

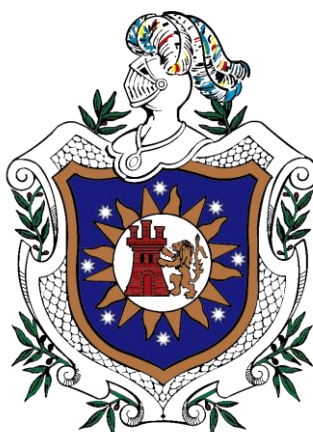
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN- LEÓN**

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Departamento de Microbiología y Parasitología

Centro de Investigación de Enfermedades infecciosas

**Tesis para optar al título de Máster en Ciencias con mención en
Microbiología Médica**



**PCR en tiempo real para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas
superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua,
Febrero-Marzo 2012**

Autor: **Lic. Francisco Enrique Romero Oviedo**
Bioanalista Clínico- Especialista en laboratorio de Salud
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia-Ministerio de Salud

Tutores: **Dra. Mercedes Cáceres, PhD**
Profesora Titular Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médica UNAN-León

Dr. Alcides González Mairena
Máster en Salud Pública, Director General Emérito
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia-Ministerio de Salud

Julio 2013

Esta Tesis es dedicada a mis Padres **Luz Marina y Raúl**, a mi esposa **Edith**, a mis hermanas **Rosa y Lumara**, quienes han estado a mi lado siempre apoyándome en todo...

También dedico esta Tesis a mis tres hijos **Francis, Jesús y Raúl** quienes han sido mi mayor motivación para continuar estudiando y poder llegar a ser un ejemplo de superación para ellos.

AGRADECIMIENTO

Antes de comenzar a mencionar a las personas que hicieron posible esta investigación quisiera en primer lugar dar gracias a **DIOS** por haberme cuidado y protegido todo el tiempo que duraron los estudios y la Tesis de investigación.

Quiero agradecer al Dr. Alcides González (Director Emérito del CNDR) por su amistad y por su apoyo incondicional a lo largo de los 13 años que trabajamos juntos, siendo el Dr. González la persona que me motivó a la mejora continua y a la realización de investigaciones científicas, también agradezco al Lic. Justo Reyes (Director de Microbiología CNDR) por su valioso apoyo para ingresar a la Maestría.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Mercedes Cáceres (Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médica UNAN-León) por haberme guiado en la realización de este manuscrito y por todo el tiempo invertido en la revisión de protocolos de investigación.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los maestros de la facultad de Ciencias Médicas y del CIDS UNAN-León por haberme facilitado sus conocimientos científicos.

También agradezco a la Agencia Sueca de Cooperación Internacional ASDI (Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries) y al Gobierno de Reconciliación y Unidad Nacional de la República de Nicaragua por haberme facilitado la Beca.

Este estudio no hubiese sido posible sin el apoyo del Dr. Carlos Sáenz (Director General de Vigilancia de Salud Pública del MINSA), Ing. Boanerges Castro (Responsable de la unidad de gestión ambiental del MINSA), higienistas sanitarios de cada SILAIS, M.Sc. Carmen Lanuza (Responsable del Departamento de Microbiología de Aguas y Alimentos CNDR), Lic. Suguey Leiva, Ing. Magaly Jiménez, Lic. Isaac Martínez (Especialista en Laboratorio de Salud CNDR), Dr. Angel Balmaceda (Director General CNDR) y Dr. Robert Harvey (TASCA).

OPINION DEL TUTOR

El presente trabajo investigativo contiene información valiosa y de mucha utilidad, mismo que ha sido elaborado con mucho entusiasmo y esfuerzo de su autor, con el propósito de Determinar *Vibrio cholerae* en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua en el periodo comprendido Febrero y Marzo del 2012.

El documento contiene información científica que podrá ser utilizado como una herramienta útil para estudiantes y personas que deseen tener información sobre la última tecnología que el gobierno de Reconciliación y Unidad Nacional ha impulsado para prevención de *Vibrio cholerae* en nuestros país, por lo que reúne requisitos necesarios para ser presentado y defendido por su autor como Tesis para optar al título de Máster en Ciencia con mención en Microbiología Médica.

Como tutor estoy avalando este trabajo, que considero es un valioso aporte científico a la universidad y al país, partiendo de que las informaciones que aquí se presentan provienen de fuentes bibliográficas científicas acerca de la temática abordada, resultados de los análisis de laboratorio y de conclusiones surgidas de la investigación.

Tema:

PCR en tiempo real para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua, Febrero-Marzo 2012

Autor: Lic. Francisco Enrique Romero Oviedo



Tutor: **Dr. Alcides González Mairéna**

(Máster en Salud Pública- Director Emérito CNDR-MINSA)

RESUMEN

El cólera es una enfermedad diarreica causada por *Vibrio cholerae*, un bacilo que se encuentra en ambientes acuáticos. Dos serogrupos O1 y O139 han estado implicados en epidemias a nivel mundial, sin embargo se han reportado cepas pertenecientes a los serogrupos no-O1 y no-O139 con capacidades de producir diarreas en seres humanos. En Nicaragua se controló el cólera a partir del año 2000, a pesar de que no se han reportados nuevos casos el Ministerio de Salud de Nicaragua a través del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia ha mantenido como política oficial la vigilancia de *V. cholerae* en aguas de recreación utilizando una metodología convencional para su detección. En el presente estudio se evaluó la eficacia de un PCR en tiempo real para la detección de *V. cholerae* en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua y también se investigó en los aislamientos de *V. cholerae* la presencia de genes de virulencia asociados a causar diarrea en seres humanos. Los resultados de este estudio descriptivo de corte transversal donde se analizaron 111 muestras de aguas superficiales destinadas a la recreación humana demostraron que la técnica molecular PCR en tiempo real presentó una excelente eficacia con una sensibilidad del 98.4 %, especificidad 86.9 %, valor predictivo positivo 91.4 %, valor predictivo negativo 97.5 %, el límite de detección fue para el gen *toxR* de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml y para el gen *ctxA* $1,0 \times 10^1$ UFC/ml. El 56.7 % de las muestras analizadas resultaron positivas para el aislamiento de *V. cholerae* no-O1/no-O139. Solo 2 muestras (1.8%) resultaron positivas para *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor y no hubo aislamiento de *V. cholerae* O139. Se identificaron 6 perfiles de genes asociados a virulencia y en el 45 % de las muestras se detectó la presencia de uno o dos genes codificadores de toxinas patógenas para el humano, sin embargo de los *V. cholerae* aislado ninguno presentó genes de virulencia relacionados a epidemias como es el caso del gen *ctxA* codificador de la subunidad A de la toxina colérica y el gen de adherencia a las células intestinales *tcpA*. Por lo que los análisis moleculares en este estudio sugieren que los *V. cholerae* aislados en las aguas superficiales destinadas a la recreación humana no son capaces de causar epidemias de cólera en nuestro país.

ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CDC	Centro para control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos
<i>ctxA</i>	Gen que codifica la producción de la sub-unidad A de la toxina colérica
<i>ctxB</i>	Gen que codifica la producción de la sub-unidad B de la toxina colérica
CT	Toxina colérica
Ct	Umbral de ciclo (threshold cycle)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<i>epsM</i>	Gen que codifica la producción de la Proteína de secreción extracelular
FAM	Carboxyfluorescein
LPS	Lipopolisacarido
MGBNFQ	Minor Groove Binding nonfluorogenic Quencher
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
OmpW	Proteína de membrana externa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RTX	Toxina RTX (repeat in toxin)
TCP	Pilus coregulador de toxina
ToxR	Proteína de regulación central
TSA	Tripticasa Soya Agar
TCBS	Tiosulfato Citrato Bilis Sal
Tm	Temperature Melting (Temperatura de fusión)
Zot	Toxina zonula occludens
<i>stn/sto</i>	Gen que codifica la producción de Enterotoxina termo-estable
NAG-ST	Non-agglutinable heat-stable toxin

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
OBJETIVOS.....	7
MARCO TEORICO	
I. Nomenclatura.....	8
II. Genes de virulencia en <i>Vibrio cholerae</i>	11
III. Epidemiología de cólera.....	16
IV. <i>Vibrio cholerae</i> en ambientes acuáticos.....	18
V. Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> en muestras ambientales.....	19
VI. Otras metodologías para la detección de <i>Vibrio cholerae</i>	25
DISEÑO METODOLOGICO.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
LIMITANTES DEL ESTUDIO.....	53
CONCLUSIONES.....	54
RECOMENDACIONES.....	55
REFERENCIAS.....	56
ANEXOS.....	60

INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae es el agente etiológico de una enfermedad diarreica aguda conocida como cólera (1-2), este agente ha sido clasificado en numerosos serogrupos, de los cuales sólo el O1 y el O139 han causado epidemias y pandemias de cólera (3-4). Sin embargo, cepas pertenecientes a los serogrupos no-O1 y no-O139 han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde una diarrea leve hasta la deshidratación grave (4).

La patogénesis de *V. cholerae* epidémico depende de la producción de toxina colérica (CT) y del pilus coregulador de toxina (TCP) las cuales son reguladas por el gen regulador de virulencia *toxR* (2).

Durante el 2009, el número de casos de cólera reportado globalmente aumentó un 16 % comparado con los casos reportados en el 2008 (5). La última epidemia de Cólera surgió en Haití en el 2010 y para el 22 de Enero del 2012 se contabilizaban 527,012 afectados con 7,025 defunciones (6).

Cepas de *Vibrio cholerae* toxigénicas y no toxigénicas persisten en ambientes acuáticos debido a la formación de biopelículas en superficies biológicas y el uso de quitina como fuente de carbono (7).

Muchas epidemias de cólera se han originado a partir de ambientes acuáticos los cuales presentan un ecosistema óptimo para la supervivencia de este agente. Estudios realizados en aguas superficiales procedentes de ríos destinados al consumo y recreación humana han evidenciado la presencia moderada de este agente (8-9).

La metodología convencional estándar para el aislamiento de *Vibrio cholerae* en aguas de recreación es el aislamiento en placa a partir de un pre-enriquecimiento en agua peptonada alcalina sin embargo esta metodología es laboriosa y tarda de 4 a 5 días para brindar un reporte final (10), por otra parte el desarrollo de técnicas moleculares como el PCR en tiempo real permite el monitoreo de este agente en menos de 24 horas (11); además esta técnica molecular también es capaz de detectar la presencia de células viables capaces de

producir patogenia en el humano y que no pueden ser cultivadas por métodos convencionales (1).

En Nicaragua, el cólera es una de las más importantes infecciones intestinales que está bajo control desde el año 2000 en el que se registraron los últimos 12 casos (12), a pesar de que no se han reportados casos de cólera el Ministerio de Salud de Nicaragua a través del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia ha mantenido como política oficial la vigilancia de *V. cholerae* en aguas de recreación utilizando una metodología convencional para su detección, este es un método laborioso que consume tiempo y no favorece el análisis de un mayor número de muestras en el sistema de vigilancia. Estas desventajas hacen necesario contar con una técnica molecular que permita obtener resultados en menor tiempo y que ofrezca alta sensibilidad y especificidad.

ANTECEDENTES

Durante el 2009, el número de casos de cólera reportado globalmente aumentó un 16 % comparado con los casos reportados en el 2008. Un total de 221,226 casos incluyendo 4,946 muertes fueron reportados en 45 países con una tasa de letalidad de 2.24 % (5).

En el 2010, se dieron brotes en Angola, Etiopía, Somalia, Vietnam del Norte y Zimbabue. La mayoría de países afectados reportaron una tasa de letalidad menor del 5 % pero en algunos casos la tasa de letalidad alcanzo el 50 % en poblaciones vulnerables (5).

La última epidemia de Cólera surgió en Haití en el 2010 y para el 22 de Enero del 2012 se contabilizaban 527,012 afectados con 7,025 defunciones y una letalidad del 1.3 % (6).

Mientras ocurría el brote de cólera en Haití en el 2010 Vincent Hill y colaboradores evidenciaron por medio del PCR en tiempo real la presencia de *V. cholerae* productor de toxina colérica en muestra de aguas, ostras, calamares, bivalvos, pescados y cangrejos (13).

Un estudio realizado en aguas superficiales (aguas usadas por residentes para el lavado de utensilios y para tomar) procedentes de un río de la localidad de Mathbaria, Bangladesh en el 2004 reveló una prevalencia del 44 % de *V. cholerae*, el 11 % de las muestras presentaron aislamientos de *V. cholerae* productores de toxina colérica (8).

Wang y colaboradores en el 2008 realizaron un estudio en aguas procedentes del río Pearl de la ciudad Guangzhou- República de China, ellos encontraron una prevalencia de *V. cholerae* del 10 %, estas cepas de *V. cholerae* no presentaban genes para producir toxina colérica (9).

Una gran variedad de técnicas moleculares han sido diseñadas para la detección de *V. cholerae* (toxigénico y no toxigénico) en ambientes acuáticos. Se han propuestos metodologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de genes muy conservados en *V. cholerae* como la Proteína de regulación central ToxR, proteína de membrana externa W (OmpW), de igual forma se han desarrollados metodologías para detectar genes de virulencias necesarios para causar epidemias (*tcpA*, *ctxA* y *ctxB*) y metodologías para detectar serogrupos O1 y O139 (14-18). Estas metodologías moleculares además de ser muy laboriosas y consumidoras de tiempo algunas utilizan kit comerciales de extracción de ADN lo que las convierte en una técnica con un costo un poco elevado (17) y otras utilizan métodos de extracción de ADN muy laboriosos como es el caso del método de cetiltrimetilamonio mas alcohol isopropilico-fenol-cloroformo (16, 19).

Estas desventajas del PCR han llevado a la comunidad científica a desarrollar metodologías moleculares más sensibles como es el caso del PCR en tiempo real. El desarrollo de sondas Taqman ha permitido mayor sensibilidad y capacidad de cuantificar este patógeno en aguas. Se han desarrollado varias metodologías de PCR en tiempo real que incluyen genes muy conservados en *Vibrio cholerae* y con poca variabilidad tanto para la detección de especie (*toxR* y *hlyA*) como para la detección de toxina colérica (*ctxA*) y la detección de serotipos O1 y O139 (11, 18, 20-21).

Katja Koskela y colaboradores en el 2009 desarrollaron un PCR en tiempo real con sondas Taqman para la detección rápida de *V. cholerae* y *V. cholerae* productor de toxina colérica en cultivos puros, este método fue exitosamente validado con cepas de *V. cholerae* en un tiempo de ejecución de 1 horas, al igual contaba con un control interno que demostraba la no inhibición del PCR en tiempo real (20).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la técnica convencional para el aislamiento es laboriosa y se requieren 4 días para brindar un resultado final es necesario evaluar una técnica molecular sensible y específica que sea capaz de detectar *V. cholerae* y *V. cholerae* productor de toxina colérica en muestras de agua de recreación en un tiempo menor de 24 horas, esta evaluación nos permitirá contar con una herramienta que podrá ser usada al momento de tener un brote de cólera en nuestro país y también nos permitirá mejorar la vigilancia de aguas superficiales a nivel nacional.

Actualmente no se han encontrado en nuestro país estudios que demuestren la presencia de genes asociados a virulencia en cepas de *V. cholerae* procedentes de aguas superficiales destinadas a la recreación humana y que puedan causar diarrea en seres humanos. Con la realización de este estudio se conocerá si existe presencia de genes de virulencia en *V. cholerae* procedentes de aguas superficiales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Es la técnica PCR en tiempo real una herramienta eficaz para detectar en menos de 24 horas la presencia de *V. cholerae* en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua?

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar por medio de una técnica molecular la presencia de *V. cholerae* y *V. cholerae* toxigénico en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua, Febrero-Marzo 2012

Objetivos específicos:

1. Estandarizar un PCR en tiempo real para la detección de *Vibrio cholerae* (gen *toxR*) y *V. cholerae* productor de toxina colérica (gen *ctxA*) en aguas superficiales destinada a la recreación humana.
2. Evaluar un PCR en tiempo real como prueba de tamizaje para la detección de *Vibrio cholerae* (gen *toxR*) en aguas superficiales destinada a la recreación humana.
3. Aislar e identificar *V. cholerae* en aguas superficiales destinada a la de recreación humana.
4. Detectar genes asociados a virulencia (*tcpA*, *rtxA*, *zot*, *stn/sto*) y gen regulador (*epsM*) en cepas aisladas de las aguas superficiales destinada a la recreación humana.

MARCO TEORICO

I. Nomenclatura

El agente responsable del cólera fue primeramente descrito en Italia en 1854 por Pacini, este investigador encontró un gran número de bacterias curvas en el intestino de víctimas de cólera a las cuales nombro *Vibrio cholerae*. El descubrimiento inicial fue sobre seguido por el trabajo de Robert Koch, quien estudio cólera en Egipto y demostró en 1883 que el cólera era causado por un organismo con forma de coma. Koch nombro este organismo *Kommabazillen* y subsecuente lo nombro *Vibrio comma* el cual fue usado por muchas décadas hasta que se reconoció el trabajo pionero realizado por Pacini y el nombre fue cambiado a *Vibrio cholerae* (1).

V. cholerae es una especie bien definida en base a pruebas bioquímicas y estudios de ADN. Sin embargo, esta especie no es homogénea con relación a potenciales patogénicos. Especialmente, distinciones importantes dentro de esta especie están hechas en la base a la producción de toxina colérica, serogrupos y potencial para causar epidemias. Existen dos serogrupos O1 y O139 que han sido asociados con brotes epidémicos pero también hay cepas de esos serogrupos que no producen toxina colérica y no son capaces de producir epidemias. Por otra parte existen cepas diferentes a O1 y O139 que son claramente patogénicos ya sea por la producción de toxina colérica o por tener otros factores de virulencia pero estos serogrupos no han sido capaz de causar grandes epidemias. Desde el punto de vista de salud pública en un aislamiento de *V. cholerae* existen dos propiedades críticas para determinar entra la identificación bioquímica de especies de *V. cholerae*, la primera es la propiedad de producir toxina colérica la cual es la responsable de la enfermedad colérica severa en epidemias y forma esporádicas, la segunda propiedad es la posesión del antígeno O1 y O139, los cuales son los determinantes actuales de potencial epidemias o pandemias (1).

