según la intensidad del color de la biopelícula formada en cada uno de los períodos estudiados. Se observó que, entre los aislados positivos predominaron los clasificados con 2 cruces en los 4 períodos estudiados. Los porcentajes de positividad se mostraron por encima de 43 %, seguidos por los catalogados con una cruz, cuyos valores superaron al 30 %. En los aislados clasificados con 3 y 4 cruces los valores de positividad fueron inferiores al 9 % y 5 %, respectivamente. En ninguna de las categorías de clasificación se encontró diferencias significativas entre los valores.

Tabla 7. Porcentaje de aislados de *Vibrio cholerae* con capacidad de formación de la biopelícula, según el sistema de clasificación de O'Toole, 2011.

Períodos	Débil (1+)	Moderado (2+)	Fuerte (3+)	Muy fuerte (4+)
1997-2001 (n= 121)	43 (35,5 %)	59 (48,8 %)	11 (9,1 %)	8 (6,6 %)
2002-2006 (n=107)	41 (38,3 %)	50 (46,7 %)	9 (8,4 %)	7 (6,5 %)
2007-2011 (n=32)	11 (34,3 %)	14 (43,7 %)	5 (15,6 %)	2 (6,2 %)
2012-2019 (n=54)	21 (38,9 %)	25 (46,3 %)	5 (9,2 %)	3 (5,5 %)
(n=273)*	109 (39,9 %)	125 (45,8 %)	25 (9,1 %)	14 (5,1 %)

Leyenda: * *V. cholerae* O1

Diferentes autores demuestran la importancia de la intensidad de la biopelícula relacionada con la patogenicidad en este microorganismo, ya que este hecho puede condicionar el pronóstico y el tratamiento de la infección causada por *V. cholerae* (Valáriková J y col., 2019).

En el estudio realizado por Schirmeister F y col., en Alemania y Austria, en aislados de *V. cholerae* procedentes de pacientes con EDA, evidencian la formación de biopelícula con predominio en la intensidad de dos cruces, o sea moderada (33,3 %) (Schirmeister F y col., 2014). Los resultados obtenidos en la presente investigación coincidieron con los mostrados por el autor antes mencionado.

Sin embargo, los resultados del presente estudio discreparon de los informados por Valáriková y col., en Eslovaquia, donde predomina la presencia de biopelícula en *V. cholerae* clasificado como muy fuerte (cuatro cruces) (Valáriková J y col., 2019). Resultados similares obtienen Balaji y col., en la India donde el 33.3 % de los aislados de *V. cholerae* se clasifican como fuertes formadores de biopelícula (Balaji K y col., 2013).

III.3. Resistencia a los antimicrobianos y su relación con la virulencia

En todos los períodos estudiados, se demostró la resistencia de *V. cholerae* frente a la ampicilina y al trimetoprim/sulfametoxazol, con los porcentajes más altos en los aislados correspondientes al período 2012-2019. Para la tetraciclina, el cloranfenicol y la ciprofloxacina, los valores de resistencia, fueron inferiores al 7 % (figura 5).

Entre los años 2012- 2019, el estudio de la resistencia a los antimicrobianos empleados en el tratamiento de primera línea (doxiciclina y azitromicina) mostró porcentajes por debajo del 3 %. Así mismo, para los aminoglucósidos (gentamicina y kanamicina) los valores de resistencia fueron inferiores al 5 % (figura 5).

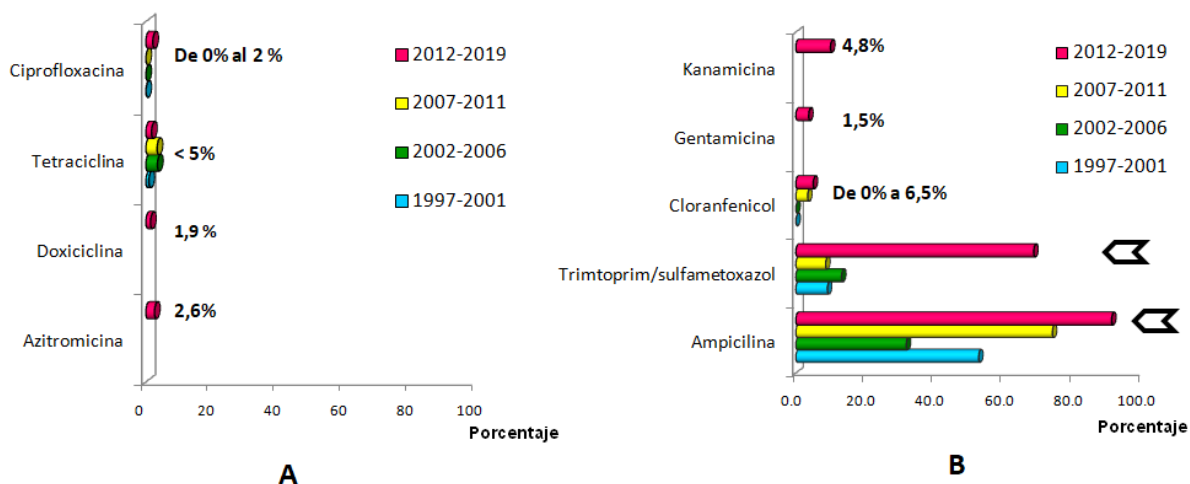


Figura 5. Resistencia de *Vibrio cholerae* a los antimicrobianos, según los períodos de tiempo. (Sección A: antimicrobianos de elección, sección B: antimicrobianos de la vigilancia). Cuba. 1997-2019.

El no cumplimiento de los regímenes de tratamiento antimicrobiano prescritos conduce con frecuencia a la aparición de resistencia antimicrobiana, lo que favorece la persistencia clínica de las cepas de *V. cholerae* y empeora el escenario para el tratamiento de la enfermedad. La resistencia a los antimicrobianos en los aislados de la séptima pandemia de *V. cholerae* biotipo El Tor, es una de las preocupaciones más serias en el manejo de la enfermedad en los países en vías de desarrollo (Weill FX y col., 2017). Está demostrado que los aislados de *V. cholerae* adquieren resistencia a casi todos los antimicrobianos después de su uso para el tratamiento del cólera. La OMS recomienda la doxiciclina y la ciprofloxacina como medicamentos de elección para el tratamiento de los casos graves de cólera. Además, la azitromicina se incluye en las pautas y en los regímenes de tratamiento para el manejo efectivo del cólera (Kumar P y col., 2020).

El incremento de la resistencia antimicrobiana frente a los antimicrobianos de uso común entre los aislados de *V. cholerae*, conlleva a serios problemas en el tratamiento de los casos de cólera en el mundo (Gupta P y col., 2016).

Según la literatura médica consultada, para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos no se tienen en cuenta los diferentes serogrupos de *V. cholerae*. Los puntos de corte según la CLSI se determinan para la especie, independientemente de los serogrupos, teniendo en cuenta que la resistencia intrínseca a los antibióticos está asociada a la adquisición de determinantes genéticos de resistencia y mutaciones dentro de la misma especie y entre los enteropatógenos en general (CLSI, 2010).

En el presente estudio los aislados presentaron un porcentaje de resistencia menor del 5 % frente a las tetraciclinas.

En Cuba, Majano en un estudio en aislados de *V. cholerae* no-O1/no-O139 evidencia un 5,5 % de resistencia a la tetraciclina (Majano A, 2009).

De igual forma, investigaciones realizadas en Hangzhou, provincia de China, detectan en aislados de *V. cholerae* O1 toxigénicos y no toxigénicos causantes de EDA entre los años 2001- 2012, valores de resistencia de 1 % frente a la tetraciclina (Wang H y col., 2020).

Sin embargo, cifras de resistencia a la tetraciclina en aislados de *V. cholerae* que superen a las de la presente investigación, se muestran en estudios realizados en Nigeria y Ghana, donde los valores de resistencia superan al 60 % (Marin M y col., 2013; Abana D y col., 2019). Por su parte Bakhshi y col., en Irán durante el año 2014 no detectan resistencia a la tetraciclina (Bakhshi B y col., 2014).

Otras investigaciones realizadas en *V. cholerae* evidencian valores de resistencia superiores a los encontrados en este trabajo: una realizada en Nueva Guinea (41,1 %) durante los años 2009 y 2011 y otra en la India (75 %) (Murhekar M y col., 2013; Raytekar NA y col., 2012).

La tetraciclina fármaco de poco uso por sus efectos adversos gastrointestinales y el depósito de este fármaco en los dientes y huesos, puede ser la causa del porcentaje de aislados resistentes frente a este antimicrobiano. Además, está documentado que la resistencia a esta familia de antibióticos está mediada por la presencia de plásmidos y del elemento conjugativo integrador SXT/391 (*Abana D y col., 2019*).

En Cuba, el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana en *V. cholerae* antes del evento epidemiológico de 2012, mostró un bajo porcentaje de la resistencia a la tetraciclina, lo que contribuyó al manejo terapéutico de esta entidad en el país.

El 1,4 % de los aislados resistentes a la doxiciclina en el período estudiado, fue similar al obtenido por *Abana y col.*, en 2019 en Ghana, quienes al investigar aislados de *V. cholerae* de origen clínico y ambiental, no evidencian resistencia a este antimicrobiano, al detectar un 15 % de sensibilidad reducida (*Abana D y col., 2019*). De igual forma, en Australia al estudiar serogrupos no epidémicos, señalan una baja resistencia frente a este antimicrobiano (*Lepuschitz S y col., 2019*).

Sin embargo, investigaciones realizadas en Mozambique en aislados circulantes y causantes de brotes de cólera entre 2012- 2015 detectan un 56 % de resistencia para la doxiciclina (*Dengo-Baloi LC y col., 2017*).

En relación con la susceptibilidad antimicrobiana frente a la azitromicina, la presente investigación identificó un 2,6 % de resistencia entre 2012-2019, etapa con una circulación de los serogrupos epidémicos y no epidémicos de *V. cholerae*. Según la literatura consultada, la resistencia para este antimicrobiano está mediada por la presencia de plásmidos adquiridos de manera horizontal o vertical (*Abana D y col., 2019*).

Esto puede relacionarse con la mayor actividad demostrada por la azitromicina contra *V. cholerae* (Calvo-Barbado DM y col., 2014), ya que su uso se recomienda para los pacientes en edades pediátricas o mujeres embarazadas como la primera opción terapéutica para el cólera en Cuba, así como para la quimioprofilaxis a los contactos.

Los resultados de la presente investigación no coincidieron con los obtenidos por Abana D y col., en 2019 en Ghana, quienes en aislados de origen clínico detectan valores de resistencia de un 42 % para este antimicrobiano (Abana D y col., 2019).

Tampoco coincidió con las investigaciones realizadas en Mozambique en aislados circulantes entre 2012 – 2015, causantes de brotes de cólera en dicho país, donde evidencian un 13 % de resistencia para la azitromicina (Dengo-Baloi LC y col., 2017).

Estudios previos a los años 2000- 2012, en Bangladesh, notifican un 5 % de resistencia a la azitromicina (Kumar S y col., 2013). Valores inferiores obtienen en 2012, en Sierra Leona, donde no detectan aislados resistentes (Mahmud ZH y col., 2014). En el presente trabajo, los resultados obtenidos no coincidieron con los antes expuestos.

En esta investigación, la resistencia frente a la ciprofloxacina, fue inferior al 3 %, resultado que pudo relacionarse con la posible ausencia de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (Ottaviani D y col., 2018), o con la política de antibióticos aplicados en Cuba para el tratamiento de las EDA causadas por *V. cholerae*, pues la ciprofloxacina se indica en aquellos pacientes adultos con la vía oral comprometida o presenten antecedentes de alergia al medicamento de elección.

Valores similares publican Cabrera y col., en 2008, quienes al no identificar aislados resistentes frente a este antimicrobiano en Cuba (Cabrera LE., 2008).

De igual forma, investigaciones realizadas en Ghana en el año 2018, no detectan aislados de *V. cholerae* resistente a la ciprofloxacina (Feglo PK y Sewurah M, 2018).

Resultados similares notifican en aislados de origen clínico de *V. cholerae* en Italia durante 2018, donde menos del 10 % de los mismos son resistentes a este antimicrobiano (Ottaviani D y col., 2018).

Así mismo, investigaciones realizadas en Mozambique durante el año 2017 en aislados de *V. cholerae* circulantes entre 2012- 2015, no evidencian resistencia para este antimicrobiano (Dengo-Baloi LC y col., 2017).

Los valores de resistencia a la ciprofloxacina obtenidos en este trabajo, no se correspondieron con los identificados en Ghana durante los años 2011, 2012 y 2014, donde no evidencian resistencia a este antimicrobiano en 2011. Sin embargo, en los dos años siguientes que incluye este estudio, el incremento de aislados resistentes corresponden al 91 % y 98 %, respectivamente (Eibach D y col., 2016).

