



Aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp. β -hemolíticas y *Vibrio* spp. potencialmente virulentos, en pescados y mariscos comercializados en Bogotá, Colombia

Isolation and Identification of β -hemolytic *Aeromonas* species and *Vibrio* species Potentially Virulent in Seafood Sold in Bogota, Colombia.

Sánchez C., Juan David^{1,2,3*}; Delgado P., María del Pilar³

¹Universidad Libre, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Seccional Barranquilla (Colombia). Sede Norte Km. 7 Antigua Vía a Puerto Colombia. ²Laboratorio de Ecología Microbiana y de Alimentos (LEMA), ³Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática (LDMB). Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Cra 1 N° 18A- 12 Bogotá (Colombia).
*jsanchezc@unilibrebaq.edu.co / jd.sanchez1634@uniandes.edu.co

Resumen

Introducción: Los pescados y mariscos pueden transmitir *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp., que sobreviven refrigeración y congelación, y pueden causar Enfermedades Transmitidas por Alimentos. En Colombia, es obligatorio reportar las pruebas positivas de *V. cholerae*. **Objetivo:** El propósito de este estudio fue: 1) determinar la presencia de *Aeromonas* spp. β -hemolíticas y *Vibrio* spp. como indicadores de contaminación microbiana en productos de mar; 2) identificar aislamientos utilizando método bifásico, y 3) determinar posibles cepas virulentas de *Aeromonas* spp. por la presencia del gen *hlyA*. **Métodos:** El aislamiento se realizó con el protocolo del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Las cepas se identificaron por 9 pruebas bioquímicas, kit Crystal™, y el análisis del gen 16S rDNA. La recuperación y aislamiento de *Vibrio* spp. fueron validados con placa de dilución estandarizada; y una PCR-multiplex para el gen *dnaj* fue estandarizada. Para evaluar la virulencia de *Aeromonas* spp., se diseñaron y normalizaron cebadores de PCR para *hlyA*. La recuperación de *Vibrio* spp. fue validada utilizando agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS). **Resultados:** Ninguna muestra dio positiva para *Vibrio* spp. 70% de las cepas fenotípicamente identificadas como *Aeromonas* spp. fueron confirmadas por Crystal™ y el 63% por secuenciación 16S, sin diferencia estadística significativa entre los métodos. 100% de *Aeromonas* spp. fueron β -hemolíticas y el 70% fueron confirmadas por amplificación y secuenciación de *hlyA*. **Conclusiones:** *Aeromonas* spp. β -hemolíticas aisladas en pescados y mariscos representan un riesgo potencial para los consumidores. Si bien ninguna muestra fue positiva para *Vibrio* spp., la selectividad del medio fue un punto de interés. Adecuada refrigeración promueve la seguridad de los mariscos. A pesar que los patógenos pueden crecer en productos refrigerados, la caracterización fenotípica y molecular satisfactoria ayuda a fortalecer la calidad y seguridad de los productos de la pesca.

Palabras clave: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio* spp., *hlyA*, β -hemólisis, Pescados y mariscos.

Abstract

Introduction: Seafood can transmit *Aeromonas* spp. and *Vibrio* spp., which survive refrigeration and freezing, and may cause foodborne illness. In Colombia, it is mandatory to report positive *V. cholerae* tests. **Purpose:** The purpose of this study was to: 1) determine presence of β -hemolytic *Aeromonas* spp. and *Vibrio* spp. as indicators of microbial contamination in seafood; 2) identify isolates using biphasic method, and 3) determine potential virulent strains of *Aeromonas* spp. by presence of the *hlyA* gene. **Methods:** Isolation was performed with the protocol of the National Institute of Health in Colombia. Strains were identified by 9 biochemical tests, Crystal™ kit, and analysis of 16S rDNA gene. *Vibrio* spp. recovery was validated with standardized dilution plate, and a multiplex-PCR test for the *dnaJ* gene was standardized. To assess the virulence of *Aeromonas* spp., primers were designed and standardized PCR to *hlyA*. *Vibrio* spp. recovery was validated using Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar. **Results:** No sample was positive for *Vibrio* spp. 70% of the strains of *Aeromonas* spp. phenotypically identified were confirmed by Crystal™ and 63% with sequencing 16S, with no statistically significant difference between the methods. 100% of *Aeromonas* spp. were β -hemolytic and 70% were confirmed by amplified and sequencing of *hlyA*. **Significance:** β -hemolytic *Aeromonas* spp. isolated in seafood represents a potential risk to consumers. Even though no sample was positive for *Vibrio* spp., the selectivity of the medium was a point of interest. Adequate refrigeration promotes seafood safety. Although pathogens can grow in refrigerated products, satisfactory phenotypic and molecular characterization helps strengthen the quality and safety of fishery products.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio* spp., *hlyA*, β -hemolysis, Seafood.

I- Introducción

La industria piscícola y la comercialización de mariscos representan una importante fuente de ingreso económico ya que constituyen fuente de empleo y son de recurso alimenticio (Da Silva, Rogério Matté, Germano, & Matté, 2010). Los pescados y mariscos pueden ser transmisores de microorganismos patógenos clásicos y emergentes para el hombre (Rapid microbiology, 2007; Yücel, Balci, & enay, 2010). Entre los patógenos de mayor relevancia que se han descrito

asociados a pescados y mariscos, están *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Aeromonas* spp., y especies del género *Vibrio* (Da Silva et al., 2010; Yücel et al., 2010). Dadas las legislaciones mundiales para la comercialización de pescados y mariscos, la mayoría de estudios se han centrado en la búsqueda de *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139 y *Vibrio parahaemolyticus* (Da Silva et al., 2010).

1.1. Género *Vibrio*. Tienen relevancia a nivel de salud pública, la mayoría de especies tienen distribución

mundial(Brenner, Krieg, & Staley, 2005; Rapidmicrobiology, 2007) y se encuentran naturalmente en ambientes acuíferos tanto salados como dulces(Organización Panamericana de la Salud, 1991a; F. Thompson, Austin, B. & Swings, J., 2006), sedimento, peces, moluscos y crustáceos. *Vibrio* spp. sobreviven mejor en el agua que en los alimentos(2005, 2012), aunque la frecuencia de aislamientos en muestras frescas, refrigeradas o congeladas de peces y crustáceos es de 30-100%(Organización Panamericana de la Salud).

Las especies patógenas más importantes para humanos son *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, las cuales se asocian a enfermedad diarreica y deshidrataciones(Organización Panamericana de la Salud; Roozbehan, 2012). Aunque se consideraban controlados, brotes en los últimos años han generado alarma, ocasionado que se tomen medidas de contención y protección(Brower, 2011; Harmon, 2012).

Con el objeto de dar respuesta a la epidemia de cólera que se presentó en Haití y República Dominicana en el 2011, en la actualidad Colombia cuenta con un Plan de Contingencia del Sector Salud para la Prevención y Control de cólera(Ministerio de la Protección Social Grupo de Vigilancia en Salud, 2011). Según los datos del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) respecto a *V. cholerae* desde 2004 no se reportan casos confirmados y no existe información de cómo es la situación de otras especies de *Vibrio* que pudieran estar

involucradas(Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), 2012).

En Colombia, la Resolución 776 de 2008 y la 000122 de 2012 establecen los reglamentos técnicos sobre requisitos fisicoquímicos y microbiológicos que deben cumplir los productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos para consumo humano(Ministerio de Salud y Protección Social, 2012). Así, respecto a *Vibrio* spp. sólo es de búsqueda obligatoria de *V. cholerae*. Adicional, según el Decreto 3518 de octubre 9 de 2006 del Ministerio de la Protección Social respecto a las especies del género *Vibrio* sólo es notificación obligatoria *V. cholerae*(Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), 2011a, 2011b). En países como Chile, otras especies asociadas a brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) como *V. parahaemolyticus*, son de notificación obligatoria(Ministerio de Salud e Instituto de Salud Pública de Chile, 2008; Subsecretaria de Salud Pública: División de Planificación Sanitaria, 2006). Tanto en Estados Unidos como en países del lejano oriente se sabe que *V. parahaemolyticus* es la principal fuente de enfermedades asociadas a comida(Richards et al., 2012).

1.2. Género *Aeromonas*. De acuerdo a la última edición del "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (2005)(Martin-Carnahan & Joseph, 2005; Martínez-Murcia et al., 2008), se desplazó este género de la familia *Vibrionaceae*, para formar su propia familia *Aeromonadaceae* con sólo el género *Aeromonas*(Bravo et al., 2011; Wang et al., 2003). *Aeromonas* spp.

son usuales en agua dulce y estuarios, muy sensibles a las condiciones ácidas y a la sal, por lo que en general no se desarrollan en alimentos con un pH menor de 6,5 y un contenido de NaCl mayor del 3,0%(Huss, 1999). Pueden ser aisladas de aguas saladas, pescados y mariscos, o bien recuperarse de otros alimentos como carnes(Gram et al., 1990; Huss, 1999). Las temperaturas óptimas de crecimiento de *Aeromonas* spp. están entre 20 °C y 37 °C, aunque una especie, *A. salmonicida*, se considera como psicrófila(Daskalov, 2006).

En seres humanos, este género de bacterias se ha relacionado principalmente con infecciones en heridas de la piel, sepsis, brotes asociados a aguas y gastroenteritis de origen alimentario, por lo que se considera un patógeno primario del tracto gastrointestinal(Aguilera-Arreola et al., 2007), aunque también puede producir infecciones tales como bacteriemia, septicemia, entre otras(Bravo et al., 2011; Sarkar, Saha, Patra, & Roy, 2012). Tres especies, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar sobria, han sido sugeridas como las causantes de las gastroenteritis humanas(Kannan, Kanna, Karkhuzali, Chattopadhyay, & Pal, 2001; Suárez Q & Herrera A, 2012) y se les ubica en el grupo de *Aeromonas* spp. móviles, en las cuales se reporta 100% de resistencia a la ampicilina(Cahill, 1990; Rodríguez, Botero, Iregui, & Figueroa, 2005; Xia, Ma, Rahman, & Wu, 2004). Desde 1968 *A. hydrophila* ha sido reconocida como patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos y más recientemente se ha demostrado causante

de ETA en las personas sanas(University of Nebraska-Lincoln, 2013). Desde 1980 en Estados Unidos se considera patógeno emergente(Hazen, Fliermans, Hirsch, & Esch, 1978; Ljungh, Popoff, & Wadstrom, 1977), aunque en otros países se ha descrito específicamente como ETA(Buchanan & Palumbo, 1985; Davies, Capell, Jehanno, Nychas, & Kirby, 2001; Morgan & Wood, 1988).

