



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Vibrio cholerae* O1  
OBTENIDOS DURANTE PERIODOS EPIDÉMICOS DE 1991 – 1995 EN PERÚ**

**Línea de investigación:**

**Salud pública**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

**Autora:**

Pompa Ramos, Iris Janet

**Asesor:**

Iannacone Oliver, José Alberto

(ORCID: 0003-3699-4732)

**Jurado:**

Nolasco Cárdenas, Oscar

Velarde Vilchéz, Mónica

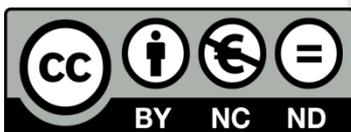
Mayanga Herrera, Ana Lucía

**Lima - Perú**

**2022**

**Referencia:**

Pompa, I. (2022). *Caracterización molecular de aislamientos de Vibrio cholerae O1 obtenidos durante periodos epidémicos de 1991–1995 en Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5993>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Vibrio cholerae* O1  
OBTENIDOS DURANTE PERIODOS EPIDÉMICOS DE 1991 – 1995 EN PERÚ.**

**Línea de investigación: Salud pública**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

**AUTOR**

Pompa Ramos, Iris Janet

**ASESOR**

Iannacone Oliver, José Alberto  
(ORCID: 0003-3699-4732)

**JURADO**

Nolasco Cárdenas, Oscar  
Velarde Vilchéz, Mónica  
Mayanga Herrera, Ana Lucía

Lima – Perú

2022

*A Dios y a mi Madre por todo el amor brindado.*

*A Ana Meza López por su amistad, y apoyo incondicional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Nacional de Salud y sus profesionales que me brindaron las facilidades para realizar la tesis en sus instalaciones.

A mis asesores Dr. Ronnie Gavilán Chávez y Dr. José Iannacone Oliver por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación y la redacción de la tesis.

Al Tec. Especializado Ana Meza López, personal del Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud, por su apoyo en las actividades de esta investigación.

## CONTENIDO

### RESUMEN

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Descripción y formulación del problema.....	1
1.2. Antecedentes.....	2
1.3. Objetivos.....	8
1.4. Justificación.....	8
1.5. Hipótesis.....	9
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	10
2.1.1. Enfermedad del cólera.....	10
2.1.2. <i>Vibrio cholerae</i> .....	11
2.1.3. Epidemiología del cólera.....	14
2.1.4. Aislamiento e identificación de <i>V. Cholerae</i> .....	18
2.1.5. Ecología de <i>V. cholerae</i> .....	20
2.1.6. Epidemiología molecular de <i>V. cholerae</i> .....	22
2.1.7. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	23
2.1.8. Análisis de perfiles de ADN.....	27
<b>III. MÉTODO.....</b>	<b>29</b>
3.1. Tipo de Investigación.....	29
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	29
3.3. Variables.....	29
3.4. Población y muestra.....	29
3.5. Instrumentos.....	30
3.6. Procedimientos.....	30
3.6.1. Viabilidad de los aislamientos de <i>V. cholerae</i> .....	31
3.6.2. Caracterización microbiológica.....	31
3.6.3. Caracterización molecular.....	34
3.6.4. Análisis bioinformático.....	38

3.7. Análisis de datos.....	39
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1. Viabilidad de los aislamientos.....	40
4.2. Caracterización microbiológica.....	40
4.2.1. Pruebas bioquímicas en medio de cultivo TSI .....	40
4.2.2. Pruebas bioquímicas en medio de cultivo LIA.....	41
4.2.3. Prueba oxidasa.....	42
4.2.4. Prueba de la cuerda.....	42
4.2.5. Pruebas serológicas.....	43
4.3. Caracterización molecular.....	43
4.3.1. Amplificación de los fragmentos <i>V-cm</i> y <i>CtxA</i> .....	43
4.3.2. Subtipificación molecular de <i>V. cholerae</i> O1.....	44
4.4. Análisis bioinformático .....	45
<b>V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>VIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>IX. ANEXOS .....</b>	<b>69</b>