Entre los antimicrobianos estudiados en esta investigación, el mayor porcentaje de resistencia para *V. cholerae* se observó frente a la ampicilina y al trimetoprim/sulfametoxazol.

Los valores de resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol se pueden atribuir a la posibilidad que tiene *V. cholerae* de portar el elemento SXT, perteneciente a una clase de ICE, descrito por vez primera por Waldor y col., en 1996, como un elemento que le confiere la habilidad de adquirir genes de resistencia provenientes de enterobacterias resistentes al sulfametoxazol, el trimetoprim y la estreptomina. En la actualidad, muchos aislados de los serogrupos O1 y O139 del mundo adquieren el elemento SXT a través de la diseminación natural (Sarkar A y col., 2019; Kumar P y col., 2020).

En relación con la ampicilina, el resultado obtenido pudo relacionarse con la producción de BLEE. La presencia de esta enzima se demuestra en el estudio de Gosh y col., donde en el 92,8 % de los aislados evidencian la presencia de esta enzima. Así mismo, al igual que otros autores, sugieren la presencia de diferentes mecanismos de resistencia tales como las mutaciones cromosomales y las bombas de eflujo (Ghosh A y col., 2011, Raipara N y col., 2018).

En Cuba, resultados similares evidencian Majano y Cabrera, en aislados de *V. cholerae*, al notificar el 55,5 % y 57 % de resistencia para la ampicilina, y 44,9 % y 41 % para el trimetoprim/sulfametoxazol, respectivamente (Majano A, 2009; Cabrera LE, 2008).

Investigaciones en aislados de *V. cholerae* causantes de brotes en 2016 en Solapur, India, manifiestan la resistencia de este microorganismo frente al trimetoprim/sulfametoxazol. Los autores confirman la presencia del integrón SXT que porta genes capaces de conferir resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol y al cloranfenicol (Kumar P y col., 2020).

De igual forma, Sarkar y cols., en 2019, en Kolkata, la India al estudiar aislados de *V. cholerae* O1 circulantes en el período 2008- 2015, evidencian que la resistencia a la ampicilina aumenta hasta un 94 %, en el período 2008- 2010, pero entre los años 2011- 2015 disminuye hasta un 0 % de resistencia. Sin embargo, en el trimetoprim/sulfametoxazol observan una tendencia a la disminución de la resistencia hasta el año 2011 desde un 92 % hasta 31 %, pero entre 2012- 2015 aumenta de nuevo por encima del 90 % (Sarkar A., y col 2019).

Valores inferiores a los obtenidos en el presente trabajo, publican investigadores de Ghana en 2019, cuando al estudiar aislados clínicos y ambientales, y demuestran un 40 % de resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol (Abana D y col., 2019).

Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos en el presente trabajo, coincidieron con los de Nepal, donde en 31 aislados de *V. cholerae* O1, detectan un 100 % de cepas resistentes a la ampicilina y al trimetoprim/sulfametoxazol (*Gupta P y col., 2016*).

Estudios realizados en la India demuestran un 100 % de aislados resistentes al trimetoprim/sulfametoxazol, cifra idéntica a la obtenida en el presente estudio; sin embargo, los valores de susceptibilidad observados en la ampicilina son opuestos, pues no detectan resistencia a dicho antibiótico (*Jain M y col., 2013*).

Investigaciones realizadas por Dutta y col., en la India, notifican un 55,5 % de aislados resistentes a la ampicilina (*Dutta D y col., 2013*). Estas cifras son inferiores a las obtenidas en el presente estudio. Sin embargo, Talkington y col., en Haití, no detectan resistencia a la ampicilina (*Talkington D y col., 2011*), resultado diferente al identificado en este estudio.

La sensibilidad al cloranfenicol en este estudio fue de un 3,4 % en el período 2006-2011, pero se incrementó hasta el 6,5 % en la etapa 2012-2019.

El comportamiento de la resistencia frente al cloranfenicol detectado en el presente estudio, puede explicarse por su poco uso en Cuba, asociado a serios efectos adversos hematológicos, por lo tanto, lo reservan para el tratamiento de infecciones severas que amenazan la vida, siempre y cuando no existan otras alternativas de tratamiento eficaces y menos tóxicas (*Calvo-Barbado DM y col., 2014*). A pesar del poco uso del cloranfenicol en Cuba, el ligero incremento observado en la resistencia, pudo relacionarse con la presencia en dichos aislados del elemento conjugativo integrador SXT/391 (*Abana D y col., 2019*).

Este resultado coincidió con los publicados en Italia en el año 2018, donde demuestran que menos del 10 % de los aislados de *V. cholerae* estudiados muestran resistencia a este antimicrobiano (*Ottaviani D y col., 2018*).

Así mismo, Mahmud *y col.*, durante el año 2014 en Sierra Leona no informan resistencia al cloranfenicol (*Mahmud ZH y col., 2014*). Por su parte *Murhekar y col.*, en Nueva Guinea, durante el período 2009–2011 detectan un 4,7 % de resistencia (*Murhekar M y col., 2013*).

Sin embargo, los resultados de la presente tesis no se correspondieron con los demostrados en Ghana: donde en el año 2019, detectan un 52 % de resistencia en aislados de muestras clínicas, y en una segunda investigación realizada en 2018, identifican un 35 % de *V. cholerae* resistentes (*Abana D y col., 2019; Feglo D y Sewurah M, 2018*).

Tampoco coincidió con los resultados publicados por Dengo-Baloi LC *y col.*, quienes al estudiar en Mozambique aislados de *V. cholerae* identificados entre 2012- 2015, causantes de brotes de cólera en dicho país, obtienen un 89 % de resistencia para el cloranfenicol (*Dengo-Baloi LC y col., 2017*).

De igual forma no hubo correspondencia con los resultados señalados por Ismail *y col.*, en Sudáfrica durante los años 2008-2009 y Raytekar *y col.*, en la India entre 2009-2012, donde evidencian 41,6 % y 71,4 % de aislamientos resistentes, respectivamente (*Ismail H y col., 2013; Raytekar NA y col., 2012*).

Frente a los aminoglucósidos el porcentaje de resistencia obtenido fue inferior al 5 %. Resultados similares muestran Válariková J *y col.*, 2019, quienes no obtienen aislados resistentes a la gentamicina (*Válariková J y col., 2019*).

Hallazgos inferiores publican Raytekar *y col.*, en la India, al mostrar valores de 35,7 %, incluso los informados por Bakhshi *y col.*, en Irán, con un 8,3 % de sensibilidad

en los aislados de *V. cholerae* O1/no-O139 (Raytekar NA y col., 2012; Bakhshi B y col., 2014).

Los aminoglucósidos son antimicrobianos de uso habitual y eficaz en la práctica clínica. A pesar de existir diversos mecanismos de resistencia como la presencia de plásmidos, aún se consideran activos frente a una gran parte de los bacilos gramnegativos aerobios. La amikacina tiende a ser efectiva contra organismos resistentes (Calvo-Barbado DM y col., 2014), pero es potencialmente nefrotóxica. Por lo que, en las enfermedades donde es frecuente el deterioro de la función renal, los riesgos superan los posibles beneficios de su empleo. Aun así, se mantiene como terapia alternativa, por lo que se incluyó en esta investigación, quedando sujeto a la valoración del médico su empleo en las situaciones excepcionales.

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos persiste como un serio y creciente problema de salud en el mundo, en especial para los países en vías de desarrollo, donde muchos factores contribuyen a originar y extender esta situación. La adquisición de genes de resistencia en aislados de *V. cholerae* constituye un importante fenómeno desde el punto de vista clínico, ya que se incrementan los enfermos con fallo terapéutico y por ende, la estancia hospitalaria (Feglo D y Sewarah M, 2018).

En relación con la multiresistencia, en los períodos desde 1997 hasta 2011, no se demostró la circulación de aislados resistentes a tres o más familias de antimicrobianos. Sin embargo, entre 2012- 2019, del total de 580 aislados investigados, 58 (10 %) fueron MR.

La figura 6 muestra la distribución porcentual de los aislados MR en el período 2012-2019. Se evidenció que, luego de la ocurrencia de los eventos epidemiológicos de

cólera, se mantuvo la circulación de *V. cholerae* MR en todos los años, tanto para los serogrupos O1 como los no-O1/no-O139, excepto en el año 2017.

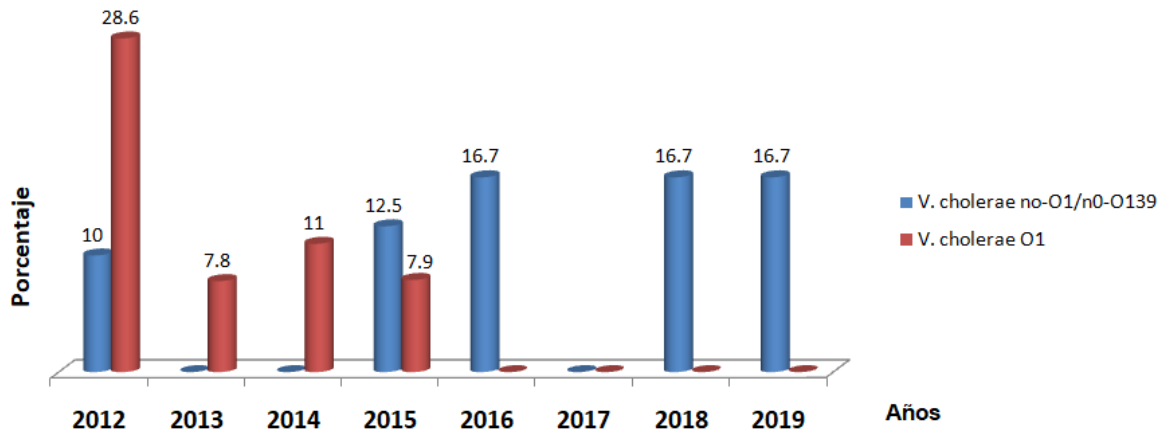


Figura 6. Distribución porcentual de los aislados de *Vibrio cholerae* multirresistentes, según períodos de tiempo. Cuba. 2012-2019

Está demostrada la emergencia de aislados de esta especie con fenotipos de resistencia que adquieren el elemento SXT. Este es un plásmido móvil que incluye genes que aportan resistencia a varias familias de antimicrobianos, y hacen MR a los aislados que lo portan (Wang R y col., 2016; Abana D y col., 2019).

Los patrones de multirresistencia en *V. cholerae* no-O1/no-O139 están menos estudiados que los serogrupos epidémicos (Baron S y col., 2017). Investigaciones realizadas en países del continente asiático, evidencian que la resistencia de estos serogrupos generalmente se asocia a los brotes de cólera, demostrándose resistencia a varios antimicrobianos y a la circulación de aislados MR (Válariková J y col., 2019).

Cuando se hace un análisis de los antibiogramas de *V. cholerae* O1 realizados en varias regiones del mundo entre los años 1938- 1993, se observa resistencia que abarca desde 1 hasta 3 antimicrobianos, mientras que, los aislados en el período

1994 - 2005 poseen entre 3 a 8 marcadores de resistencia, incluyendo a las fluoroquinolonas (*Ghosh A y col., 2011*).

Como se puede apreciar, en esta investigación se demostró que a partir del 2012, comenzaron a circular aislados de *V. cholerae* de los serogrupos O1 y no-O1/no-O139 MR. Este trabajo es el primero en notificar la circulación de aislados MR de este patógeno en Cuba.

Es probable que estos resultados se relacionen con la política de antibióticos establecida en cada país, por lo que en cada región debe predominar el patrón de resistencia relacionado con los antibióticos más utilizados. El hecho de que, en 2017 no se identificaron aislados MR pudo relacionarse con el número pequeño de aislados confirmados en ese año. El porcentaje de los aislados MR detectados en este trabajo, constituye un llamado de alerta y ratifica la necesidad de mantener la vigilancia de la susceptibilidad de los aislados de *V. cholerae* circulantes en el país.

En la presente investigación se obtuvieron 21 patrones de multirresistencia en los aislados de *V. cholerae* estudiados. Se evidenció que los patrones AMP/SXT/K y AMP/C/SXT/DXT/TE coincidieron en ambos serogrupos. En las tablas 8 y 9 se expone la distribución de los aislados epidémicos y no epidémicos, respectivamente, según los patrones de multirresistencia. En los mismos se observan patrones que incluyen a la doxiciclina, la azitromicina y la ciprofloxacina, antimicrobianos hoy integrantes de la primera y segunda línea de tratamiento del cólera.