En *Aeromonas* spp. se han identificado muchos factores de virulencia(Bravo et al., 2011; Kannan et al., 2001; Sarkar et al., 2012), se sabe que segregan toxinas que estarían preformadas en el alimento antes del consumo (aerolisina), o que pueden ser producidas dentro del ser humano al ingerir de la bacteria (β -hemolisina)(Huss, 1999). Sin embargo, no se conoce específicamente el papel de cada uno de estos factores como causantes de patologías en humanos y no existe un método para diferenciar patógenas de las que sí lo son (Bravo et al., 2011; Huss, 1999; Suárez Q & Herrera A, 2012; Yousr, Napis, Ali, Rusul, & Radu, 2007). No hay prueba de que las toxinas preformadas en los alimentos jueguen algún papel crucial en la patogénesis de la bacteria, por lo que la asociación entre comer pescado con aerolisina y la infección con *Aeromonas* spp. parecería ser circunstancial(Huss, 1999). Así, la relación directa de esta toxina en la gastroenteritis humana aún es discutible(Miguel Cisneros-Herreros, Cobo-Reinoso, Pujol-Rojo, Rodríguez-Baño, & Salavert-Lletí, 2007), porque cepas toxigénicas humanas se han aislado tanto de peces sanos como enfermos y no todas las cepas relacionadas con

gastroenteritis humana tienen genes para la producción de aerolisina (Cahill, 1990; Rodríguez et al., 2005; Xia et al., 2004).

Por el contrario, todas las cepas de *Aeromonas* asociadas a patologías gastrointestinales se han determinado como productoras de β -hemolisina, encontrando estrecha relación con la virulencia de la bacteria (Mateos, Anguita, Naharro, & Paniagua, 1993; Pollard, Johnson, Lior, Tyler, & Rozee, 1990; Xia et al., 2004). La β -hemólisis puede no darse a partir de una sola toxina (Uma, Rebecca, Meena, & Saravanabava, 2010), incluso puede ser generada por metabolitos secundarios que actúan como surfactantes (Ilori, Amobi, & Odocha, 2005). Por ende, es de relevancia conocer si efectivamente existe correlación entre el efecto de lisis celular y la presencia del factor de virulencia.

Existen dificultades para reconocer las cepas potencialmente patogénicas de *Aeromonas* spp. que pudieran estar siendo transmitidas por alimentos (Kirov, 1993), en parte porque los métodos de microbiología tradicional para el aislamiento e identificación de este patógeno, son lentos, laboriosos y no están 100% estandarizados (Sarkar et al., 2012). En algunos casos se han utilizado metodologías de aislamiento para *Aeromonas* spp., inicialmente ideadas para *Vibrio* spp. por la excelente recuperación de estas bacterias en los medios empleados (Al-Fatlawy & Al-Ammar, 2013).

Sólo un número limitado de brotes vinculados a ETA por este patógeno han sido publicados, algunos en Japón y Suecia por consumo de productos

marinos (González Ayala & Cecchini; University of Nebraska-Lincoln, 2013). En Latinoamérica no existen descripciones de brotes asociados a este patógeno, aunque se han aislado en pacientes con diarrea. En Cuba (Mayor, Ferrer, Valdés, & Delfino, 2000), Venezuela y México, *Aeromonas* spp. son las bacterias más frecuentemente involucradas en este tipo de episodios. En Colombia a la fecha no se presenta ningún reporte oficial y las investigaciones se han centrado en algunos pescados frescos como trucha, la prevalencia de *Aeromonas* spp. llega incluso a ser de 100% (Castro-Escarpulli et al., 2002; Suárez & Herrera).

Dado lo anterior, se determinó la presencia de *Aeromonas* spp. β -hemolíticas y *Vibrio* spp. como indicadores microbianos de contaminación en pescados y mariscos comercializados en Bogotá. Se reconocieron por un método bifásico, cepas aisladas de pescados y mariscos, determinando en qué alimentos estaban presentes. Se identificó el potencial virulento las cepas de *A. hydrophila* por presencia del gen *hlyA*. Adicional, se validó el método de recuperación de *Vibrio* spp. usando agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS).

II- Materiales y Métodos

2.1. Muestras

En el mercado de la ciudad de Bogotá se comercializan diferentes pescados y mariscos, los cuales son distribuidos en las cadenas de supermercados por 6 grandes marcas. Las muestras fueron recolectadas entre mayo y julio de 2014 en diferentes almacenes de

cadena. Para el análisis estadístico se escogieron 2 marcas particulares que ofrecieran la gran mayoría de tipos de pescados y mariscos, y para una

determinación independiente de la marca como factor, se analizaron algunos alimentos de otros proveedores. En total se examinaron 124 muestras. Tabla 1.

Tabla 1. Datos del muestreo

Alimento	Marcas analizadas o lugares de expendio	Muestras por marca o lugar de expendio	Total de muestras analizadas
Almejas	2	3	6
Anillos de calamar	2	3	6
Camarón	3**	3	9
Filete de atún	2	3	6
Filete de merluza	3**	3	9
Filete de salmón	2	3	6
Filete de tilapia	3**	3	9
Langostinos	3**	3	9
Ostras*	4	13	52
Palmitos de cangrejo	2	3	6
Pulpo	2	3	6
		Total	124

*Las ostras fueron compradas en refrigeración a partir de pequeños expendios en la ciudad de Bogotá. Los demás pescados y mariscos, distribuidos en estado de congelación, se adquirieron en almacenes de cadena.

**Para camarón, langostino, filete de merluza y tilapia se analizaron también muestras de marcas diferentes a las 2 principales.

2.2. Análisis Microbiológicos

2.2.1. Aislamiento de *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp.

Para el aislamiento de *Vibrio* spp. se utilizó el protocolo oficial de *V. cholerae* del INS enmarcado en el protocolo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)(Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), 2010). Se realizó un pre-enriquecimiento en Agua Peptona Alcalina (APA) pH 8,4 de 25 g de muestra asépticamente pesados y se

homogenizaron en 225 mL, se incubó a 30 °C por 24 horas y se recuperó en agar TCBS.

Para *Aeromonas* spp. se utilizó el mismo protocolo de *V. cholerae* del INS. El cultivo pre-enriquecido se recuperó en agar Base rojo de fenol con almidón (10%) y ampicilina (10 mg/L). El desarrollo de este medio de cultivo estuvo basado en investigaciones previas que han buscado recuperar *Aeromonas* spp.(Kaper, Seidler, Lockman, & Colwell, 1979; Palumbo, Maxino, Williams, Buchanan, & Thayer, 1985).

2.2.2. Identificación bioquímica de *Vibrio* spp.

Partiendo de colonias aisladas en medio TCBS de las respectivas muestras, se seleccionaron colonias puntiformes sacarosa positiva y negativa (amarillas y verdes respectivamente), sulfuro negativas (no negras); parámetros bioquímicos característicos del género *Vibrio*. Las colonias, se pasaron a agar nutritivo donde se verificó la actividad citocromo oxidasa c; cultivo en agar kligler donde se determinó fermentación de la glucosa y no producción de gas (Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986b; F. L. Thompson, Lida, & Swings, 2004). Las cepas se confirmaron por kit Crystal Gram negativos™.

2.2.3. Identificación bioquímica de *Aeromonas* spp.

Partiendo de colonias aisladas en medio agar Base rojo de fenol con almidón y ampicilina, se seleccionaron las colonias amarillas puntiformes cremosas, ampicilina resistentes, rodeadas de un halo de aclaramiento luego de agregar lugol como revelador como indicador de producción de amilasas (Al-Fatlawy & Al-Ammar, 2013; Sarkar et al., 2012). Se pasaron a agar nutritivo donde se verificó la actividad citocromo oxidasa c; cultivo en agar kligler donde se miró fermentación de la glucosa y producción de gas, agar Sulfuros, Indol, Motilidad (SIM) (Janda & Abbott, 2010; Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986a). Las cepas se confirmaron por kit Crystal Gram negativos™ y se les determinó capacidad β -hemolítica en agar sangre de carnero al 5%.

2.3. Identificación molecular de *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp.

Todas las cepas previamente caracterizadas a nivel metabólico, fueron confirmadas mediante identificación molecular por amplificación del gen ADN_r 16S. Se sembraron en el caldo Brain-Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 horas, para posterior extracción de ADN. El ADN fue extraído siguiendo el protocolo previamente estandarizado en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Alimentos (LEMA) (Martínez, Bossio, Durango, & Vanegas, 2007).

Para todas las reacciones, la concentración de ADN se cuantificó en ng/ μ L mediante espectofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Los amplicones obtenidos en todas las reacciones de PCR evaluadas fueron purificados y secuenciados por MacroGen® (Seúl, Corea), y se analizaron con el software BLASTn del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

2.3.1. PCR-multiplex para identificación de *Vibrio* spp.

Previo al procesamiento de todas las muestras, se estandarizó esta técnica para así evaluar las posibles cepas de *Vibrio* spp. que se aislaran. La PCR-multiplex amplificó el gen "housekeeping" *dnaJ*, que codifica para una proteína de shock térmico específica del género y que permite una diferenciación por secuencia entre especies (Nhung, Ohkusu, Miyasaka, Sun, & Ezaki, 2007). La PCR utilizó una mezcla de 5 cebadores (1 cebador "forward" universal para *Vibrio* spp. y 4 "reverse").

“Forward”:

CAGGTTTGYTGCACGGCGAAGA

“Reverse”

V. alginolyticus:

GATCGAAGTRCCRACACTMGGA

V. cholerae:

AGCAGCTTATGACCAATACGCC

V. mimicus:

YCTTGAAGAAGCGGTTCTGTGCA

V. parahaemolyticus:

TGCGAAGAAAGGCTCATCAGAG

V. vulnificus:

GTACGAAATTCTGACCGATCAA

Se utilizaron cepas control de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*. que generan amplicones de 96, 412 y 144 pb respectivamente (Nhung et al., 2007). Aunque en la mezcla original de la reacción de PCR se utilizó el cebador “reverse” para *V. cholerae*, no se evaluó la cepa control de *V. cholerae* ya que no es posible conseguirla. Esto, debido a que se trata un patógeno de grupo de riesgo 2 (Centers For Disease Control Prevention, 2011), cuya importación, venta y circulación el gobierno la tiene restringida, y solo se tiene permiso para su aplicación en métodos oficiales de vigilancia epidemiológica. Ello aplica de igual manera para *V. mimicus*, sin embargo para este no se utilizó su cebador.

Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 2,5% (peso/vol.) en buffer Tris-borato-EDTA (pH 8.2), se tiñeron a 0,5X de GelRed™, se corrieron a 110V por 90 minutos y se visualizaron con el sistema de transiluminador UV XRS ChemiDoc de BioRad®.

2.3.1.1 Alineamiento de la secuencia de *dnaJ* para identificación molecular de *Vibrio* spp.

Esto se realizó con el fin de evaluar la especificidad de la amplificación del gen “housekeeping” *dnaJ* mediante la PCR-multiplex, frente a otras especies bacterianas. Mediante la base de datos del NCBI se obtuvieron las secuencias del gen *dnaJ* de las bacterias *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas axonopodis*, *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Bacillus cereus*. Todas las secuencias fueron alineadas utilizando ClustalW2® (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larkin et al., 2007).