## RESUMEN

La caracterización molecular de *Vibrio cholerae* O1 obtenidos entre 1991 a 1995 se realizó utilizando la técnica de subtipificación molecular “electroforesis en gel de campo pulsado”. El objetivo fue caracterizar aislamientos de *V. cholerae* O1 y analizar la variabilidad de los perfiles de ADN durante el periodo mencionado. Se seleccionaron 140 aislamientos de 12 regiones, del cepario del Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud. Los aislamientos viables se confirmaron como *V. cholerae* O1 por pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares, así mismo se determinó la presencia del gen de la toxina del cólera (CT) y los perfiles de ADN. La relación entre los perfiles de ADN fue estimada por la proporción de bandas compartidas aplicando el coeficiente Dice y generando dendrogramas basados en el método de agrupamiento UPGMA. Se obtuvieron 91 aislamientos viables (91/140), que mostraron los mismos resultados bioquímicos y el gen de la toxina del cólera (*ctxA*). La comparación de los perfiles de ADN mostró un índice de similaridad de 93,9%, se evidenció dos grupos en el dendrograma, el primero incluye todos los aislamientos de 1991 y 1992 con una similaridad de 94,1% y el segundo conformado solo por aislamientos de 1993, 1994 y 1995 con un índice de similaridad de 95,5%. Se concluye que la caracterización molecular por PFGE diferenció los perfiles de ADN, que indican que *V. cholerae* O1 ha sufrido pocos cambios desde su emergencia en 1991 hasta 1995, los hallazgos encontrados demuestran que los perfiles de ADN están estrechamente relacionados.

**Palabras clave:** cólera, epidemiología molecular, perfil de ADN.

## ABSTRACT

The characterization of *vibrio cholerae* O1 obtained between 1991 and 1995 was performed using the molecular subtyping technique “pulse-field gel electrophoresis”. The aim was to characterize isolations of *V. cholerae* O1 and analyze the diversity of DNA patterns during the aforementioned period. 140 isolations were selected from 12 regions, from the National Reference Laboratory of Enteropathogens of the National Institute of Health. Viable isolations were confirmed as *V. cholerae* O1 by biochemical, serological and molecular tests, as well as the presence of the cholera toxin (CT) gene and DNA patterns were determined. The relationship between DNA patterns was estimated by the proportion of shared bands applying the Dice coefficient and generating dendrograms based on the UPGMA grouping method. 91 viable isolations (91/140) were obtained, all showed the same biochemical results, and cholera toxin gene (*ctxA*). Comparison of DNA patterns showed a similarity index of 93.9%, two clusters were evident in the dendrogram, the first includes all isolations of 1991 and 1992 with a similarity index of 94.1% and the second made up only of isolations of 1993, 1994 and 1995 with a similarity rate of 95.5%. It is concluded that molecular characterization by PFGE has made possible to determine differences in DNA patterns, indicating that *V. cholerae* O1 has undergone few changes since its emergence in 1991 to 1995, these findings show that DNA patterns are closely related.

**Keywords:** cholera, molecular epidemiology, DNA pattern.

## I. INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad infecciosa producida por cepas toxigénicas la bacteria *Vibrio cholerae* que pertenece a los serogrupos O1 y O139 (Garg et al., 2000), y causa morbilidad y mortalidad sobre todo en regiones donde las condiciones de salubridad son deficientes. En el Perú se registraron los primeros casos de cólera en enero de 1991 originando la primera epidemia (Reimer et al., 2011).

En la actualidad, los países cuentan con sistemas de vigilancia epidemiología para *V. cholerae*, lo que permite determinar los medios de propagación y distribución, por lo cual es necesario caracterizar adecuadamente los aislamientos.

Varias técnicas se han desarrollado para analizar la diversidad de cepas de *V. cholerae* basados en el estudio de su genoma, así marcadores de baja variabilidad son usados para establecer relaciones filogenéticas entre aislamientos que han evolucionado en un largo periodo, por ejemplo, la ribotipificación, y marcadores de alta variabilidad discriminan entre microorganismos relacionados cercanamente para la vigilancia de brotes (Okada et al., 2012).

### 1.1. Descripción y formulación del problema

Caracterizar y determinar la relación entre aislamientos involucrados en brotes de enfermedades infecciosas es un prerrequisito para la investigación epidemiológica, durante mucho tiempo los sistemas de tipificación epidemiológica convencional se basaron en caracterización fenotípica; sin embargo, estos no han sido capaces de discriminar entre cepas relacionadas a un brote (Gautom, 1997). Desde la aparición de la caracterización molecular, grandes esfuerzos se han dirigido hacia el desarrollo de métodos moleculares adecuados para el uso en salud pública. Entre estos métodos, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es considerada la técnica “gold standard” para la subtipificación molecular de bacterias (Neoh

et al., 2019) que posee un alto poder discriminatorio, excelente reproducibilidad y presenta concordancia con la epidemiología (Barret et al., 2006; Liao et al., 2018; Rahaman et al., 2015).

¿Nos permitirá la caracterización molecular de *V. cholerae* mediante la generación de perfiles de ADN por PFGE determinar una mayor variabilidad?