***V. cholerae* O1:** *V. cholerae* del serogrupo O1 que produce toxina colérica (CT) ha sido asociado con cólera epidémico y pandémico. Algunos aislamientos no producen CT y no poseen genes que codifican CT. Cepas ambientales son usualmente CT negativas y son consideradas de ser no patogénicas en base a estudios con humanos voluntarios. Sin embargo, cepas de *V. cholera* O1 CT negativas han sido aisladas de casos ocasionales de diarrea y de infecciones extra intestinales. Este serogrupo se subdivide en 3 serotipos Ogawa, Inaba e Hikojima. *V. cholerae* O1 también puede ser dividido en 2 biotipos, Clásico y El Tor. Todas las combinaciones pueden ser encontradas, aislamientos clásicos con Inaba u Ogawa y aislamientos El Tor con Inaba u Ogawa (1).

***V. cholerae* non-O1/non-O139:** las cepas de *V. cholerae* non-O1/non-O139 han sido clasificadas en base al antígeno somático lipopolisacárido (LPS), a la fecha actual existen más de 200 serogrupos de *V. cholerae* (22). La gran mayoría de estas cepas no producen CT y no están asociadas con diarreas epidémicas. Estas cepas son ocasionalmente aisladas de casos de diarrea (usualmente asociadas al consumo de moluscos) y han sido aisladas de una variedad de infecciones extra intestinales incluyendo heridas, infecciones óticas, esputo, orina, y fluidos cerebroespinales. Estas cepas son encontradas regularmente en ambientes acuáticos y las infecciones debido a estas cepas son comúnmente de origen ambiental. Mientras la gran mayoría de estas cepas no producen CT, algunas cepas pueden producir otras toxinas; Sin embargo, para muchas cepas de *V. cholerae* Non-O1/non-O139 aisladas de casos de gastroenteritis, los mecanismos patogénicos son desconocidos aún (1).

***V. cholerae* O139 Bengal:** La simple distinción entre *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* non-O1 fue completamente obsoleta en 1993 cuando apareció el primer reporte de una nueva epidemia emergente de enfermedad colérica severa en el este de la India y Bangladesh. Al principio, el organismo responsable de este brote fue referido como *V. cholerae* non-O1 porque este no aglutinaba con antisero O1. Sin embargo, fuertes investigaciones revelaron que este organismo no pertenecía a los serogrupos O previamente descritos sino que se trataba de una nueva variante y se designó O139 con un sinónimo de Bengal en reconocimiento al origen de donde se aisló esta cepa. En general, este organismo aparenta ser un híbrido de una cepa O1 con una cepa non-O1. En características de virulencia

importante, especialmente, toxina colérica y pilus coregulador de toxina (TCP), *V. cholerae* O139 es indistinguible de *V. cholerae* O1 El Tor. Sin embargo, este organismo no produce el LPS O1 y carece al menos del material genético necesario para la producción del antígeno O1 (1).

II. Genes de virulencia en *Vibrio cholerae*

La principal característica de la patogénesis de cólera está bien establecida. La infección debido a *V. cholerae* comienza con la ingestión de aguas y alimentos contaminados con este microorganismo. Después de pasar a través de la barrera ácida del estómago, el *Vibrio* coloniza el epitelio del intestino delgado por medio del factor TCP. La toxina colérica producida por los *Vibrios* adheridos (y otras toxinas) rompen el transporte de iones de las células del epitelio intestinal lo que con lleva subsecuentemente a la pérdida de agua y electrolitos produciendo diarrea severa característico de cólera (1).

Toxina colérica (CT): La existencia de una toxina responsable de los síntomas del cólera fue primeramente mencionado por Robert Koch, quien en 1884 propuso que el agente responsable del cólera producía un veneno especial el cual actuaba sobre el epitelio intestinal. La existencia de esta toxina hipotética fue demostrada en 1959 por dos grupos de investigadores que trabajaban en la India. Ellos demostraron en conejos el derramamiento de fluido cuando filtrados de cultivos o lisados de *V. cholerae* eran introducidos dentro del tracto intestinal de conejos. Finkelstein y LoSpalluto 10 años después purificaron la toxina y esto permitió que numerosos investigadores descubrieran propiedades fundamentales de esta (1).

La estructura de la CT es caracterizada por 2 grupos de subunidades de toxina las cuales tienen funciones específicas. La subunidad B (compuesta de 5 monómeros de 103 aminoácidos con un peso de 11.6 kDa cada uno, los cuales unidos forman un pentámero) sirve de unión de la toxina al receptor de la célula eucariótica gangliosido G_{M1} [$Gal\beta 1-3GalNAc\beta 1(NeuAc\alpha 2-3)Glc$ -ceramide, donde *Gal* es galactosa, *GalNAc* es N-acetylgalactosamina, *Glc* es glucosa y *NeuAc* es ácido N-acetylneuraminico] y la subunidad A (monómero cuya masa es de 27.2 kDa) posee una función enzimática específica que actúa intracelularmente sobre la adenil ciclase (Enzima mediadora de la transformación de ATP a AMP cíclico), uno de los mas importante sistemas regulatorios de la célula eucariota (1).

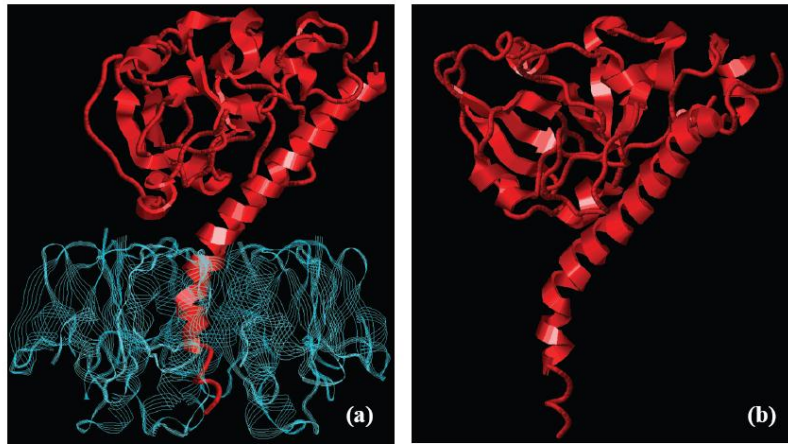


Figura 1: Estructura cristalográfica de la toxina colérica. (a) Subunidad B compuesta de 5 monómero con un peso de 11.6 kDa cada uno, los cuales unidos forman un pentámero (b) Subunidad A monómero cuya masa es de 27.2 kDa. (23)

Pilus coregulador de toxina (TCP): TCP es el único factor de colonización que ha sido probado de tener importancia en la enfermedad en humanos, estudios en voluntarios sanos muestran que la colonización de *V. cholerae* al epitelio intestinal no se logra cuando los genes *tcpA* que codifican el TCP fueron inactivados en una cepa mutante Ogawa 395, los voluntarios no sufrieron de diarrea y ningún *Vibrio* fue recuperado de las heces (1). El factor de colonización (TCP), que confiere la habilidad de colonizar el intestino delgado, actúa además como receptor para el fago *ctxA*, que contiene los genes para la síntesis de CT (24). La proteína estructural de la fimbria TCP está codificada en el gen *tcpA*, que presenta alta variabilidad. Esta hipervariabilidad en la superficie de la bacteria le permite escapar del reconocimiento por el sistema inmune del huésped (25).

Toxina RTX (repeat in toxin): Lin y colaboradores en 1999 identificaron una toxina (que pertenece a la familia RTX de hemolisinas/leucotoxinas) por medio del uso de análisis de secuencia genómica (26). El grupo de genes de la toxina RTX en *V. cholerae* codifica la presuntiva citotoxina (*RtxA*), un acetiltransferasa (*RtxC*) y un sistema de transporte asociado a la unión de ATP (*RtxB*, *RtxD*, 2 proteínas de transporte de toxina), este grupo de genes está físicamente ligada al elemento CTX del genoma de *V. cholerae* pero su actividad es independiente. La presencia del grupo de genes RTX intactos está correlacionado con la expresión de actividad citotóxica sobre células HEp-2 (26-27). Cepas de *V. cholerae* del biotipo Clásico contienen una delección en el gen *rxC* lo cual hace que no exprese la actividad citotóxica (26). ver Figura 2

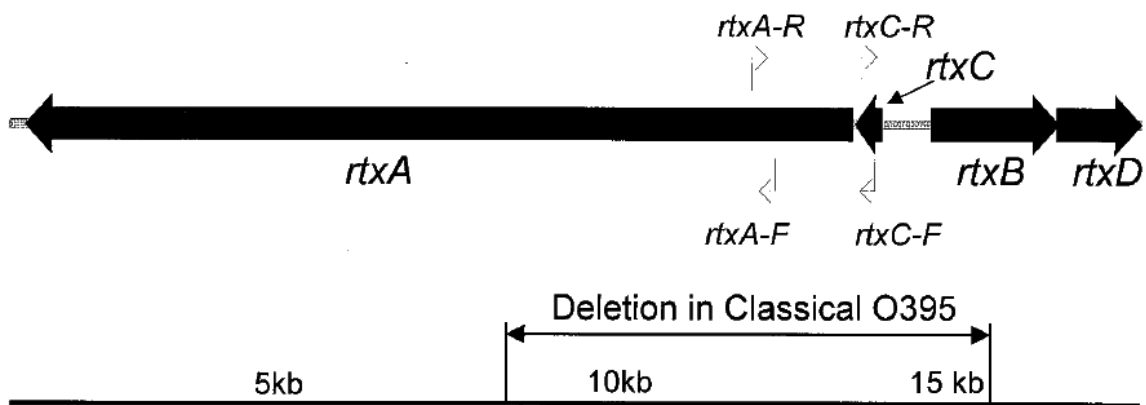


Figura 2. Estructura genómica del elemento de toxina RTX en *V. cholerae* (27).

La toxina RTX también puede contribuir a la reactogenicidad de algunas cepas de *V. cholerae* usada en vacunas. Las cepas tales como JBK70, CVD110, CVD111, y CVD112 mostraron una significativa reactogenicidad en voluntarios, a pesar del hecho de que se les había eliminado parte o la totalidad del elemento central de patogenicidad incluyendo la toxina del cólera y otras toxinas putativas codificadas por el profago CTX. Sin embargo, estas simples deleciones dejaron el grupo de genes RTX intacto en estas cepas causando diarrea moderada en voluntarios sanos (26).

Toxina Zot (toxina zonula occludens): La toxina Zot fue descrita por Fasano y colaboradores en 1991, ellos reportaron que *V. cholerae* producía una toxina que aumentaba la permeabilidad de la mucosa intestinal por afectación de la estructura de la unión estrecha intercelular o zonula occluden (1, 28). Al examinar por microscopía electrónica las uniones estrechas del epitelio, la principal barrera en la vía paracelular, se evidencio que la exposición del tejido ileal con el sobrenadante de *V. cholerae* CVD101 (el cual tenía una deleción del *ctxA*) resultó en el aflojamiento de las uniones estrechas de manera que un marcador denso-electrón pudo impregnar el espacio paracelular. En contraste, el tejido tratado con caldo sin inocular no fue permeable a este marcador. Fasano y colaboradores especularon que, por el aumento de permeabilidad intestinal, la toxina Zot puede causar diarrea por pérdida de agua y electrólitos dentro del lumen bajo la fuerza de presión hidrostática. El gen *zot* consiste de un marco de lectura abierta de 1.3 kb el cual puede potencialmente codificar un polipéptido de 44.8 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína Zot no muestra ninguna homología con otras toxinas bacterianas (1).

Enterotoxina termo-estable (NAG-ST Non-agglutinable heat-stable toxin): *V. cholerae* No-O1/No-O139 al igual que *V. cholerae* O1 (no muy frecuente) pueden producir una enterotoxina termo-estable de 17 aminoácidos la cual está muy relacionada con la toxina termo-estable producida por *Escherichia coli* enteropatógena. Los genes que codifican la enterotoxina termo-estable en *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* No-O1/No-O139 están flanqueados por repeticiones directas de 123 pb, lo que sugiere que esta toxina ha sido introducida dentro de *V. cholerae* por medio de un transposón (1). Resultados de un estudio en voluntarios sanos demostraron que, además de la producción de NAG-ST, la virulencia de *V. cholerae* No-O1/No-O139 dependía de la habilidad de colonizar el intestino (29).

Proteína reguladora ToxR: La regulación y expresión de genes para el crecimiento y sobrevivencia depende de la proteína reguladora ToxR, coordinadamente regulada por un mecanismo que envuelve 3 componentes conocidos: ToxR, ToxS y ToxT. La proteína ToxR, una proteína transmembrana de 32 kDa, es el regulador máster y su expresión depende de condiciones de crecimiento ambientales (temperatura de incubación, pH, osmolaridad, sales biliares, tensión de oxígeno, presión hidrostática y composición de aminoácidos del medio). El gen *toxR* codifica un activador transcripcional que controla la expresión del gen de la toxina colérica (*ctxA*), la biogénesis de (TCP) Pilus coregulador de toxina (gen *tcpA*), la expresión de proteína de membrana externa (gen *ompU*) y al menos 17 genes distintos (28). Este gen está bien distribuido en cepas de *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139 y *V. cholerae* no-O1/no-O139 (20) por lo que lo convierte en un excelente marcador de referencia para *V. cholerae*. La importancia de la proteína ToxR en la enfermedad humana fue demostrada por Herrington y colaboradores en 1988, ellos alimentaron a voluntarios sanos con *V. cholerae* 395 el cual tenía una mutación en el gen *toxR*, ningún voluntario sufrió síntomas de diarrea y el microorganismo no pudo ser cultivado a partir de la heces fecales (1).

Proteína de secreción extracelular: El gen *epsM* codifica una proteína de superficie la cual ha demostrado ser esencial para la función de la vía secretora general de *V. cholerae*, esta es responsable de la secreción de proteínas incluyendo enterotoxinas, proteasas y quitinasas. El gen de la proteína de secreción extracelular *epsM* fue usado por Kong y colaboradores en 2002 como un identificador de *V. cholerae* en un ensayo de PCR hexaplex que distinguió 6 tipos de patógenos bacterianos en aguas marinas (30). Por lo que también lo convierte en un excelente marcador de referencia para *V. cholerae*.

III. Epidemiología de cólera

El *Vibrio* responsable de la séptima pandemia de cólera es conocido como *V. cholerae* O1, biotipo El Tor. Esta pandemia comenzó en 1961 en Célebes, Indonesia. La enfermedad luego se esparció rápidamente a otros países del Este de Asia y alcanzó Bangladesh en 1963, la India en 1964, la Unión Soviética, Irán e Iraq entre 1965-1966. En 1970 el cólera invadió África Oeste (el cual no había tenido experiencia con esta enfermedad por más de 100 años) la enfermedad se esparció rápidamente a varios países africanos y se volvió endémico en ese continente. En 1991 el cólera afectó Latino América y se expandió rápidamente en el continente afectando en un año 11 países entre ellos Nicaragua. Hasta 1992 solo el *V. cholerae* serogrupo O1 producía epidemias de cólera, otros serogrupos podían causar casos esporádicos de diarrea pero no una epidemia de cólera. En 1993 un gran brote de cólera comenzó en la India y Bangladesh, el cual fue causado por un serotipo no reconocido de *V. cholerae* designado O139 Bengal (31).

En total 948,429 casos de cólera fueron notificados a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), entre enero de 1991 y diciembre de 1993, por los países latinoamericanos afectados por la epidemia. Las incidencias anuales más altas se registraron en el Perú (1991 y 1992) y Guatemala (1993) y la tasa de letalidad para todo el trienio fue de 0,8 %. La incidencia de cólera mostró una tendencia descendente en la mayor parte de los países sudamericanos, pero aumentó en casi todos los países de Centroamérica (32).

Los esfuerzos regionales, liderados por la OPS/OMS, para controlar la epidemia y mitigar su impacto se concentraron en el fortalecimiento de los servicios de salud, la ampliación y mejoramiento de sistemas de desinfección del agua, control sanitario de aguas servidas, la ampliación de los sistemas de vigilancia, la mejora de los niveles de educación sanitaria y la abogacía para la inversión en infraestructura sanitaria (12).

Hacia 1997 se había logrado reducir su magnitud, al punto que se reportaban aproximadamente 4% de los casos iniciales. El carácter endémico que el cólera parecía haber adquirido se manifestaba en brotes ocasionales que mostraban la persistencia de la

vulnerabilidad, sin embargo, en el tiempo transcurrido las condiciones sanitarias apenas se habían mejorado en el área de Centroamérica (12).

En 1998, el precario equilibrio entre las condiciones de salud de la población y el ambiente, se deterioró repentinamente con la manifestación de dos mega eventos climáticos: el fenómeno de “El niño” y el huracán Mitch, que amenazaban con revertir la tendencia descendente del cólera y añadir al enorme impacto social y económico del desastre sanitario. El 6 de diciembre de 1998 los ministros de salud de Centroamérica se comprometieron a fortalecer los programas nacionales para prevenir y controlar el cólera en sus países (12).

Durante el 2009, el número de casos de cólera reportado globalmente aumentó un 16 % comparado con los casos reportados en el 2008. Un total de 221,226 casos incluyendo 4,946 muertes fueron reportados en 45 países con una tasa de letalidad de 2.24 % (5).

En el 2010, se dieron brotes en Angola, Etiopía, Somalia, Vietnam del Norte y Zimbabue. La mayoría de países afectados reportaron una tasa de letalidad menor del 5 % pero en algunos casos la tasa de letalidad alcanzo el 50 % en poblaciones vulnerables (5).

La última epidemia de Cólera surgió en Haití en el 2010 y para el 22 de Enero del 2012 se contabilizaban 527,012 afectados con 7,025 defunciones y una letalidad global del 1.3 % (6).