2.3.2 PCR para *hlyA* e identificación *Aeromonas* spp. β -hemolíticas portadoras del gen

Una vez confirmadas las cepas de *Aeromonas* spp., se amplificó por PCR un segmento del gen *hlyA* en búsqueda de cepas portadoras de este. Se establecieron los parámetros de la reacción y se diseñaron los cebadores específicos para la amplificación de dicho fragmento génico utilizando el software Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) (Rozen & Skaletsky, 1999).

Se utilizaron 8 secuencias del gen *hlyA* incluida la de la cepa de *A. hydrophila* ATCC7966 y cepas ambientales, encontrándose alto grado de similitud entre las secuencias de nucleótidos. Las secuencias con las que se trabajó se

tomaron de la investigación de Chun Xia, *et al.* 2003, artículo donde se pueden consultar los códigos de acceso (Xia *et al.*, 2004). Se diseñaron los cebadores con base en la región mayormente conservada entre estas secuencias, y una vez diseñados se probaron *in vitro* para evaluar su especificidad con el software Primer-BLAST del NCBI (Ye *et al.*, 2012).

Hemolisina	“Forward”:
AGTATCGAGGCGTCCAACAC	
Hemolisina	“Reverse”:
CGGCCGTACTGGTCATAGATG	

La amplificación por PCR se llevó a cabo en 25 μ L de mezcla de reacción que contenía 12,5 μ L de GoTaq[®] Hot Start Polymerase (Promega[®]), 2,0 μ L de cada cebador, 3,0 μ L de ADN y se llevó hasta 25 μ L con agua libre de DNasa/RNasa. Este protocolo se basó en uno previamente ajustado en el laboratorio LEMA (Vanegas-López & Martínez-León, 2011). Los ciclos de amplificación una vez estandarizados fueron:

1. 94 °C 03:00 1X
2. 94 °C 00:45 // 57.5°C 00:45 // 72°C 01:00 20X
3. 94 °C 00:45 // 57.0°C 00:45 // 72°C 01:00 20X

En la PCR de *hlyA* se utilizó la cepa *A. hydrophila* ATCC7966 como control. Posteriormente confirmadas bioquímicamente y por método molecular como *Aeromonas* spp. fueron evaluadas en búsqueda del gen. Se trabajó específicamente con cepas de *Aeromonas* spp. que mostraron β -hemólisis en agar sangre, y como controles se utilizaron cepas de *Aeromonas* spp. no hemolíticas, cepas ATCC de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*,

todas β -hemolíticas, y cepas aisladas de pescados y mariscos de *Burkholderia cepacia* tanto β -hemolíticas como no hemolíticas.

Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 1,0% (peso/vol.) en buffer Tris-borato-EDTA (pH 8,2), se tiñeron a 1X con GelRed[™], se corrieron a 80V por 100 minutos y se visualizaron con el sistema de transiluminador UV XRS ChemiDoc de BioRad[®].

2.3.2 PCR ADNr 16S

Se amplificó el gen ADNr 16S usando los cebadores universales 8F y 1492R. Se utilizó la cepa de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 como control. Las concentraciones de reactivos y ciclos de amplificación se realizaron de acuerdo con el método descrito por Dojka *et al.* (Dojka, Harris, & Pace, 2000) y estandarizado en el laboratorio LEMA.

2.4. Validación del método de recuperación de *Vibrio* spp. usando agar TCBS

Debido que el medio TCBS llegó a ser restrictivo en el crecimiento de *Vibrio* spp. incluso para cepas control, se decidió evaluar la recuperación de estos microorganismos usando el protocolo oficial de *V. cholerae* del INS. La metodología empleada de validación del medio se basó en parte en análisis estadísticos previamente reportados (Van Tassell *et al.*, 2012).

2.4.1. Estandarización del inóculo utilizado

Se realizó un pre-enriquecimiento en APA pH 8,4 de 22,5 g de muestra asépticamente pesados, se homogenizaron en 225 mL y se le agregaron 2,5 mL de un inóculo estandarizado de *V. parahaemolyticus* + *V. alginolyticus*, con una concentración de 1 Unidad Formada de Colonia (UFC)/mL. De esta manera el inóculo en la muestra quedó a una dilución de 10^{-2} . De igual manera se realizó el mismo experimento partiendo de 10 UFC/mL.

Se partió de un supuesto de $1 \cdot 10^7$ células/UFC, para luego contrarrestarlo con los datos observados y poderlo ajustar, en caso de ser necesario. Para determinar dicho valor, se promediaron los inversos de las diluciones por el número de UFC contadas para cada placa de TSA (Breed & Dotterer, 1916; Noonan et al., 2006).

Para estimar el número de UFC esperadas en los posteriores recuentos, se calculó el valor promedio de células por colonia (Tortora, Funke, & Case, 2007). Se agregó 1 colonia en 10 mL de APA estéril, se homogenizaron y posteriormente se realizaron diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , y se sembraron 6 réplicas dichas diluciones en Agar Tripticasa de Soya (TSA). También se hizo un ensayo donde se agregaron 10 colonia en 10 mL (Breed & Dotterer, 1916; Noonan et al., 2006).

2.4.2. Recuperación de *Vibrio* spp. en medio TCBS

Se evaluó la eficiencia de la recuperación bacteriana del medio selectivo TCBS comparándolo directamente con TSA,

un medio no selectivo enriquecido. Se realizaron recuentos en diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} con 6 réplicas y se contaron las colonias. Las diluciones entre 30 y 300 UFC se contaron directamente y recuentos superiores se hicieron con estimación por cm^2 .

Se realizaron los recuentos con filete de merluza congelado no estéril, inoculado (a lo que se llamó "Muestra" M) y no inoculado (a lo que se llamó "Contra Muestra" CM) con la cantidad estandarizada de *Vibrios*. Los recuentos se efectuaron durante 3 etapas diferentes del pre-enriquecimiento en APA pH 8,4: directo 0 horas, 9 horas y 24 horas, como se utiliza en el protocolo oficial de *V. cholerae* del INS.

Para la comparación entre TCBS y TSA, se modelaron regresiones lineales entre el Log_{10} de UFC y las diluciones en que se realizaron los recuentos. Los límites de confianza del 95,00% para el Log_{10} de UFC de la regresión, se trabajaron con la desviación estándar del promedio para cada una de las 6 réplicas por dilución.

2.5. Conservación de las cepas

Las cepas control y todas las cepas aisladas de pescados y mariscos se conservaron por subcultivos en TSA en tubo inclinado, por triplicado y con renovación de cultivo cada 3 semanas. Las cepas se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 1% de glicerol en caldo BHI (Rúgeles, Bai, Martínez, Vanegas, & Gómez-Duarte, 2010).

2.6. Análisis estadístico

2.6.1. Relación presencia/ausencia de patógeno y matriz alimenticia

Mediante un Modelo Lineal General (MLG) se analizó la prevalencia total de *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. en las muestras de pescados y mariscos. Además, se evaluó una posible correlación entre la presencia/ausencia de dichos patógenos con el tipo de “Alimento”, “Marca” y “Estado de la muestra” (refrigerado o congelado). Para poder resolver la respuesta de carácter binario (presencia/ausencia del patógeno), el modelo estadístico partió de 3 variables predictivas en el caso de la mayoría de alimentos congelados: 2 variables predictivas categóricas (“Marca” y “Alimento”) y la variable predictiva categórica “Interacción Marca-Alimento”. Para analizar el efecto del estado de congelación y refrigeración en los alimentos no se tuvo en cuenta la variable “Marca”, por lo que no hubo “Interacción” entre variables.

Así, para los efectos estadísticos presentados, los análisis se hicieron de la siguiente manera: **a).** Para determinar si el factor “Alimento”, “Marca” y su “Interacción” eran relevantes, se analizaron sólo las muestras de las dos principales marcas; cada una con 10 alimentos y 3 réplicas (60/124 muestras, se excluyeron 12 muestras de alimentos de otras marcas y 52 de los refrigerados). **b).** Para analizar exclusivamente el factor “Alimento” se analizaron todos los alimentos, independientemente de la marca (124 muestras). **c).** Para determinar la relevancia del “Estado de la muestra” se seleccionaron

igual número de alimentos congelados y refrigerados (las 52 ostras y 52 muestras al azar de congelados).

El MLG se trabajó con un 95,00% de confianza ($\alpha=0,05$) y utilizando el test HSD (Honestly-Significant-Difference) de Tukey para comparaciones múltiples, usando el software Minitab®. Para la comparación entre presencia/ausencia de patógeno respecto a dos alimentos cuyo tamaño maestral era diferente, se buscó diferencia significativa basado en la distribución de proporciones usando el mismo software.

2.6.2. Comparación entre métodos de identificación para la presencia/ausencia de patógenos

Se utilizó el Coeficiente kappa de Cohen (κ) como medida estadística para evaluar el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada entre las cepas de *Aeromonas* spp. identificadas por Crystal™ y secuenciación 16S (Cerdeña L & Villarroel del P, 2008). Esta medida varía entre 1 (ambos métodos identifican de igual manera) y 0, se considera robusta dado que con un simple cálculo del porcentaje de concordancia, tiene en cuenta los eventos que ocurren por casualidad (Sim & Wright, 2005).

2.6.3. Validación del método de recuperación de *Vibrio* spp. usando agar TCBS

El análisis por medio de regresiones se utilizó para determinar la relación causal las variables Medio (TCBS o TSA) y tipo de muestra (inoculada o no), para el recuento de UFC por dilución. La comparación de los

parámetros de escala (pendientes) se analizaron mediante un Análisis de la Covarianza (ANCOVA), probando el efecto de un factor categórico sobre una variable dependiente (variable Y) controlado por el efecto de una covariable continua (variable X)(Goldberg & Scheiner, 1993; R in Ecology and Evolution, 2011; Rutherford, 2001).

Lo anterior se hizo tanto para la evaluación misma de los recuentos en TCBS contra TSA, como para la determinación de UFC/colonia entre *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, en la estandarización del inóculo.

III- Resultados y Discusión

3.1. Análisis Microbiológicos

3.1.1. Aislamiento e identificación de *Vibrio* spp.

Ninguna muestra fue positiva para *Vibrio* spp.

3.1.2. Aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp.

Se estandarizó la preparación de un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Aeromonas* spp. utilizando rojo de fenol como indicador de pH (viraba a rosado en condiciones alcalinas), almidón (10%) para evidenciar presencia de amilasas con revelador de lugol y ampicilina (10 mg/L) para la selección de *Aeromonas* spp. móviles. Esto se muestra en la Figura 1. El medio, junto al pre-enriquecimiento en APA mostraron ser selectivo y diferenciales para *Aeromonas* spp., probándolo con diferentes microorganismos como se muestra en la Tabla 2.