## 1.2. Antecedentes

El cólera es una enfermedad representa un problema de salud pública de importancia creciente en países en desarrollo (García et al., 2010; Lü et al., 2017), causa un estimado de 2,8 millones de casos a nivel global (Mwape et al., 2020), produce epidemias y pandemias de alta mortalidad, y permanece de forma endémica en las zonas geográficas afectadas (García et al., 2010), como países de Asia (Hajia y Sohrabi, 2019), África (Bundi et al., 2019) y América Latina (Liao et al., 2018). Para la salud pública, los marcadores más importantes son la producción de la toxina del cólera y la posesión de antígenos O1 u O139 (Faruque et al., 1998).

En Perú, el cólera ingresó en enero de 1991, originando un brote epidémico de diarrea aguda con deshidratación intensa, al comienzo de la epidemia fueron afectadas varias localidades del litoral peruano (Bravo y Guillén, 2011), y posteriormente se extendió a todo el país. Durante 1991 el cólera llegó a producir 322 562 casos; manteniéndose tasas altas en los siguientes años, que disminuyeron progresivamente (Gavilán y Martínez, 2011).

La epidemia de Cólera en Perú, continuo en años posteriores presentando casos de forma decreciente; sin embargo, en 1998 se observó un rebrote de los casos que fue asociado con el fenómeno de El Niño, que se inició en 1997 hasta 1998 (Gavilán y Martínez, 2011), confirmándose 2 178 casos de *V. cholerae* O1 (Huapaya et al., 2005). Estos eventos fueron reportados hasta el 2002 cuando se informa de los últimos casos y hasta la fecha no se han reportado la presencia del cólera toxigénico en Perú (Gavilán y Martínez, 2011), aunque si se

ha reportado casos de *V. cholerae* no O1 sin toxina como en 2004 que se presentó un caso de *V. cholerae* O139 sin toxina al sur de Lima (Huapaya et al., 2005). En alguna medida los factores para la transmisión del cólera se han reducido en algunos sectores, aun así, quedan muchas regiones con condiciones propicias para la reintroducción de esta enfermedad.

Otra epidemia de cólera de gran importancia se presentó en Haití en 2010. Después de un terremoto, un brote emergió causando 385 000 infecciones y 5 800 muertes hasta julio de 2011, esta fue la primera vez que se documentó la presencia de cólera en Haití (Katz et al., 2013). La cepa del brote se dispersó rápidamente a países de la región como República Dominicana y llegó hasta Florida (EUA) (Hendriksen et al., 2011; Reimer et al., 2011), esto puso en alerta los sistemas de vigilancia epidemiológica de los países de América, convirtiéndose su vigilancia en un asunto trascendente para la salud pública.

A partir de la reemergencia de cólera en Haití en 2010, posterior al terremoto de ese mismo año, el Cólera quedó circunscrito en países centroamericanos Haití, República Dominicana y Cuba (Bahamonde y Stuardo, 2013), sin embargo, también se ha presentado un brote en México durante 2013, al comienzo se aislaron 2 cepas de *V. cholerae* O1 Ogawa toxigénicas, biotipo El Tor de pacientes de México DF, posteriormente se inició el brote en la región de La Huasteca, los perfiles se compararon con los de Haití encontrando una homología del 97%, confirmándose que se trataba de la misma cepa que causó los brotes en Haití, República Dominicana y Cuba (Díaz, 2017).

Debido a la reemergencia de cólera en Haití, los mecanismos de alerta en los diferentes países del continente se han activado. Perú no es ajeno a esta situación y a través del sistema de vigilancia epidemiológica propuso el plan nacional de prevención y preparación de la respuesta frente al cólera. Con la emergencia de nuevas variantes a nivel global, es importante

caracterizar las cepas aisladas localmente y determinar la comparación con estas (Bundi et al., 2019).

La relación entre aislamientos de *V. cholerae* tanto clínicos como ambientales, se han establecido utilizando técnicas basadas en biología molecular como: PFGE, MLEE (Electroforesis Enzimática de Multilocus), ribotipificación y RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Estas técnicas han logrado demostrar la existencia de varias poblaciones de clones patogénicos, por ejemplo, clones de la sexta y séptima pandemia y U.S. Gulf Coast (Byun et al., 1999).

La técnica AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) se emplea para determinar la diversidad molecular sin embargo ha demostrado limitaciones al no poder discriminar entre algunos aislamientos de los serogrupos O1 y O139 considerándolos idénticos con la enzima *HindIII-TaqI* (Jiang et al., 2000). En un estudio, se observó cuatro aislamientos de *V. cholerae* que se reconocieron como idénticos basados en la secuencia de ADN de la subunidad B de la toxina del cólera y marcadores MEE (Electroforesis multilocus enzimática); sin embargo, se identificaron como diferentes según el perfil de ADN obtenido por PFGE (Jiang et al., 2000).