IV. *Vibrio cholerae* en ambientes acuáticos

Tradicionalmente, el agua se considera como el vehículo más importante para la transmisión del cólera. Hacia 1860, después de los estudios de John Snow y otros investigadores, quedó claro que las fuentes de agua contaminadas con aguas residuales, como sistemas municipales de abastecimiento de agua, ríos, arroyos ó pozos eran la principal vía de transmisión de la enfermedad. El contacto con alimentos contaminados puede también propagar el cólera, aunque los alimentos mas asociados son los pescados y mariscos. En una epidemia, generalmente el agua y los alimentos se contaminan con cepas de *V. cholerae* procedentes de heces humanas. Así, por muchos años se creyó que el único reservorio de *V. cholerae* era el intestino humano y que la supervivencia del microorganismo en el ambiente era limitada. Sin embargo, durante los últimos 20 años, investigaciones efectuadas en Australia y en los Estados Unidos han demostrado que cepas de *V. cholerae* no toxigénicas y productoras de toxina pueden formar parte del ecosistema acuático de manera natural. Estos datos apoyan la idea de que las cepas toxigénicas y no toxigénicas de *V. cholerae* pueden tener un reservorio ambiental, el cual tendría repercusiones importantes en relación con los esfuerzos para combatir y erradicar el cólera (10).

Al igual que otros miembros de la familia *Vibrionaceae*, *V. cholerae* puede sobrevivir por períodos prolongados en ambientes acuáticos, y muchos lo consideran como una especie nativa de aguas salobres y de estuarios. Diversos factores biológicos y fisicoquímicos, como el contenido de nutrientes, la salinidad, la temperatura y el pH, pueden influir en la multiplicación, supervivencia y distribución de *V. cholerae* en los ambientes acuáticos. El tiempo de supervivencia de *V. cholerae* en el agua puede ir desde horas hasta meses. La capacidad de *V. cholerae* para producir quitinasa puede también ayudarlo a sobrevivir en estuarios donde abundan el plancton y otras especies marinas constituidas en parte por quitina. *V. cholera* 01 logro sobrevivir en diversas especies de plancton recogidas en Bangladesh, donde el cólera es endémico. Otras biotas acuáticas, como los jacintos de agua de Bangladesh, también se colonizan con *V. cholerae* y favorecen su multiplicación (10).

V. Aislamiento de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales

La selección del método de aislamiento depende del tipo de muestra que se va a cultivar. Las muestras procedentes de aguas marinas y de estuarios pueden contener muchas otras especies de *Vibrio* que crecen igual que *V. cholerae* en el agua peptonada alcalina y en el Agar TCBS. Estas muestras se diluyen para reducir el número de microorganismos competidores. La incubación en agua peptonada alcalina a una temperatura elevada (42 °C) inhibe el crecimiento de algunos microorganismos competidores, particularmente otros vibriones que no se multiplican bien a esa temperatura. Por lo tanto, puede facilitarse el aislamiento de *V. cholerae* a partir de muestras de agua de estuario o de mar debido a que los competidores principales se inhiben a esa temperatura. Si los recursos de laboratorio lo permiten, es aconsejable preparar duplicados de las diluciones e incubarlos a 42 °C. Al contrario, las muestras provenientes de agua dulce o de aguas residuales, que contienen menos vibriones y microorganismos semejantes a estos, generalmente no requieren dilución ni incubación a 42 °C antes de cultivarse (10).

Todas las muestras de agua se recogerán en recipientes estériles y se transportarán refrigeradas al laboratorio para evitar el calentamiento. Por lo general, cuanto más grande es la muestra de agua, mayores son las probabilidades de aislar *V. cholerae*. La selección del método de aislamiento dependerá del tipo de muestra de agua que se va a cultivar, y de la salinidad de la fuente de agua, que será el factor decisivo. Por ejemplo, el agua de lastre de un barco, una fuente demostrada de *V. cholerae*, debe cultivarse por el mismo método que el agua de mar (10).

Técnica de cultivo directo: Se agregan 450 ml de agua a 50 ml de agua peptonada alcalina concentrada 10x. Un método alternativo consiste en hacer una dilución de 10^{-1} de la muestra en agua peptonada alcalina 1 x (por ejemplo, 10 ml de agua en 90 ml de agua peptonada alcalina). El último método es particularmente útil para las muestras muy contaminadas. Si se cultivan muestras de agua de estuario o de mar, se deben hacer dos diluciones (decimal) adicionales en agua peptonada alcalina para obtener diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} . Se pueden hacer diluciones adicionales hasta 10^{-6} si se desea enumerarlas. Se

incubaban todas las diluciones a una temperatura de 35 °C a 37 °C y se siembran al cabo de 6 a 8 horas en agar TCBS. Si los recursos del laboratorio lo permiten, se prepara un duplicado de las diluciones para incubarlos a 42 °C. Cuando se cultivan muestras de agua dulce, quizás no sean necesarias las diluciones ulteriores ni la incubación a 42 °C para favorecer el aislamiento, ya que el numero de microorganismos competidores (en particular *Vibrio spp.*) tal vez sea considerablemente menor que en las aguas marinas o de estuario (10).

Técnica del filtro de membrana: La técnica del filtro de membrana es más apropiada para el agua clara que no contiene detritus ni cieno. Si se utiliza para agua turbia, puede necesitarse un agente clarificante, filtro o prefiltro para eliminar partículas suspendidas. Se filtran 100 a 300 ml de la muestra de agua (o una cantidad mayor si es posible) a través de un filtro de membrana de 0,22 a 0,45 µm. Se coloca el filtro en 100 ml de agua peptonada alcalina en un matraz. Se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C por 6 a 8 horas y se siembra en Agar TCBS. Si lo permiten los recursos del laboratorio, se prepara una muestra duplicada para incubarla a 42 °C. De manera alternativa, el filtro puede colocarse directamente en la superficie de una placa de Agar no selectivo), incubarse por 3 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C, transferirse a una placa de Agar de TCBS y, por último, incubarse durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Si se cultivan muestras de aguas marinas o de estuario, hay que filtrar muestras de agua más pequeñas o diluirlas adecuadamente colocando los filtros en volúmenes mayores de agua peptonada alcalina (10).

Técnica Hisopo de Moore: Se puede utilizar el hisopo de Moore para el muestreo de agua y de aguas residuales, pero solo es ventajoso para usarse en ríos y fuentes de agua en movimiento; no ofrece ventaja alguna sobre otros métodos de muestreo de fuentes de agua estacionaria. Como se hace con las aguas residuales, el hisopo de Moore debe dejarse en el sitio de muestreo durante 24 a 48 horas (10).

Identificación de *V. cholerae*: Los miembros del genero *Vibrio* son bacilos gran negativos curvos o rectos, anaerobios facultativos y móviles. Los vibriones pueden requerir NaCl o que su crecimiento se estimule por la adición de este. Todos los miembros del genero

Vibrio, con excepción de *V. metschnikovii* y *V. gazogenes*, son oxidasa positivos y reducen los nitratos a nitritos. La familia *Vibrionaceae* incluye muchas especies, que en su mayor parte son habitantes normales del ambiente acuático. La identificación mínima de *V. cholerae* O1 y O139 solo requiere la confirmación serológica de la presencia de antígenos del serotipo O1 y O139 en los aislamientos sospechosos. Sin embargo, puede ser necesaria una caracterización más completa del microorganismo que incluya diversas pruebas bioquímicas así como la determinación de otras características como la producción de toxina del cólera, biotipificación, subtipificación molecular y sensibilidad a los antimicrobianos. Estas pruebas solo se deben realizar en un número limitado de aislamientos (33).

Identificación serológica de *V. cholerae* O1 y O139: La confirmación para la identificación de *V. cholerae* O1 y O139 es la aglutinación en antiseros polivalentes contra los antígenos O1 y O139 (1). Aunque para el tratamiento del cólera no es necesario identificar el serogrupo y el serotipo de los aislamientos de *V. cholerae*, esta información puede ser de importancia en epidemiología y en salud pública (33).

Serotipos de *V. cholerae* O1: Los aislamientos del serogrupo O1 de *V. cholerae* se han subdividido en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima (muy raro). La identificación del serotipo se basa en la aglutinación con antiseros dirigidos contra antígenos tipo específicos O. La identificación de estos antígenos es válida solamente con aislamientos de serogrupos O1. Por esta razón, los antiseros Inaba y Ogawa nunca deben usarse con cepas que son negativas frente a los antiseros polivalentes O1. Los aislamientos que aglutinan débil o lentamente con los antiseros del serogrupo O1 pero no aglutinan con los antiseros Inaba ni Ogawa no se consideran del serogrupo O1 (33).

Tabla 1 Serotipos de *V. cholerae* serogrupo O1

Serotipo	Principales factores O presentes	Aglutinación en suero	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A,C	-	+
Hikojima	A,B,C	+	+

Identificación Bioquímica *V. cholerae*: Debido a que la confirmación de *V. cholerae* O1 y O139 requieren tan solo la identificación de los antígenos del serotipo O1 y O139 por aglutinación en lámina, la confirmación bioquímica rara vez es necesaria. En la tabla 2 se presenta una breve lista de pruebas bioquímicas que se pueden utilizar para confirmar aislamientos de *V. cholerae*. Si los resultados de las pruebas con un aislamiento son los mismos que se muestran en la tabla 2, la identificación del aislamiento se confirma como *V. cholerae* (33).

Prueba de oxidasa: La prueba de la oxidasa se lleva a cabo con colonias aisladas recientemente en Agar no selectivo que no contenga carbohidratos. No se utilizaran colonias aisladas en Agar TCBS. Se colocan dos o tres gotas del reactivo de oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina al 1%) sobre un pedazo de papel filtro. Se extiende el cultivo sobre el papel húmedo con un aplicador de madera o un palillo de dientes estéril. En una reacción positiva, el cultivo bacteriano se torna morado oscuro en 10 segundos (33).

Prueba de hilo mucoide: La prueba de la hebra o hilo mucoide se puede realizar en un portaobjeto, donde se suspenden colonias (obtenidas por cultivo durante 18 a 24 horas en Agar de infusión de corazón u otro medio no inhibitorio) en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%. Si el resultado es positivo, las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato, con lo cual la suspensión perderá turbidez y el DNA liberado de las células lisadas ocasionara que la mezcla se haga viscosa. Al retirar lentamente de la suspensión el asa, se forma un "hilo" mucoide. La mayor parte de los vibrones son positivos, en tanto que las cepas de *Aeromonas* suelen ser negativas (33).

Agar hierro de Kigler o Agar hierro de tres azúcares: El Agar hierro de Kligler (KIA) y el Agar hierro de tres azúcares (TSI) son medios selectivos que contienen carbohidratos y son de uso general en la microbiología de diagnóstico. Aunque se usan de modo parecido, contienen distintos carbohidratos. Las reacciones de *V. cholerae* en KIA, que contiene glucosa y lactosa, son similares a las de los miembros de la familia Enterobacteriaceae que no fermentan la lactosa (K/A, y no producen gas ni H₂S). El medio TSI, que contiene sacarosa además de glucosa y lactosa, presenta reacciones de A/A y no produce gas ni H₂S (33).

Reacciones de descarboxilasa: Los caldos para las pruebas de Arginina, Lisina y Ornitina, modificados por la adición del 1% de NaCl, se inoculan ligeramente a partir de un cultivo recién obtenido, luego se agrega una capa superficial de 4 a 5 mm de espesor de aceite mineral estéril. Se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C y se lee a las 24 horas. Cuando se utilizan como indicadores el púrpura de bromocresol y el rojo de cresol, una reacción alcalina (positiva) da color morado, en tanto que una reacción negativa o ácida se indica por un color amarillo (33).

V. cholerae es típicamente positivo para la descarboxilación de la lisina y de la ornitina, en tanto que otras especies de *Vibrio* son negativas y las *Aeromonas* dan reacciones variables (33).

V. cholerae es típicamente negativo para la dihidrólisis de la arginina, en tanto que *Aeromonas*, *Plesiomonas* y ciertas especies de *Vibrio* son positivos (33).

Tabla 2 Características bioquímicas de aislamientos típicos de *V. cholerae*

Prueba	% Positivo
Oxidasa	100
Hilo mucoide	100
Agar hierro de Kligler	K/A, sin gas, H ₂ S -
Agar hierro de tres azucares	A/A, sin gas, H ₂ S -
Glucosa ^a (Producción de ácido)	100
Glucosa (Producción de gas)	0
Sacarosa	100
Lisina ^a	99
Arginina ^a	0
Ornitina ^a	99
Crecimiento en 0 % de NaCl ^b	100
Crecimiento en 1 % de NaCl ^b	100
Voges-Proskauer	75 ^c

Nota: K/A: alcalinidad/acidez; A/A: acidez/acidez

^aModificada mediante la adición de 1 % de NaCl; ^bBase de caldo nutritivo; ^cLa mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* serotipo O1, biotipo El Tor, dan positiva la prueba de Voges-Proskauer, mientras que las cepas del biotipo Clásico la dan negativa.(33)

VI. Otras metodologías para la detección de *Vibrio cholerae*

Existe una gran variedad de metodologías alternas para la detección de *V. cholerae*, se han estandarizados muchas técnicas de biología molecular para la detección de este patógeno en fuentes acuáticas.

Pruebas inmuno enzimáticas: Urmil Tuteja y colaboradores en el 2007 diseñaron un ELISA sándwich para la detección de *V. cholerae* y *V. cholerae* productor de toxina colérica, ellos usaron anticuerpos monoclonales contra la proteína de membrana externa W (OmpW) y contra la sub-unidad B de la toxina colérica, los resultados de esta prueba fueron idénticos a los observados con el método convencional y con el método molecular PCR (34). La desventaja de esta técnica es que se necesita clonar, expresar y purificar las proteínas recombinantes que serán usadas para la producción de anticuerpos monoclonales el cual con lleva un proceso muy laborioso y costoso para laboratorios de países en vía de desarrollo.

Pruebas moleculares: Una gran variedad de técnicas moleculares han sido diseñadas para la detección de *V. cholerae* y *V. cholerae* productor de toxina colérica en ambientes acuáticos. Se han propuestos metodologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de genes muy conservados en *V. cholerae* como la Proteína de regulación central ToxR, proteína de membrana externa W (OmpW), de igual forma se han desarrollados metodologías para detectar genes de virulencias relacionados a epidemias (*tcpA*, *ctxA* y *ctxB*) y metodologías para detectar serogrupos O1 y O139 (14-18). Estas metodologías moleculares además de ser muy laboriosas y consumidoras de tiempo algunas utilizan kit comerciales de extracción de ADN lo que las convierte en una técnica con un costo un poco elevado (17) y otras utilizan métodos de extracción de ADN muy laboriosos como es el caso del método de cetiltrimetilamonio mas alcohol isopropilico-fenol-cloroformo (16, 19).

Estas desventajas del PCR han llevado a la comunidad científica a desarrollar metodologías moléculas más sensibles y menos costosas como es el caso del PCR en tiempo real. El desarrollo de sondas Taqman ha permitido mayor sensibilidad y capacidad de cuantificar este patógeno en aguas. Se han desarrollado varias metodologías de PCR en tiempo real que incluyen genes muy conservados en *Vibrio cholerae* y con poca variabilidad tanto para la detección de especie (*toxR* y *hlyA*) como para la detección de toxina colérica (*ctxA*) y la detección de serotipos O1 y O139 (11, 18, 20-21).

W.J Lyon en el 2001 desarrollo un PCR en tiempo real con sondas Taqman para la detección rápida de *V. cholerae* en cultivos puros, ostras crudas y agua de mar sintética, aunque el método obtuvo una muy buena sensibilidad y un tiempo de ejecución de 3 horas este no contaba con un control interno que demostrara la no inhibición del PCR ni brindaba una alternativa para saber si el *V. cholerae* presente era toxigénico o no toxigénico (21).

Aneta Gubala y David Proll en el 2006 desarrollaron un PCR en tiempo real utilizando sondas molecular beacon para la detección rápida de genes de virulencia de *V. cholerae* en agua, aunque el método obtuvo una muy buena sensibilidad y un tiempo de ejecución de 2 horas este no contaba con un control interno que demostrara la no inhibición del PCR ni brindaba una alternativa para saber si el *V. cholerae* presente era portador de toxina colérica (35).

George M. Blackstone y colaboradores en el 2006 desarrollaron un PCR en tiempo real para la detección rápida de *V. cholerae* productor de toxina colérica, este método demostró una alta sensibilidad, alta especificidad, un tiempo de ejecución de 2 horas y contaba con un control interno que demostraba la no inhibición del PCR, la debilidad de este método es que se limitaba a la determinación solo de toxina colérica y no ha determinar la presencia de *V. cholerae* no toxigénico (11).

Jianwei Huang y colaboradores en el 2009 desarrollaron un PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman para la detección rápida de *V. cholerae* en agua (Este método detecta la presencia de *V. cholerae* y *V. cholerae* productor de toxina colérica y detecta los serogrupos

O1 y O139), aunque el método obtuvo una muy buena sensibilidad y un tiempo de ejecución de 2 horas este no contaba con un control interno que demostrara la no inhibición del PCR (36).

Katja Koskela y colaboradores en el 2009 desarrollaron un PCR en tiempo real con sondas taqman para la detección rápida de *V. cholerae* y *V. cholerae* productor de toxina colérica en cultivos puros, este método fue exitosamente validado con cepas de *V. cholerae* en un tiempo de ejecución de 1 horas, al igual contaba con un control interno que demostraba la no inhibición del PCR (20).

Principios Básicos del PCR en tiempo real: Una sola copia de una secuencia específica puede ser amplificada y detectada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción del PCR genera exponencialmente copias de un molde de ADN, esto resulta en una relación cuantitativa entre la cantidad de una secuencia diana inicial y la cantidad de producto de PCR acumulado en cualquier ciclo particular. Debido a inhibidores de la reacción de la polimerasa encontrado en la muestra, limitación de reactivo o acumulación de moléculas de pirofosfato, la reacción de PCR eventualmente deja de generar amplificación a un ritmo exponencial (Fase Plateau) haciendo la cuantificación de punto final del PCR no fiables. Por lo tanto, reacciones duplicadas pueden generar cantidades variables de producto de PCR, sólo durante la fase exponencial de la reacción del PCR es posible extrapolar a fin de determinar la cantidad de secuencia de ADN inicial. La medición de los productos de PCR a medida que se acumulan (PCR en tiempo Real) permiten la cuantificación en la fase exponencial de la reacción y por lo tanto elimina la variabilidad asociada con la PCR convencional (37).

El PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una enzima ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sonda de oligonucleótidos doblemente marcadas que, en un termociclador que albergue sensores para medir

fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real. En muchos casos el molde que se emplea para la PCR en tiempo real no es desde el principio ADN, sino que puede ser ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por reverso-transcripción de ácido ribonucleico (ARN); en este caso, la técnica es una RT-PCR en tiempo real (37).