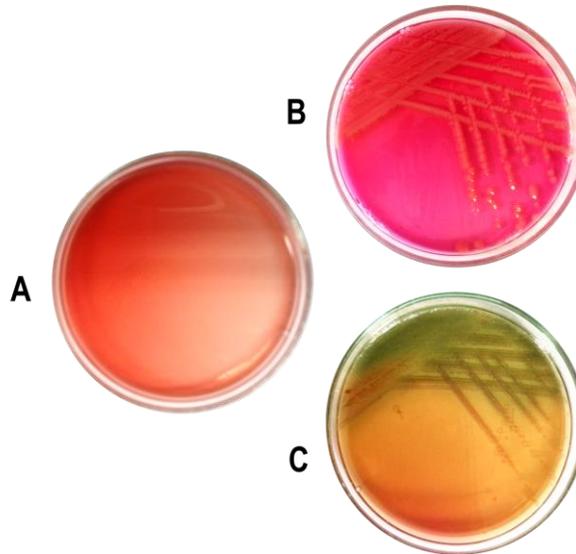


Figura 1. Agar para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles. El agar contiene rojo de fenol como indicador de pH, almidón (10%) y ampicilina (10 mg/L). En el grupo de *Aeromonas* spp. móviles se reporta 100% de resistencia a la ampicilina. **A.** Medio sin inocular. **B.** *A. hydrophila* como control positivo. **C.** *P. aeruginosa* como control negativo. Todos los cultivos tuvieron 24 horas de pre-enriquecimiento en APA y otras 24 horas de cultivo en el agar.

Tabla 2. Crecimiento de microorganismo en agar Base rojo de fenol

Microorganismo	Crecimiento	Producción de amilasas
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+/-	+/-
<i>Bacillus circulans</i>	+/-	+/-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-
<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
<i>Micrococcus roseus</i>	-	-
<i>Micrococcus sedentarius</i>	-	-
<i>Micrococcus varians</i>	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Vibrio furnissii</i>	-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	-

+ Positivo - Negativo +/- Limitado

El pre-enriquecimiento selectivo alcalino junto a la incorporación de ampicilina al medio, suprimió el crecimiento no sólo de coliformes sino de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Si bien se inhibió el crecimiento de la gran mayoría de bacterias Gram positivas, las que lo hicieron estuvieron bastante restringidas, algunas bacterias como *P. aeruginosa*, *B. cereus* y *Vibrio* spp. productoras de amilasas crecieron en el medio sin ser inhibidas, sin embargo, cepas de *Aeromonas* spp. fácilmente se diferenciaron por la morfología de colonia (puntiforme, cremosa y amarilla) y/o presencia de amilasas.

Se obtuvieron 30 cepas presuntivas de *Aeromonas* spp. mediante pruebas bioquímicas, de las cuales el 70,00% (21/30) se identificaron por el método comercial Crystal Gram negativos™ con porcentajes superiores al 97,00% como de *A. hydrophila*; el 30,00% restante de las cepas (9/30) se determinaron como *Burkholderia cepacia* con porcentajes superiores al 98,00% utilizando el mismo método. Las cepas analizadas se recuperaron del 24,19% (30/124) de las muestras de pescados y mariscos.

Los datos resultantes de secuenciación del gen ADNr 16S y análisis bio-informáticos arrojaron que el 90,50% (19/21) de las cepas previamente confirmadas como *Aeromonas* spp., fueron identificadas como *Aeromonas* spp. por secuenciación; esto corresponde al 63,33% (19/30) de las cepas inicialmente presuntivas. Las otras 9,50% (2/21) de las

cepas se identificaron como *Enterobacter* sp. y *Comamonas* sp. respectivamente.

El 68,50% (13/19) de las cepas correspondieron a *A. hydrophila*, el 10,50% (2/19) a otras especies no determinadas del género *Aeromonas*, el 15,80% (3/19) *Aeromonas salmonicida* y el 5,20% (1/19) *Aeromonas veronii*. Se encontró que 1 cepa identificada como *Burkholderia cepacia* (1/9) mediante Crystal Gram negativos™ con 98,22%, se identificó molecularmente mediante la amplificación del gen ADNr 16S como *A. hydrophila*; las otras cepas (8/9) se confirmaron como *Burkholderia cepacia* mediante secuenciación.

Todos los análisis bio-informáticos se basaron en secuencias con porcentajes de identidad superiores al 90,00% y con “e-values” inferiores a 0,001 como parámetros establecidos.

3.2. Identificación molecular de *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp.

3.2.1. PCR-multiplex y alineamiento secuencia *dnaJ*

Se estandarizó la PCR basada en el protocolo de: Nhung, P.H., *et al.* (Nhung *et al.*, 2007), la cual fue modificada utilizando 4 cebadores “reverse” en vez de los 5 originalmente propuestos. La temperatura de anillaje se estableció en 62 °C, a diferencia de la originalmente reportada por Nhung, P.H., *et al.* de 60 °C, dado que se observó una mayor amplificación en reacciones con concentraciones iniciales de ADN menores a 10 ng/μl.

La Figura 2 muestra la amplificación de la PCR-multiplex. En la parte superior se observa un dendograma que agrupa entre

los carriles 2 y 5 las bacterias evaluadas del género *Vibrio*.

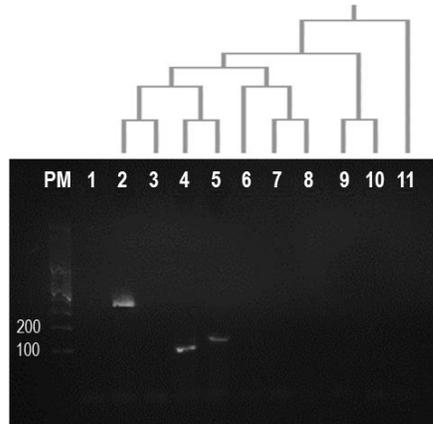


Figura 2. PCR-multiplex para la detección de especies de *Vibrio* junto a dendograma para el gen *dnaJ*: PM, Marcador de Peso Molecular (100 pb). 1, Control Negativo. 2, *V. vulnificus* (412 pb). 3, *V. furnissii*. 4, *V. parahaemolyticus* (96 pb). 5, *V. alginolyticus* (144 pb). 6, *A. hydrophila*. 7, *P. aeruginosa*. 8, *X. axonopodis*. 9, *E. coli*. 10, *S. Typhimurium*. 11, *B. cereus* ("out-group"). El dendograma de la parte superior muestra los agrupamientos por homología de las secuencias del gen *dnaJ* entre las diferentes especies.

3.2.2. PCR para *hlyA* e identificación de *Aeromonas* spp. β -hemolíticas portadoras del gen

Usando cebadores específicos para la amplificación de *hlyA*, se obtuvo un amplicón de 737 pb. Figura 3.



Figura 3. PCR para la detección del gen *hlyA* en *Aeromonas* spp. 1, Marcador de Peso Molecular (100 pb). 2, Control Negativo. 3, *A. hydrophila* ATCC7966 β -hemolítica (737 pb). 4, *A. hydrophila* no hemolítica aislada de ostras. 5, Marcador de Peso Molecular (Thermo Scientific® 1 kb).

3.2.2.1. Correlación de cepas de *Aeromonas* spp. β -hemolíticas en agar y cepas portadoras del gen *hlyA*

Se trabajó específicamente con cepas de *Aeromonas* spp. que mostraron β -hemólisis en agar sangre, y como controles se utilizaron cepas de *Aeromonas* spp. no hemolíticas, donde no se evidenció amplificación del gen *hlyA*.

El 100% (20/20, incluyendo la cepa identificada como *Burkholderia cepacia* por

Crystal Gram negativos™) presentaron actividad hemolítica en agar sangre de carnero al 5% (Figura 4). El 70,00% (14/20) de las cepas β -hemolíticas en agar, presentaron amplificación del gen *hlyA*, esto fue confirmado por visualización en gel de agarosa y secuenciación del amplicón.

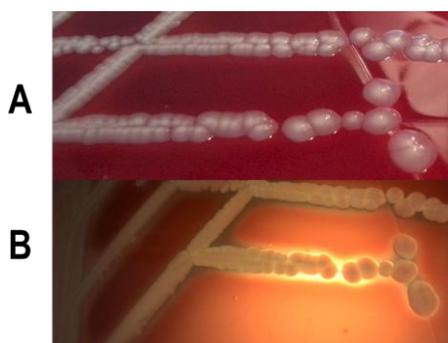


Figura 4. Hemólisis en agar sangre de carnero al 5% para *Aeromonas* spp. Todas las cepas identificadas como *Aeromonas* spp. fueron evaluadas para determinar su capacidad hemolítica en agar concentrándose en especial en cepas que presentaron β -hemólisis. **A.** No-hemólisis **B.** β -hemólisis.

De las cepas *hlyA*+, se determinó mediante análisis bio-informático del segmento secuenciado *hlyA*+ y cotejado con el resultado de ADNr 16S, que el 92,8% (13/14) correspondieron a *A. hydrophila*. Los resultados de un análisis pareado entre los resultados arrojados por ambas secuencias (ADNr 16S y *hlyA*), mostró que estos fueron iguales en el 92,85% (13/14) de las cepas identificadas (12 *A. hydrophila* y 1 *Aeromonas* spp.). La cepa restante incluso se llegó a determinar como *A.*

hydrophila mediante *hlyA*, cuando inicialmente usando 16S fue identificada como *Aeromonas* spp.

De las cepas *hlyA*- (6/20), previamente identificadas por secuenciación del 16S, se determinó que el 16,66% (1/6) correspondió a *Aeromonas veronii*, el 33,34% (2/6) a *A. hydrophila* y el 50,00% (3/6) a *A. salmonicida*.

Respecto la relación entre las cepas de *Aeromonas* spp. y el alimento del que

fueron aisladas, 90,00%(18/20) fueron de ostras y 10,00% (2/20) fueron de camarón. Sin embargo, las proporciones de muestras positivas para *Aeromonas* sp. en camarón y ostras respecto al total de muestras analizadas no fueron significativamente

distintas ($p>0,05$). De estas, la presencia del gen *hlyA* se evidenció en el 70,00%(14/20) de las cepas aisladas a partir de ostras y 0,00% (0/2) fueron *hlyA+* de camarón. (Figura 5).

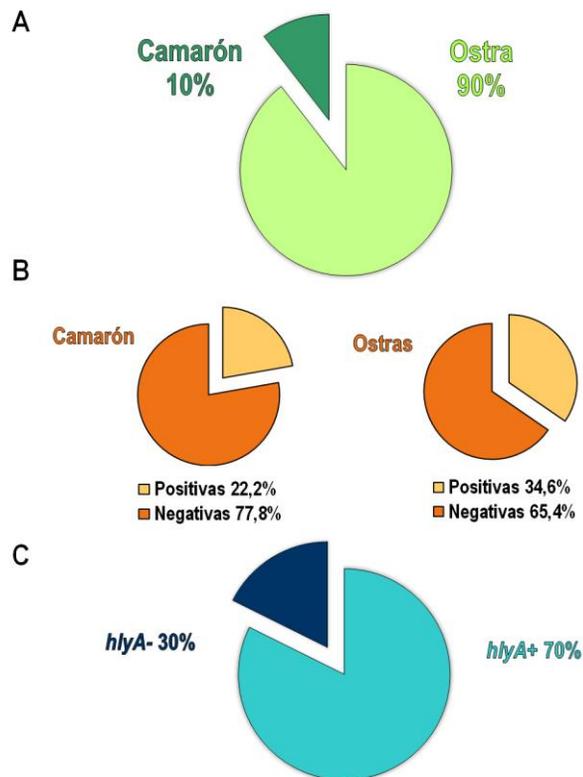


Figura 5. Porcentajes para el aislamiento de cepas de *Aeromonas* spp. A. Alimento de origen **B.** Proporción de muestras positivas y negativas de camarón y ostras sobre el total de muestras analizadas. **C.** Amplificación para el gen *hlyA*, que codifica para la β -hemolisina. Todas las cepas *hlyA+* fueron aisladas de ostras.