Tabla 8. Distribución porcentual de los patrones de multirresistencia en los aislados de *Vibrio cholerae* O1. Cuba. 2012-2016

Patrones de multirresistencia		
Total de aislados 52 (10,4 %)	No.	%
AMP/SXT/K	8	15,4
AMP/SXT/TE	6	11,5
AMP/SXT/AZM	5	9,6
AMP/C/SXT/DXT	5	9,6
AMP/SXT/DXT/TE/K	4	7,7
AMP/SXT/CIP/K	4	7,7
AMP/C/SXT/CIP/TE	4	7,7
AMP/SXT/CN	3	5,8
AMP/C/SXT/DXT/TE	2	3,8
AMP/C/DXT/AZM	2	3,8
AMP/C/SXT/DXT/TE/AZM	2	3,8
AMP/C/SXT/DXT/TE/K	1	1,9
AMP/SXT/DXT/AZM/TE/K	1	1,9
AMP/SXT/DXT/CIP/TE	1	1,9
AMP/SXT/TE/K	1	1,9
AMP/SXT/DXT/CIP/TE/K	1	1,9
AMP/C/SXT/CIP/TE/K	1	1,9
AMP/C/DXT/AZM/K	1	1,9

Leyenda: AMP: ampicilina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, C: cloranfenicol, TE: tetraciclina, DXT: doxiciclina, AZM: azitromicina, CIP: ciprofloxacina, CN: gentamicina, K: kanamicina

Tabla 9. Distribución porcentual de los patrones de multirresistencia en los aislados de *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139. Cuba. 2012-2019

Patrones de multirresistencia		
Total de aislados 6 (7,5 %)	No.	%
AMP/SXT/C	2	33,3
AMP/C/TE	1	16,6
AMP/SXT/K	1	16,6
AMP/SXT/CIP	1	16,6
AMP/C/SXT/DXT/TE	1	16,6

Leyenda: AMP: ampicilina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, C: cloranfenicol, TE: tetraciclina, DXT: doxiciclina, CIP: ciprofloxacina, K: kanamicina

Estudios realizados en Australia, en aislados ambientales y clínicos de *V. cholerae* no-O1/no-O139, evidencian que no hay diferencias en la multirresistencia entre ambos tipos de aislados, y demuestran que el 33,3 % de los mismos son resistentes a tres o más familias de antimicrobianos, y los patrones predominantes se corresponden con sulfonamidas-ampicilina-estreptomicina-amoxicilina ácido clavulánico y sulfonamida-ampicilina-estreptomicina (*Lepuschitz S y col., 2019*).

De igual forma, Ghana en 2018, al estudiar aislados de *V. cholerae* causantes de brotes de cólera evidencian varios patrones de multirresistencia, siendo los más frecuentes: ampicilina-trimetoprim/sulfametoxazol-ceftriaxona, ampicilina-trimetoprim/sulfametoxazol-cloranfenicol, ampicilina-trimetoprim/sulfametoxazol-cefuroxima-ceftriaxona (*Feglo D y Sewurah M, 2018*).

Kihla y col., en Camerún, publican que el patrón ampicilina-trimetoprim/sulfametoxazol-amoxicilina-tetraciclina es uno de los más frecuentes (*Kihla J y col., 2013*).

Kumar y col., en la India, en un estudio que abarca los años 2000-2012, notifican una incidencia de aislados MR en Matlab y Dhaka entre el 15 y 18 %, respectivamente (*Kumar S y col., 2013*).

Los estudios anteriores difieren de este último, por presentar cifras superiores a las detectadas en el presente trabajo. El número de aislados MR encontrado puede relacionarse con la presencia de integrones en los aislados, ya que los mismos son la principal causa de multirresistencia entre los enteropatógenos. Tal y como señalan Bakhshi y col., quienes sugieren la presencia de un integrón clase 1 en los enteropatógenos (*Bakhshi B y col., 2014*).

De manera general, aunque los patrones de multirresistencia de la presente investigación no son idénticos a los publicados en el mundo, sí se observó que la tetraciclina, la ampicilina y el trimetoprim/sulfametoxazol están presentes en los patrones de multirresistencia detectados en diferentes áreas geográficas. Lo anterior lo demuestran en varias investigaciones (*Bhattacharya D y col., 2012; Gupta P y col., 2018*).

La figura 7 muestra la distribución según las regiones geográficas de los aislados MR en el período 2012-2019. Se evidenció que la circulación de estos aislados comenzó por la región oriental y luego se extendió a la región central y occidental de Cuba.

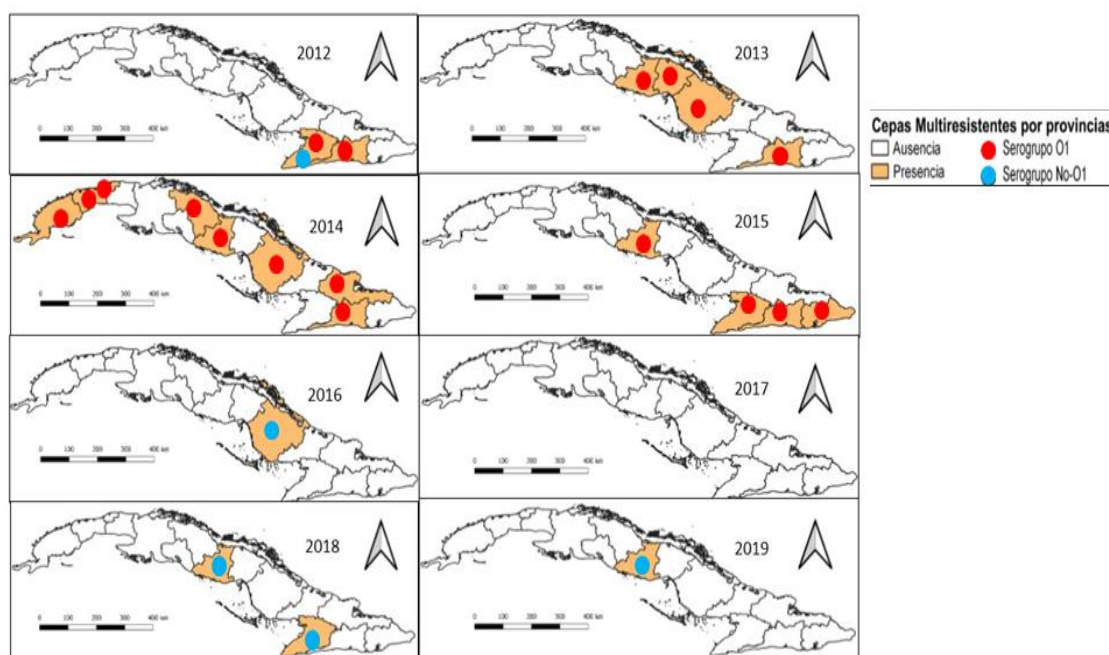


Figura 7. Distribución de los aislados de *Vibrio cholerae* multirresistentes, según las regiones geográficas. Cuba. 2012-2019

La detección de los aislados MR según las regiones geográficas se relacionó con la aparición de los brotes de cólera en el 2012, los que comenzaron por la región oriental. Se conoce que, dentro de las medidas aplicadas en el control del cólera está la aplicación de la terapia con antimicrobianos en los pacientes y contactos, lo que ejerce una presión selectiva sobre los aislados circulantes durante el brote, favoreciendo así la aparición de la multirresistencia.

Estudios recientes evidencian que en los países no endémicos de cólera, la presencia de *V. cholerae* no-O1/no-O139 juega un rol en la diseminación de genes de resistencia, por lo que debe mantenerse una estrecha vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en estos serogrupos (*Lepuschitz S y col., 2019*).

Según la literatura internacional consultada, *V. cholerae* tiene una evolución constante relacionada con la virulencia y los patrones de resistencia. Esta evolución se reconoce como una emergencia debido a la aparición de nuevos aislados con alta

patogenicidad y multirresistencia capaces de causar brotes y epidemias en diferentes regiones del mundo (Kumar P y col., 2020).

III. 3.1 Relación entre la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia

La tabla 10 muestra la relación entre la presencia de las enzimas extracelulares, la formación de biopelícula y el serogrupo en los aislados de *V. cholerae* y la multirresistencia (análisis bivariado). En los aislados pertenecientes al serogrupo O1, donde se identificó la presencia de gelatinasa y lecitinasa fue más probable la presencia de multirresistencia ($p < 0,05$). Es decir, en los aislados donde se identificaron la gelatinasa (OR: 2,7; $p = 0,013$) y la lecitinasa (OR: 2,3; $p = 0,007$) el riesgo de multirresistencia fue dos veces más probable. En cuanto a los serogrupos, se evidenció que en los aislados identificados como *V. cholerae* O1, la multirresistencia era 13 veces más probable. Sin embargo, la presencia de la biopelícula mostró un valor de OR menor que uno (OR: 0,49; $p = 0,016$), lo que demostró que su presencia constituye un factor protector para la multirresistencia.

Tabla 10. Relación entre los aislados multirresistentes y el fenotipo de virulencia en *Vibrio cholerae* (análisis bivariado). Cuba 1997-2019

Variables	Total (n=1 060)	Aislados multirresistentes (n=58)	Valor de p	OR	(IC-95 %)	
Serogrupo O1	500	53	0,000	13,161	5,217	33,202
Dnasa	741	46	0,108	0,591	0,309	1,131
Elastasa	511	28	0,991	0,997	0,587	1,694
Lecitinasa	925	44	0,007	2,317	1,233	4,353
Gelatinasa	988	49	0,013*	2,738	1,286	5,826
Hemolisis	768	42	0,995	1,002	0,554	1,812
Biopelícula	587	41	0,016	0,496	0,278	0,886

Leyenda: p .prueba de X^2 , *: prueba exacta de Fisher. OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza

En la tabla 11 se muestra la relación entre las variables investigadas, según el análisis multivariado. Al analizar la influencia del conjunto de todas las variables, se encontró que entre los factores de virulencia extracelulares estudiados, la gelatinasa dejó de influir en la multirresistencia y la presencia de lecitinasa (OR: 5,8; $p= 0,000$) persistió como un factor de riesgo. De igual forma, la identificación en serogrupo confirmó que en *V. cholerae* O1 la multirresistencia fue más probable (OR: 25,5; $p= 0,000$). No obstante, la formación de biopelícula se evidenció como un factor protector (OR: 0,469; $p= 0,016$).

Tabla 11. Relación entre los aislados multirresistentes y el fenotipo de virulencia en *Vibrio cholerae* (análisis multivariado). Cuba 1997-2019

Variables	Valor de p	OR	IC- 95 %	
Serogrupo	0,000	25,586	9,115	71,822
Lecitinasa	0,000	5,830	2,344	14,499
Gelatinasa	0,134	2,260	0,777	6,569
Biopelícula	0,016	0,469	0,254	0,866

Legenda: p .prueba de X^2 , OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza

Según la literatura internacional, la asociación existente entre la virulencia y la resistencia antimicrobiana puede ser positiva o negativa, con un balance final determinado por la habilidad de la bacteria para sobrevivir o adaptarse a nichos ecológicos específicos. Los estudios indican que el aumento de la resistencia en la mayoría de los casos, se asocia directa o indirectamente con la disminución de la virulencia (Beceiro A y col., 2013).

Los resultados de la presente investigación acerca de la relación entre los factores de virulencia y la multirresistencia en los aislados estudiados pueden relacionarse con la presencia de mecanismos de resistencia, como las bombas de eflujo, la

adquisición de plásmidos y de elementos integradores y conjugativos, involucrados en ambos procesos. A continuación, se presentan diferentes estudios en bacilos gramnegativos que evidencian la transferencia de genes involucrados con la virulencia y la resistencia a una o varias familias de antimicrobianos.

Aunque, aún se desconoce la causa exacta de esta asociación, algunos autores plantean que la presencia de serotipos menos patógenos, por mantener la colonización durante un tiempo más prolongado, están más expuestos a múltiples antibióticos. Este comportamiento, puede ser la causa de una relación inversa entre el aumento de la resistencia y la disminución de la virulencia (Díaz L y col., 2009).

Existen estudios que evidencian una asociación entre la virulencia y la resistencia a los antimicrobianos en los bacilos gramnegativos. Por ejemplo, en aislados de *E. coli* productoras de BLEE como mecanismo de resistencia frente a betalactámicos, está demostrada la expresión de la toxina termoestable, y se sugiere que los genes que producen estas enzimas y los relacionados con la virulencia pueden coexistir en clones de este patógeno como resultado de un proceso de coevolución (Peirano G y col., 2011). Sin embargo, en aislados de *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium productora de AmpC se observa una reducción del crecimiento y la invasividad (Morosini MI y col., 2000).