Los resultados de la PCR en tiempo real se visualizan mediante curvas de amplificación. Durante la fase exponencial produce un aumento exponencial de la fluorescencia que se corresponde con un aumento de la cantidad de producto amplificado. El valor umbral es un nivel de fluorescencia a partir del cual la señal fluorescente alcanza un valor por encima del ruido de fondo, y el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral se conoce como ciclo umbral o Ct (threshold cycle). Se considera que la amplificación es positiva si la curva de amplificación sobrepasa ese umbral, y que es negativa si la curva se mantiene por debajo (37).

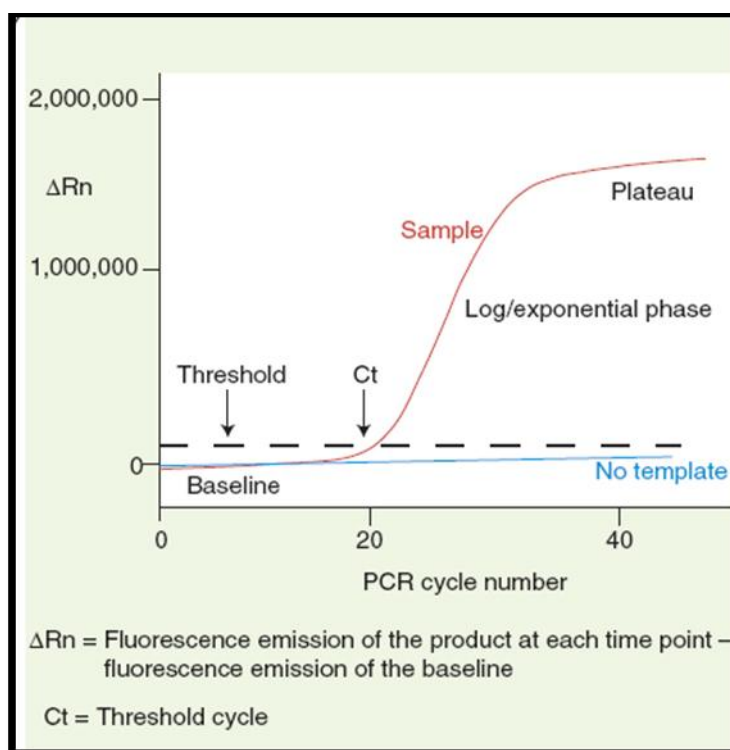


Figura 3. Modelo de un gráfico de amplificación único que ilustra la nomenclatura comúnmente utilizada en PCR en tiempo real (37).

El PCR en tiempo real se ha usado en diversos números de aplicaciones incluyendo expresión de ARNm, medición del número de copias de ADN genómico o ADN viral, ensayos de discriminación alélica, análisis de expresión de variantes genéticas y detección de patógenos.

La introducción de sondas de hidrolisis (**TaqMan**) doblemente marcadas permitió la eliminación del proceso Post-PCR. La sonda tiene un reportero fluorescente en la posición 5' y un apagador unido al extremo terminal 3'. Mientras la sonda se encuentre intacta, la proximidad del apagador disminuye la fluorescencia del reportero. Una señal de fluorescencia es emitida solamente cuando la sonda es cortada o separada por la enzima polimerasa este fenómeno se conoce como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés) (37).

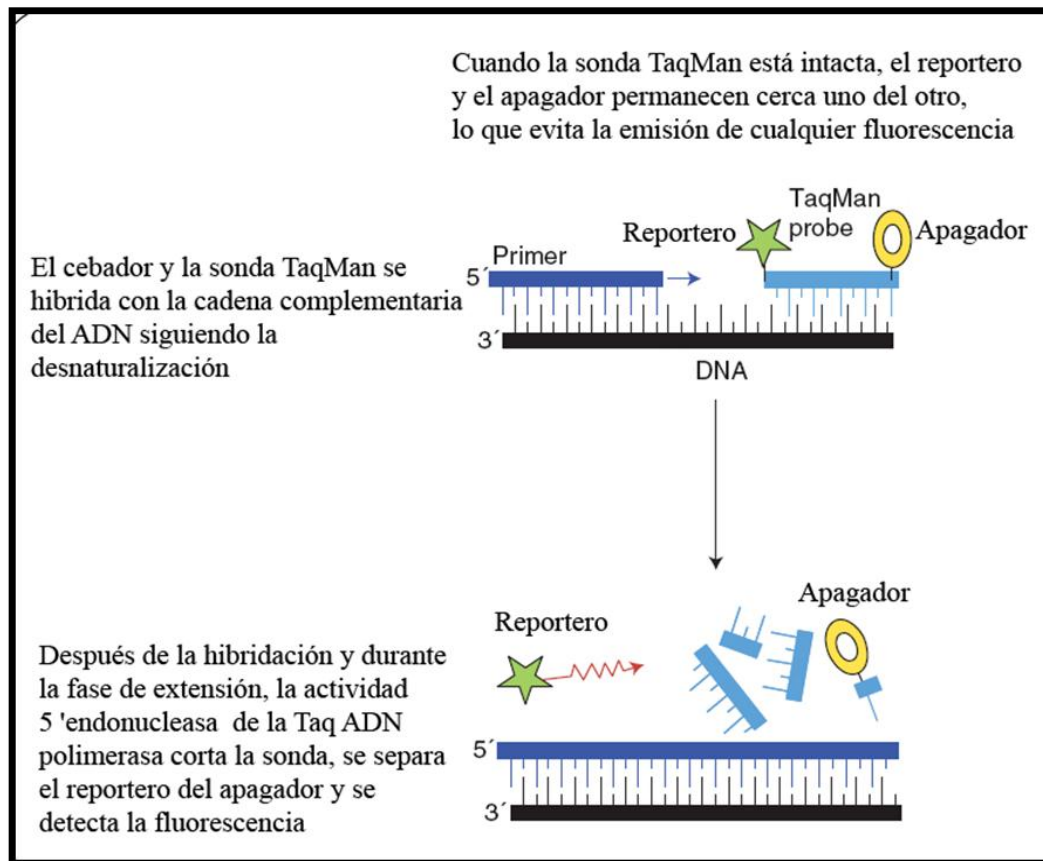


Figura 4. Sondas de hidrolisis (TaqMan) (37).

Agente intercalante del ADN de doble cadena (**SYBR Green**) utilizado como medio de visualización directa de los productos del PCR en tiempo real. Esta molécula se introduce en la estructura de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleídos que lo forman, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. El complejo resultante ADN-SYBR Green presenta el pico de absorción en $\lambda = 498$ nm y el pico de emisión en $\lambda = 522$ nm (correspondiente a la zona verde del espectro, de ahí su nombre). Las mediciones de fluorescencia se realizan al final de la etapa de elongación de cada ciclo del PCR para monitorear el aumento de la cantidad de ADN amplificado. La ventaja de esta técnica es que su costo es barato, también se puede utilizar con cualquier par de primers para cualquier diana. Sin embargo, como la presencia de cualquier ADN de doble cadena genera fluorescencia, la especificidad de este ensayo es considerablemente disminuida debido a la amplificación de productos de PCR no específicos y a dímeros de primers. La generación y comparación de curvas de disociación (trazado de fluorescencia como función de la temperatura) es un método para aumentar la especificidad de la reacción. Un pico de fusión característico en la temperatura de fusión (T_m) del amplicón se distinguirá de los artefactos de amplificación que se fundan a temperaturas más bajas (37).

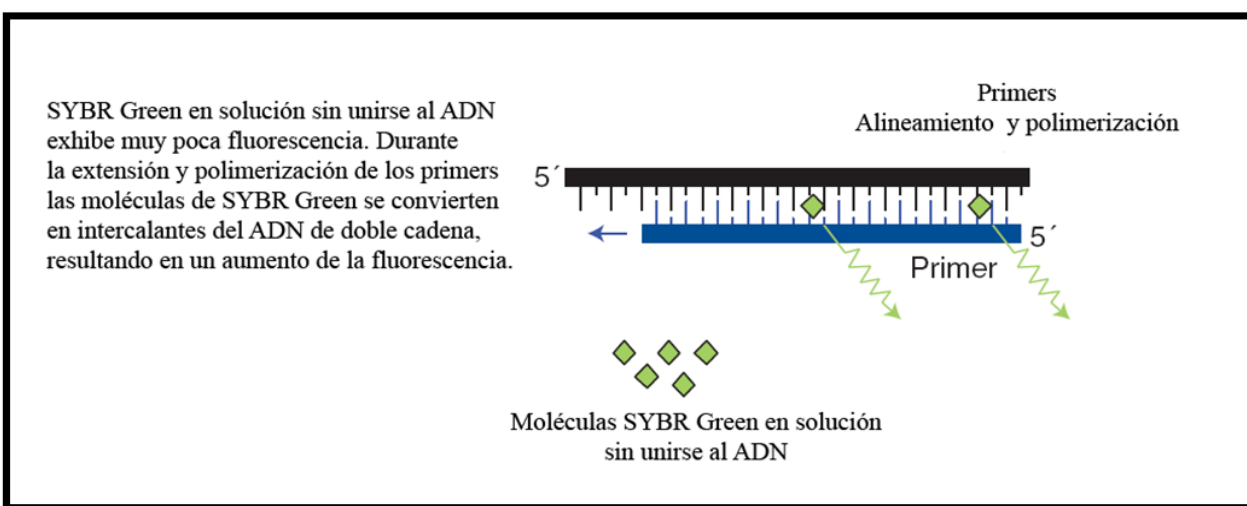


Figura 5. Agente intercalante de ADN de doble cadena SYBR Green (37).

DISEÑO METODOLOGICO

Area de estudio: El estudio se realizó en los principales balnearios públicos de Nicaragua.

Período de estudio: El estudio se realizó entre Febrero y Marzo del 2012

Tipo de estudio: Descriptivo de corte transversal y evaluación de prueba.

Muestra de estudio: Se analizaron 111 muestras de aguas superficiales destinadas a la recreación humana, procedentes de los principales balnearios públicos de Nicaragua (Boaco 4, Carazo 5, Chinandega 10, Chontales 7, Estelí 9, Granada 16, Jinotega 10, León 7, Madriz 5, Managua 3, Masaya 14, Matagalpa 3, Nueva Segovia 5, Región Autónoma Atlántico Sur 8, Rivas 5). Los sitios de recolección de las muestras fueron seleccionados por cada Sistema Local de Atención Integral en Salud (SILAIS) del país, priorizando los lugares donde frecuentan más los veraneantes.

Criterios de inclusión: Muestras de aguas superficiales destinadas a la recreación humana como aguas de ríos, lagos, lagunas y aguas de mar.

Criterios de exclusión: No se incluyeron aguas procedentes de piscinas.

El tipo de muestreo fue por conveniencia, las muestras de aguas fueron recolectadas (por higienistas sanitarios de cada SILAIS) a 5 metros de la playa de cada lugar, el volumen de agua recolectada fue aproximadamente 2 litros por cada sitio de muestreo, estas muestras se remitieron en termos con refrigerantes (temperatura ente 4 °C y 8 °C) al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia donde se realizaron los análisis para búsqueda de *V. cholerae*.

Recopilación de datos: Para cada muestra se adjuntó una hoja de remisión la cual fue llenada por un oficial de la Dirección de Vigilancia epidemiológica del MINSA, la información solicitada fue: Procedencia, Lugar de muestreo, Tipo de agua superficial (dulce o salada), hora de recolección, coordenadas de sistema de posicionamiento global (GPS), entre otras.

Cepas de *V. cholerae* para el control del PCR en tiempo real: Para la realización de este estudio fueron usadas tres cepas productoras de toxina colérica facilitadas por el Departamento de Bacteriología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud y una cepa no productora de toxina colérica de origen ambiental. Estas bacterias fueron cultivadas individualmente en agua peptonada alcalina al 1% por 24 horas a 35 ± 1 °C, luego se dispensó 1 ml de cada cultivo en diferentes viales y fueron sometidos a 99 °C por 10 minutos (Eppendorf Thermomixer® confort), se centrifugó por 5 minutos a 8000 g (Eppendorf Centrifuge 5424) y el sobrenadante fue usado para la realización del PCR en tiempo real.

Tabla 3. Cepas de *V. cholerae* para control del PCR en tiempo real

Cepas controles	<i>toxR</i>	<i>ctxA</i>	<i>epsM</i>	<i>rtxA</i>	<i>rtxC</i>	<i>zot</i>	<i>stn/sto</i>	<i>tcpA</i> El Tor	<i>tcpA</i> clasico
<i>V. cholerae</i> O1 Inaba El Tor	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa Clásico	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>V. cholerae</i> O139 El Tor	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa El Tor	+	-	+	+	+	-	+	-	-

PCR en tiempo real como prueba de tamizaje de *V. cholerae* en aguas superficiales:

Koskela y colaboradores 2009 (20) diseñaron un PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman para la detección de gen *toxR* (gen codificador de la proteína de activación transcripcional de la toxina del cólera presente en *V. cholerae*) y el gen *ctxA* (gen codificador de la subunidad A de la toxina de cólera presente solo en cepas productoras de toxina colérica), este protocolo fue exitosamente validado en 63 cepas de *V. cholerae* y 8 cepas de *Vibrios* no cholerae.

Para la estandarización del PCR en tiempo real descrito por Koskela y colaboradores se usaron 4 cepas de referencia ATCC como controles Negativos (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Estas bacterias fueron cultivadas individualmente en caldo infusión cerebro corazón por 24 horas a 35 ± 1 °C, luego se dispensó 1 ml de cada cultivo en diferentes viales y fueron sometidos a 99 °C por 10 minutos (Eppendorf

Thermomixer® confort), se centrifugó por 5 minutos 8000 g (Eppendorf Centrifuge 5424) y el sobrenadante fue usado para la realización del PCR en tiempo real.

La cepa control *V. cholerae* O1 Inaba El Tor fue cultivada por 24 horas a 35 ± 1 °C en agua peptonada alcalina al 1%, luego se realizaron diluciones decimales 10^{-1} hasta 10^{-9} , se dispensó 1 ml de cada cultivo en diferentes viales y fueron sometidos a 99 °C por 10 minutos (Eppendorf Thermomixer® confort), se centrifugó por 5 minutos a 8000 g (Eppendorf Centrifuge 5424) y el sobrenadante fue usado para determinar el límite de detección del PCR en tiempo real. Las tres últimas diluciones fueron sembradas por triplicado en Agar TSA+ NaCl 1% y se incubaron por 24 horas a 35 ± 1 °C, por último se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de cada dilución y se calculó el promedio de cada una (11, 20).

Extracción del ADN en muestras de aguas de recreación: a cada muestra de agua dulce se le realizó 2 extracciones de ADN, 2 alícuotas de 1 ml de la muestra pre enriquecida en agua peptonada alcalina al 10 % incubada a 35 ± 2 °C por 7 ± 1 hr y 21 ± 3 hr fueron sometidas a 99 °C por 10 minutos (Eppendorf Thermomixer® confort) , se centrifugó por 5 minutos a 8000 g (Eppendorf Centrifuge 5424) y el sobrenadante fue usado para la realización del PCR en tiempo real (11, 38). Muestra de aguas de origen marino las 2 alícuotas de 1 ml de la muestra pre enriquecida en agua peptonada alcalina al 10 % incubada a 42 ± 0.5 °C por 7 ± 1 hr y 21 ± 3 hr fueron procesadas con el kit comercial Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal siguiendo especificaciones del fabricante (39-40) ver Anexo 1.

El PCR en tiempo real se realizó siguiendo las recomendaciones de Koskela y colaboradores con unas pequeñas variantes, se utilizó el equipo 7500 Fast Applied Biosystems con un volumen total (mezcla de reacción) de 10 µl, Ver anexo 2 y 3 para el volumen y concentración de cada uno de los componentes de la reacción. Los parámetros de termociclado fueron 5 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de, 15 segundo a 95 °C y 1 minuto a 60 °C, las sondas *toxR* y *ctxA* fueron leídas en el canal FAM (530 nm), el control interno fue leído en el canal VIC (554 nm). Las muestras fueron consideradas positivas si sobrepasaban un ΔRn de 0.1 y presentaban una curva eficiente (20).

Tabla 4. Especificaciones de los primer para detectar los genes *toxR* y *ctxA*

Primer	Secuencia 5`- 3`	Tamaño del amplicon
<i>toxR</i>		
<i>toxR</i> Foward	TGGCATCGTTAGGGTTAGCAA	68 pb
<i>toxR</i> Reverse	CATTCACAGCCCTGAAGTTTCA	
Sonda <i>toxR</i> probe	FAM -CGTAAGGTTATGTTTTCC- MGBNFQ	
<i>ctxA</i>		
<i>ctxA</i> Foward	ACTCACTCTGTCCTCTTGGCATAA	67 pb
<i>ctxA</i> Reverse	GCAGATTCTAGACCTCCTGATGAAAT	
Sonda <i>ctxA</i> probe	FAM -ACCACCTGACTGCTT- MGBNFQ	
FAM: Carboxyfluorescein MGBNFQ: minor groove binding nonfluorogenic quencher pb = pares de bases		

Aislamiento de *V. cholerae* en aguas de recreación: Las aguas de recreación fueron procesadas siguiendo la normativa del Centro para control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos (CDC) (10, 33). Se agregaron 450 ml de agua superficial (Dulce o Salada) a 50 ml de agua peptonada alcalina al 10 %, luego se incubaron las aguas dulces a 36 ± 1 °C y las aguas saladas a 42 ± 0.5 °C . Después de 7 ± 1 hr y 21 ± 3 hr fueron sembradas en placas de Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sal) posteriormente fueron incubadas durante 21 ± 3 hr a una temperatura de 36 ± 1 °C (10). A partir de los Agares TCBS de 7 ± 1 hr y 21 ± 3 hr se seleccionaron 8 colonias características (amarillas planas de 2-4 mm) y fueron subcultivadas en línea recta en placas de Agar T₁N₀ (1 % de tripticasa y 0 % de NaCl) y Agar T₁N₁ (1 % de tripticasa y 1 % de NaCl) después se incubaron durante 21 horas ± 3 hr a una temperatura de 36 ± 1 °C. A partir de las placas T₁N₁ se realizaron las pruebas con antisueros polivalentes contra *V. cholerae* O1 y O139, también se realizaron pruebas comprobadas como útiles para excluir microorganismos diferentes de *V. cholerae* como son: descarboxilación de arginina, descarboxilación de lisina, descarboxilación de ornitina, prueba del cordón (hilo mucoide), oxidasa y Agar hierro de tres azúcares (TSI) (33).