3.3. Análisis estadístico para la relación presencia/ausencia de patógenos y matriz alimenticia

Utilizando test de Tukey y un nivel de confianza del 95,00% **a)** Se determinó que los factores "Alimento" (N=60; GL=9;

F=1,94; $p>0,05$), "Marca" (GL=1; F=0,02; $p>0,10$) y su "Interacción" (GL=9; F=0,01; $p>0,10$), no fueron diferenciales respecto a los alimentos congelados donde hubo muestras positivas de *Aeromonas* spp. **b)** Si bien las ostras fueron el principal alimento

del que se recuperaron cepas de *Aeromonas* spp., la variable "Alimento" no fue indicadora y no se encontraron diferencias significativas entre la presencia de *Aeromonas* spp. entre ostras y otros alimentos. (N=124; GL=10; F=1,88; p>0,05) **c).** El análisis comparativo entre "Estado de la muestra", independientemente del alimento o su marca reveló que si existe una diferencia significativa entre productos congelados y refrigerados, por lo que este factor si fue relevante en el aislamiento de *Aeromonas* spp. y *A. hydrophila*. (N=104; GL=1; F=11,62; p<0,01).

3.4. Comparación entre métodos de identificación para la presencia/ausencia de patógenos

Se utilizaron las 30 cepas presuntivas por pruebas bioquímicas como muestras de comparación. De estas, 19 cepas fueron identificadas como *Aeromonas* spp. tanto por Crystal™ como por secuenciación 16S; 9 no fueron determinadas como *Aeromonas* spp. por ninguno de los métodos; y 2 cepas fueron

determinadas como *Aeromonas* spp. sólo por secuenciación 16S.

Así el análisis κ arrojó un valor de 0,85 (IC. 0,65-1,00), valor que utilizando la escala propuesta por Landis y Koch (Cerdeira L & Villarroel del P, 2008) sobre este índice, corresponde a un grado de acuerdo entre "sustancial" y "casi perfecto" entre ambos métodos, lo que evidencia una diferencia no significativa entre estos.

3.5. Validación del método de recuperación de *Vibrio* spp. usando agar TCBS

3.5.1. Estandarización del inóculo utilizado

Partiendo de un supuesto de 1×10^7 células/colonia, y luego de ajustarlo con los datos observados, se llegó a que por cada colonia de *V. parahaemolyticus* o *V. alginolyticus*, en promedio hay 4×10^5 células/colonia. (Figura 6).

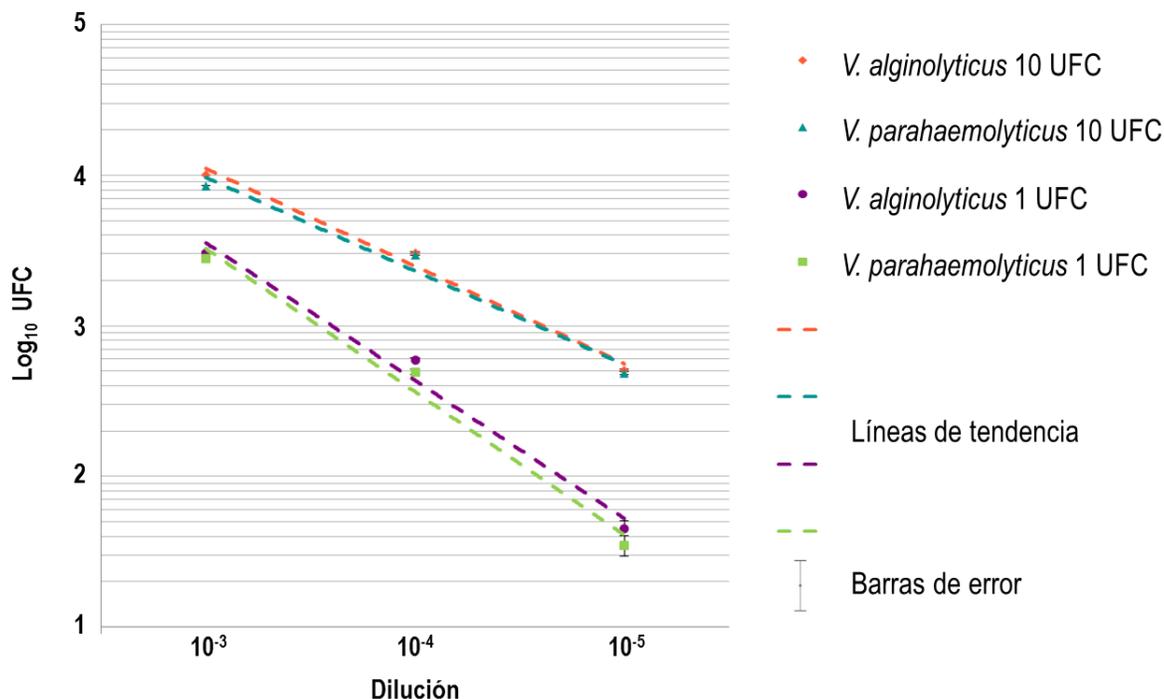


Figura 6. Recuento *Vibrio* spp. Células por colonia. Las pendientes de las líneas de tendencia muestran el comportamiento decreciente para los recuentos según se diluía la muestra. Los conteos se hicieron a partir de 1 UFC y 10 UFC, Las rectas de 1 UFC y 10 UFC, no mostraron diferencias significativas al 95,00% como Intervalo de Confianza (IC.).

La Tabla 3 muestra el análisis estadístico por ANCOVA y la determinación de modelos para las diferentes regresiones lineales que relacionan Log₁₀ UFC contra las diluciones.

Tabla 3. Parámetros estadísticos para la estandarización del inóculo utilizado.

Regresión	Significancia de la regresión	R ²	
<i>V. alginolyticus</i> 10 UFC (V.alg 10)	p < 0,001***	98,67%	
<i>V. parahaemolyticus</i> 10 UFC (V.par 10)	p < 0,001***	97,71%	
<i>V. alginolyticus</i> 1 UFC (V.alg 1)	p < 0,001***	98,36%	
<i>V. parahaemolyticus</i> 1 UFC (V.par 1)	p < 0,001***	98,54%	
Comparación entre regresiones lineales	Diferencia de pendiente	Diferencia de intercepto	Diferencia significativa
V.alg 10 vs V.par 10	p = 1,000	p = 0,9824	No
V.alg 10 vs V.alg 1	p = 1,000	p < 0,01**	Si
V.par 10 vs V.par 1	p = 1,000	p < 0,01**	Si
V.alg 1 vs V.par 1	p = 1,000	p = 0,7849	No

Significancia estadística. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

3.5.2. Recuperación de *Vibrio* spp. en medio TCBS

La determinación de conteo directo se muestra en la Figura 7. Se ven los recuentos en diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} con 6 réplicas. El promedio corresponde al punto graficado y la barra de error a la desviación estándar entre el promedio y las

6 réplicas. Se muestran los recuentos entre el filete de merluza congelado no estéril, inoculado (Muestra M) y no inoculado (Contra Muestra CM). Las 3 etapas del pre-enriquecimiento en APA pH 8,4 (directo 0 horas, 9 horas y 24 horas) se exponen como gráficas independientes. Los parámetros estadísticos para la construcción de las regresiones se evidencian en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros estadísticos para la recuperación de *Vibrio* spp. en medio TCBS

Regresión	0 Horas		9 Horas			24 Horas			
	Significancia de la regresión	R ²	Significancia de la regresión	R ²	Significancia de la regresión	R ²	Significancia de la regresión	R ²	
TCBS CM	-	-	-	-	p < 0,001***	99,37%	75,00%		
TCBS M	-	-	-	-	p < 0,01**	96,39%	65,00%		
TSA CM	p < 0,001***	98,48%	p < 0,001***	99,94%	p < 0,001***	99,55%	76,10%		
TSA M	p < 0,001***	99,35%	p < 0,001***	99,34%	p < 0,05*	75,00%	72,40%		
Comparación entre regresiones lineales	Diferencia de pendiente	Diferencia de intercepto	Diferencia significativa	Diferencia de pendiente	Diferencia de intercepto	Diferencia significativa	Diferencia de pendiente	Diferencia de intercepto	Diferencia significativa
TCBS CM vs TCBS M	-	-	-	-	-	-	p = 1,000	p < 0,01**	Si
TCBS CM vs TSA CM	-	-	-	-	-	-	p = 1,000	p = 0,9127	No
TCBS M vs TSA M	-	-	-	-	-	-	p = 1,000	p < 0,001***	Si
TSA CM vs TSA M	p = 1,000	p = 0,7207	No	p = 1,000	p = 0,5638	No	p = 1,000	p < 0,001***	Si

Significancia estadística. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

Las celdas que no tienen valor (-) corresponden a los recuentos en placa donde el número de UFC fue 0.

Las diluciones correspondientes al tiempo 0 horas fueron homólogas a los procesos de dilución seriadas hechas para la estandarización del inóculo, dado que no se realizó pre-enriquecimiento alguno. Así, al agregar 2,50 mL de inóculo con concentración de $4 \cdot 10^5$ células/mL,

mezclarlo con 22,5 gramos del pescado y 225 mL de APA y sembrar directamente 0,10 mL en superficie sobre el agar, se esperaría aislar en promedio $4 \cdot 10^2$ UFC en la dilución 10^{-3} . En la gráfica 0 Horas de la Figura 7 se evidencia que utilizando el método del INS, muestras analizadas con

contenido de *Vibrios* inferiores a las 5 unidades logarítmicas no se recuperaban

con éxito antes de las 24 horas de pre-enriquecimiento.