Investigaciones relacionadas con este tema realizadas en *E. coli*, sugieren que la producción de porinas como la OmpC le confiere resistencia antimicrobiana a estos aislados, mientras que a su vez juega un papel importante en la adhesión, invasión y colonización intestinal (Liu YF y col., 2012). Otros estudios sugieren que la deficiencia de porinas en *Klebsiella pneumoniae* incrementa la resistencia antimicrobiana, mientras que de manera simultánea disminuye la virulencia.

Similares resultados se informan para *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* spp., y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae (Beceiro A y col., 2013).

Las bombas de expulsión y los determinantes de virulencia se estudian en especies de importancia clínica entre las que se encuentra *V. cholerae*. Se conoce que este microorganismo utiliza bombas de expulsión para exportar un amplio rango de antibióticos, detergentes y colorantes que no tienen relación química ni estructural. Bina y col., en los Estados Unidos refieren que los aislados que presentan bombas de expulsión RND (resistencia-nodulación-división celular) muestran una disminución en la producción de la TC y Tcp en comparación con aislados salvajes, y sugieren que este fenómeno puede estar dado por la reducción de la transcripción de tcpP y toxT (Bina XR y col., 2008).

Los mecanismos de resistencia que implican mutaciones de genes tales como *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, que confieren resistencia a las fluoroquinolonas se asocian a un incremento de la virulencia en aislados de *P. aeruginosa* que poseen los genes *exoU* y *exoS* que codifican una enzima con efecto citolítico (Agnello M y col., 2012).

Los plásmidos son elementos extracromosómicos y autorreplicantes, no esenciales para las bacterias, pero a menudo transportan y diseminan genes que confieren a las bacterias ciertas características como la resistencia, virulencia y persistencia en condiciones extremas. En particular, los plásmidos conjugativos juegan un papel importante en la evolución de las bacterias patógenas porque se transmiten fácilmente por transferencia horizontal tanto entre las especies como dentro de ellas. La distribución de plásmidos entre patógenos humanos puede convertirse en un problema de salud. Las bacterias que adquieren plásmidos que portan genes de virulencia y de resistencia, se adaptan fácilmente al ambiente y estos son muy

favorables para el intercambio de material genético de manera horizontal y vertical (*Verma J y col., 2019*).

El grupo principal de incompatibilidad (Inc) involucrado en la transferencia de genes de resistencia y virulencia es el grupo IncF; la transmisión de plásmidos IncF es un claro ejemplo de cómo la virulencia y la resistencia pueden aumentar mediante la coselección, probablemente debido a la presión selectiva ejercida por los antibióticos. Esto conduce con frecuencia a la aparición de aislados o brotes de clones virulentos y resistentes a múltiples fármacos, evidenciado en los aislados de *E. coli* y *Salmonella entérica* (*Beceiro A y col., 2013*).

Los ICE son elementos genéticos móviles autotransmisibles que ayudan en la dispersión horizontal de genes como los plásmidos y los cromosomas. Con la introducción de nuevas metodologías, como la metagenómica y la secuenciación masiva paralela, se demuestra que los ICE pueden tener un impacto aún más significativo que los plásmidos en la transferencia horizontal de genes (*Weill FX y col., 2017*). Es probable que los elementos genéticos como los integrones y los transposones pueden capturar genes de virulencia y dispersarlos junto con genes de resistencia, aunque no existe suficiente información sobre la relación entre la virulencia y los factores de resistencia en el mismo ICE (*Beceiro A y col., 2013*).

Esto puede sugerir la dificultad de coselección de ambos tipos de factores por los ICE. Sin embargo, puede haber algún sesgo, ya que muchos estudios buscan la causa de la diseminación de la resistencia a los antibióticos en poblaciones bacterianas al ubicar y secuenciar solo a los marcadores de resistencia y las ubicaciones genéticas vecinas. Además, los transposones y los integrones que portan genes de virulencia están menos extendidos que los que llevan genes de resistencia o vías catabólicas; de hecho, los factores de virulencia se relacionan con

estructuras de tipo profágico, los cuales tienen menos probabilidades de portar genes de resistencia. La principal explicación para esto es la diferencia en la escala de tiempo evolutiva de virulencia y resistencia para los hospedadores y los antibióticos, respectivamente. Los patógenos actuales son el producto de un largo período de evolución junto con el hospedero y un período corto, pero intenso, de evolución, de solo unas pocas décadas, que involucra la presión selectiva de los antibióticos. Mientras que los fagos tienen un rango de hospederos estrecho, los transposones pueden insertarse, con facilidad en un amplio rango de plásmidos, proporcionando funciones a un gran número de hospederos. Esto facilita la propagación, en este caso, de los factores de resistencia a los antibióticos (*Rowe-Magnus AD y col., 2002*).

Sin embargo, hay algunos ejemplos claros en los que la coselección de resistencia y virulencia se produce a través de ICE. En *V. cholerae*, la enzima bis- (3', 5') - GMP dimérico cíclico aumenta la formación de biopelículas y disminuye la virulencia y la motilidad, por lo que se considera un factor importante para la persistencia en el medio ambiente, y está regulada por las diguanilatociclasas, las que se codifican, integrando elementos conjugativos de la familia SXT/R391. Por lo tanto, la adquisición de estos ICE puede mejorar la supervivencia de esta especie en los ambientes acuáticos. Los ICE SXT/R391 se involucran en la transmisión de resistencia a múltiples medicamentos en diferentes especies, incluidas las especies del género *Vibrio* (*Bordeleau E y col., 2010*).

De hecho, el análisis de algunos aislados de brotes de cólera revelan la participación de genes similares a SXT / R391 en la transmisión de virulencia y resistencia (*Bordeleau E y col., 2010*). Además, se documenta la plasticidad *in vitro* y la

capacidad del ICE relacionado con SXT de *V. cholerae* para transferir genes de virulencia a otras especies como *E. coli* (Escudero JA y Mazel D, 2017).

Los mecanismos bacterianos implicados en la patogenicidad y virulencia son en la actualidad objeto de estudios en el ámbito de la microbiología médica infecciosa. Sin embargo, estos mecanismos experimentan un largo proceso evolutivo dependiente de la relación hospedero-patógeno. Muchos de estos cambios se deben a la presión de selección provocada por la introducción de los antimicrobianos en la medicina (Cárdenas-Perea y col., 2014).

Esta presión obliga a los microorganismos a su adaptación a las condiciones cambiantes, con la adquisición o el desarrollo de nuevos mecanismos de patogenicidad y resistencia de manera continua, los que provocan cambios importantes en las funciones celulares, influyendo al final sobre la virulencia (Cárdenas-Perea y col., 2014).

En relación con la formación de la biopelícula, en el presente estudio se evidenció que este atributo de virulencia constituyó un factor protector para las células bacterianas ubicadas dentro de la biopelícula. Gupta P y col., en 2018, evidencian en aislados de *V. cholerae* que, las células dentro de la biopelícula son más resistentes a la acción de los antimicrobianos tanto para *V. cholerae* O1, biotipo El Tor como para *V. cholerae* O139, lo cual parece un comportamiento universal para los aislados de esta especie. Cuando se habla de `resistencia` en esta ocasión, no se refiere a los mecanismos genéticos descritos para este patógeno, sino implica que los antimicrobianos no pueden penetrar y ejercer su acción en las células localizadas dentro de la biopelícula (Gupta P y col., 2018). Esto se debe a que la barrera que constituye la matriz de exopolisacáridos es más resistente a la penetración de los antimicrobianos y a la existencia de microambientes que

antagonizan con la acción del antimicrobiano. Además, el crecimiento lento de las bacterias dentro de la biopelícula debido a la limitación de nutrientes y la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria, favorece la aparición de un fenotipo específico de biopelícula que combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (Díaz-Pascual F et al., 2020).

El rol protector de la biopelícula en los aislados de *V. cholerae* se demuestra al exponer el estrés inducido por la presencia del antimicrobiano a las células que forman la biopelícula. Esta investigación no evidenció cambios en la morfología de las mismas. Este comportamiento pudo relacionarse con la heterogeneidad de los residentes de la biopelícula que le confieren esta capacidad protectora (Gupta P y col., 2018).

III.4 Discusión general

Las EDA causadas por *V. cholerae* constituyen un problema de salud pública en el mundo (D'Mello-Guyett L y col., 2020). De ahí, que se requiera tomar acciones en la vigilancia microbiológica y epidemiológica para identificar las situaciones de riesgo, con el objetivo de controlar la entidad causante de la infección gastrointestinal.

En la presente investigación se realizó un análisis integral de la hipótesis de la misma, demostrándose la presencia de *V. cholerae* en las diferentes regiones del país, con predominio en la región oriental, y la mayor cantidad de aislados procedentes de brotes en la región occidental. Se evidenció además, el incremento de los factores de virulencia estudiados durante el período de circulación los serogrupos epidémicos y los no epidémicos, y cambios en el comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos en el último período de estudio.

Relacionados con los estudios de heterogeneidad espacial, se confirmaron los resultados de los serogrupos epidémicos y no epidémicos de *V. cholerae* que

circularon durante 23 años y se conoció su distribución según las regiones geográficas y los períodos de tiempo analizados. Esta herramienta aportó elementos relacionados con la existencia de un nicho ecológico en la región oriental, favoreció la persistencia de las diarreas provocadas por este enteropatógeno en dicho territorio. En el caso de los aislados a partir de brotes, la circulación pudo relacionarse con las condiciones desfavorables del abasto de agua y de la eliminación de excretas en los municipios que conforman la región occidental.

Según la bibliografía consultada, existen evidencias que avalan el crecimiento de *V. cholerae* en los ecosistemas acuáticos y su relación con los cambios en los patrones climáticos, hecho que contribuye a la ocurrencia de brotes y epidemias (*Chowdhury FR y col., 2017*). En el país no se ha investigado el efecto de la variabilidad climática sobre el comportamiento espacio-temporal en este enteropatógeno, por lo que se propone incluir esta temática en estudios posteriores.

De manera evidente, estos resultados ratifican la problemática en Cuba de las infecciones gastrointestinales por *V. cholerae*, y sugiere utilizar los resultados de la investigación para el diseño de las estrategias focalizadas, atendiendo al patrón de distribución temporo-espacial. Este enfoque es además significativo y de vital importancia en el manejo de las diarreas, pues brinda al Sistema Nacional de Salud y al Programa de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una información útil y pertinente referente a la programación de hacia dónde deben dirigirse los recursos humanos y materiales necesarios para el control de las EDA.

En paralelo, es importante conocer el papel patogénico de los aislados que circulan en el país. En relación con los serotipos epidémicos se reconoció la producción de toxinas (TC y la T_{cp}) como las responsables del cuadro típico del cólera (*Froelich BA y Daines DA, 2020*). Sin embargo, existen pocas investigaciones que demuestren la

presencia de enzimas extracelulares en *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* no-O1/no-O139. La demostración en el último período, del incremento en la variación porcentual para todos los factores de virulencia enzimáticos en los serogrupos no-O1/no-O139, alerta sobre la diseminación de cepas con elevado potencial para generar brotes epidémicos. La presente investigación, sienta las bases para la realización de estudios futuros encaminados a demostrar la presencia de otros factores de virulencia y determinar sus mecanismos de patogenicidad.

La capacidad de formación de biopelícula por *V. cholerae* se relaciona a la aparición de epidemias, ya que este microorganismo puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo en los ambientes acuáticos (Maestre-Reyna M y col., 2021). Se reconoce que las células dentro de la biopelícula requieren de una menor dosis infectante, crecen más rápido, logran un mayor nivel de colonización y tienen una dinámica temporal de infección diferente (Gallego-Hernández AL et al., 2020). Además, son más resistentes a la acción de los antimicrobianos (Díaz-Pascual F y col., 2020). Esta investigación demostró, en las cuatro etapas estudiadas, que más del 54 % de los aislados tenía la capacidad de formación de biopelícula, aunque el mayor valor correspondió al período transcurrido entre los años 2012- 2019. Se evidenció además, que predominaron los aislados considerados con capacidad moderada de formación de biopelícula según la intensidad del color, cuyo aspecto se relaciona con la patogenicidad y la resistencia a los antimicrobianos (Valáriková J y col., 2019).

en la actualidad se conoce bien la problemática de la resistencia a los antimicrobianos, evidenciada en la especie (Rabaan AA y col., 2019). *V. cholerae* demuestra un progreso constante relacionado con los patrones de resistencia. Esto se reconoce como una emergencia debido a la aparición de aislados MR capaces de

causar brotes y epidemias en diferentes regiones del mundo (*Kumar P y col., 2020*). Las cifras elevadas de resistencia a los antimicrobianos aplicados en el tratamiento de las diarreas por *V. cholerae*, constituye una alerta para las autoridades de salud y ratifica la necesidad del uso controlado de los antimicrobianos en la prevención y el control de infecciones causadas por este microorganismo (*Rabaan AA y col., 2019*).