PCR en tiempo real para la detección de genes de virulencia (*tcpA*, *rtxA*, *zot*, *stn/sto*) y gen regulador (*epsM*): Por cada muestra positiva de *V. cholerae* se seleccionaron 8 colonias del Agar T₁N₁ para el análisis molecular de genes de virulencia y gen regulador, se utilizò SYBR Green como agente intercalante emisor de fluorescencia.

Extracción de ADN para análisis moleculares: Se seleccionaron 8 colonias de *V. cholerae* a partir del Agar T₁N₁ y se suspendieron en 1 ml de buffer TE 1x, luego fueron sometidas a 99 °C por 10 minutos (Eppendorf Thermomixer® confort), se dejó enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 8000 g (Eppendorf Centrifuge 5424), el sobrenadante fue usado para la realización del PCR en tiempo real.

Para la detección de los genes *rtxA* y *epsM* se realizó siguiendo las recomendaciones de Gubala 2005 con unas pequeñas variantes, se utilizó el reactivo iQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad) y el equipo 7500 Fast Applied Biosystems con un volumen total (mezcla de reacción) de 10 µl para cada gen. Ver anexo 4 y 5 para el volumen y concentración de cada uno de los componentes de la reacción. Los parámetros de termociclado para ambos fueron 5 minutos a 95 °C; seguido por 35 ciclos de 3 pasos que consistían de, 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C (30).

La señal de fluorescencia fue medida al final de cada paso de extensión a través del canal SYBR (530 nm). Al final de la amplificación del producto, se realizó análisis de temperatura de fusión (Melting temperature T_m) por medio de la reducción de la temperatura a 60 °C y luego calentamiento hasta 95 °C a una tasa de 0.2 °C/s; la fluorescencia fue monitoreada continuamente, los picos T_m fueron calculados basado en la curva de fluorescencia inicial negativa (F/T) por el trazado de la derivada negativa de la fluorescencia sobre la temperatura versus temperatura (-dF/dT versus T) (30). Para conocer el rango de variabilidad de la temperatura de fusión se utilizaron 10 valores del control positivo a los cuales se les calculó el promedio y +/- 2 desviaciones estándar.

Tabla 5. Especificaciones de los primer para detectar los genes *rtxA* y *epsM*

Primer	Secuencia 5`-3`	Tamaño del amplicon Temperatura de disociación
<i>rtxA</i>		
<i>rtx</i> -AV1F Foward	AGCAAGAGCATTGTTGTTTCCTACC	120 pb
<i>rtx</i> -AV1R Reverse	ACTTCCCTGTACCGCACTTAGAC	TM: 83.02 +/- 0.55
<i>epsM</i>		
<i>epsM</i> -V3F Foward	TGGTTGATCGCTTGGCGCATC	145 pb
<i>epsM</i> -V3R Reverse	ATGGCAGCCTTTGAGTGAG	TM: 85.45 +/- 0.47

pb = pares de bases TM: Temperature Melting o Temperatura de disociación

Detección de los genes *tcpA*, *zot*, *stn/sto*: Rivera y colaboradores detectaron en el 2001 genes de virulencia en *V. cholerae* aislados del ambiente utilizando un PCR de punto final (28), debido a que el PCR de punto final es más laborioso y utiliza bromuro de Etidio se decidió usar los primers y las temperaturas recomendadas por Rivera 2001 para la realización del PCR real time. Se utilizó el reactivo iQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad) y el equipo 7500 Fast Applied Biosystems con un volumen total (mezcla de reacción) de 20 µl para cada gen. Ver anexo 6,7 y 8 para el volumen y concentración de cada uno de los componentes de la reacción.

Para los genes *tcpA* y *zot* los parámetros de termociclado fueron 5 minutos a 95 °C; seguido por 35 ciclos de 3 pasos que consistía de, 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundo a 72 °C. Para el gen *stn/sto* los parámetros de termociclado fueron 5 minutos a 95 °C; seguido por 35 ciclos de 3 pasos que consistía de, 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C.

La señal de fluorescencia fue medida al final de cada paso de extensión a través del canal SYBR (530 nm). Al final de la amplificación del producto, se realizo análisis de temperatura de fusión (Melting temperature Tm) por medio de la reducción de la temperatura a 60 °C y luego calentamiento hasta 95 °C a una tasa de 0.2 °C/s; la fluorescencia fue monitoreada continuamente, los picos Tm fueron calculados basado en la curva de fluorescencia inicial negativa (F/T) por el trazado de la derivada negativa de la

fluorescencia sobre la temperatura versus temperatura ($-dF/dT$ versus T). Para conocer el rango de variabilidad de la temperatura de fusión se utilizaron 10 valores del control positivo a los cuales se les calculó el promedio y ± 2 desviaciones estándar. El producto del PCR en tiempo real fue separado por electroforesis en gel de agarosa (Ultra Pura-Invitrogen) al 1.4 % por 60 minutos a 110 voltios usando buffer TBE 1X, las bandas de ADN fueron visualizadas y fotografiadas bajo luz ultra violeta después de haber sido teñido con bromuro de Etidio, se usó un marcador molecular de 100 pb (TrackIt-Life Technologies).

Tabla 6. Especificaciones de los primer para detectar los genes *tcpA*, *zot* y *stn/sto*

Primer	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del amplicon Temperatura de disociación
<i>tcpA</i>		
<i>tcpA</i> -72F Foward	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	451 pb
<i>tcpA</i> -477R Reverse	CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG	TM: 84.23 $\pm$ 0.5
<i>El Tor</i>		
<i>tcpA</i> -647R Reverse	TTACCAAATGCAACGCCGAATG	620 pb
<i>Clásico</i>		
<i>zot</i>		
<i>zot</i> -225F Foward	TCGCTTAACGATGGCGCGTTTT	947 pb
<i>zot</i> -1129R Reverse	AACCCCGTTTCACTTCTACCCA	TM: 86.01 $\pm$ 0.4
<i>stn/sto</i>		
<i>stn/sto</i> -67F Foward	TCGCATTTAGCCAAACAGTAGAAA	172 pb
<i>stn/sto</i> -194R Reverse	GCTGGATTGCAACATATTTTCGC	TM: 79.1 $\pm$ 0.3

pb = pares de bases TM: Temperature Melting o Temperatura de disociación

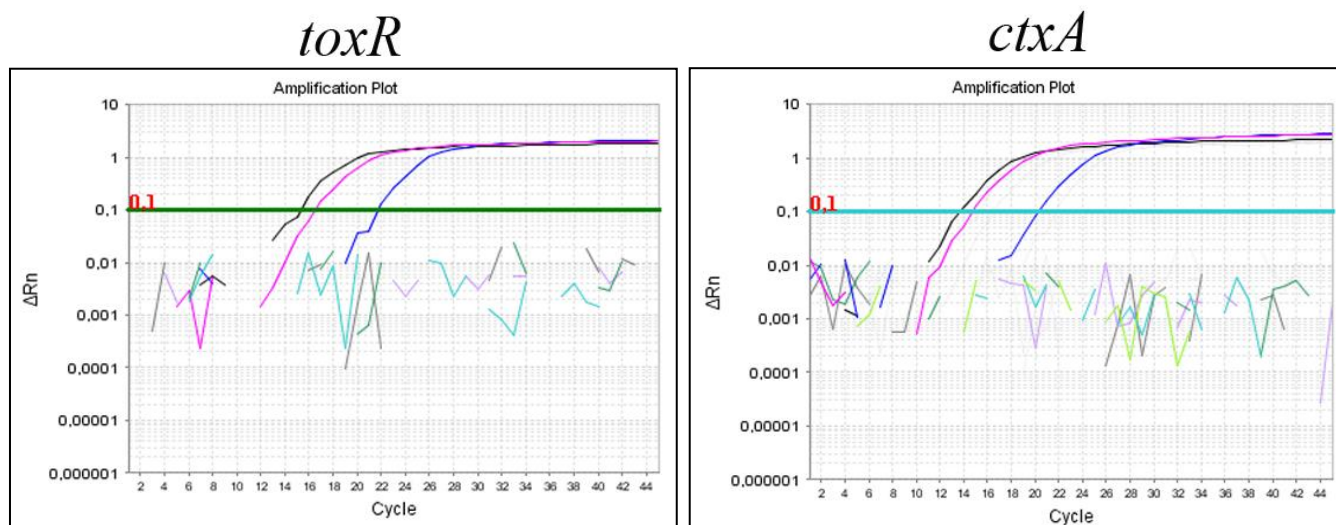
Análisis de la información: La eficacia del PCR en tiempo real como prueba de tamizaje se realizó en comparación con los resultados obtenidos por el método convencional y se calculó usando el software Epidat 3.1 los siguientes parámetros: Sensibilidad, Especificidad, índice Kappa, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo. Las variables del estudio se analizaron usando el software Epi Info versión 3.5.1 Software gratuito (Trademark of the Centers for Disease Control and Prevention-CDC)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PCR en tiempo real como prueba de tamizaje de *V. cholerae* en aguas superficiales:

Estandarización: Se logro estandarizar el PCR en tiempo real a un tiempo de ejecución de 1 hora con 40 minutos, fue imposible obtener resultados satisfactorios en un tiempo menor a este, esto pudo deberse a que se usó una súper-mezcla de otra casa comercial (Roche) cuyo costo fue muchos más económico que la mezcla universal de Applied Biosystem recomendada por Koskela y colaboradores (usando la súper-mezcla de la casa comercial Roche se ahorro 2.4 dólares por muestra). La amplificación de los genes *toxR* y *ctxA* en cepas controles positivas de *V. cholerae* fue exitosa y no hubo amplificación con cepas controles negativas.

Grafico 1: Cepas controles para la detección de los genes *toxR* y *ctxA* por PCR en tiempo real



Controles positivos

Vibrio cholerae O1 Ogawa classico

Vibrio cholerae O1 Inaba El Tor

Vibrio cholerae O139 El Tor

Controles negativos

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Escherichia coli ATCC 25922

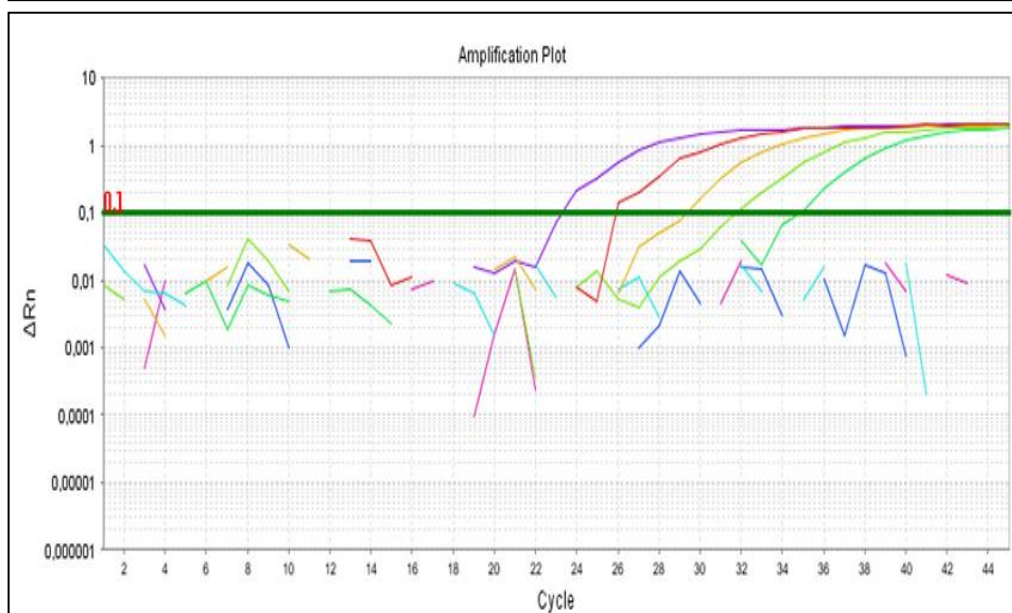
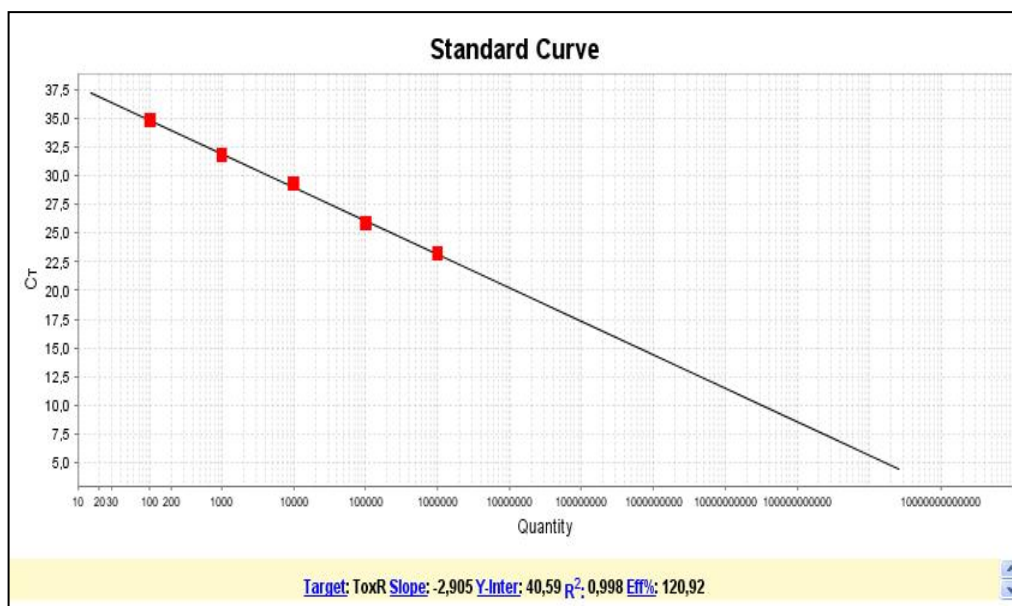
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Para determinar el límite de detección se usó una cepa toxica de *V. cholerae* O1 Inaba, los resultados fueron para el gen *toxR* de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml y para el gen *ctxA* $1,0 \times 10^1$ UFC/ml, estos datos fueron muy similares a los datos publicados por Koskela y colaboradores.

Grafico 2: Limite de detección de *V. cholerae*, por PCR en tiempo real para el gen *toxR*

Target: ToxR Slope: -2,905 Y-Inter: 40,59 R^2 : 0,998 Eff%: 120,92

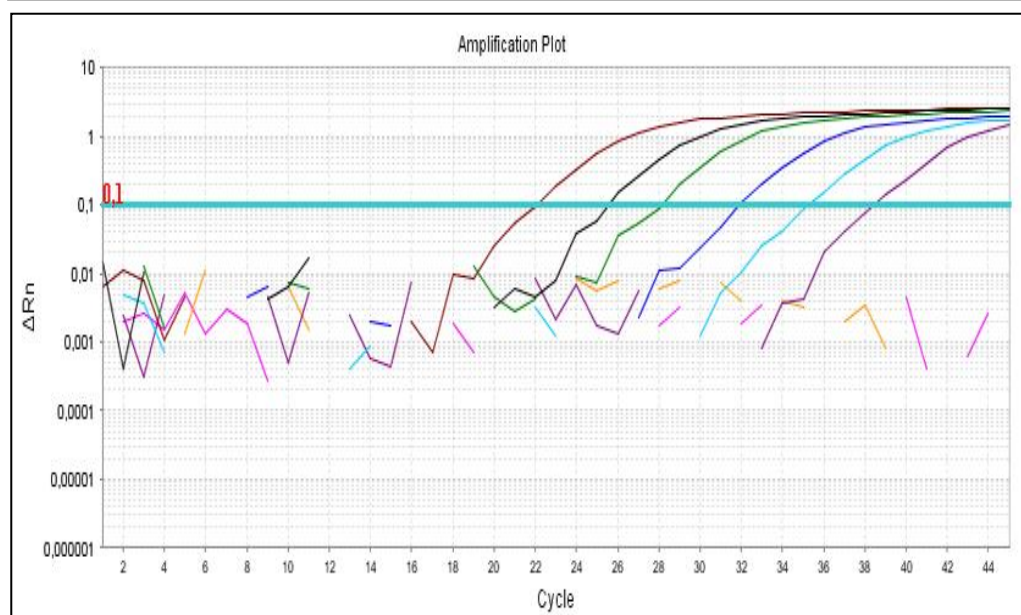
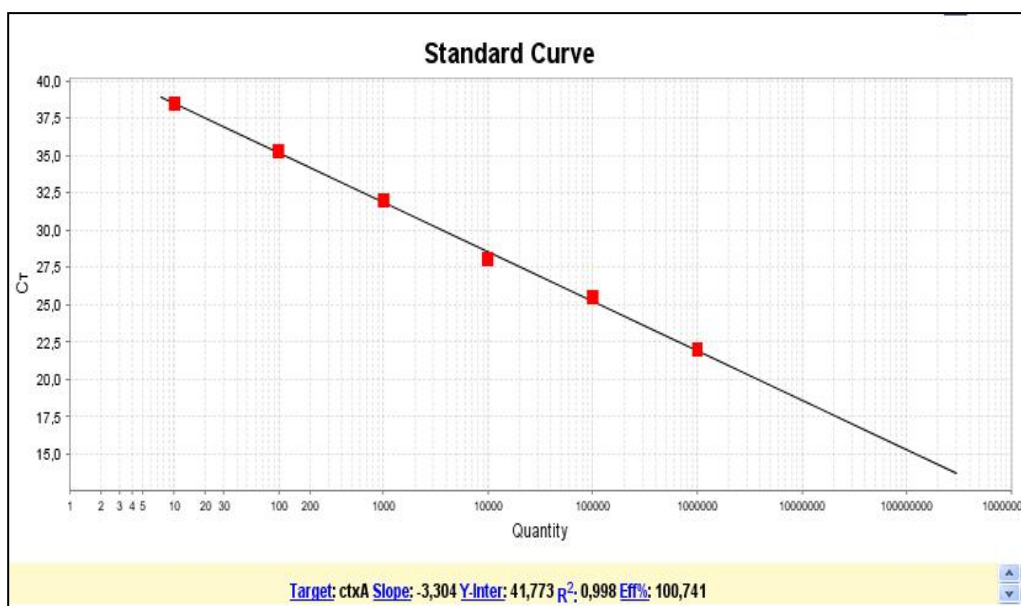


Estándares de *Vibrio cholerae* O1 Inaba El Tor

	2	3	4	5	6	7	8	Control Negativo
UFC/ml	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	1	-----
Ct <i>toxR</i>	23,17	25,90	29,27	31,74	34,77	-----	-----	-----

Grafico 3: Limite de detección de *V. cholerae*, por PCR en tiempo real para el gen *ctxA*

Target: ctxA Slope: -3,304 Y-Inter: 41,773 R^2 : 0,998 Eff%: 100,741



Estándares de *Vibrio cholerae* O1 Inaba El Tor

	2	3	4	5	6	7	8	Control Negativo
UFC/ml	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	1	-----
Ct ctxA	22,04	25,47	28,01	31,95	35,30	38,89	-----	-----

Evaluación: El gen *toxR* es el codificador de la proteína de activación transcripcional de la toxina del cólera presente en *V. cholerae* tanto toxigénicas como no toxigénicas, al comparar la detección de este gen por PCR en tiempo real con el aislamiento a las 7 +/- 1 hr de incubación presentó una sensibilidad del 90.91 %, especificidad 80.6 %, valor predictivo positivo 75.47 %, valor predictivo negativo 93.10 %, nivel de concordancia 0.69 y una positividad de 39.64 %. Cuando se comparó la detección de este gen por PCR en tiempo real con el aislamiento a las 21 +/- 3 hr de incubación aumento la sensibilidad al 98.46 %, especificidad 86.96 %, valor predictivo positivo 91.43 %, valor predictivo negativo 97.56 %, nivel de concordancia 0.86 y la positividad de 58.56 %.