Con el objetivo de identificar variantes genéticas de *V. cholerae* también se ha realizado estudios de genotipificación por la técnica RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) de cepas de *V. cholerae* O1 aisladas en Perú entre 1991 a 1999, mediante RFLP de 75 cepas *Vibrio cholerae*, se identificó tres variantes ribotípicas Per 1, Per 2 y Per 3, la variante Per1 fue reportada tanto en la etapa epidémica y endémica del cólera, mientras que Per2 y Per3 se relacionaron sólo con la etapa endémica poniendo en evidencia la emergencia de un mismo grupo clonal en los brotes epidémicos del Perú (Huguet et al., 2000). Posterior al desarrollo de la técnica RFLP se emplea la electroforesis en campo pulsado, PFGE,

una metodología con respecto a RFLP que permite una mayor discriminación entre cepas bacterianas y que ha cobrado mayor importancia en la tipificación de bacterias (Huguet et al., 2000).

Diversos estudios demuestran que PFGE tiene una mayor capacidad de discriminación sobre técnicas como MEE, y RFLP (Boonkerd et al., 2019; Cameron et al., 1994; Kotetishvili et al., 2003), así a partir de 180 aislamientos de *V. cholerae* O1 se obtuvo seis patrones diferentes de MEE y 27rRNA ribotipos por RFLP sin embargo PFGE permitió obtener 63 patrones o perfiles de ADN diferentes, mediante esta técnica se pudo distinguir cepas del mismo ribotipo aislados en África, Europa, el Pacífico Sur o sureste de Asia, PFGE demostró ser más rápida y menos laboriosa y ser una herramienta epidemiológica muy útil (Cameron et al., 1994).

En 1997, 50 aislamientos de *V. cholerae* O1 de Lima (muestras obtenidas entre 1991 a 1995) se caracterizaron mediante ribotipificación por RFLP y tipificados por PFGE obteniendo cuatro ribotipos y ocho pulsotipos. Esta tipificación molecular demuestra que los aislamientos introducidos al Perú en 1991 han sido sometidos a cambios genéticos, además se identificó una nueva cepa de *V. cholerae* O1 en 1994 (Dalsgaard et al., 1997).

Otros estudios en Venezuela que evaluaron 25 aislamientos de los brotes de 1996 y 1998 obtuvieron 1 solo ribotipo por RFLP y 9 pulsotipos que formaron 3 grupos con un índice de similitud Dice 91,5% (Fernández y Alonso, 2017).

Los estudios moleculares por PFGE han demostrado que la cepa de Haití tiene una cercana correlación con las cepas de Bangladesh y es distante de las cepas de América del Sur, indicando el posible origen y capacidad de estas cepas de trasladarse para producir brotes epidémicos en lugares inesperados (Bravo y Guillén, 2011). En 2011, se demuestra mediante estudios basados en PFGE que los aislamientos de Haití son clonales y genéticamente similares

a aislamientos en África y Sur de Asia (Hendriksen et al., 2011; Talkington et al., 2011), además también muestran que aislamientos obtenidos en Nepal son indistinguibles con respecto al pulsotipo más común obtenido en Haití (Hendriksen et al., 2011), el análisis filogenético de aislamientos de Haití y Nepal sostuvieron la hipótesis que la cepa epidémica de Haití fue importada de Nepal (Katz et al., 2013). En 2012, en Nepal se desencadena un brote por *V. cholerae* O1 multidrogo resistente El Tor con la toxina del cólera alelo (*ctx*) B7, el cual de acuerdo a los perfiles por PFGE (NotI) fue clonal y cercanamente relacionado con *V. cholerae* asociado con cólera en Bangladesh y Haití (Dixit et al., 2014).

En el 2012, se caracterizó por PFGE 343 aislamientos de *V. cholerae* O1 El Tor de brotes en Tailandia ocurridos entre 2007 y 2010, con especial referencia a variaciones genotípicas en el tiempo y se logró diferenciar 10 pulsotipos diferentes, conformando dos grupos principales, con una similaridad de 88%, los pulsotipos encontrados en Tailandia son similares a los encontrados en India (Okada et al., 2012).

En 2016, el análisis por PFGE de 37 aislamientos de *V. cholerae* de muestras ambientales y clínicas en Bangladesh mostraron estar relacionados clonalmente, con un porcentaje de similaridad mayor a 95% que fue confirmado por patrones sub agrupados en un dendrograma basados en PFGE, con la enzima de restricción NotI (Rafique et al., 2016).