El presente estudio recoge los resultados de las primeras investigaciones encaminadas a conocer el comportamiento de la resistencia en los aislados identificados desde 1997 hasta 2019. El incremento de los porcentajes de resistencia y la identificación de aislados multirresistentes en el período epidémico, constituye un llamado de atención para el Sistema de Salud de Cuba y la focalización de acciones para su control.

En el estudio se constata el potencial patogénico de los aislados en Cuba, evidenciado a partir de la expresión fenotípica de los factores de virulencia enzimáticos y su asociación con la multirresistencia. Sin embargo, la formación de la biopelícula desempeña un papel protector para la aparición de la multirresistencia, aspecto recién abordado en la literatura internacional (*Gallego-Hernández AL y col., 2020*).

Estudios venideros mediante la aplicación de la secuenciación de genoma completo de aislados de *V. cholerae* pueden aportar una fuente inagotable de información de utilidad para el pronóstico y tratamiento de la infección causada por este microorganismo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ✓ La distribución de *Vibrio cholerae* en Cuba, durante las últimas dos décadas sugieren un patrón de heterogeneidad espacial, con predominio de la detección en la región oriental, a partir de brotes y casos aislados.
- ✓ La variación de la patogenicidad en los serogrupos de *Vibrio cholerae* O1 y no-O1/no-O139 en los últimos ocho años en Cuba, alerta sobre la emergencia y diseminación de cepas más virulentas y con un elevado potencial para generar brotes epidémicos.
- ✓ Asociado al incremento en la detección de aislados entre 2012-2019, Cuba notifica la emergencia de cepas resistentes y multirresistentes, lo cual representa una alerta para el Sistema Nacional de Salud y la focalización de las acciones de control.
- ✓ El potencial patogénico de los aislados en Cuba resulta se evidencia a partir de la expresión fenotípica de la lecitina, mientras que, la formación de biopelícula revela capacidad protectora para la aparición de la multirresistencia.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- ✓ Fomentar el desarrollo de nuevas investigaciones que aborden acerca de la influencia de las variables climatológicas en las infecciones causadas por *V. cholerae* en Cuba, y la secuenciación completa del genoma de estos microorganismos.
- ✓ Utilizar los resultados obtenidos en este estudio para el diseño de las estrategias focalizadas, atendiendo el patrón de la distribución temporo-espacial.
- ✓ Sugerir modificaciones en las estrategias del tratamiento y contribuir al perfeccionamiento continuo del Programa de Control de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abana, D., Gyamfi, E., Dogbe, M., Opoku, G., Opare, D., Boateng, G., et al. (2019) Investigating the virulence genes and antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 in environmental and clinical isolates in Accra, Ghana. *BMC Infect Dis.* 19(1):76. doi.org/10.1186/s12879-019-3714-z.
- Agnello, M., Wong-Beringer, A. (2012). Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 7:e42973. doi:10.1371/journal.pone.0042973
- Alam, M., Weppelmann, T., Longini, I., De Rochars, V., Morris, J., Ali, A. (2015). Increased isolation frequency of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from environmental monitoring sites in Haiti. *PLoS One*, 10:4. e0124098. doi.org/10.1371/journal.pone.0124098.
- Almagro-Moreno, S., Pruss, K., Taylor, R.K. (2015). Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 11:e1004787. doi: 10.1371/journal.ppat.1004787
- Arteaga, M., Velasco, J., Rodríguez, Sh., Vidal, M., Arellano, C., Silva, F., et al. (2020). Genomic characterization of the non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain that caused a gastroenteritis outbreak in Santiago, Chile. *Microb Gen.* 12:3. doi: 10.1099/mgen.0.000340.

- Azman, A.S., Lessler, J., Luquero, F.J., Bhuiyan, T.R., Khan, A.I., Chowdhury, F., et al. (2019). Estimating cholera incidence with cross-sectional serology. *Sci Transl Med.* 11:eaau6242. doi.org/10.1126/scitranslmed.aau6242.
- Baddam, R., Sarker, N., Ahmed, D., Mazumder, R., Abdullah, A., Morshed, R, et al. (2020). Genome Dynamics of *Vibrio cholerae* Isolates Linked to Seasonal Outbreaks of Cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio.* 11(1), e03339-19. doi.org/10.1128/mBio.03339-19.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J., González-Escalona, N., Martínez-Urtaza, J. (2017). Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. *Trends Microbiol.* 25:76–84. doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.008.
- Bakhshi, B., Eftekhari, N., Pourshafie, M. (2014). Genetic Elements Associated With Antimicrobial Resistance Among Intestinal Bacteria. *Jundishapur. J Microbiol.* 7, 9924. doi.org/10.5812/jjm.9924.
- Balaji, K., Okonjo, P.A., Thenmozhi, R., Pandian, S.K. (2013). Virulence and Multidrug Resistance Patterns of *Vibrio cholerae* O1 Isolates from diarrheal outbreaks of south India during 2006–2009. *Microbial Drug Resistance.* 19(3): 198-203. doi:10.1089/mdr.2012.0127.
- Baron, S., Larvor, E., Chevalier, S., Jouy, E., Kempf, I., Granier, S.A., et al. (2017). Antimicrobial susceptibility among urban wastewater and wild shellfish isolates of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance estuary (Brittany, France). *Front Microbiol.* 8:1637. doi.org/10.3389/fmicb.2017.01637.
- Basu, P., Pal, R.R., Dasgupta, S., Bhadra, R.K. (2017). DksA-HapR-RpoS axis regulates haemagglutinin protease production in *Vibrio cholerae*. *Microbiol.*163(6):900-910. doi:10.1099/mic.0.000469.

- Battle, M.C., Dickinson, F. (2014). Notas para una historia del cólera en Cuba durante los siglos XIX, XX, XXI. *Rev Anales de la Acad Cien Cuba*. 4(1): 1-11.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherman, T., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Path*, 45(4):494-485.
- Beceiro, A., Tomás, M., Bou, G. (2013). Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2): 185–230. doi: 10.1128/CMR.00059-12.
- Bhattacharya, D., Dey, S., Roy, S., Parande, M.V., Telsang, M., Seema, M.H., et al. (2015). Multidrug-resistant *Vibrio cholerae* O1 was responsible for a cholera outbreak in 2013 in Bagalkot, North Karnataka. *Jpn J Infect Dis*, 68(4): 347–350.
- Bhattacharya, D., Sayi, D.S., Thamizhmani, R. (2012). Emergence of multidrugresistant *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor in Port Blair, India. *Am J Trop Med Hyg*, 86:1015–7.
- Bidinost, C., Saka, H.A., Aliendro, O., Sola, C., Panzatta-Duttari, G., Carranza, P., et al. (2004). Virulence factors of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Córdoba, Argentina. *Rev Argentina de Microbiol*, 36: 158-163.
- Bina, X., Provenzano, D., Nguyen, N., Bina, J. (2008). *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infection and Immunity*, 76(8): 3595–3605.
- Bordeleau, E., Brouillette, E., Robichaud, N., Burrus, V. (2010). Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol*, 12:510–523.

- Bravo, L. (2002). Estudio del género *Vibrio* en Cuba. Tesis para optar por el título de Dr. En Ciencias. IPK, La Habana, Cuba.
- Briceño, I., Puebla, C., Guerra, F., Jensen, D., Núñez, H., Ulloa, M., et al. (2009). Septicemia fatal causada por *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 hemolítico en Chile. Caso clínico. *Rev Méd Chile*, 137 (9): 1193-1196.
- Bueno, Y. (2011). Caracterización fenotípica de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica agua. Tesis para optar por el título de Licenciatura en Microbiología y Virología. IPK, La Habana, Cuba.
- Cabrera, L. (2008). Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología. IPK, La Habana, Cuba.
- Caffer, M., Terrago, R., González, S., Viñas, M., Pichel, M., Binsztein, N. (2010). Manual de procedimientos, aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*. Organización Panamericana de la Salud (OPS).
- Calvo-Barbado DM. (2014). Formulario Nacional de Medicamentos. Ed. Calvo-Barbado DM, Delgado Martínez I. Editorial Ciencias Médicas. La Habana, 2014: Recuperado de: http://www.bvs.sld.cu/libros_texto/formulario_nac_medicamentos_4taed/indice_p.htm
- Cárdenas-Perea, M., Cruz, Y., López, O., Gándara-Ramírez, J., Pérez-Hernández, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: La “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, 94: 35-43.
- Carnahan, A., Joseph, S. (2005). *Aeromonadaceae*. En Brenner DJ, Krieg NR, Staly JT, Garryti GM, editors. *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, 2, 557-578.

- Castrillón, L.E., Palma, A., Padilla, M.C. (2010). Importancia de las biopelícula en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex*, 54(1):14-24.
- çBriquaire, R., Colwell, R.R., Boncy, J., Rossignol, E., Dardy, A., Pandini, I., et al. (2017). Application of a paper based device containing anew culture medium to detect *Vibrio cholerae* in water samplescollected in Haiti. *J Microbiol Methods*, 133:23–31.
- CDC (2014) [Internet].Non-O1 and Non-O139 *Vibrio cholerae* Infections Recuperado de: <http://www.cdc.gov/Sources of Infection & Risk Factors Cholera CDC.htm>.
- Ceccarelli, D., Alam, M., Huq, A., Colwell, R. (2016). Reduced susceptibility to extended-spectrum β -Lactams in *Vibrio cholerae* isolated in Bangladesh. *Frontiers in Public Health* 4: 231.
- Chen, A., Cai, D., Zhu, S., Huang, Z., Liao, H., Yan, G. (2004). Study on biology and epidemiology characteristics of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from environmental waters in Foshan city. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zh*, 38(1):47-9.
- Chin, J. El control de las enfermedades transmisibles. (2001). 17^{ed}. Washington, DC. OPS: Publicación científica y técnica No. 581.
- Chowdhury, F.R., Nur, Z., Hassan, N., von Seidlein, L., Dunachie, S. (2017). Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 16:10. doi:10.1186/s12941-017-0185-1.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2010). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline Second Edition; M45-A2 [ISBN 1-56238-732-4]; 30(18):36-37.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing—28th edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- D’Mello-Guyett, L., Gallandat, K., Van den Bergh, R., Taylor, D., Bulit, G., Legros, D., et al. (2020) Prevention and control of cholera with household and community water, sanitation and hygiene (WASH) interventions: A scoping review of current international guidelines. *PLoS ONE*, 15(1): e0226549. doi.org/10.1371/journal.pone.0226549.
- Dalsgaard, A., Forslund, A., Bodhidatta, L., Serichantalergs, O., Pitarangsi, C., Pang, L., et al. (1999). A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogeneous non-O1, non-O139 O-serotypes. *Epidemiol Infect*, 122 (2): 17-226.
- Das, B., Pazhani, G.P., Sarkar, A., Mukhopadhyay, A.K., Nair, G.B., Ramamurthy, T. (2016). Molecular evolution and functional divergence of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Infect Dis*, 29:520–527.
- Davies, H.G., Bowman, C., Luby, S.P. (2017). Cholera—management and prevention. *J Infect*, 74, S66—S73.
- Dengo-Baloi, L.C., Sema-Baltazar, C.A., Manhique, L.V., Chitio, J.E., Inguane, D.L., Langa, J.P. (2017). Antibiotics resistance in El Tor *Vibrio cholerae* O1 isolated during cholera outbreaks in Mozambique from 2012 to 2015. *PLoS ONE*, 12(8): e0181496. doi.org/10.1371/journal.pone.0181496.
- Di, D.Y.W., Lee, A., Jang, J., Han, D., Hur, H.G. (2017). Season-Specific Occurrence of Potentially Pathogenic *Vibrio* spp. on the Southern Coast of South Korea. *Appl Environ Microbiol*, 83(3):e02680-16. doi:10.1128/AEM.02680-16.