Tabla 7. Datos de eficacia del PCR en tiempo real para el gen *toxR*

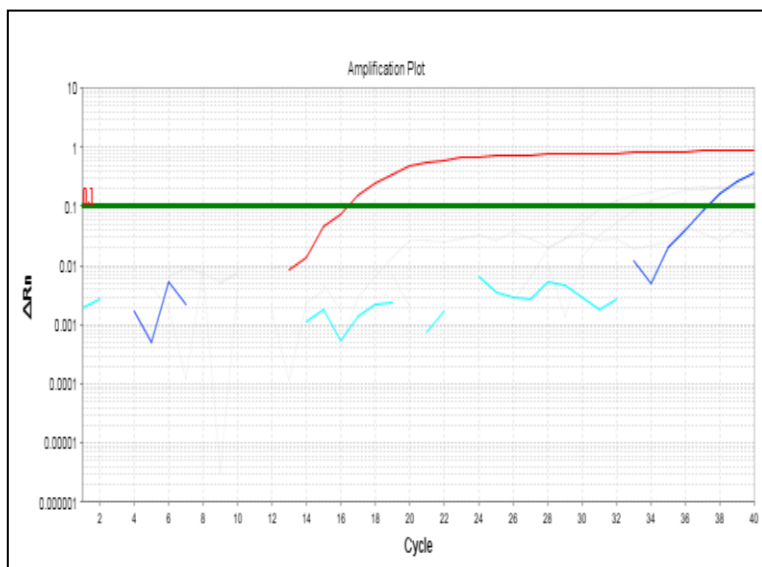
	Valor	Intervalo de confianza 95 %
PCR en tiempo real comparado a partir del cultivo de 7 +/- 1 hr		
Sensibilidad	90.91	81.28 - 100.0
Especificidad	80.60	70.38 - 80.81
Valor predictivo Positivo	75.47	62.94 - 88.00
Valor predictivo Negativo	93.10	85.72 - 100.0
Positividad	39.64	30.09 - 49.19
Nivel de Concordancia (Kappa)	0.69	0.55 – 0.82
PCR en tiempo real comparado a partir del cultivo de 21 +/- 3 hr		
Sensibilidad	98.46	94.70 - 100.0
Especificidad	86.96	76.14 - 97.78
Valor predictivo Positivo	91.43	84.16 - 98.70
Valor predictivo Negativo	97.56	91.62 - 100.0
Positividad	58.56	48.94 - 68.17
Nivel de Concordancia (Kappa)	0.86	0.77 - 0.96

Para más detalles ver anexo 9 y 10

La técnica de cultivo directo de *V. cholerae* en aguas superficiales descrito por el CDC recomienda que se siembre en Agar TCBS las muestras de aguas superficiales incubadas por 7 +/- 1 hr a 35 °C en agua peptonada alcalina al 10 %, sin embargo en este estudio se evidenció que se obtenían mejores resultados a partir de las muestras incubadas por 21 +/- 3 hr a 35 °C en agua peptonada alcalina al 10 %, la positividad aumento del 39 % al 58 % respectivamente, también hubo disminución en los falsos negativos. Solo una muestra presento aislamiento de *V. cholerae* el cual no amplifico el gen *toxR* lo que sugiere que esta cepa de *V. cholerae* puede tener una mutación en este gen, las evidencias de este estudio sugieren que la metodología de aislamiento a 21 +/- 3 hr a 35 °C en agua peptonada alcalina al 10 % es más efectiva tanto para la detección por PCR en tiempo real como para el aislamiento de *V. cholerae* en aguas superficiales. En el grafico 5 y 6 se puede apreciar la diferencia entre el análisis de una muestra por PCR en tiempo real y la metodología de aislamiento incubada por 7 +/- 1 hr y 21 +/- 3 hr a temperatura de 35 °C, en esta muestra no se logró aislar *V. cholerae* a un tiempo de incubación de 7 +/- 1 hr pero se pudo detectar por PCR en tiempo real, no se omite manifestar que la incubación de la muestra por 21 +/- 3 hr nos permitió la detección por PCR en tiempo real y el aislamiento de *V. cholerae*.

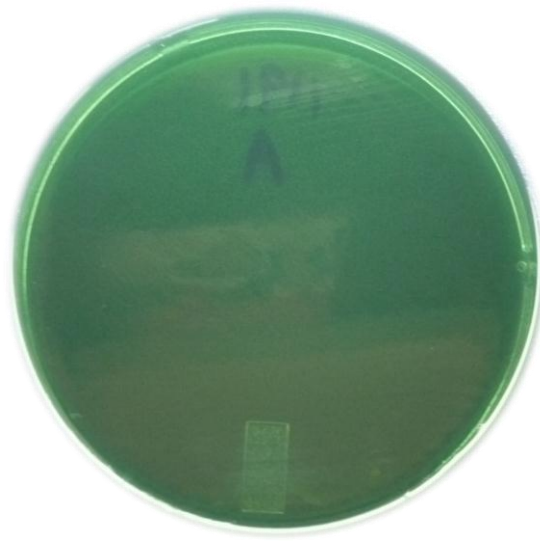
En ninguna de las muestras analizadas se detecto el gen *ctxA* codificador de la sub-unidad A de la toxina colérica.

Grafico 5: Muestra procedente de la laguna de Masaya, PCR en tiempo real y metodología de aislamiento incubada por 7 +/- 1 hr a temperatura de 35 °C.



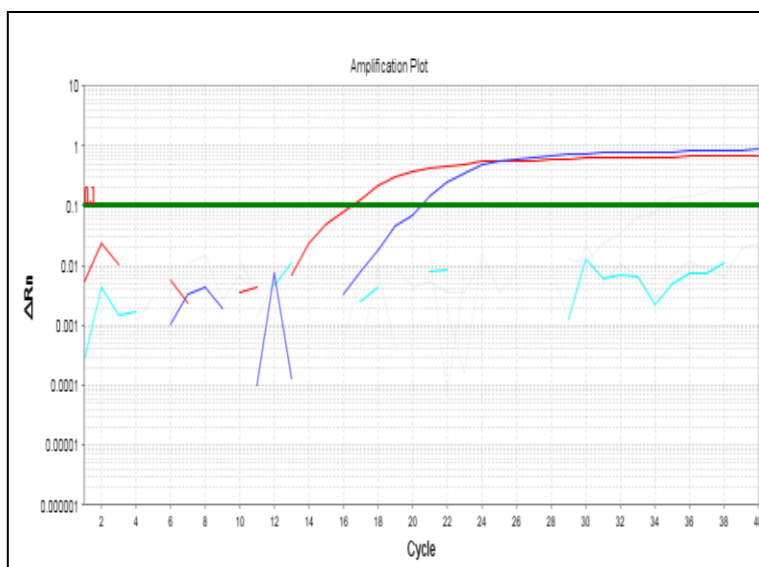
PCR en tiempo real de la muestra 1191A Positivo Ct: 37.1

Control Positivo Ct: 16.28 Control Negativo no amplificó



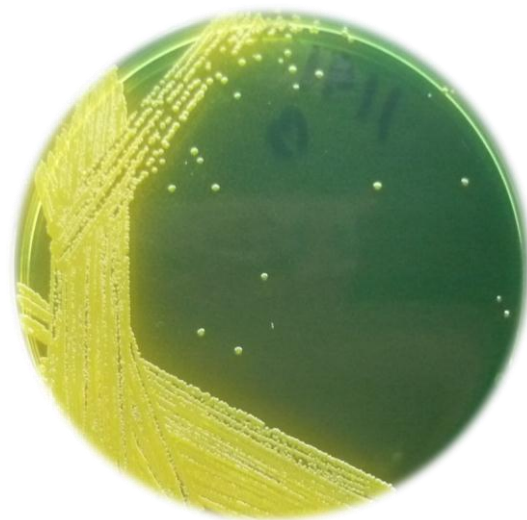
Agar TCBS

Grafico 6: Muestra procedente de la laguna de Masaya, PCR en tiempo real y metodología de aislamiento incubada por 21 +/- 1 hr a temperatura de 35 °C.



PCR en tiempo real de la muestra 1191B Positivo Ct: 20.35

Control Positivo Ct: 16.41 Control Negativo no amplificó



Agar TCBS

Aislamiento de *V. cholerae* O1

Aislamiento de *V. cholerae* en aguas superficiales:

El 58.5 % de las muestras analizadas resultaron positivas para el aislamiento de *V. cholerae* (las aguas dulces procedentes de ríos, lagos y lagunas presentaron una positividad del 64 % y las aguas procedentes del mar una positividad del 10 % existiendo diferencia significativas entre ambas $p= 0.0005$, en la Tabla 8 se pueden apreciar la distribución de las muestra positivas por departamento). Con respecto a los serotipos epidémicos solo en 2 sitios procedentes de la Laguna de Masaya se pudo aislar *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor (estos dos aislamientos no representan riesgo para causar epidemias ya que estos aislamientos no cuentan con la presencia del gen *ctxA* ni del gen *tcpA* los cuales son los principales genes relacionados a las epidemias de cólera en el mundo, sin embargo estos aislamientos tienen el gen de la toxina de repetición *rtxA* y el gen de la enterotoxina termoestable NAG-ST, estos aislamientos al carecer del gen *tcpA* se le imposibilita colonizar el intestino humano y causar diarrea), por otra parte no se aisló el serotipo epidémico *V. cholerae* O139 en muestras de agua superficiales destinada a la recreación.

La frecuencia de aislamiento de *V. cholerae* en este estudio fue más alta en comparación al estudio realizado en Mathbaria, Bangladesh en el 2004, en el cual se obtuvo una prevalencia del 44 % de *V. cholerae*, también encontraron que el 11 % de las muestras presentaron aislamientos de *V. cholerae* productores de toxina colérica (8). Por otra parte Wang y colaboradores en el 2008 realizaron un estudio en aguas procedentes del río Pearl de la ciudad Guangzhou- República de China, ellos encontraron una prevalencia baja de *V. cholerae* del 10 % (9). En el estudio realizado por Wang y colaboradores se utilizó la metodología de 450 ml de muestra con un pre-enriquecimiento de 8 hr a 37 °C, no se omite manifestar que si los autores hubiesen aumentado el pre-enriquecimiento a 21 hr probablemente la prevalencia hubiese aumentado un poco más.

Tabla 8. Distribución por departamentos del aislamiento de *V. cholerae* no O1/no O139 en aguas superficiales destinadas a la recreación.

Procedencia	Tipo de Agua Superficial				Positivo/Total	
	Positivo/Total de las muestras					
		Agua dulce			Agua Salada	
	Agua de Lagos	Agua de Lagunas	Agua de Ríos	Total	Agua de Mar	
Boaco	---	---	1/4	1/4	---	1/4
Carazo	---	---	3/5	3/5	---	3/5
Chinandega	---	---	4/4	4/4	0/6	4/10
Chontales	0/2	---	4/5	4/7	---	4/7
Estelí	---	---	4/9	4/9	---	4/9
Granada	12/12	---	4/4	16/16	---	16/16
Jinotega	0/3	---	2/7	2/10	---	2/10
León	---	---	3/3	3/3	0/4	3/7
Madriz	---	---	2/5	2/5	---	2/5
Managua	---	3/3	---	3/3	---	3/3
Masaya *	---	14/14	---	14/14	---	14/14
Matagalpa	---	---	1/3	1/3	---	1/3
Nueva Segovia	---	---	1/5	1/5	---	1/5
RAAS	---	4/4	2/4	6/8	---	6/8
Rivas	0/4	---	---	---	1/1	1/5
Total	12/21	21/21	31/58	64/100 (64 % P)	1/11 (10 % P)	65/111 (58.5 % P)

% P: Porcentaje de positividad

RAAS: Región Autónoma Atlántico Sur

- * Solo en 2 muestras procedentes de la laguna de Masaya se aisló *V. cholera* O1 Ogawa El Tor

- No se aisló *V. cholerae* O139

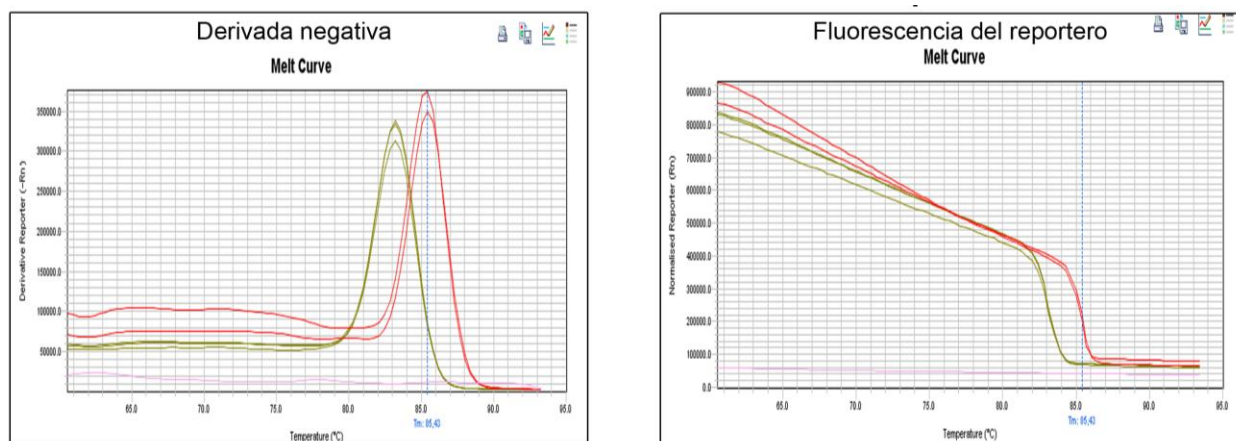
- Todos los aislamientos de *V. cholerae* no presentan riesgo para seres humanos debido a que no cuentan con el factor de colonización a las células intestinales.