Otra investigación desarrollada en India muestra que de 281 aislamientos de *V. cholerae* non O1 non O139 (NAG's), las cepas carecían del gen *CtxA*, pero tenían los genes *hlyA*, *rtxA* y *rtxC* (Dutta et al., 2013), por PFGE no se demostró relación genética entre cepas, ya que presentaron un índice de similaridad de 70% demostrando que las cepas no pertenecen a un mismo serogrupo (Dutta et al., 2013), de manera similar aislamientos de *V. cholerae* no O1 no O139 mostraron ser muy diversos en Tucumán (Argentina), donde se hallaron 27 patrones distintos en 29 asilamientos tipificables por PFGE (González et al., 2009).

Las investigaciones mediante PFGE de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor de muestras clínicas y ambientales permitieron determinar aislamientos cercanamente relacionados en tres regiones de Nigeria (Abia, Kano y Bauchi) y diferenciarlas de otras regiones durante los últimos periodos epidémicos entre 2007 a 2013, todos los aislamientos compartieron 95 a 100% de similitud de sus perfiles de ADN con la enzima *NotI* (Adewale et al., 2016).

En Japón la caracterización por PFGE sobre casos importados y domésticos de *V. cholerae* O1 demuestran claramente que el análisis por PFGE es una herramienta poderosa para evaluar la relación entre cepas aisladas en áreas distanciadas (Arakawa et al., 2000).

Existe una investigación que demuestra que la técnica MLST (tipificación multilocus de secuencias), tiene un mayor poder de discriminación que PFGE, en 2013, sobre 22 aislamientos de *V. cholerae*, incluyendo algunos serogrupos epidémicos (O1 y O139) y no epidémicos, se caracterizaron por PFGE y MLST usando 3 genes “housekeeping” *gyrB*, *pgm*, y *recA*; aún con un pequeño número de loci usados, MLST tuvo mejor habilidad discriminatoria que PFGE, en el análisis MLST hubo un cluster de serogrupos epidémicos (Kotetishvili et al., 2003). En otra investigación PFGE presenta un mayor poder de discriminación que MLST entre aislamientos de *V. cholerae*, por ejemplo, en China, en un estudio realizado en pacientes hospitalizados se obtuvieron 40 aislamientos *V. cholerae* no O1 no O139 que fueron analizados por PFGE y MLST, mediante PFGE se obtuvo 25 pulsotipos, mientras que por MLST se obtuvo 15 tipos secuenciados (Luo et al., 2013). Estudios posteriores en China demuestran que PFGE tiene una mayor resolución que dos métodos de MLST basado en siete y nueve genes “housekeeping” respectivamente (Liao et al., 2018), de similar manera sucedió en India sobre un estudio de aislamientos comprendidos entre 2000 y 2018, por MLST se identificó una ST (ST69) y por PFGE 10 pulsotipos que conformaron 3 grupos (Narendrakumar et al., 2020).

En 2010, un aislamiento clínico de *V. cholerae* O1 serotipo Inaba sin gen *CtxA*, se analizó por PFGE, la comparación del perfil PFGE de este aislamiento con otros de la región de Latino América evidenció que se trataba de una cepa con un perfil genético nuevo y no presento relación con los aislamientos de *V. cholerae* O1 asociados a los casos de cólera durante los brotes epidémicos, ni con los aislamientos más recientes de *V. cholerae* toxigénico de Argentina (2005) y Paraguay (2009) (Zamudio et al., 2011).

### **1.3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Caracterizar molecularmente los aislamientos de *V. cholerae* O1 obtenidos durante los periodos epidémicos 1991 a 1995 de Perú.

#### **Objetivos específicos**

Caracterizar aislamientos de *V. cholerae* obtenidos durante los periodos epidémicos comprendidos entre 1991 y 1995 en Perú, mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

Caracterizar aislamientos de *V. cholerae* obtenidos durante los periodos epidémicos comprendidos entre 1991 y 1995 en Perú, mediante la técnica molecular electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Relacionar los perfiles de ADN con variables microbiológicas tal como serotipo, y año de aislamiento.

### **1.4. Justificación**

Dada la emergencia del Cólera en Haití en octubre de 2010, esta enfermedad había quedado circunscrita en tres países centroamericanos, Haití, República Dominicana y Cuba (Díaz et al., 2014). Sin embargo, la aparición de casos en México durante el 2013, que mostraron una estructura genómica similar a la detectada en Haití (Díaz, 2017), ha hecho que

se activen los mecanismos de alerta en los diferentes países y se incrementen los estudios como parte de los sistemas de vigilancia de este patógeno en la región.

Ante estos hechos el presente estudio se justifica por la necesidad de aportar un mayor conocimiento sobre *V. cholerae*, y su distribución, para esto es importante caracterizar los aislamientos y compararlos con otros, tanto del país como los obtenidos en otros países y evaluar los posibles cambios que se presenten a nivel molecular.