- Díaz Jidy, M. (2012). Ensayos clínicos para evaluar candidatos vacunales contra el cólera. Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Médicas. IPK, La Habana, Cuba.
- Díaz, L., Cabrera, L., Fernández, T., Arias, M., Scull, G. (2009). Serogrupos y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Shigella*. *Rev Cubana Ped.* 8(1): 13-19.
- Díaz-Pascual, F., Hartmann, R., Lempp, M., Vidakovic, L., Song, B., Jeckel, H., et al. (2019). Breakdown of *Vibrio cholerae* biofilm architecture induced by antibiotics disrupts community barrier function. *Knut Drescher Nat Microbiol.* 4(12): 2136–2145. doi:10.2214/AJR.14.13787AJR 204: 685-686.
- Domman, D., Quilici, M.L., Dorman, M.J., Njamkepo, E., Mutreja, A., Mather, A.E., et al. (2017). Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. *Science*,10: 789-793.
- Dutta, D., Chowdhury, G., Pazhaniv, G., Guin, S., Dutta, S., Ghosh, S., et al. (2013). *V. cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis.* 19(2). doi.org/10.3201/eid1903.121156.
- Eibach, D., Herrera-León, S., Gil, H. (2016). Molecular Epidemiology and Antibiotic Susceptibility of *Vibrio cholerae* Associated with a Large Cholera outbreak in Ghana in 2014. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6. doi:10.1371/journal.pntd.0004751.
- Escudero, J.A., Mazel, D. (2017). Genomic plasticity of *Vibrio cholerae*. *Int Microbiol*, 20:138–148.
- Farmer, J., Janda, J., Brenner, F., Cameron, D., Birkhead, K. (2015). Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Recuperado de: <http://doi:10.1002/9781118960608.gbm01078>.

- Feglo, P.K., Sewurah, M. (2018). Characterization of highly virulent multidrug resistant *Vibrio cholerae* isolated from a large cholera outbreak in Ghana. *BMC Res Notes*, 11:45. doi:10.1186/s13104-017-2923-z.
- Fong, J.C., Syed, K.A., Klose, K.E., Yildiz, F.H. (2010). Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology*. 156:2757–2769. doi. org/10.1099/mic.0.040196-0.
- Francisca, G., De Menezes, M., Rodríguez, F. (2017). Pathogenic *Vibrio* species isolated from estuarine environments (Ceará, Brazil) - antimicrobial resistance and virulence potential profiles. *An Acad Bras Cienc*.Online version ISSN 1678-2690 Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160191>.
- Froelich, B.A., Daines, D.A. (2020). In hot water: effects of climate change on *Vibrio*-human interactions. *Environ Microbiol*. Mar 1. doi:10.1111/1462-2920.14967.
- Gaceta Oficial de la República de Cuba. Ministerio de Justicia. ISSN 1682-7511. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Resolución No. 8 del 2000. Gaceta Oficial No. 8 Ordinaria de 21 de enero de 2000. Recuperado de: www.gacetaoficial.cu.
- Gaceta Oficial de la República de Cuba. Ministerio de Justicia. ISSN 1682-7511. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Resolución No. 103 del 2002. Gaceta Oficial No. 61 Ordinaria de 7 de noviembre de 2002. Recuperado de: www.gacetaoficial.cu.
- Gaceta Oficial de la República de Cuba. Ministerio de Justicia. ISSN 1682-7511. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Resolución No. 38 del 2006. Gaceta Oficial Ordinaria de 24 de marzo de 2006. Recuperado de: www.gacetaoficial.cu.

- Gallego-Hernández, A.L., DePas, W.H., Park, J.H., Teschler, J.K., Hartmann, R., Jeckel, H., et al. (2020). Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity. Recuperado de: <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.19165711117/-/DCSupplemental>.
- García, B. (2014). Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. Recuperado de: <http://www.seimc.org/control/reviBacte/vibrio.htm>.
- García, H.M., Thompson, R., Valera, R., Fando, R., Fumane, J., Jani, I., et al. A single dose of live-attenuated 638 *Vibrio cholerae* oral vaccine is safe and immunogenic in adult volunteers in Mozambique. *VacciMonitor*, 2011, 20, 1-8.
- García, H.M., Valera, R., Fando, R.A., Pérez, J., Cardoso, E., Armesto, M., et al. (2017). The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638, was safe and immunogenic in healthy children and adolescents, from Cienfuegos province, Cuba. International Conference on Vaccines. *Madridge J Vaccines*. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.18689/2638-1966.a1.004>.
- Ghosh, A., Ramamurthy, T. (2011). Antimicrobials & cholera: are we stranded? *Indian J Med Res*, 133(2): 225–231.
- Global Burden of Diarrhoeal Diseases Collaborators (GDDC). (2017) Estimates of global, regional, national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis*, 17 (9): 909-948.
- González, L.M., Casanova, M.C., Pérez, J. Cólera: historia y actualidad. (2011). *Rev Ciencias Médicas*. 15 (4). Recuperado de: www.revcmpinar.sld.cu/index.php/publicaciones/article/view/856/1578.

- González, M.I., Torres, T., Chiroles, S., Valdés, M., Domínguez, I., Beltrán, J., et al. (2008). Estudio microbiológico de *Vibrio cholerae* y sus principales asociaciones ecológicas en aguas naturales. Informe Final. INHEM, Ciudad de la Habana, Cuba.
- Guillaume, Y., Raymond, M., Jerome, G.J., Ternier, R., Ivers, L.C. (2019). 'It was a ravage!': lived experiences of epidemic cholera in rural Haiti. *BMJ Global Health*, 4:e001834. doi:10.1136/bmjgh-2019-001834.
- Gupta P, Dutt N, Bhandari R, Shrestha P. (2016). Cholera outbreak caused by drug resistant *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotype El Tor serotype Ogawa in Nepal; a cross-sectional study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(23): 1-5.
- Gupta P, Mankere B, ChekkooraKeloth S, Tuteja U, Pandey P, ThavaChelvam K. (2018). Increased antibiotic resistance exhibited by the biofilm of *Vibrio cholerae* O139. *J Antimicrob Chemother*, 73: 1841–1847. doi.org/10.1093/jac/dky127.
- Hackbusch, S., Wichels, A., Gimenez, L., Döpke, H., Gerdt, G. (2019). Potentially human pathogenic *Vibrio* spp. in a coastal transect: Occurrence and multiple virulence factors. *Sci Total Environ*. 707:136113. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136113
- Halpern, B.S., Grazier, M., Alflerbach, J., Lowndes, J.S., Micheli, F., O'Hara, C. (2019). Recent pace of change in human impact on the world's ocean. *Sci Rep*, 9: 11609. doi.org/10.1038/s41598-019-47201-9.
- Herrera-Benavente, I.F., Comas-García, A., Mascareñas-de los Santos, A.H. (2018). Impacto de las enfermedades diarreicas agudas en América Latina. Justificación del establecimiento de un Comité de Enfermedades Diarreicas en SLIPE. *Rev Latin Infect Ped*, 31(1): 8-16.
- Hirk, S., Huhulescu, S., Allerberger, F., Lepuschitz, S., Rehak, S., Weil, S., et al. (2016). Necrotizing fasciitis due to *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 after exposure

to Austrian bathing sites. *Wien Klin Wochenschr.* 128:141–145
doi.org/10.1007/s00508-015-0944-y.

- Hossain, M., Islam, K., Kelly, M., Mayo Smith, L.M., Charles, R.C., Weil, A.A., et al. (2019). Immune responses to O-specific polysaccharide (OSP) in North American adults infected with *Vibrio cholerae* O1 Inaba. *PLoS Negl Trop Dis.* 13(11), e0007874. doi.org/10.1371/journal.pntd.0007874.
- Hsieh, M.L., Hinton, D.M., Waters, C.M. (2018). VpsR and cyclic di-GMP together drive transcription initiation to activate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Nucleic Acids Res.* 46:8876–8887. doi.org/10.1093/nar/gky606.
- Hsueh, B.Y., Waters, C.M. (2019). Combating Cholera [version 1; peer review: 2 approved] F1000 Research, 8 (F1000 Faculty Rev):589 doi.org/10.12688/f1000research.18093.1.
- IPCC. (2019). The special report on the ocean and cryosphere in a changing climate. Geneva: Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Pp. 1-44.
- Islam, M.T., Alam, M., Boucher, Y. (2017). Emergence, ecology and dispersal of the pandemic generating *Vibrio cholerae* lineage. *Int Microbiol*, 20:106–115.
- Ismail, H., Smith, A.M., Tau, N.P., Sooka, A., Keddy, K.H. (2013). Cholera outbreak in South Africa, 2008–2009: Laboratory analysis of *Vibrio cholerae* O1 strains. *J Infect Dis*; 208 (suppl 1): S39-S45.
- Jain, M., Kushwah, K., Kumar, P., Goel, A. (2013). Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 reveals continuous Evolution of its new variants in India. *Indian J Microbiol*, 53(2): 137–141.
- Jung, J.C., Lee, M.A., Lee, K.H. (2019). Role of flagellin-homologous proteins in biofilm formation by pathogenic. *Mbio.* 10: e01793-19. doi:10.1128/mBio.01793.

- Karagozova, A., Salnikova, O. (2000). The expression of the pathogenic properties of the *Vibrio cholerae* O139 serogroup in vitro. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 3, 7-10.
- Karlsson, E.K., Harris, J.B., Tabrizi, S., Rahman, A., Shlyakhter, I., Patterson, N., et al. (2013). Natural selection in a bangladeshi population from the cholera-endemic Ganges river delta. *Sci Transl Med*, 5. doi.org/10.1126/scitranslmed.3006338.
- Karlsson, S.L., Thomson, N., Mutreja, A., Connor, T., Sur, D., Ali, M., et al. (2016). Retrospective analysis of serotype switching of *Vibrio cholerae* O1 in a cholera endemic region shows it is a non-random process. *PLoS Negl Trop Dis*. 10:e0005044. doi:10.1371/journal.pntd.0005044.
- Kaur, S., Sharma, P., Kalia, N., Singh, J., Kaur, S. (2018). Anti-biofilm properties of the fecal probiotic Lactobacilli against *Vibrio* spp. *Front Cell Infect Microbiol*. 8:120. doi: 10.3389/fcimb.2018.00120.
- Kihla, J., Njiniwuh, T., Akum, H. (2013). Multi-drug resistant toxigenic *Vibrio cholerae* O1 is persistent in water sources in New Bell-Douala, Cameroon. *BMC Infect Dis*. 13: 366.
- Koneman, E., Win, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G. y Schreckenber, P. (2008). Koneman Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. Capítulo 3: El diagnóstico de laboratorio por métodos inmunológicos 109; Capítulo 4: Microbiología Molecular 129; Capítulo 8: Bacilos gramnegativos curvos y fermentadores oxidasa positivos: campilobacterias y vibriones 372, 6ta Edición. Editorial médica Panamericana.
- Kumar, P., Yadav, P., Ingole, K.V., Jaiswal, R.K., Khalid, N.S., Deshmukh, D.G., et al. (2020). Emergence of Haitian variant genotype and altered drug susceptibility in

Vibrio cholerae O1 El Tor-associated cholera outbreaks in Solapur, India. *Internat J Antimic Agents*, 55. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.11.010.

- Kumar, S., Klontz, E.H., Azmi, I.J., Ud-Din, A.I.M.S., Jobayer, M., Hassan, M., et al. (2013). Characteristics of multidrug resistant *Shigella* and *Vibrio cholerae* O1 infections in patients treated at an urban and a rural hospital in Bangladesh. *ISRN Microbiology*. doi.org/10.1155/2013/213915.
- Lackova, D., Sojka, M. (2018). A rare case of infection caused by *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 in clinical practice in Slovakia. *NewsLab*, 1:50–53.
- Le Roux, F., Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., et al. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis. *Front. Microbiol*, 6:830. doi:10.3389/fmicb.2015.00830.
- Lepuschitz, S., Baron, S., Larvor, E., Granier, S.A., Pretzer, C., Mach, R.L., et al. (2019). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolated from a Large Austrian Lake frequently associated with cases of human infection. *Front. Microbiol*, 10:2600. doi:10.3389/fmicb.2019.02600
- Leung, D.T., Chowdhury, F., Calderwood, S.B., Qadri, F., Ryan, E.T. (2012). Immune responses to cholera in children. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10(4): 435–444. doi:10.1586/eri.12.23.
- Logar-Herderson, C., Ling, R., Tuite, A.R., Fisman, D.N. (2019). Effects of large scale oceanic phenomena on non cholera vibriosis incidence in the United States: implications for climate change. *Epidemiol Infect*, 147.
- Liang, W., Wang, L., Liang, P., Zheng, X., Zhou, H., Zhang, J., et al. (2013). Sequence polymorphisms of rfbT among the *Vibrio cholerae* O1 strains in the Ogawa and Inaba serotype shifts. *BMC Microbiol*, 13:173. doi:10.1186/1471-2180-13-173.