Genes de virulencia en *V. cholerae* aislados de aguas superficiales:

PCR en tiempo real para detectar genes de virulencia:

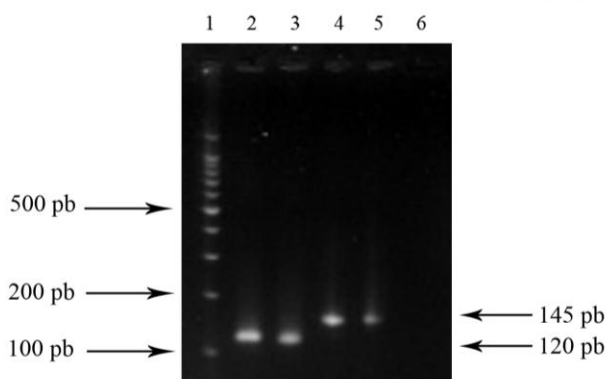
- La detección del gen de referencia de *V. cholerae* *epsM* y el gen de virulencia *rtxA* se realizó en un equipo Applied Biosystem 7500 fast siguiendo las recomendaciones del autor (30), hubo diferencia en las temperaturas de fusión con respecto a las temperaturas reportadas por el autor, esto pudo deberse a que se usó una super mezcla SYBR® Green de la casa comercial Biorad (la cual resulto mucho más económica que la recomendada por el autor) las temperatura de fusión para el gen regulador *epsM* fue de T_m : 85.45 +/- 0.47 con un tamaño del amplicón de 145 pb y para el gen de virulencia *rtxA* fue de T_m : 83.02 +/- 0.55 con un tamaño del amplicón de 120 pb, ver grafico 7

Grafico 7: Detección de genes *rtxA* y *epsM* usando iQ™ SYBR Green Supermix



PCR-en tiempo real *rtxA* :Temperature Melting: 83.02 +/- 0.55 *epsM* (Temperature Melting: 85.45 +/- 0.47)

rtxA (TM: 83.21) *V. cholerae* O139 El Tor
rtxA (TM: 83.21) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor
epsM (TM: 85.62) *V. cholerae* O139 El Tor
epsM (TM: 85.25) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor
Control Negativo *rtxA* y *epsM*

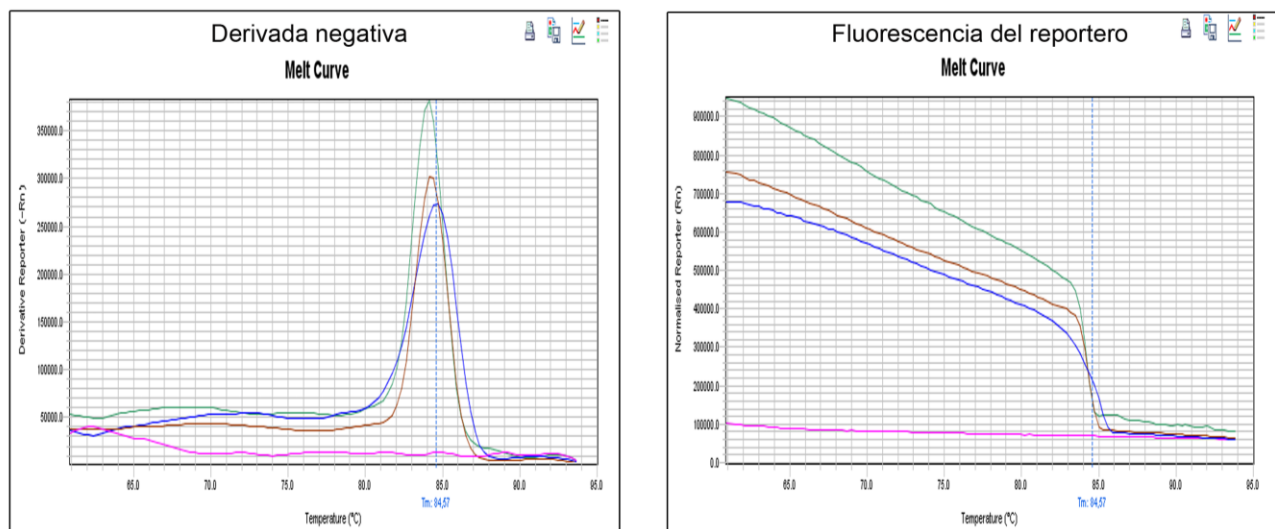


Electroforesis Agarosa al 1.4 %
TBE 1X, 60 minutos a 110 voltios
1: Marcador de 100 pb

2: *rtxA* (120 pb) *V. cholerae* O139 El Tor
3: *rtxA* (120 pb) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor
4: *epsM* (145 pb) *V. cholerae* O139 El Tor
5: *epsM* (145 pb) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor
6: Control Negativo

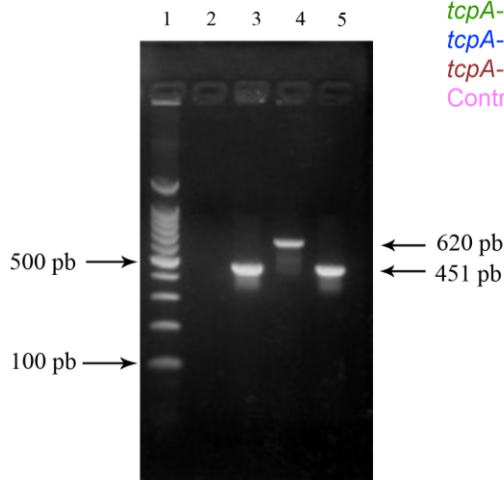
- La detección de los genes *tcpA*, *zot*, *stn/sto* se realizaron en un equipo Applied Biosystem 7500 fast siguiendo las recomendaciones de concentración de primers y temperaturas de reacción descritas por Rivera 2001 (28), las temperatura de fusión para el gen de virulencia *tcpA* fue de T_m : 84.23 +/- 0.5 con un tamaño del amplicón de 451 pb (El Tor) 620 pb (Clasico) , para el gen de virulencia *zot* fue de T_m : 86.1 +/- 0.46 con un tamaño del amplicón de 947 pb y para el gen de virulencia *stn/sto* fue de T_m : 79.1 +/- 0.3 con un tamaño del amplicón de 172 pb ver Grafico 8, 9 y 10 respectivamente.

Grafico 8: Detección del gen *tcpA* usando iQTM SYBR Green Supermix



PCR-en tiempo real El Tor y Clasico Temperature Melting: 84.23 +/- 0.5

tcpA- El Tor (TM: 84.12) *V. cholerae* O139 El Tor
tcpA-Clasico (TM: 84.57) *V. cholerae* O1 Ogawa Clasico
tcpA-El Tor (TM: 84.27) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor
 Control Negativo



Electroforesis en Agarosa al 1.4 %
 TBE 1X, 60 minutos a 110 voltios

1: Marcador de 100 pb

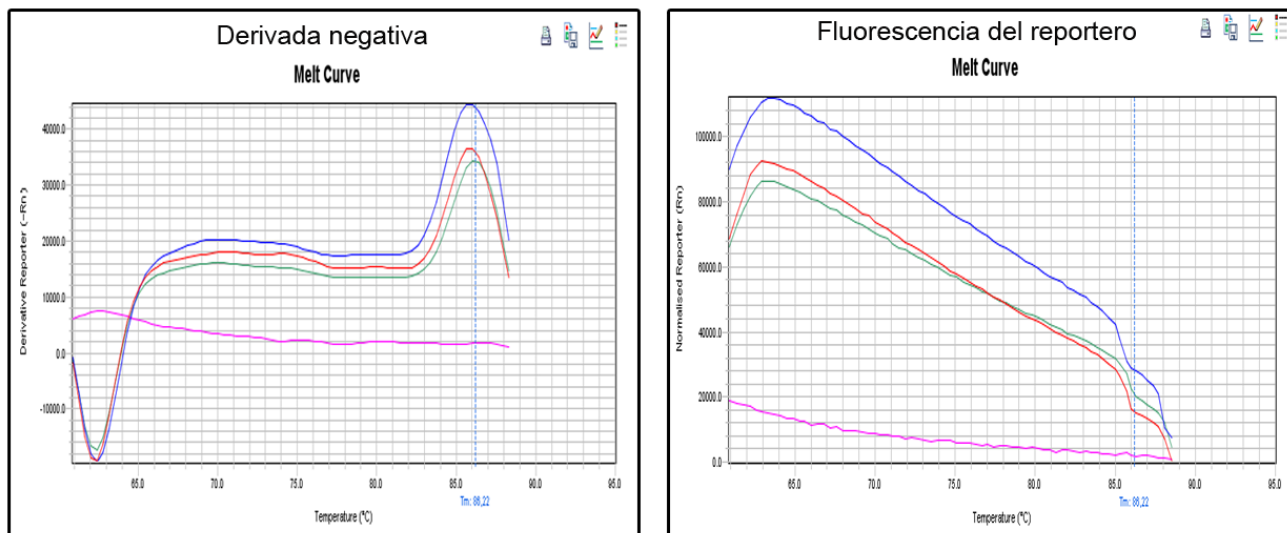
2: Control Negativo

3: *tcpA*-El Tor (451 pb) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor

4: *tcpA*-Clasico (-620 pb) *V. cholerae* O1 Ogawa Clasico

5: *tcpA*-El Tor (451 pb) *V. cholerae* O139 El Tor

Grafico 9: Detección del gen *zot* usando iQTM SYBR Green Supermix



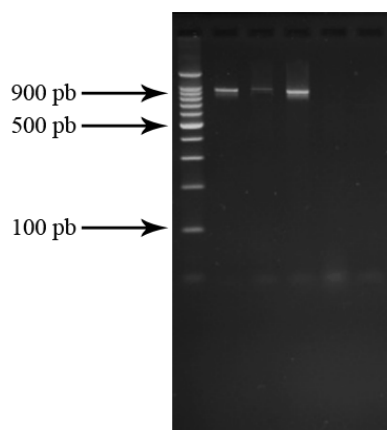
PCR-en tiempo real *zot* Temperature Melting: 86.1 +/- 0.46

zot (TM: 85.84) *V. cholerae* O139 El Tor

zot (TM: 86.22) *V. cholerae* O1 Ogawa Clasico

zot (TM: 85.84) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor

Control Negativo



Electroforesis Agarosa al 1.4 %

TBE 1X, 60 minutos a 110 voltios

1: Marcador de 100 pb

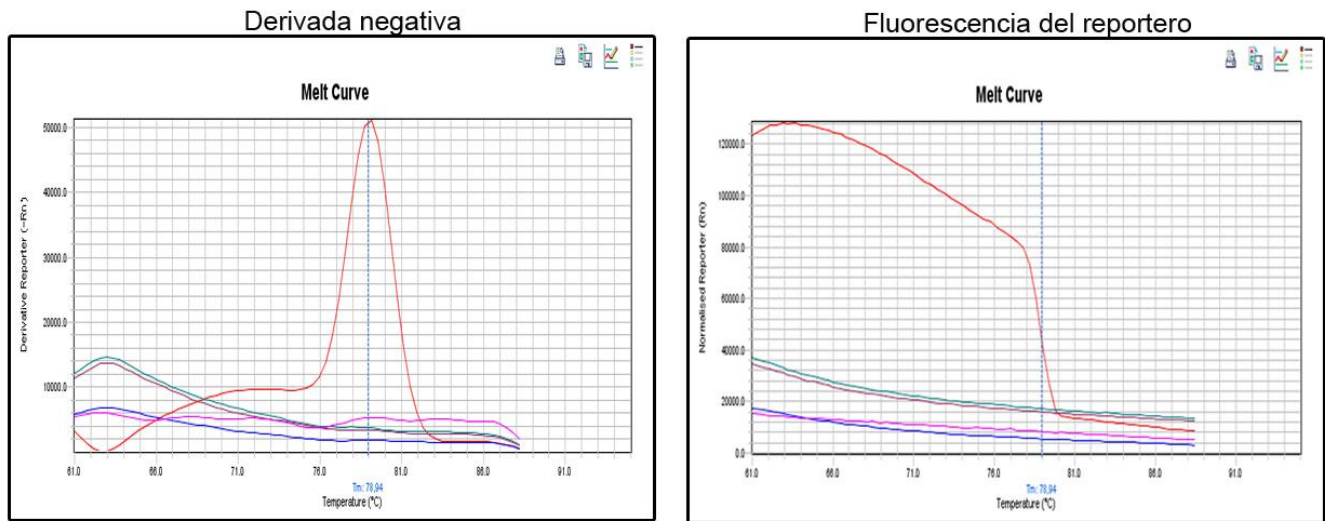
2: *zot* (947 pb) *V. cholerae* O1 Inaba El Tor

3: *zot* (947 pb) *V. cholerae* O139 El Tor

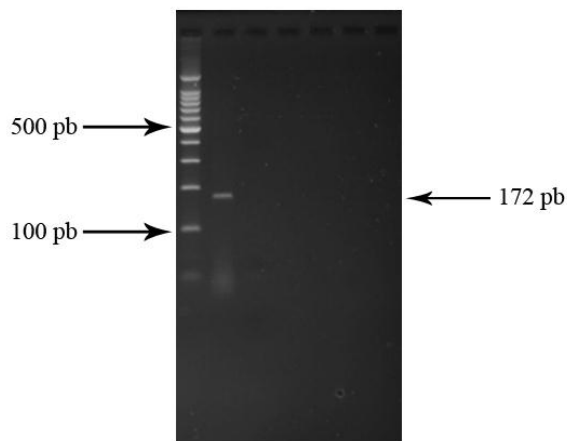
4: *zot* (947 pb) *V. cholerae* O1 Ogawa clasico

5: Control Negativo

Grafico 10: Detección del gen *stn/sto* usando iQTM SYBR Green Supermix



PCR-en tiempo real *stn/sto* Temperature Melting: 79.12 +/- 0.3
stn/sto (TM: 78.94) *V. Cholerae* O1 Ogawa (*ctxA* y *tcpA* Negativo) Ambiente
V. cholerae O1 Inaba El Tor No amplifico
V. cholerae O139 El Tor No amplifico
V. cholerae O1 Ogawa Classico No amplifico
 Control Negativo



Electroforesis Agarosa al 1.4 %
 TBE 1X, 60 minutos a 110 voltios
stn/sto 172 pb
 1: Marcador de 100 pb
 2: *V. cholerae* O1 Ogawa (*ctxA* negativo)
 3: *V. cholerae* O1 Inaba El Tor
 4: *V. cholerae* O139 El Tor
 5: *V. cholerae* Ogawa classico
 6: Control Negativo

Frecuencia de genes de virulencia en muestras de aguas superficiales: Se analizaron 111 muestras de aguas superficiales de las cuales en 63 se aisló *V. cholerae* no-O1/no-O139 y en 2 muestras se aisló *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor. El gen de referencia *epsM* fue detectado en todos los aislamientos de *V. cholerae*. No se detectó la presencia del gen *tcpA* en ninguna muestra; sin embargo se detectaron genes de virulencias *rtxA* en 38 muestras, *stn/sto* en 18 muestras y *zot* en 3 muestras, en la Tabla 9 se puede apreciar la distribución por procedencia de las muestras.

A pesar que se aislaron *V. cholerae* con genes de virulencia que han sido relacionados a causar patogenicidad en el humano (como son los genes *rtxA*, *stn/sto* y *zot*) estos aislamientos posiblemente no tengan un significado de riesgo para el humano ya que estos no cuentan con la presencia del gen *tcpA* el cual es usado por el *V. cholerae* para adherirse a las células intestinales y causar daño. Por otra parte al no detectar el gen *ctxA* la evidencia sugiere que no existe riesgo alguno de que los *V. cholerae* presentes en las aguas superficiales destinadas a recreación causen epidemias de cólera.

Tabla 9. Frecuencia de genes de virulencia en *V. cholera* no O1/ no O139 procedentes de aguas superficiales destinadas a la recreación.

Procedencia Positivo/Total de las muestras	Tipo de agua	Gen regulador		Genes de virulencia		
		<i>epsM</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>zot</i>	<i>stn/sto</i>
Boaco ‡ 1/4	Agua Dulce	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1
Carazo 3/5	Agua Dulce	3/3	0/3	3/3	2/3	1/3
Chinandega 4/10	Agua Dulce	4/4	0/4	4/4	0/4	0/4
Chontales 4/7	Agua Dulce	4/4	0/4	1/4	0/4	0/4
Estelí 4/9	Agua Dulce	4/4	0/4	2/4	0/4	0/4
Granada 16/16	Agua Dulce	16/16	0/16	4/16	0/16	9/16
Jinotega 2/10	Agua Dulce	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
León 3/7	Agua Dulce	3/3	0/3	3/3	0/3	0/3
Madriz 2/5	Agua Dulce	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2
Managua 3/3	Agua Dulce	3/3	0/3	2/3	0/3	2/3
Masaya * 14/14	Agua Dulce	12/12	0/12	7/12	0/12	0/12
	Agua Dulce*	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2
Matagalpa 1/3	Agua Dulce	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
Nueva Segovia 1/5	Agua Dulce	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
RAAS 6/8	Agua Dulce	6/6	0/6	5/6	0/6	4/6
Rivas 1/5	Agua salada	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
TOTAL 65/111		65/65	0/65	38/65	3/65	18/65

‡ : *V. cholerae* no O1/ no O139, gen *toxR* negativo

* : Aislamiento de *V. cholerae* O1 Ogawa El tor (No productor de toxina colérica)

Perfiles de genes asociados a virulencia: En el presente estudio de un total de 111 muestras de aguas superficiales analizadas 65 muestras resultaron positivas para el aislamiento de *V. cholerae*, se identificaron 6 perfiles de genes asociados a virulencia, de los cuales el perfil 3 fue el que obtuvo mayor representatividad, en 50 muestras se detectó la presencia de uno o dos genes codificadores de toxinas patógenas para el humano, solo 15 muestras no presentaron genes codificadores de toxinas, en la Tabla 10 se puede apreciar la distribución por procedencia de las muestras

Perfil 1 (*toxR*-,*ctxA*-,*epsM*+,*tcpA*-,*rtxA*-,*zot*+,*stn/sto*-) se detectó en 1 muestra;

Perfil 2 (*toxR*+,*ctxA*-,*epsM*+,*tcpA*-,*rtxA*+,*zot*+,*stn/sto*-) se detectó en 2 muestras;

Perfil 3 (*toxR*+,*ctxA*-,*epsM*+,*tcpA*-,*rtxA*+,*zot*-,*stn/sto*-) se detectó en 29 muestras;

Perfil 4 (*toxR*+,*ctxA*-,*epsM*+,*tcpA*-,*rtxA*+,*zot*-,*stn/sto*+) se detectó en 7 muestras;

Perfil 5 (*toxR*+,*ctxA*-,*epsM*+,*tcpA*-,*rtxA*-,*zot*-,*stn/sto*-) se detectó en 15 muestras;

Perfil 6 (*toxR*+,*ctxA*-,*epsM*+,*tcpA*-,*rtxA*-,*zot*-,*stn/sto*+) se detectó en 11 muestras.

Praveen Kumar y colaboradores en el 2010 (41) investigaron la presencia de genes de virulencia en 90 aislamientos de *V. cholerae* no-O1/no-O139 procedentes de aguas superficiales de Trivandrum, Alappuzha y Kottayam India. Ellos encontraron 7 perfiles de virulencia, los genes codificadores de toxinas con mayor frecuencia fue *rtxA* con 72 % y el gen *stn/sto* con 17 %, estos datos fueron muy similares a los datos reportado en el presente estudio.

Tabla 10. Perfiles de virulencia en *V. cholera* no O1/ no O139 aislados de aguas superficiales destinadas a la recreación.