Para analizar la variabilidad genética de *V. cholerae* una de las técnicas desarrolladas es la PFGE, esta técnica es considerada el “gold standard” para la subtipificación molecular y nos brinda una huella dactilar o “fingerprint” de los aislamientos, ya que genera fragmentos de ADN, obtenidos por el corte a nivel molecular con enzimas de restricción.

### **1.5. Hipótesis**

La caracterización molecular *Vibrio cholerae* O1 nos permitirá determinar la variabilidad genética en periodos epidémicos y su relación con otras variables como fecha de aislamiento, y serotipo.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

#### 2.1.1. Enfermedad del cólera

La enfermedad del cólera es una infección intestinal aguda causada por la bacteria *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139 (Osei et al., 2012), que producen la toxina del cólera (CT), un factor de virulencia crítico causante de la diarrea y expresan un factor de colonización intestinal, TCP (Toxin-coregulated pilus) implicado en la adherencia de *V. cholerae* a las células intestinales (Dutta et al., 2013).

La transmisión del Cólera se da fundamentalmente a través de la ingestión de agua contaminada con heces de personas infectadas, ingestión de alimentos contaminados, y también puede ser transportado por moscas. Se calcula que aproximadamente  $10^2$  -  $10^3$  células se requieren para causar una diarrea severa y deshidratación (Osei et al., 2012).

Los vibrios del Cólera al ser ingeridos pasan a través de los ácidos del estómago y colonizan la parte superior del intestino delgado, donde penetran la capa mucosa e invaden el epitelio y luego secretan la toxina colérica (Osei et al., 2012) La enterotoxina producida por *V. cholerae* estimula a las células del intestino a secretar grandes cantidades de fluido isotónico e incrementar la permeabilidad del endotelio vascular lo que produce la deshidratación a través del paso de cantidades anormales de líquido y electrolitos resultando en una diarrea acuosa (Huapaya et al., 2005; Osei et al., 2012). La deshidratación produce taquicardia, hipotensión y colapso vascular y si no hay tratamiento, conduce a la muerte repentina (Osei et al., 2012).

El principal modo de tratamiento es reemplazar los electrolitos perdidos a través del consumo de fluidos de rehidratación, por ejemplo, sales de rehidratación oral. Sin tratamiento la mortalidad puede ser tan alta como 50% y con tratamiento adecuado, es decir, terapia de rehidratación y uso de antibióticos la mortalidad disminuye al 1% (Osei et al., 2012).

### **2.1.2. *Vibrio cholerae***

Es el agente etiológico del cólera y fue descrito por primera vez en 1854 por Filippo Pacini en Italia y cultivado en 1883 por Robert Koch (Rahaman et al., 2015). *Vibrio cholerae* es una bacteria aerobia o anaerobia facultativa, móvil, gram negativa, en forma de bacilo, mide 1,5-3  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5 $\mu\text{m}$  de diámetro y posee un flagelo polar que le permite realizar movimientos muy rápidos (Osei et al., 2012), fermenta glucosa y produce la enzima citocromo C oxidasa, crece en presencia de cloruro de sodio (Rojas et al., 2006). *V. cholerae* forma parte de la microflora autóctona de ambientes acuáticos, y a menudo se encuentran en asociación con algas y crustáceos (Byun et al., 1999).

A fines de los 90's se describió el genoma de *V. cholerae* por mapeo físico y se determinó que está conformado por dos cromosomas separados como megareplicones circulares (Rahaman et al., 2015; Trucksis et al., 1998), cada cromosoma circular consiste de 2 961 146 bp y 1 072 314 bp. (Heidelberg et al., 2000). En 2014 en base a una cepa del brote de 2013 de La Huasteca, México se realizó el secuenciamiento genómico de una cepa que constaba de 4 017 985 pb (los dos cromosomas), el genoma mostró 3676 genes, 2875 secuencias codificantes (CDS), 708 pseudogenes, 25 rRNAs, 67 tRNAs y un RNA no codificante (ncRNA) (Díaz et al., 2014).

*V. cholerae* se diferencia serológicamente por el antígeno O de los polisacáridos de la membrana externa, más de 206 serogrupos se han documentados basados en las variaciones epitópicas de los antígenos O (Bundi et al., 2019; Kanampalliwar y Singh, 2020; Kotetishvili

et al., 2003), de estos los serogrupos O1 y O139 toxigénicos son causantes del cólera epidémico (Dutta et al., 2013; Osei et al., 2012). Otros serogrupos diferentes a O1 y O139 denominados non O1/ non O139 o vibrios no aglutinantes (NANG'S), no producen toxina del cólera sin embargo presentan otros factores de virulencia como hemolisina, enterotoxina termoestable NAG-ST y el sistema de secreción tipo 3 (TTSS) (Dutta et al., 2013; González et al., 2009), los que pueden estar contribuyendo a la virulencia de estas cepas, que no causan síndromes diarreicos tan graves, pero producen frecuentemente infecciones extraintestinales (García et al., 2010).