- Liu, Y.F., Yan, J.J., Lei, H.Y., Teng, C.H., Wang, M.C., Tseng, C.C., Wu, J.J. (2012). Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. *Infect Immun*, 80:1815–1822.
- Maestre-Reyna M, Huang WC, Wu WJ, Singh PK, Hartmann R, Wang PH, et al. (2021). *Vibrio cholerae* biofilm scaffolding protein RbmA shows an intrinsic, phosphate-dependent autoprolysis activity. *IUBMB Life*, 73:418–431. doi: 10.1002/iub.2439.
- Mahmud, Z.H., Islam, S., Zaman, R.U., Akter, M., Talukder, K.A., Bardhan, P.K., et al. (2014). Phenotypic and genotypic characteristics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from the Sierra Leone cholera outbreak in 2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 108(11):715-20.
- Majano A. (2009). Susceptibilidad antimicrobiana de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva. Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología. IPK, La Habana, Cuba.
- Manneh-Roussel, J., Haycocks, J.R.J., Magán, A., Pérez-Soto, N., Voelz, K., Camilli, A., et al. (2018). cAMP receptor protein controls *Vibrio cholerae* gene expression in response to host colonization. *mBio*, 9:e00966-18. doi.org/10.1128/mBio.00966-18.
- Marin, M.A., Thompson, C.C., Freitas, F.S., Fonseca, E.L., Aboderin, A.O., et al. (2013) Cholera Outbreaks in Nigeria Are Associated with Multidrug Resistant Atypical El Tor and Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(2): e2049. doi:10.1371/journal.pntd.0002049.
- Marrero, K., Fando-Calzada, R. (2011). Formación de biopelícula por *Vibrio cholerae*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42 (2): 69-80.

- Mc Faddin, J.F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Baltimore: William and Wilkins.
- Mey, A.R., Craig, S.A., Payne, S.M. (2012). Effects of amino acid supplementation on porin expression and ToxR levels in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 80:518–528. doi:10.1128/IAI.05851-11.
- Minsap. (2016). Nota Informativa: Concluido el brote de cólera. *Periódico Granma*, Recuperado de: <http://www.granma.cu>.
- Miwanda, B., Moore, S., Muyembe, J., Nguefack-Tsague, G., Kabangwa, I., Ndjakani, D., et al. (2015). Antimicrobial drug resistance of *Vibrio cholerae*, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis*, 21(5):847–51.
- Mohammed, Y., Aboderin, A.O., Okeke, I.N., Olayinka, A.T. (2018). Antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* from sub-Saharan Africa: a systematic review. *Afr J Lab Med*, 7:778. doi.org/10.4102/ajlm.v7i2.778.
- Mohanraj, R.S., Samanta, P., Mukhopadhyay, A.K., Mandal, J. (2020). Haitian-like genetic traits with creeping MIC of azithromycin in *Vibrio cholerae* O1 isolates from Puducherry, India. *J Med Microbiol*. doi.org/10.1099/jmm.0.001131.
- Montero D, Vidal M, Pardo M, Torres A, Kruger E, Farfán M, O’Ryan M, Luo Q, Fleckenstein J, Del Canto F, Vidal R. (2017). Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from the massive multi-pathogen gastroenteritis outbreak in the Antofagasta region following the Chilean earthquake, 2010. *Infect Genet Evol*, 52:26–29.
- Morosini, M.I., Ayala, J.A., Baquero, F., Martínez, J.L., Blazquez, J. (2000). Biological cost of AmpC production for *Salmonella entérica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:3137–3143.

- Motaweq, Z. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Vibrio cholerae* Isolated from Diarrheal Patients in Najaf Province. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*; 10:1021-27.
- Naha, A., Pazhani, G.P., Ganguly, M., Ghosh, S., Ramamurthy, T., Nandy, R.K., et al. (2012). Development and evaluation of a PCR assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant ctxB in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from Kolkata, India. *J Clin Microbiol*, 50:1733–36. doi: 10.1128/JCM.00387-12.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCL). (2003). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eight informational supplement. M 2-A8. 2003. p. 74.
- Oficina Nacional de Estadísticas e Información (ONEI). (2012). Informe Final. Censo de Población y Viviendas. Cuba. Recuperado de: www.one.cu/resumenadelantadocenso2012.htm.
- Olivares, F., Domínguez, I., Dabanch, J., Porte, L., Ulloa, M.T., Osorio, G. (2019). Bacteriemia por *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139 que porta una región homóloga a la isla de patogenicidad Vpal-7 *Rev. chil. Infectol*, 36(3). doi.org/10.4067/S0716-10182019000300392.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2012): Recuperado de: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs107/es/index.html>.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Vacunas contra el cólera: Documento de posición de la OMS. [Citado el 17 de diciembre de 2020]. Recuperado de: <https://www.who.int/es/>.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). Epidemias mundiales e impacto del cólera. Recuperado de: https://www.who.int/immunization/cholera_grad_safety/.

- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2013). Situación de salud en las Américas. Recuperado de: <http://www.paho.org/spanish/dd/ais/IB-folleto-2005.pdf>.
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. (2016). Actualización Epidemiológica: Cólera 23 de nov 2016, Washington D.C. OPS/OMS.
- O'Toole, G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. 47.2437. 10–11. doi: 10.3791/2437.
- Ottaviani, D., Medici, L., Talevi, G., Napoleoni, M., Serratore, P., Zavatta, E., et al. (2018). Molecular characterization and drug susceptibility of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* strains of seafood, environmental and clinical origin, Italy. *Food Microbiol*, 72:82-88. doi: 10.1016
- Parte, A.C. (2018) LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol*. 68: 1825–1829. doi.org/10.1099/ijsem.0.002786.
- Peach, K.C., Cheng, A.T., Oliver, G., Yildiz, F.H., Linington, R.G. (2013). Discovery and Biological Characterization of the auromomycin chromophore as an inhibitor of biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Chembiochem*; 14(16): 2209– 2215. doi: 10.1002/cbic.201300131.
- Peirano, G., Schreckenberger, P.C., Pitout, J.D. (2011). Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131. *Antimicrob Agents Chemother*, 55:2986–2988.
- Peláez, O., Más, P. (2020). Brotes, epidemias, eventos y otros términos epidemiológicos de uso cotidiano. *Rev Cubana Salud Pública*, 46(2): 23-35.

- Pérez, C. 2013. Caracterización fenotípica de *Vibrio cholerae* no-O1 aislados de pacientes con diarreas Cuba. Tesis para optar por el título de Licenciado en Microbiología. La Habana, Cuba.
- Preeprem, S., Mittraparp-arhorn, P., Bhoopong, P., Vuddhakul, V. (2014). Isolation and characterization of *Vibrio cholerae* isolates from seafood in Hat Yai City, Songkhla, Thailand. *Foodborne Pathog Dis*, 11:881–886.
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J.A. y Piédrola-Angulo, G. (1987). Microbiología y Parasitología Médica. 2da edición. Barcelona: Salvat Editores.
- Qadri, F., Alam, M., Nishibuchi, M., Rahman, T., Alam, N., Chisti J. (2003). Adaptive and inflammatory immune responses in patients infected with strains of *V. parahaemolyticus*. *J Infect Dis*, 187:1085-96.
- Rabaan, A.A. (2019). Cholera: an overview with reference to the Yemen epidemic. *Front Med*, 13(2): 213–228.
- Rahman, M., Jubair, M., Alam, M.T., Weppelmann, T.A., Azarian, T., et al. (2014). High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae* strains isolated in Haiti. *PLoS ONE*, 9 (11): e112853. doi:10.1371/journal.pone.0112853.
- Rahman, Z., Rahman, M.A., Rashid, M., Monira, S., Johura, F.T., Mustafiz, M., et al. (2018). Cholera patients in cholera endemic coastal villages of Bangladesh, 2015–2016 (CHoBI7 Trial). *Front Public Health*, 6: 238.doi: 10.3389/fpubh.2018.00238.
- Rajpara, N., Nair, M., Bhardwaj, A.K. (2018). A highly promiscuous integron, plasmids, extended spectrum betalactamases and efflux pumps as factors governing multidrug resistance in a highly drug resistant *Vibrio fluvialis* isolate BD146 from Kolkata, India. *Indian J Microbiol*, 58(1):60-67. doi:10.1007/s12088-017-0687-8.

- Ramamurthy, T., Mutreja, A., Weill, F.X., Das, B., Ghosh, A., Nair, G.B. (2019). Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front Public Health*,7: 203 doi: 10.3389/fpubh.2019.00203.
- Rashed, S.M., Hasan, N.A., Alam, M., Sadique, A., Sultana, M., Hoq, M.M., et al. (2017). *Vibrio cholerae* O1 with reduced susceptibility to ciprofloxacin and azithromycin isolated from a rural coastal area of Bangladesh. *Front Microbiol*, 8:252. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00252.
- Raytekar, N.A., Saini, S., Bhalerao, D., Deorukhkar, S., Sarkar, B.L. (2012). A bacteriological study of *Vibrio cholerae* isolated from rural tertiary care hospital of Loni, Western Maharashtra. SDI Paper Template Version1.6 Date 11.10.2012.
- Registro público cubano de Ensayos clínicos. (2020). Recuperado de: <http://registroclinico.sld.cu/trials/RPCEC00000228-En>.
- Rijal, N., Acharya, J., Adhikari, S., Upadhaya, B.P., Shakya, G., Kansakar, P., et al. (2019). Changing epidemiology and antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*: AMR surveillance findings (2006-2016) from Nepal. *BMC Infectious Dis*, 19:801. doi.org/10.1186/s12879-019-4432-2.
- Ritter, A.S., Chowdhury, F., Franke, M.F., Becker, R.L., Bhuiyan, T.R., Khan, A.I., et al. (2019). Vibriocidal titer and protection from cholera in children. *Open Forum Infect Dis*, 6:ofz057. doi.org/10.1093/ofid/ofz057.
- Rivera, I.N., Lipp, E.K., Gil, A., Choopun, N., Huq, A., Colwell, R.R., et al. (2003). Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ Microbiol*, 5: 599-606.
- Robinson, J. (1986). Comparison of direct plating with the use of enrichment culture of isolating of *Aeromonas* spp from faeces. *J Med Microbiol*, 22, 315-7.

- Romero-Placeres, M. (2015). Estimación de la carga de enfermedad para enfermedades diarreicas relacionadas al agua y saneamiento en municipios seleccionados de Cuba en 2012. Tesis para optar por el título de Doctor en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud Pública, Escuela Nacional de Salud Pública de México. México DF.
- Rowe-Magnus, A.D., Davies, J., Mazel, D. 2002. Impact of integrons and transposons on the evolution of resistance and virulence. *Curr Top Microbiol Immunol*, 264:167–188.
- Ruenchit, P., Reamtong, O., Siripanichgon, K., Chaicumpa, W., Diraphat, P. (2017). New facet of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* haemolysin A: a competitive factor in the ecological niche. *FEMS Microbiol Ecol*, 93:12.
- Saleh, T., Sabba, M.A., Asem, K.A., Hammad, Z.N. (2011). Identification of virulence factors in *Vibrio cholerae* isolated from Iraq during the 2007-2009 outbreak. *Can. J. Microbiol*, 57: 1024-1031.
- Sánchez, L.M., Cheng, A.T., Warner, C.J., Townsley, L., Peach, K.C., Navarro, G., et al. (2016). Biofilm Formation and Detachment in Gram-Negative Pathogens Is Modulated by Select Bile Acids. *PloS one*, 11(3), e0149603. doi.org/10.1371/journal.pone.0149603.
- Sánchez, R.M., Pérez, I.A. (2014). Cólera: historia de un gran flagelo de la humanidad. *Human Méd*, 14(2):547-569.
- Sarab, K., Jameel, M.A.S., Abdulmohsen, A., Mohamed, N., Sarmad, R.N., Tuhama, T.M. (2016). The isolation of *Vibrio cholerae* and other enteric bacteria with molecular characterization of *V. cholerae* during outbreak of Baghdad/Iraq in 2015. *Adv Microb.* 6: 699-715, Recuperado de: <http://file.scirp.org/pdf/AiM2016081117175737.pdf>

- Sarkar, A., Morita, D., Ghosh, A., Chowdhury, G., Mukhopadhyay, A.K., Okamoto, K. et al. (2019). Altered integrative and conjugative elements (ICEs) in recent *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera cases, Kolkata, India. *Front Microbiol*; 10:2072. doi:10.3389/fmicb.2019.02072.
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., Bisht, R. (2018). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J Microbiol*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0757-6>.
- Schatzki, S. (2015). Cholerae. *Am J Roentgenol*, 204(3):685-6.
- Schirmeister, F., Dieckmann, R., Bechlars, S., Bier, N., Faruque, S.M., Strauch, E. (2014). Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33:767–778. doi.org/10.1007/s10096013-2011-9.
- Sharma, C., Thungapathra, M., Ghosh, A., Mukhopadhyay, A., Basu, A., Mitra, R. (1998). Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *Clin Microbiol*, 36: 756-763.
- Shin, O.S., Tam, V.C., Suzuki, M., Ritchie, J.M., Bronson, R.T., Waldor, M.K., et al. (2011). Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio*. 2:e00106-11. doi.org/10.1128/mbio.
- Shinoda, S., Miyoshi, S.I. (2011). Proteases produced by vibrios. *Biocontrol Sc*, 16(1):1-11.
- Silva, A.J., Benitez, J.A. (2016). *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*, 10:e0004330. doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330.