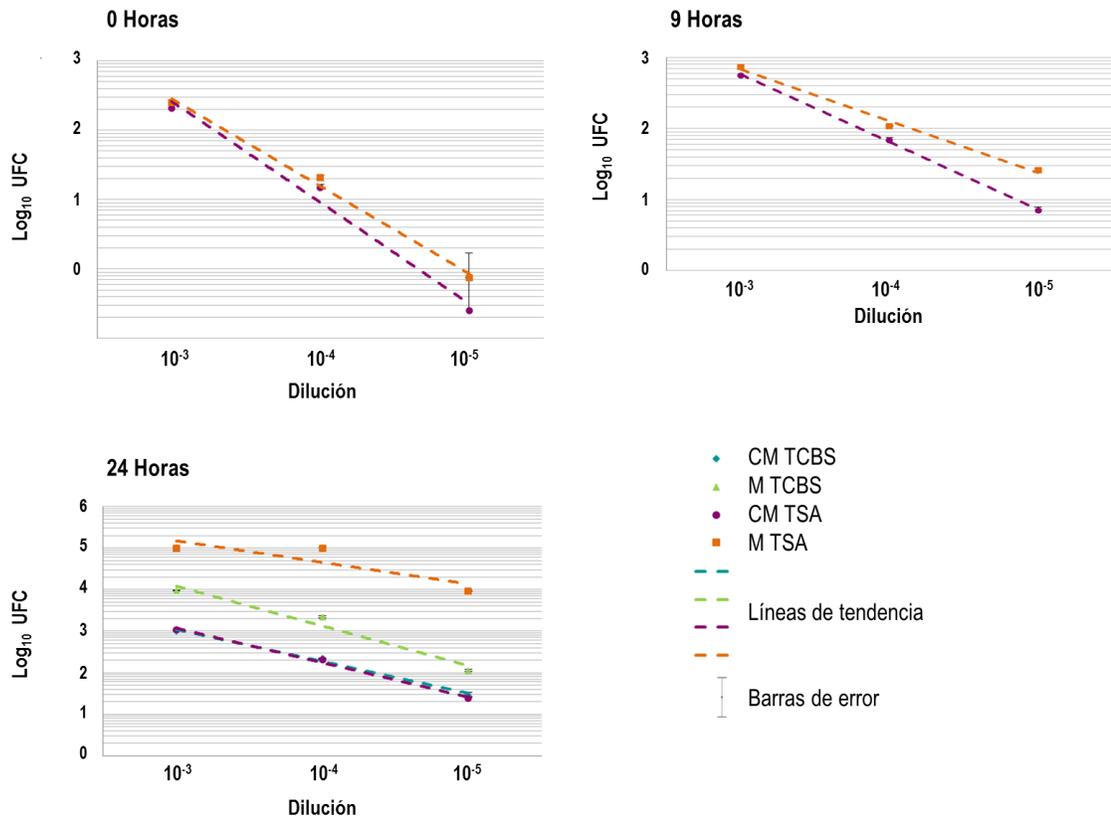


Figura 7. Recuperación de *Vibrio* spp. en medio TCBS para filete de merluza. Se comparó la cantidad de microbiota recuperada en medio TCBS cotejándola con TSA. Se plaqueó en 3 diferentes horas de pre-enriquecimiento (0 horas, 9 horas y 24 horas). Se analizó filete de merluza congelado no estéril, inoculado con *Vibrios* (Muestra M) y no inoculado (Contra Muestra CM) como control de la microbiota propia del alimento. Con 95,00% IC., las pendientes de las 2 rectas de TSA, no mostraron diferencia significativa en las horas 0 y 9, sólo fueron significativas a las 24 horas. A las 0 y 9 horas no hubo recuperación alguna en el medio TCBS (No se muestran regresiones azul y verde). Las pendientes de las 2 rectas de TCBS, sólo fueron significativas a las 24 horas).

Según el INS de Colombia, entre 2010 y 2013 se reportaron en todo el país 334 posibles aislamientos de *V. cholerae*, como se mostró en el informe de Vigilancia fenotípica y genotípica de *Vibrio cholerae*(Instituto Nacional de Salud, Dirección Redes en Salud Pública y Dirección de Investigación en Salud Pública, & Grupo de Microbiología, 2013).

Tan sólo 123 de los 334 fueron identificados como *V. cholerae* utilizando las pruebas bioquímicas establecidas por el INS(Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), 2010). De los 221 cepas no identificadas como *V. cholerae*, los principales interferentes registrados fueron *V. alginolyticus* con el 6,60% y *A. hydrophila* con el 5,70%. Esto evidencia la dificultad de

la correcta identificación bioquímica de *V. cholerae*, que al igual que en la presente investigación, la determinación fenotípica errónea para algunas cepas de *A. hydrophila* se dio en parte a la diversidad bioquímica de éstas.

En pescados, crustáceos y moluscos se ha reportado supervivencia de *Vibrio* spp. incluso de 7 a 14 días en refrigeración (Buller, 2004; Organización Panamericana de la Salud, 1991b). Sin embargo, los pescados y mariscos que llegan cada 8 días a Bogotá, tardan incluso hasta de 10 días en comercializarse desde que se capturan, y en los congeladores de los expendios de Bogotá pueden permanecer incluso hasta 30 días más (Perucho Gómez, 2010). Quizá esta es la razón por la que en estudios relacionados con la detección de *Vibrio* spp. en las costas colombianas si se aíslan bastantes cepas, y por el contrario en el interior del país, debido al transporte y tiempo de congelación, los posibles *Vibrios* que llegasen a estar dentro de una muestra no fuesen cultivables y/o viables (López et al., 2010).

La legislación colombiana es clara respecto a la búsqueda obligatoria de *V. cholerae* en pescados y mariscos, pero el panorama respecto a otras especies del género que pudiesen estar siendo transmitidas por alimentos no es claro. Según la OPS, *V. alginolyticus* en América a pesar de no ser de notificación obligatoria, es uno de los agentes etiológicos de casos esporádicos con cuadros gastrointestinales asociados a la ingestión de productos marinos contaminados, generalmente

crudos o mal cocidos (Gómez-León, Villamil, Lemos, Novoa, & Figueras, 2005; Organización Panamericana de la Salud). En México, la legislación indica que bajo situaciones de emergencia sanitaria, en moluscos bivalvos y crustáceos frescos, refrigerados, congelados y procesados se deberá determinar la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Secretaría de Gobernación de México, 2009). De esta manera, junto con los datos previos del informe de Vigilancia de *Vibrio cholerae* (Instituto Nacional de Salud et al., 2013), valdría la pena puntualizar la importancia de estos patógenos en los alimentos comercializados en Colombia.

El diagnóstico de la enfermedad asociado a *Aeromonas* spp., está ligado a cultivo, aislamiento, identificación, tipificación. Según la OPS, en América sólo es de notificación obligatoria ante la ocurrencia de un brote (González Ayala & Cecchini). Incluso, se ha sugerido que muchos brotes vinculados a *Aeromonas* spp. pueden haber pasado desapercibidos dado que muchas veces no se realiza el adecuado estudio microbiológico (Bravo et al., 2012). Estudios en Colombia como en la Universidad de Pamplona, han mostrado que la prevalencia de *Aeromonas* spp. en pescados frescos es cercana al 75% (Castro-Escarpulli et al., 2002; Suárez & Herrera), pero los datos asociados a la prevalencia de estas bacterias en pescados y mariscos congelados o refrigerados, son aún desconocidos. Así, teniendo como base la prevalencia indirecta de aislamientos de *Aeromonas* spp. según el INS y el conocimiento de la presencia de estos

patógenos en pescados frescos, la recuperación de estas bacterias en los alimentos analizados es congruente con la información previamente reportada.

Aeromonas spp. pueden ser aisladas de pescados y mariscos (Gram et al., 1990; Huss, 1999). En la industria de alimentos congelados, evaluaciones han determinado que *Aeromonas* spp. daña los productos congelados (Suárez Q & Herrera A, 2012), siendo el principal causante del deterioro de salmón crudo empacado en vacío y pescados de aguas tropicales (Gram et al., 1990; Huss, 1999). Si bien las temperaturas óptimas de crecimiento están entre 20°C y 37°C, y la mínima para el desarrollo cepas clínicas es 4°C, se ha demostrado que algunas cepas aisladas de alimentos son psicrófilas (Bravo et al., 2011; Rouf & Rigney, 1971). Ello explicaría la presencia relativamente alta de *Aeromonas* spp. en ostras frente a otros alimentos. Las ostras al venderse refrigeradas y no congeladas, permitirían mayor proliferación de *Aeromonas* spp. posibilitando mayor recuperación de microbiota asociada al alimento.

Se evidenció que el uso de agar Base rojo de fenol con almidón y ampicilina, es una excelente alternativa para el aislamiento de cepas móviles de *Aeromonas* spp. y que particularmente la formulación usada fue apropiada para el objetivo deseado. Esto no es nuevo, y se sabe que formulaciones similares de agares con almidón y ampicilina se han utilizado durante muchos años para la recuperación de estas bacterias (Buchanan & Palumbo, 1985;

Havelaar, During, & Versteegh, 1987; Palumbo et al., 1985).

La combinación de la microbiología clásica, método comercial Crystal Gram negativos™, amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S permiten la detección y caracterización precisa de cepas, dándole robustez a la identificación de los microorganismos. Todos los métodos tienen márgenes de sensibilidad y porcentajes de error inherente, por lo que la integración de técnicas de identificación permite generar una sinergia entre éstas (Janda & Abbott, 2007). Aunque se muestran algunas variaciones entre los resultados obtenidos por los diversos métodos en la identificación de cepas, estos no son porcentualmente altos, por lo que no revelan incongruencia entre las técnicas, como se evidenció utilizando el índice de kappa (κ). Así, las pequeñas discrepancias entre métodos reflejan las fluctuaciones mismas que poseen cada uno de los procesos (Tang et al., 1998).

Cambios metabólicos en los microorganismos con el paso del tiempo sugieren optar por el análisis de genes conservados como herramienta confirmatoria del método de identificación bioquímico (Clarridge, 2004; Janda & Abbott, 2002). Siguiendo esa idea, el uso de la PCR-multiplex para la detección de especies de *Vibrio* mediante el gen *dnaJ*, sería una excelente alternativa para eventuales aislamientos de *Vibrio* spp.

Genes *dnaJ* codifican para una familia de proteínas involucrados en plegamiento y transporte de otras proteínas (co-

chaperonas)(Hunter, Swanson, Haendel, Lyons, & Cross, 1999), además de ayudar en la respuesta celular contra el estrés (proteínas de choque térmico)(Cheetham & Caplan, 1998; Van Asseldonk, Simons, Visser, De Vos, & Simons, 1993). Debido a la naturaleza “housekeeping” de *dnaJ*, su investigación puede llevar a la identificación de patógenos, independientemente de sus fenotipos o serotipos. Algunos genes de virulencia específicos para *Vibrio* spp. se han utilizado para identificar especies en particular (*tdh*, hemolisina de *V. parahaemolyticus*)(Nhung et al., 2007), aunque el análisis de *dnaJ* podría utilizarse para múltiples especies. La PCR-multiplex empleada para *dnaJ* según Nhung, P.H., et al.(Nhung et al., 2007) utiliza una mezcla de 1 cebador “forward” universal para *Vibrio* spp. y 5 “reverse” específicos para especies. No haber incluido el cebador para *V. mimicus* en la mezcla de reactivos pudo haber cambiado la temperatura de anillaje de 60 a 62°C como se evidenció experimentalmente.