El serogrupo O1 además presenta dos biotipos, denominados Clásico y El Tor, cada uno con dos serotipos diferentes, Inaba y Ogawa (Ghosh et al., 2016). El biotipo El Tor fue aislado por Gotschlich en 1905 como una cepa particular de *V. cholerae*, que era diferente al clásico y tenía características hemolíticas. Se denominó El Tor debido a que fue hallada en peregrinos fallecidos en la estación de cuarentena de El Tor, en Egipto (Olarte, 1991).

En recientes años se ha visto la emergencia de nuevas variantes de *V. cholerae* O1 que tienen características de ambos biotipos, a estas se refieren colectivamente como El Tor “atípico” (Bundi et al., 2019; Safa et al., 2010). La epidemiología y evolución de El Tor “atípico”, hace referencia a componentes del genoma de CTX $\phi$  y proteína CT (Safa et al., 2010). Algunos ejemplos de variantes EL Tor atípico son: la variante Tucumán (Argentina) que deriva de El Tor (Pichel et al., 2013), la variante Amazonia (Brasil) (Coelho et al., 1995), la variante Matlab (Bangladesh) que deriva de El Clásico (1991-1994) (Safa et al., 2005), y la variante Mozambique (2004) que comparte características de *V. cholerae* O1 Clásico y El Tor (Safa et al., 2010), entre otros. Usando microarreglos y secuenciamiento de ADN se demostró que solo siete genes diferencian el biotipo clásico y El Tor, y se sugiere que ambos biotipos derivan de una cepa ambiental no toxigénica similar a El Tor (Safa et al., 2005). Actualmente

*V. cholerae* se clasifica en 8 linajes filéticos (L1-L8) donde el prototipo Clásico (L1) y prototipo El Tor (L2) difieren entre sí por 20000 SNPs (Narendrakumar et al., 2020).

Los principales factores de virulencia asociados a las cepas epidémicas O1 y O139, incluyen la toxina colérica (CT) y el factor de colonización (TCP) (Alam et al., 2014; Safa et al., 2005). Los genes patogénicos de CT y TCP se encuentran en regiones del cromosoma formando “clusters” o islas de patogenicidad, teniendo la capacidad de ser propagados por transferencia horizontal de genes (THG) (Díaz et al., 2014; Faruque et al., 1998). El sistema regulatorio ToxR controla expresión de la toxina del cólera y TcpA (Faruque et al., 1998; Pichel et al., 2003).

La toxina del Cólera (CT) está codificada por los genes del operón *ctxAB* del bacteriófago CTX $\phi$  que se encuentra en el genoma de *V. cholerae* toxigénico (Díaz, 2017), es el factor de virulencia mejor estudiado por su estructura genética y función. CT presenta dos subunidades, A y B, donde la subunidad B (pentamérica), se une irreversiblemente a un receptor específico en la membrana celular, el gangliósido GM1, que permite el ingreso de la subunidad A, la cual tiene actividad tóxica y pasa a través de la membrana basal hacia el citoplasma, siendo su blanco la adenilatociclasa. El fragmento A es un ADP ribosilante, mientras el componente Ns, Gs de la adenilatociclasa es la que induce el incremento de AMP cíclico, lo que incrementa de secreción de cloro, bicarbonato y agua a la luz intestinal, además de la inhibición de la absorción intestinal de cloruro de sodio, que conducen a cambios en el movimiento de los líquidos, y dan como resultado una diarrea acuosa masiva (Robles et al., 1999).

El factor de colonización (TCP) confiere la habilidad de colonizar el intestino delgado. Este factor esencial, actúa además como receptor para el factor fago *ctx $\phi$* , que contiene genes para la síntesis de CT, esta codificado por un grupo de genes de 40kb (Alam et al., 2014; Pichel

et al., 2013). La presencia TCP (si se expresa) confiere a las cepas CTX $\phi$  negativas el potencial para ser infectadas y lisogenizadas mediante CTX $\phi$  para llegar a ser productoras de toxina del cólera (Domman et al., 2017).