- Somarriba, L., Llanes, R., Sánchez, M.J. (2013). Cólera en Haití. Lecciones aprendidas por la Brigada Médica Cubana. Capítulo 2: Cólera 5-10; Capítulo 5: Presentación clínica del caso cólera y conducta a seguir. pp 157-171.
- Talkington, D., Bopp, C., Tarr, C., Parsons, M., Dahourou, G., Freeman, M., et al. (2011). Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerg Infect Dis*, 17(11): 2122-2129.
- Ulloa, M.T., Sanhueza, C., Henríquez, T., Aguayo, B., Hermosilla, G., Porte, L., et al. (2019). Chilean strains of clinical origin of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* carry the genes *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF* from secretion system T3SS2 present in an island of pathogenicity. *Rev chil Infectol*, 36(3). doi.org/10.4067/S0716.
- Valáriková, J., Korcová, J., Ziburová, J., Čížová, A., Bieliková, S., Sojka, M., Farkaš, P. (2019). Potential pathogenicity and antibiotic resistance of aquatic *Vibrio* isolates from freshwater in Slovakia. *Folia Microbiologica*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00760-w>.
- Vandembroucke, J.P., Von Elm, E., Altman, D.G., Gøtzche, P.C., Mulrow, C.D., Pocock, S.J., et al. (2009). Mejorar la comunicación de estudios observacionales en epidemiología (STROBE): explicación y elaboración. *Gac Sanit*. doi:10.1016/j.gaceta.2008.12.001.
- Verma, J., Bag, S., Saha, B., Kumar, P., Ghosh, T.S., Dayal, M., et al. (2019). Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 26; 116(13): 6226–6231. doi:10.1073/pnas.1900141116.
- Waldor, M.K. y Rya, E.T. (2016). *Vibrio cholerae*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica. Octava ed. Edición Española Elseiver.

- Wang, H., Yang, C., Sun, Z., Zheng, W., Zhan, W., Yu, H., et al. (2020). Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxigenic lineages. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(2):e0008046. doi.org/10.1371/journal.pntd.0008046.
- Wang, Q., Ma, Y., Liu, L., Zhu, J., Liu, Z. (2017). Biofilm development and environmental determinants in *Vibrio cholerae*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 25; 33(9):1533-1546. doi: 10.13345/j.cjb.170052.
- Wang, R., Yu, D., Yue, J., Kan, B. (2016). Variations in SXT elements in epidemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in China. *Sci Rep*, 6:22733. doi.org/10.1038/srep22733.
- Wang, Y., Wang, H., Hay, A.J., Zhong, Z., Zhu, J., Kan, B. (2015). Functional RelBE-Family Toxin-Antitoxin Pairs Affect Biofilm Maturation and Intestine Colonization in *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE*, 10 (8): e0135696. doi:10.1371/journal.pone.0135696.
- Weil, A.A., Becker, R.L., Harris, J.B. (2019). *Vibrio cholerae* at the intersection of immunity and the microbiome. *mSphere*, 4:e00597-19. doi.org/10.1128/mSphere.00597-19.
- Weill, F.X., Domman, D., Njamkepo, E., Tarr, C., Rauzier, J., Fawal, N., et al. (2017). Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science* 358, 785–789. doi:10.1126/science.aad5901.
- World Health Organization. (2015). Cholera, 2014. Weekly epidemiological record. 90: 517-544.
- World Health Organization. (2017). Ending cholera. A global roadmap to 2030. Geneva, Switzerland: WHO. Recuperado de: <http://www.who.int/cholera/publications/global-roadmap/en/>.

- Zeb, S., Shah, M.A., Yasir, M., Awan, H.M., Prommeenate, P., Klanchui, A. (2019). Type III secretion systems confers enhanced virulence in clinical non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *Microb Pathog*, 135: 103645. doi:10.1016/j.micpath.2019.10.3645
- Zelada, A., Ledón, T., Fando, F. (2015). El cólera: una enfermedad infecciosa reemergente. El candidato vacunal CV 638, una herramienta para su prevención. *Rev. CENIC*, 46(2):131-143.

*PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL
AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA
TESIS*

Producción científica del autor sobre el tema de tesis

Publicaciones

1. Bravo L, Monté R, **Fernández A**. Determinación de toxina termoestable en cepas de *Vibrio* aisladas en Cuba. *Rev. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 255-256.
2. Bravo L, Monté R, **Fernández A**. Aislamiento de *Vibrio cholerae* no-O1 en niños con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Rev. Enf. Infec. Microbiol.* (México).1998;1-4.
3. Bravo L, **Fernández A**. Caracterización de cepas de *Vibrio cholerae* O1. *Avances en Biotecnología Moderna*. Vol 5. V19. 1999.
4. Bravo L, Cabrera R, **Fernández A**. Sensibilidad antimicrobiana en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba. *Rev. Esp Quimioter*. 2004; 17:200-201.
5. Bravo L, **Fernández A**, Ramírez M. Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba. *Rev. Cubana Med Trop*. 2007; 58.
6. **Fernández A**, Bravo L, Águila A, Cruz Y, Illnait MT, Llop A, Hernández JL, Blanco S, Bebelagua D. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos cubanos de *Vibrio cholerae*O1 procedentes de muestras clínicas. *Rev. Cubana Med Trop*. 2016; 68 (1):51-58

7. **Fernández A**, Bravo L, Rivero G, Cabrera N, Nuñez FA, Cruz Y, Águila A, Hernández JL. Determinants of Virulence and Antimicrobial Susceptibility in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* Isolates. *MEDICC Review*, 2017;19 (4): 21-5.
8. **Fernández A**, Bravo L, Rivero G, Nuñez FA, Cruz Y, Águila A, Hernández JL. Determinación de biopelículas y betalactamasas de espectro extendido en *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 aislados de pacientes con diarreas en Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 2019; 71(2).

Presentación de resultados en eventos científicos

- ❖ Mecanismos de Resistencia en *Vibrio cholerae*. Taller de Resistencia a los antimicrobianos Cuba, 11/2012 Conferencista: **Fernández A**.
- ❖ Principales agentes causales de enfermedad diarreica. Sociedad Científica de Microbiología Cuba, 07/2013 Conferencista: **Fernández A**.
- ❖ Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos procedentes de brotes de *V. cholerae* O1 en Cuba. VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, V Congreso Nacional de Medicina Tropical, V Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el sida en Cuba. Cuba, 10/2014. Conferencista: **Fernández A**.
- ❖ Vigilancia de la resistencia antimicrobiana de enteropatógenos bacterianos en Cuba. IV Taller de resistencia antimicrobiana en bacterias y hongos patógenos. Universidad San Jerónimo, La Habana Cuba, 11/2015. Conferencista: **Fernández A**.
- ❖ Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos cubanos de *Vibrio cholerae* O1. Evento Brigadas Técnicas Juveniles (base, institucional, municipal). Cuba, 03, 06/ 2017. Coautor: **Fernández A**

- ❖ Factores de virulencia en aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 causantes de brotes en Cuba. (2012-2015). Evento Brigadas Técnicas Juveniles (base, institucional, municipal). Cuba, 03/06/2017 Coautor: **Fernández A.**
- ❖ Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana en enteropatógenos bacterianos productores de enfermedad diarreica aguda. Fórum de Ciencia y Técnica. Empresa 8 de marzo, La Habana. Cuba, 07/2017 Coautor: **Fernández A.**
- ❖ Veinte años de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana de enteropatógenos emergentes en Cuba. Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical. IX Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. VI Congreso Nacional de Medicina Tropical. VI Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el sida en Cuba. 5to Simposio Internacional. Cromoblastomycosis: Una enfermedad desatendida. 07/2017. Conferencista: **Fernández A.**
- ❖ Vigilancia de la resistencia antimicrobiana. 1er. Curso Internacional de enfermedades transmitidas por los alimentos. IPK, Cuba, febrero de 2019. Conferencista: **Fernández A.**

Resultados científicos

- ❖ Introducción y extensión a todos los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología de las técnicas de aislamiento e identificación de los microorganismos *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*. **LOGRO ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA. Ciudad de La Habana, Cuba.** Enero. 1997. Coautor: **Fernández A**
- ❖ Caracterización molecular de cepas cubanas. **LOGRO ACADEMIA DE CIENCIAS**

DE CUBA. Ciudad de La Habana Cuba. (Enero 1999). Coautor: **Fernández A.**

- ❖ Bravo L, **Fernández A**, Ramírez M. *Vibrio cholerae* no-O1. Resultados de 10 años de vigilancia microbiológica en Cuba. **Resultado Relevante Institucional** (IPK/2007) Coautor: **Fernández A.**
- ❖ Generalización del enfrentamiento de un evento epidemiológico de cólera. Papel del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK. **Resultado Relevante Institucional** (IPK/2013) Coautor: **Fernández A.**
- ❖ Generalización del enfrentamiento de un evento epidemiológico de cólera. Papel del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.XVI Fórum de Base IPK Cuba, (09/2014). XVI Fórum de Ciencia y Técnica Municipal. Relevante. Autor: **Fernández A.**
- ❖ Enfoque integrado del cólera en adultos con diarreas ingresados en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, 2012-2015” (**Propuesto a Logro de la Academia de Ciencias de Cuba**). **Resultado Relevante Institucional** (IPK/2017) Coautor: **Fernández A.**

Tesis defendidas y tutoradas

2011Tutor.Tribunal Politécnico “Mártires de Girón”. Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos oxidasa positiva, aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. (Alumna: Jennifer Felipe Hernández).

2016 Tutor. Maestría Bacteriología-Micología. “Determinación de betalactamasa de espectroextendido y biofilm en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba”. (Alumna Dra. Giselle Rivero Navea).

2017 Tutor. Tribunal Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en cepas de *Vibrio cholerae* O1 de origen clínico aisladas en Cuba. (Alumna: Yuselys García).

2017 Tutor. Tribunal Médico Residente de Microbiología. Identificación y susceptibilidad antimicrobiana de bacilos gramnegativos oxidasa positivos aislados de muestras clínicas. William Soler/ IPK. (Alumna: Osleidys Pomares).

2017 Tutor. Maestría Bacteriología-Micología. *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*. Agentes etiológicos de infecciones extraintestinales e intestinales. Cuba 2016 – 2017. (Alumna: Omayda Oquendo).

2018 Tutor. Maestría Bacteriología-Micología. Resistencia antimicrobiana y factores de virulencia en aislados cubanos de *Vibrio cholerae* O1. IPK .2012-2015. (Alumna: Yanaika Cruz).

2018 Tutor. Tribunal Fac Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Caracterización microbiológica de microorganismos pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* procedentes de la red de laboratorios nacional de Cuba. (Alumna: Navia García Cejas).

*PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL
AUTOR NO RELACIONADAS CON EL
TEMA DE LA TESIS*

Producción científica del autor no relacionado con el tema de tesis

PUBLICACIONES:

1. Bravo L, **Fernández A**. Tiras reactivas para el diagnóstico de la actividad oxidasa en las bacterias. *Rev. Cubana Med Trop.* 2000; 52 (2): 150-1.
2. Bravo L, **Fernández A**. Severe otitis due to *Vibrio fluvialis* in a patient with AIDS: First report in the world . *Rev. Cubana Med Trop.* 2005; 57 : (2) 1- 2.
3. López-Cánovas L, Bravo L, **Fernández A**, Herrera J, Riverón AM, Haver E, Sánchez A et al. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed field minigel electrophoresis. *Electrophoresis.* 2006; 27:2857-64.
4. Bravo L, **Fernández A**, Ramírez M, Cabrera L. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales. *Rev. Infec Chile.* 2007 ; 24: 204-08
5. Bravo L, Majano A, **Fernández A**, Ramírez M, Águila A. Susceptibilidad a los antimicrobianos de bacilos gramnegativos oxidasa positivo. *Arch Ven Farm y Terap* 2009; 28 : 14-18
6. Majano A, Bravo L, **Fernández A**, Ramírez M. Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivas aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. *Rev Biomed* 2009; 20: 25-32.