Haber identificado 2 cepas como *A. hydrophila* utilizando 2 métodos bioquímicos, y que al realizar secuenciación se determinarían como *Enterobacter* sp. y *Comamonas* sp., refleja como las características fenotípicas entre las cepas dificultan su exacta caracterización mediante los métodos tradicionales. Por ejemplo, *Comamonas* es un género de bacterias Gram negativas heterotróficas con un flagelo polar, que residen en el agua y están asociadas con la exposición a pescados tropicales, características usuales del género *Aeromonas*, razón por la cual su diferenciación no es sencilla(Park, 1962).

Incluso, a nivel clínico la sintomatología es similar. En Taiwán, casos de caracterización errónea del agente etiológico conllevan a una alta probabilidad de mortalidad de la población afectada cuando no se administra la medicina apropiada a los pacientes(Tsui et al., 2011).

Respecto al efecto hemolítico de *Aeromonas* spp., hay pruebas suficientes para sugerir que en este género la hemólisis β no se debe únicamente a la toxina β -hemolítica, sino que deben haber otros factores bacterianos que pueden desestabilizar la membrana de los eritrocitos y consiguen producir los resultados observados en agar sangre, entre ellos metabolitos secundarios que actúen como surfactantes(Ilori et al., 2005). Incluso, se reconoce a *A. hydrophila* como productora de lipasas que pueden alterar la membrana plasmática de eritrocitos(Guerra et al., 2007). La evidencia de especificidad de los cebadores diseñados para *hlyA* sugieren su futura aplicación para la evaluación del potencial virulento de cepas de *A. hydrophila*.

Los resultados mostrados en la Figura 6, tanto en el ensayo de diluciones seriadas partiendo tanto de un inóculo de 10 UFC/mL como 1 UFC/mL, sugieren que *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* pueden utilizarse en conjunto para el modelamiento de condiciones de cultivos no puros. El uso de cultivos mixtos logra simular con mayor precisión condiciones naturales(Adams & Hall, 1988).

La Figura 7 muestra como independientemente del tiempo de pre-

enriquecimiento en TSA se recuperó mayor microbiota que en TCBS, y que de igual manera se aisló más en un alimento inoculado con *Vibrios* que en una muestra sin inocular. La diferencia entre los recuentos registrados en TSA y TCBS, además de ser significativa, en una escala temporal mostró que incluso a las 9 horas de pre-enriquecimiento en TCBS no se registraba ningún crecimiento de *Vibrios*. Este resultado se da enmarcado en la comparación de recuentos en TSA entre la muestra inoculada y la no inoculada, que evidencia que si habían *Vibrios* viables adicionales a la microbiota autóctona del alimento. La comparación entre muestra inoculada y control a las 24 horas en la Figura 7 reflejan una diferencia cercana a 2 Log de más donde se agregó el inóculo de *Vibrios*, validando el uso de TSA como medio control.

La Figura 7 sugiere que el método para el aislamiento de *Vibrio* spp. del protocolo oficial de *V. cholerae* usando agar TCBS, podría llegar a ser demasiado abrasivo. Por esto se puede recomendar no realizar análisis de presencia/ausencia de *Vibrios* con un pre-enriquecimiento menor a 24 horas. La selectividad del medio y concentraciones bacterianas muy bajas en las muestras iniciales podrían llevar a resultados negativos simplemente por no ser cultivables (Breed & Dotterer, 1916; Noonan et al., 2006).

IV- Conclusiones

Dados los aislamientos de *Aeromonas* spp. y la alta presencia de cepas

portadoras del gen *hlyA*, el consumo de pescados y mariscos sin previo tratamiento térmico representa un alto riesgo de infección. *Aeromonas* spp. son agentes etiológicos de diarreas mal diagnosticadas (Vázquez-López et al., 2009), principalmente porque se suele establecer la causalidad de los casos sobre bacterias más comunes, como en Asia donde se ha notificado el aislamiento *Aeromonas* spp. como agente causal de enfermedades diarreicas agudas en cerca del 9% de los casos (Bravo et al., 2012; Figueras, Horneman, Martínez-Murcia, & Guarro, 2007).

Aunque es necesario hacer un análisis más profundo de la relación de *Aeromonas* spp. con síntomas diarreicos, es importante tener presente que este grupo de microorganismos han sido descritos como patógenos emergentes causantes de ETA.

V- Referencias

- Adams, M., & Hall, C. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology*, **23**(3), 287-292.
- Aguilera-Arreola, M. G., Hernández-Rodríguez, C., Zúñiga, G., Figueras, M. J., Garduño, R. A., & Castro-Escarpulli, G. (2007). Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**(7), 877-887. doi: 10.1139/w07-051
- Al-Fatlawy, H., & Al-Ammar, M. (2013). Molecular Study of

Aeromonas hydrophila Isolated from Stool Samples in Najaf (Iraq). *International Journal of Microbiology Research*, ISSN, **5**(1), 363-366.

Bravo, L., Fernández, A., Ledo, J., Ramírez, M., Aguila, A., Núñez, F. A., . . . Cruz, Y. (2011). Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Revista chilena de infectología*, **28**, 159-165.

Bravo, L., Fernández, A., Núñez, F. Á., Rivero, L. A., Ramírez, M., Águila, A., . . . Hernández, J. (2012). *Aeromonas* spp. asociada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudios de casos y controles. *Revista chilena de infectología*, **29**(1), 44-48.

Breed, R. S., & Dotterer, W. (1916). The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. *Journal of Bacteriology*, **1**(3), 321.

Brenner, D., Krieg, N. R., & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). Michigan State University: Springer.

Brower, V. (2011). Vaccination would curb Haitian cholera. 10, from <http://www.nature.com/news/2011/11/0411/full/news.2011.226.html>

Buchanan, R. L., & Palumbo, S. A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: A review. *Journal of Food Safety*, **7**(1), 15-29. doi: 10.1111/j.1745-4565.1985.tb00490.x

Buller, N. B. (2004). *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals : A Practical Identification Manual*. Wallingford, Oxon, GBR: CABI Publishing.

Cahill, M. M. (1990). A Review Virulence factors in motile *Aeromonas*

species. *Journal of Applied Microbiology*, **69**(1), 1-16.

Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M. G., Cerezo, S. G., Hernández-Rodríguez, C. H., Chacón, M. R., Falgás, L. S., . . . Salvat, M. J. F. (2002). El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, **22**(4), 206.

Centers For Disease Control Prevention. (2011). Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. *MMWR*, **60**, 3-4.

Cerda L, J., & Villaruel del P, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista chilena de pediatría*, **79**, 54-58.

Cheetham, M. E., & Caplan, A. J. (1998). Structure, function and evolution of *dnaJ*: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell stress & chaperones*, **3**(1), 28.

Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, **17**(4), 840-862.

Da Silva, M., Rogério Matté, G., Germano, P. M., & Matté, M. H. (2010). Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in São Paulo, Brazil. *Journal of Food Safety*, **30**(1), 94-110. doi: 10.1111/j.1745-4565.2009.00192.x

Daskalov, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, **17**(6), 474-483.

Davies, A. R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G. J. E., & Kirby, R. M. (2001). Incidence of foodborne

pathogens on European fish. *Food Control*, **12**(2), 67-71. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00022-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00022-0)

Dojka, M. A., Harris, J. K., & Pace, N. R. (2000). Expanding the Known Diversity and Environmental Distribution of an Uncultured Phylogenetic Division of Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(4), 1617-1621. doi: 10.1128/aem.66.4.1617-1621.2000

FAO. (2005). Risk Assessment of *Vibrio vulnificus* in Raw Oysters: Interpretative Summary and Technical Report. from <http://www.fao.org/docrep/008/a0252e/a0252e00.htm>

FAO. (2012). Visión general de la legislación acuícola nacional: Colombia. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: Departamento de Pesca y Acuicultura*. from http://www.fao.org/fishery/legalframe/work/nalo_colombia/es

Figueras, M., Horneman, A., Martínez-Murcia, A., & Guarro, J. (2007). Controversial data on the association of *Aeromonas* with diarrhoea in a recent Hong Kong study. *Journal of Medical Microbiology*, **56**(7), 996-998.

Goldberg, D., & Scheiner, S. (1993). ANOVA and ANCOVA: field competition experiments. *Design and analysis of ecological experiments*. Chapman & Hall, New York, 1, 69-93.

Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L., Novoa, B., & Figueras, A. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from Aquacultured Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Larvae Associated with Mass Mortalities. *Applied and Environmental*

Microbiology, **71**(1), 98-104. doi: 10.1128/aem.71.1.98-104.2005

González Ayala, S. E., & Cecchini, D. M. Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Alimentos. from <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroetas/modulo2/modulo2a.html>

Gram, L., Wedell-Neergaard, C., & Huss, H. H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, **10**(3), 303-316.

Guerra, I. M., Fadanelli, R., Figueiró, M., Schreiner, F., Delamare, A. P. L., Wollheim, C., . . . Echeverrigaray, S. (2007). *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**(4), 638-643.

Harmon, K. (2012). Can a vaccine cure Haiti's cholera? , 10, from <http://www.nature.com/news/can-a-vaccine-cure-haiti-s-cholera-1.9802>

Havelaar, A., During, M., & Versteegh, J. (1987). Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *Journal of applied bacteriology*, **62**(3), 279-287.

Hazen, T., Fliermans, C., Hirsch, R., & Esch, G. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**(5), 731-738.

Hunter, P. J., Swanson, B. J., Haendel, M. A., Lyons, G. E., & Cross, J. C. (1999). Mrj encodes a dnaJ-related co-chaperone that is essential

for murine placental development. *Development*, **126**(6), 1247-1258.

Huss, H. H. (1999). *Aseguramiento de la la calidad de los productos pesqueros* (Vol. 334): Food & Agriculture Org.

Ilori, M., Amobi, C., & Odocha, A. (2005). Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, **61**(7), 985-992.

Instituto Nacional de Salud, Dirección Redes en Salud Pública y Dirección de Investigación en Salud Pública, & Grupo de Microbiología. (2013). Vigilancia fenotípica y genotípica de *Vibrio cholerae* 2010 - 2013. from <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/SiteAssets/Paginas/colera/Vigilancia%20C%C3%B3lera%20Colombia%202013.pdf>

Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS). (2010). Instructivo en el diagnóstico bacteriológico de *Vibrio cholerae* pandémico para los laboratorios de salud pública departamentales y distritales. from <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/SiteAssets/Paginas/colera/Instrutivo%20diagnostico%20Colera.pdf>

Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS). (2011a). Protocolo de Vigilancia y Control de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. from <http://www.ipsunipamplona.com/es/images/notas/PDF/ETA.pdf>

Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS). (2011b). Protocolo de Vigilancia y Control del Cólera. from <http://190.26.195.115/saludpublica/Protocolos/COLERA.pdf>

Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS). (2012). Informe del evento cólera, periodo epidemiológico

XIII, Colombia 2011. from <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/C%C3%B3lera%202011.pdf>

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2002). Bacterial identification for publication: when is enough enough? *Journal of clinical microbiology*, **40**(6), 1887-1891.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, **45**(9), 2761-2764.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, **23**(1), 35-73.