Perfil de virulencia	Tipo de agua	Procedencia (Positivo)
<i>toxR</i> -, <i>ctxA</i> -, <i>epsM</i> +, <i>tcpA</i> -, <i>rtxA</i> -, <i>zot</i> +, <i>stn/sto</i> -	Agua Dulce	Boaco (1)
<i>toxR</i> +, <i>ctxA</i> -, <i>epsM</i> +, <i>tcpA</i> -, <i>rtxA</i> +, <i>zot</i> +, <i>stn/sto</i> -	Agua Dulce	Carazo (2)
<i>toxR</i> +, <i>ctxA</i> -, <i>epsM</i> +, <i>tcpA</i> -, <i>rtxA</i> +, <i>zot</i> -, <i>stn/sto</i> -	Agua Dulce	Chinandega (4) Chontales (1) Estelí (2) Granada (4) León (3) Madriz (2) Managua (1) Masaya (7) Matagalpa (1) Nueva Segovia (1) RAAS (2)
	Agua salada	Rivas (1)
<i>toxR</i> +, <i>ctxA</i> -, <i>epsM</i> +, <i>tcpA</i> -, <i>rtxA</i> +, <i>zot</i> -, <i>stn/sto</i> +	Agua Dulce	Carazo (1) Managua (1) RAAS (3)
	Agua Dulce*	Masaya (2)
<i>toxR</i> +, <i>ctxA</i> -, <i>epsM</i> +, <i>tcpA</i> -, <i>rtxA</i> -, <i>zot</i> -, <i>stn/sto</i> -	Agua Dulce	Chontales (3) Estelí (2) Granada (3) Jinotega (2) Masaya (5)
<i>toxR</i> +, <i>ctxA</i> -, <i>epsM</i> +, <i>tcpA</i> -, <i>rtxA</i> -, <i>zot</i> -, <i>stn/sto</i> +	Agua Dulce	Granada (9) Managua (1) RAAS (1)

* : Aislamiento de *V. cholerae* O1 Ogawa El tor (No productor de toxina colérica)

LIMITANTES DEL ESTUDIO

- El alto costo de las sondas Taqman no permitió que se usaran en el PCR en tiempo real sondas para la detección del gen *tcpA* y genes específicos para los serotipos epidémicos (O1 y O139) a partir del enriquecimiento en agua peptonada alcalina.
- Con respecto a la detección de los genes de virulencia por PCR en tiempo real usando SYBR Green, el quipo utilizado 7500 Fast de Applied Biosystems no fue capaz de diferenciar bien las temperaturas de fusión cuando se usaban más de dos pares de primers por reacción por lo que el uso de PCR multiplex resulto insatisfactorio dejando como única opción el uso de reacciones individuales para un solo juego de primers.

CONCLUSIONES

- El PCR en tiempo real descrito por Koskela y colaboradores en el 2009 resultó ser una técnica muy eficaz para la detección de *V. cholerae* en aguas superficiales destinadas a la recreación humana obteniendo una excelente sensibilidad y especificidad, esto lo convierte en una herramienta optima para el monitoreo de este agente bacteriano.
- El 56.7 % de las muestras analizadas resultaron positivas para el aislamiento de *V. cholerae* no-O1/no-O139. Con respecto a los serotipos epidémicos solo 2 muestras (1.8%) procedentes de la laguna de Masaya resultaron positivas para *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor y no hubo aislamiento de *V. cholerae* O139. La metodología de aislamiento de *V. cholerae* en aguas superficiales incubadas por 21 +/- 3 hr en agua peptonada alcalina al 10 % resulto mucho más efectiva tanto para la detección por PCR en tiempo real como para el aislamiento de *V. cholerae*.
- De los *V. cholerae* aislado en este estudio ninguno presentó genes de virulencia relacionados a epidemias como es el caso del gen *ctxA* codificador de la subunidad A de la toxina colérica y el gen de adherencia a las células intestinales *tcpA*. Se identificaron 6 perfiles de genes asociados a virulencia y en el 45 % de las muestras se detecto la presencia de uno o dos genes codificadores de toxinas patógenas para el humano.
- Los análisis moleculares en este estudio sugieren que los *V. cholerae* aislados en las aguas superficiales destinadas a la recreación humana no son capaces de causar epidemias de cólera en nuestro país.

RECOMENDACIONES

- Incluir en los planes de monitoreo de *V. cholerae* sitios de tratamiento de aguas residuales y puertos marítimos esto con el fin de lograr la detección temprana de *V. cholerae* importados de otros países.
- Mejorar la vigilancia epidemiológica de *V. cholerae* incorporando sondas Taqman para la detección del gen *tcpA*, genes específicos para los serotipos epidémicos (O1 y O139) a partir del enriquecimiento en agua peptonada alcalina.
- Optimizar y evaluar un PCR en tiempo real para la detección de *V. cholerae* a partir de heces humanas.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Kaper J, Morris G, Levine M. Cholera. Clinical Microbiology Reviews. 1995.
2. Krebs SJ, Taylor RK. Protection and Attachment of *Vibrio cholerae* Mediated by the Toxin-Coregulated Pilus in the Infant Mouse Model. Journal Of Bacteriology, American Society for Microbiology. 2011.
3. Safa A, Nair GB, Kong RYC. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Cell Press, Elsevier. 2009.
4. Fraga SG, Trejos AVd, Pichell M, Figueroa S, Merletti G, Caffer MI, et al. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. Revista Argentina de Microbiología. 2009.
5. PAHO. Epidemiological Alert: Cholera. Epidemiological Alert/Information Sheets Pan American Health Organization World Health Organization. 24 October 2010.
6. Haiti MdSPd. Reporte de Casos de colera 22 de Enero 2012. <http://www.mspp.gouv.ht/site/download.php?file=downloads/Rapport> journalier MSPP du 22 janvier 2012.pdf. 2012.
7. Nelson E, Harris J, Morris G, Calderwood S, Camilli A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. Nature reviews Microbiology. 2009.
8. Alam M, Sultana M, Nair B, Sack B, Sack D, Ali A, et al. Toxigenic *Vibrio cholerae* in the Aquatic Environment of Mathbaria, Bangladesh. Applied and Environmental Microbiology. 2006.
9. Wang D, Xu X, Deng X, Chen C, Li B, Tan H, et al. Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Environmental Water Samples by an Immunofluorescent-Aggregation Assay. Applied and Environmental Microbiology. 2009.
10. CDC. Chapter 5: Examination of Food and Environmental Samples. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. Centers for Disease Control and Prevention. Accesado Febrero 2012. <http://www.cdc.gov/cholera/>.
11. Blackstone G, Nordstrom J, Bowen M, Meyer R. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay. Journal of Microbiological Methods. 2007.
12. MINSA. Vigilancia del Cólera en Nicaragua. Boletín Epidemiológico Ministerio de Salud Nicaragua. 2003;Semana 49.

13. Hill VR, Cohen N, Kahler AM, Jones JL, Bopp CA, Marano N, et al. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in Water and Seafood, Haiti. *Emerging Infectious Diseases* • wwwcdc.gov/eid. 2011.
14. Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay A, Chakraborty S, Basu A, Bhattacharya S, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1998.
15. Nandi B, Nandy R, Mukhopadhyay S, GB N, T S, AC G. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein ompW. *Journal Clinical Microbiology*. 2000.
16. Rivera I, Lipp E, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell RR. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*. 2003.
17. Chomvarin C, Namwat W, Wongwajana S, Alam M, Thaew-Nonngiew K, Sinchaturus A, et al. Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *Journal Gen Applied Microbiology*. 2007.
18. Khuntia HK, Bhusan B, Chhotray GP. Quadruplex PCR for Simultaneous Detection of Serotype, Biotype, Toxigenic Potential, and Central Regulating Factor of *Vibrio cholerae*. *Journal of clinical microbiology*. 2008.
19. Lipp E, Rivera I, Gil A, Espeland E, Choopun N, Louis V, et al. Direct Detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian Coastal Water and Plankton by PCR. *Applied and Enviromental Microbiology*. 2003.
20. Koskela K, Matero P, Blatny J, Fykse E, Olsen J. A multiplatform real-time polymerase chain reaction detection assay for *Vibrio cholerae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2009.
21. Lyon WJ. TaqMan PCR for Detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in Pure Cultures, Raw Oysters, and Synthetic Seawater. *Applied and Enviromental Microbiology*. 2001.
22. Nelson E, Harris J, Morris G, Calderwood S, Camilli A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nature Reviews- Microbiology*. 2009.
23. Sánchez J, Holmgren J. Cholera toxin – A foe & a friend. *Indian J Med Res*. 2011.
24. Waldor M, Mekalanos K. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996.
25. Nandi B, Nandy R, Vicente A, Ghose A. Molecular Characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic Non-O1/ Non-O139 Strain of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 2000.

26. Lin W, Fullner KJ, Clayton R, Sexton J, Rogers M, Calia K, et al. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999.
27. Chow KH, Ng TK, Yuen KY, Yam WC. Detection of RTX Toxin Gene in *Vibrio cholerae* by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2001.
28. Rivera I, Chun J, Huq A, Sack B, Colwell R. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001.
29. Morris J, Takeda T, Tall B, Losonsky G, Bhattacharya K, Forrest B, et al. Experimental non-O1 group *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. *Journal of Clinical Investigation*. 1990.
30. Gubala AJ. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Microbiological Methods*. 2005.
31. WHO. Cholerae. World Health Organization. 2000;Fact sheet 107.
32. Koo D, Traverso H, Libel M, Drasbek C. El cólera epidémico en América Latina 1991 a 1993: implicaciones de las definiciones de casos usadas en la vigilancia sanitaria. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 1997.
33. CDC. Chapter 6: Laboratory Identification of *Vibrio cholerae*. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae*. Centers for Disease Control and Prevention. Accessed February 2012. <http://www.cdc.gov/cholera/>.
34. Tuteja U, Kumar S, Shukla J, Kingston J, Batra HV. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *Journal of Medical Microbiology*. 2007.
35. Gubala A, Prohl DF. Molecular-Beacon Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006.
36. Huang J, Zhu Y, Wen H, Zhang J, Huang S, Niu J, et al. Quadruplex Real-Time PCR Assay for Detection and Identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Strains and Determination of Their Toxigenic Potential. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009.
37. Arya M, Shergill I, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Future Drugs Ltd*. 2005.
38. BAM-FDA. Chapter 9: *Vibrio*. *Bacteriological Analytical Manual US Food and drug administration*. May 2004. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>.

39. Invitrogen-LifeTechnologies. Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal. Accesado Enero 2012. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/dynabeads-dna-direct-universal.html>.
40. Lyon W. TaqMan PCR for Detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in Pure Cultures, Raw Oysters, and Synthetic Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001.
41. Kumar P, Peter W, Thomas S. Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Environmental Strains of *Vibrio cholerae* by Multiplex PCR. *Current Microbiology*. 2010.

Anexo 1

Extracción de ADN en muestras de aguas de recreación de origen marino usando el kit comercial **Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal Invitrogen 630-06**

- 1) Dispensar 1 ml de los cultivos primarios incubados a 35 ± 2 °C por 7 ± 1 h y 21 ± 3 h en dos diferentes viales, luego centrifugarlos por 5 minutos (8000 g) y descartar el sobrenadante.
- 2) Resuspender el sedimento con 200 ul de buffer de lisis Dynabeads y dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 3) Colocar los viales por 1 minuto en el equipo DynaMag™-2 magnet esto con el fin de que las partículas imantadas se agrupen.
- 4) Aspirar el lisado sin tocar el complejo ADN/ Dynabeads.
- 5) Retirar los viales del equipo DynaMag y agregar 200 ul de buffer de lavado 1X.
- 6) Colocar los viales por 1 minuto en el equipo DynaMag™-2 magnet.
- 7) Aspirar el buffer de lavado sin tocar el complejo ADN/ Dynabeads.
- 8) Repetir el paso 5-7
- 9) Agregar 100 ul de buffer de resuspensión (Pre-calentado a 65°C por 5 minutos) al complejo ADN/ Dynabeads y pipetear varias veces hasta que se resuspenda completamente.
- 10) Colocar los viales por 1 minuto en el equipo DynaMag™-2 magnet y utilizar el sobrenadante para la realización del PCR en tiempo real.



Anexo 2

Reactivos para la detección del gen *toxR*

Reactivo	Volumen	Concentración
2X FastStart Universal Probe Master Rox (Roche)	5 µl	1X
10× Exo IPC Mix (Applied Biosystems)	1 µl	1X
50× Exo IPC DNA (Applied Biosystems)	0.2 µl	1X
Primer <i>toxR</i> Forward (Operon)	0.3 µl	0.3 uM
Primer <i>toxR</i> Reverse (Operon)	0.3 µl	0.3 uM
Sonda <i>toxR</i> probe (Applied Biosystems)	0.25 µl	0.25 uM
Agua grado PCR (ACROS)	1.95 µl	
ADN de la Muestra	1 µl	
Volumen Total	10 µl	

Anexo 3

Reactivos para la detección del gen *ctxA*

Reactivo	Volumen	Concentración
2X FastStart Universal Probe Master Rox (Roche)	5 µl	1X
10× Exo IPC Mix (Applied Biosystems)	1 µl	1X
50× Exo IPC DNA (Applied Biosystems)	0.2 µl	1X
Primer <i>ctxA</i> Forward (Operon)	0.3 µl	0.3 uM
Primer <i>ctxA</i> Reverse (Operon)	0.3 µl	0.3 uM
Sonda <i>ctxA</i> probe (Applied Biosystems)	0.25 µl	0.25 uM
Agua grado PCR (ACROS)	1.95 µl	
ADN de la Muestra	1 µl	
Volumen Total	10 µl	

Anexo 4

Reactivos para la detección del gen *rtxA*

Reactivo	Volumen	Concentración
2X SYBR® Green Supermix (Biorad) 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM de cada dNTP, iTaq DNA polymerasa 50 units/ml, 6 mM MgCl ₂ , SYBR Green I, 20 nM fluoresein y estabilizadores	5 µl	1X
Primer <i>rtx-AV1F</i> Forward (Invitrogen)	0.2 µl	0.2 uM
Primer <i>rtx-AV1R</i> Reverse (Invitrogen)	0.2 µl	0.2 uM
Agua grado PCR (ACROS)	3.6 µl	
ADN de la Muestra	1 µl	
Volumen Total	10 µl	
Melting temperature T _m : 83.02 +/- 0.55		Tamaño amplicón: 120 pb

Anexo 5

Reactivos para la detección del gen *epsM*

Reactivo	Volumen	Concentración
2X SYBR® Green Supermix (Biorad) 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM de cada dNTP, iTaq DNA polymerasa 50 units/ml, 6 mM MgCl ₂ , SYBR Green I, 20 nM fluoresein y estabilizadores	5 µl	1X
Primer <i>epsM-V3F</i> Forward (Invitrogen)	0.2 µl	0.2 uM
Primer <i>epsM-V3R</i> Reverse (Invitrogen)	0.2 µl	0.2 uM
Agua grado PCR (ACROS)	3.6 µl	
ADN de la Muestra	1 µl	
Volumen Total	10 µl	
Melting temperature T _m : 84.97 +/- 0.47		Tamaño amplicón: 145 pb

Anexo 6

Reactivos para la detección del gen *tcpA* (TCP A [El Tor y Clásico])

Reactivo	Volumen	Concentración
2X SYBR® Green Supermix (Biorad) 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM de cada dNTP, iTaq DNA polymerasa 50 units/ml, 6 mM MgCl ₂ , SYBR Green I, 20 nM fluoresein y estabilizadores	10 µl	1X
Primer <i>tcpA-72F</i> Foward (Invitrogen)	1.6 µl	0.8 uM
Primer <i>tcpA-477R</i> Reverse (Invitrogen) El Tor	1.6 µl	0.8 uM
Primer <i>tcpA-647R</i> Reverse (Invitrogen) Clásico	1.6 µl	0.8 uM
Agua grado PCR (ACROS)	3.2 µl	
ADN de la Muestra	2 µl	
Volumen Total	20 µl	
Melting temperature T _m : 84.23 +/- 0.5 Tamaño amplicón: El Tor 451 pb y Clásico 620 pb		

Anexo 7

Reactivos para la detección del gen *zot*

Reactivo	Volumen	Concentración
2X SYBR® Green Supermix (Biorad) 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM de cada dNTP, iTaq DNA polymerasa 50 units/ml, 6 mM MgCl ₂ , SYBR Green I, 20 nM fluoresein y estabilizadores	10 µl	1X
Primer <i>zot-225F</i> Foward (Invitrogen)	1.6 µl	0.8 uM
Primer <i>zot-1129R</i> Reverse (Invitrogen)	1.6 µl	0.8 uM
Agua grado PCR (ACROS)	3.2 µl	
ADN de la Muestra	2 µl	
Volumen Total	20 µl	
Melting temperature T _m : 86.1 +/- 0.4 Tamaño amplicón: 947 pb		

Anexo 8

Reactivos para la detección del gen *stn/sto*

Reactivo	Volumen	Concentración
2X SYBR® Green Supermix (Biorad) 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM de cada dNTP, iTaq DNA polymerasa 50 units/ml, 6 mM MgCl ₂ , SYBR Green I, 20 nM fluoresein y estabilizadores	10 µl	1X
Primer <i>stn/sto-67F Forward</i> (Invitrogen) 5`- TCGCATTTAGCCAAACAGTAGAAA-3`	1.6 µl	0.8 uM
Primer <i>stn/sto-194R Reverse</i> (Invitrogen) 5`- GCTGGATTGCAACATATTTCGC-3`	1.6 µl	0.8 uM
Agua grado PCR (ACROS)	3.2 µl	
ADN de la Muestra	2 µl	
Volumen Total	20 µl	
Melting temperature T _m : 79.1 +/- 0.3		Tamaño amplicón: 172 pb

Anexo 9

Resultados del PCR en tiempo real gen *toxR* comparado a partir del cultivo de 7 +/- 1 hr

Aislamiento 7 +/- 1 hr

		Positivo	Negativo	Total
PCR en tiempo real	Positivo	40	13	53
	Negativo	4	54	58
Total		44	67	111

Verdaderos Positivos Verdaderos Negativos Falsos Positivos Falsos Negativos

	Valor	Intervalo de confianza 95 %
Sensibilidad	90.91	81.28 - 100.0
Especificidad	80.60	70.38 - 80.81
Valor predictivo Positivo	75.47	62.94 - 88.00
Valor predictivo Negativo	93.10	85.72 - 100.0
Positividad	39.64	30.09 - 49.19

Anexo 10

Resultados del PCR en tiempo real gen *toxR* comparado a partir del cultivo de 21 +/- 3 hr

Aislamiento 21 +/- 3 hr

		Positivo	Negativo	Total
PCR en tiempo real	Positivo	64	6	70
	Negativo	1	40	41
Total		65	46	111

Verdaderos Positivos Verdaderos Negativos Falsos Positivos Falsos Negativos

	Valor	Intervalo de confianza 95 %
Sensibilidad	98.46	94.70 - 100.0
Especificidad	86.96	76.14 - 97.78
Valor predictivo Positivo	91.43	84.16 - 98.70
Valor predictivo Negativo	97.56	91.62 - 100.0
Positividad	58.56	48.94 - 68.17