Kannan, S., Kanna, P. S., Karkhuzali, K., Chattopadhyay, U., & Pal, D. (2001). Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene. *European review for medical and pharmacological sciences*, **5**, 91-94.

Kaper, J., Seidler, R., Lockman, H., & Colwell, R. (1979). Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**(5), 1023-1026.

Kirov, S. M. (1993). The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **20**(4), 179-198.

Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X

version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(21), 2947-2948.

Ljungh, A., Popoff, M., & Wadstrom, T. (1977). *Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease: detection of enterotoxin and biotyping of strains. *Journal of clinical microbiology*, **6**(2), 96-100.

López, L., Manjarrez, G., Herrera, L., Montes, A., Olascuaga, Y., & Ortega, R. (2010). Estudio piloto para el aislamiento de *Vibrio* spp en la ostras (*Crassostrea rhizophorae*) capturadas en la Ciénaga de la Virgen, Cartagena, Colombia. *Revista Salud Pública y Nutrición*, **11**(1).

Martin-Carnahan, A., & Joseph, S. W. (2005). *Aeromonadales* ord. nov *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 556-587): Springer.

Martínez-Murcia, A., Saavedra, M., Mota, V., Maier, T., Stackebrandt, E., & Cousin, S. (2008). *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**(5), 1169-1175.

Martínez, A. J., Bossio, C. P., Durango, A. C., & Vanegas, M. C. (2007). Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Isolated from Foods. *Journal of Food Protection*, **70**(12), 2843-2846.

Mateos, D., Anguita, J., Naharro, G., & Paniagua, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Microbiology*, **74**(2), 111-118.

Mayor, V. M., Ferrer, C. M. G., Valdés, C. R. C., & Delfino, P. L. (2000). Incidencia de *Aeromonas* spp.

en la provincia de Santiago de Cuba. *Medisan*, **8**(1), 28-32.

Miguel Cisneros-Herreros, J., Cobo-Reinoso, J., Pujol-Rojo, M., Rodríguez-Baño, J., & Salavert-Lletí, M. (2007). Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **25**(2), 111-130.

Ministerio de la Protección Social Grupo de Vigilancia en Salud. (2011). Plan de Contingencia del Sector Salud para la Prevención y Control de Cólera en Colombia. from <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/PLAN%20DE%20CONTINGENCIA%20DEL%20SECTOR%20SALUD%20PARA%20LA%20PREVENCION%20Y%20CONTROL%20DE%20CÓLERA%20EN%20COLOMBIA.pdf>

Ministerio de Salud e Instituto de Salud Pública de Chile. (2008). Manual de Procedimientos Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. from http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_vibrio_paraahaemolyticus_2008.pdf

Ministerio de Salud y Protección Social. (2012). Resolución número 000122 de 2012, por la cual se modifica parcialmente la Resolución número 776 de 2008. from [http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/543bd5fa59bedc3a032579de00526b80/\\$FILE/Resoluci%C3%B3n%20N%C2%B0%200122-2012.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/543bd5fa59bedc3a032579de00526b80/$FILE/Resoluci%C3%B3n%20N%C2%B0%200122-2012.pdf)

Morgan, D. R., & Wood, L. V. (1988). Is *Aeromonas* sp. a foodborne pathogen? Review of the clinical data. *Journal of Food Safety*, **9**(1), 59-72. doi: 10.1111/j.1745-4565.1988.tb00508.x

Nhung, P. H., Ohkusu, K., Miyasaka, J., Sun, X. S., & Ezaki, T. (2007). Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **59**(3), 271-275. doi:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.05.016>

Noonan, J. P., Coop, G., Kudaravalli, S., Smith, D., Krause, J., Alessi, J., . . . Pritchard, J. K. (2006). Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science*, **314**(5802), 1113-1118.

Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos, Módulo 2: *Vibrio* from <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2j.html>

Organización Panamericana de la Salud. (1991a). Riesgos de Transmisión del Cólera por los Alimentos OPS/OMS. Retrieved Octubre 6, 2013, from <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/repind41/Riesgos/Riesgos.html>

Organización Panamericana de la Salud. (1991b). Riesgos de Transmisión del Cólera por los Alimentos OPS/OMS. Retrieved Marzo 6, 2012, from <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/repind41/Riesgos/Riesgos.html>

Palumbo, S. A., Maxino, F., Williams, A. C., Buchanan, R. L., & Thayer, D. W. (1985). Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, **50**(4), 1027-1030.

Park, R. (1962). A study of certain heterotrophic polarly flagellate water bacteria: *Aeromonas Pseudomonas* and *Comamonas*. *Journal of general microbiology*, **27**(1), 121-133.

Perucho Gómez, E. (2010). El Mercado del Pescado en la Ciudad de Bogotá. from http://www.infopesca.org/publicaciones_libre_acceso/Informe-Bogota.pdf

Pollard, D., Johnson, W., Lior, H., Tyler, S., & Rozee, K. (1990). Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, **28**(11), 2477-2481.

R in Ecology and Evolution. (2011). Comparing two regression slopes by means of an ANCOVA. from <http://r-eco-evo.blogspot.com/2011/08/comparing-two-regression-slopes-by.html>

Rapidmicrobiology. (2007). Detection and Identification of *Vibrio* Species in Food. Retrieved Octubre 3, 2013, from <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Vibrios.php>

Richards, G. P., Fay, J. P., Dickens, K. A., Parent, M. A., Soroka, D. S., & Boyd, E. F. (2012). Predatory Bacteria as Natural Modulators of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Seawater and Oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(20), 7455-7466. doi: 10.1128/aem.01594-12

Rodríguez, M., Botero, E., Iregui, C., & Figueroa, J. (2005). *Aeromonas hydrophila* extracelular products extraction and its effects on tilapia roja (*Oreochromis* spp.) and cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Acta Biológica Colombiana*, **10**(2), 75-94.

Roosbehan, A. D., Bakhshi, B., Pourshafie, M.R. & Katouli, M. . (2012). A rapid and reliable species-specific identification of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* using a three-test procedure and *recA* polymerase chain reaction. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **30**(1), 39-43.

Rouf, M., & Rigney, M. M. (1971). Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. *Applied microbiology*, **22**(4), 503-506.

Rozen, S., & Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386): Springer.

Rúgeles, L. C., Bai, J., Martínez, A. J., Vanegas, M. C., & Gómez-Duarte, O. G. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, **138**(3), 282-286. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.034>

Rutherford, A. (2001). *Introducing ANOVA and ANCOVA: a GLM approach*. Sage.

Sarkar, A., Saha, M., Patra, A., & Roy, P. (2012). Characterization of *Aeromonas hydrophila* through RAPD-PCR and SDS-PAGE

Analysis. *Open Journal of Medical Microbiology*, **2**(2), 37-40.

Secretaría de Gobernación de México. (2009). Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba., from http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011

Sim, J., & Wright, C. C. (2005). The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Physical therapy*, **85**(3), 257-268.

Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986a). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2*. Williams & Wilkins.

Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986b). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2*: Williams & Wilkins.

Suárez Q, W., & Herrera A, F. (2012). Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp., aisladas a partir de pescado. *Revista MVZ Córdoba*, **17**, 2846-2851.

Suárez, W., & Herrera, F. (2011). Aislamiento de *Aeromonas* spp. En muestras de pescado fresco comercializado en Pamplona (Norte de Santander). Isolation of *Aeromonas* spp. In fresh fish samples marketed in Pamplona (Norte de Santander). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, **14**(2), 7 - 13.

Subsecretaria de Salud Pública: División de Planificación Sanitaria. (2006). Circular de vigilancia epidemiológica de Brote de *Vibrio parahaemolyticus*. from

<http://epi.minsal.cl/epi/html/normas/circular/Circular%20241%20Vibrio.pdf>

Tang, Y., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Dodge, D. E., & Persing, D. H. (1998). Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, **36**(12), 3674-3679.

Thompson, F., Austin, B. & Swings, J. (2006). *Biology of Vibrios*. Washington, DC, USA: ASM Press.

Thompson, F. L., Lida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**(3), 403-431.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*: Ed. Médica Panamericana.

Tsui, T.-L., Tsao, S.-M., Liu, K.-S., Chen, T.-Y., Wang, Y.-L., Teng, Y.-H., & Lee, Y.-T. (2011). *Comamonas testosteroni* infection in Taiwan: Reported two cases and literature review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **44**(1), 67-71.

Uma, A., Rebecca, G., Meena, S., & Saravanabava, K. (2010). PCR detection of putative aerolysin and hemolysin genes in an *Aeromonas hydrophila* isolate from infected Koi Carp (*Cyprinus carpio*). *Tamilnadu J. Vet. and Animal Sci*, **6**(1), 31-33.

University of Nebraska-Lincoln, A., Julie A.: (2013). *Aeromonas hydrophila*. from <http://food.unl.edu/safety/aeromonas>

Van Asseldonk, M., Simons, A., Visser, H., De Vos, W., & Simons, G. (1993). Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis dnaJ* gene.

Journal of Bacteriology, **175**(6), 1637-1644.

Van Tassell, J., Martin, N., Murphy, S., Wiedmann, M., Boor, K., & Ivy, R. (2012). Evaluation of various selective media for the detection of *Pseudomonas* species in pasteurized milk. *Journal of dairy science*, **95**(3), 1568-1574.

Vanegas-López, M. C., & Martínez-León, A. J. (2011). Serotipificación molecular de cepas colombianas de *Listeria monocytogenes*. *Alimentos Hoy*, **13**(13), 3-9.

Vázquez-López, R., Solano, G., Fernández, P., Barragán, J., Ruy-Díaz, J., & Barrientos, F. (2009). Efecto inmunosupresor en linfocitos humanos de *Aeromonas hydrophila* biotipo 296 aisladas de ostiones en la Ciudad de México. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, **2**.

Wang, G., Clark, C. G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C. K., Kruk, T. M. A. C., . . . Rodgers, F. G. (2003). Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, **41**(3), 1048-1054. doi: 10.1128/jcm.41.3.1048-1054.2003

Xia, C., Ma, Z.-H., Rahman, M. H., & Wu, Z.-G. (2004). PCR cloning and identification of the β -haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. *Aquaculture*, **229**(1), 45-53.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, **13**(1), 134.

Yours, A., Napis, S., Ali, R., Rusul, G., & Radu, S. (2007). Detection of aerolysin and hemolysin genes in *Aeromonas* spp. isolated from environmental and shellfish sources by polymerase chain reaction. *ASEAN Food Journal*, **14**(2), 115-122.

Yücel, N., Balci, & enay. (2010). Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* Species in Fish Used for Human Consumption in Turkey. *Journal of Food Protection*, **73**(2), 380-384.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes (Bogotá, Colombia) por haber colaborado con la financiación del proyecto y a los docentes adscritos a dicha institución: Doctora María Consuelo Vanegas López, por su dirección en los procesos microbiológicos y al Doctor Adolfo Amézquita por el asesoramiento en los tratamientos estadísticos.