La evolución más importante de las cepas de *V. cholerae* ha sido documentada en la región del fago CTX $\phi$  y la región satélite del fago (RS1) (Narendrakumar et al., 2020). El bacteriófago CTX $\phi$  está conformado por dos clusters de genes funcionales denominados núcleo y región satélite 2 (RS2). La región nuclear incluye genes *ctxAB*, que codifica toxina, junto con otros cinco genes *Psh*, gen que codifica una pilina (Cep), *pIII<sup>ctx</sup>*, enterotoxina cólerica accesoria (Ace) y toxina de la zónula occludens (Zot), los cuales son requeridos en la fagomorfogénesis (Safa et al., 2010). La región RS2 codifica proteínas con funciones en la replicación (RstA), integración (RstB) y regulación (RstR) de un sitio específico de recombinación de CTX $\phi$  de *V. cholerae* (Safa et al., 2010).

### **2.1.3. Epidemiología del cólera.**

Desde que se iniciaron los registros epidemiológicos de Cólera, los brotes se han dividido en siete pandemias (Byun et al., 1999). Hasta el siglo XIX, se conocía que el cólera existía únicamente en Asia y principalmente en India, pero luego siguiendo las rutas del comercio llegó casi a todo el mundo en seis pandemias entre 1817 a 1923, actualmente afrontamos la séptima pandemia que se inició en la Indonesia (Islas Celebes) en 1961 (Faruque et al., 1998; Fernández y Alonso, 2017), extendiéndose por el norte hacia Korea y al Oeste a toda África y sur de Europa (Maguiña, et al., 2010). El causante de esta pandemia es *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, y se diseminó por Asia y África, donde la enfermedad endémica y epidémica persiste hasta hoy (Okada et al., 2012; Reimer et al., 2011).

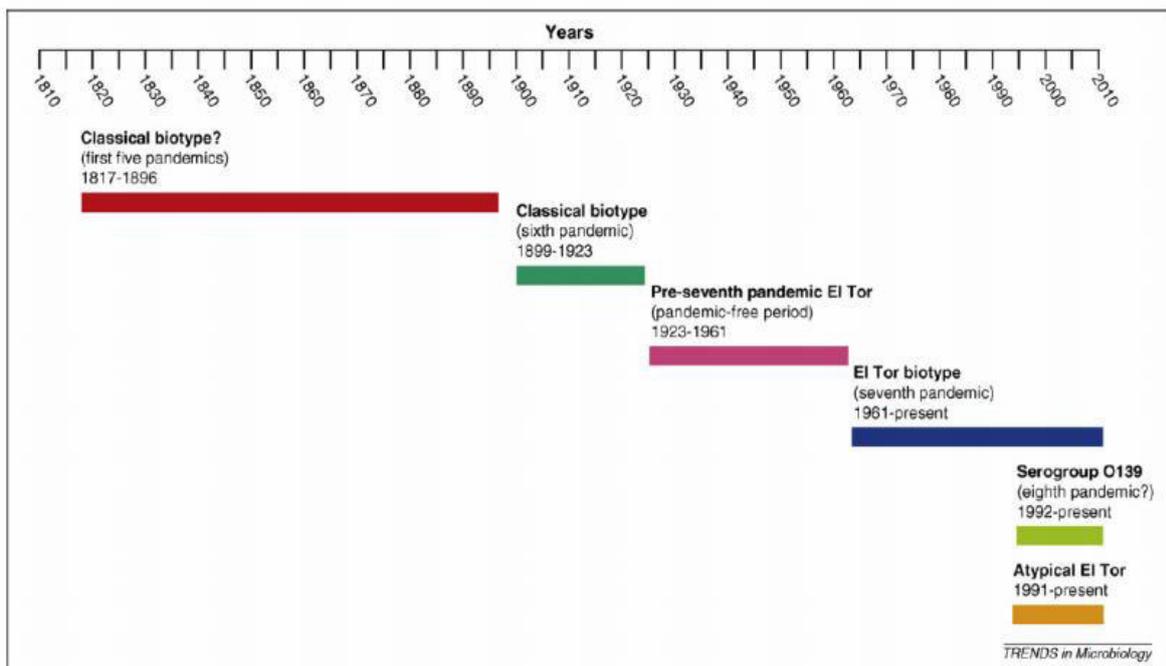
Las grandes epidemias de cólera se han presentado en Bangladesh, América del Sur, sudeste asiático y África (Jiang et al., 2000), siendo el continente más afectado África con 90%

de los casos notificados, seguido por Asia y América; en EEUU, Europa y Oceanía se notifican casos esporádicos, casi siempre importados (García et al., 2010).

Desde el comienzo de la séptima pandemia el biotipo El Tor ha desplazado gradualmente al biotipo Clásico como causa del Cólera y permanece hasta hoy (Safa et al., 2005), en Bangladesh el biotipo Clásico desapareció aparentemente en 1973, y reemergió en 1982, co-circulando con El Tor por al menos 10 años, causando algunos casos de enfermedad (Alam et al., 2014; Safa et al., 2009).

## Figura 1

### Línea de tiempo de las pandemias de cólera



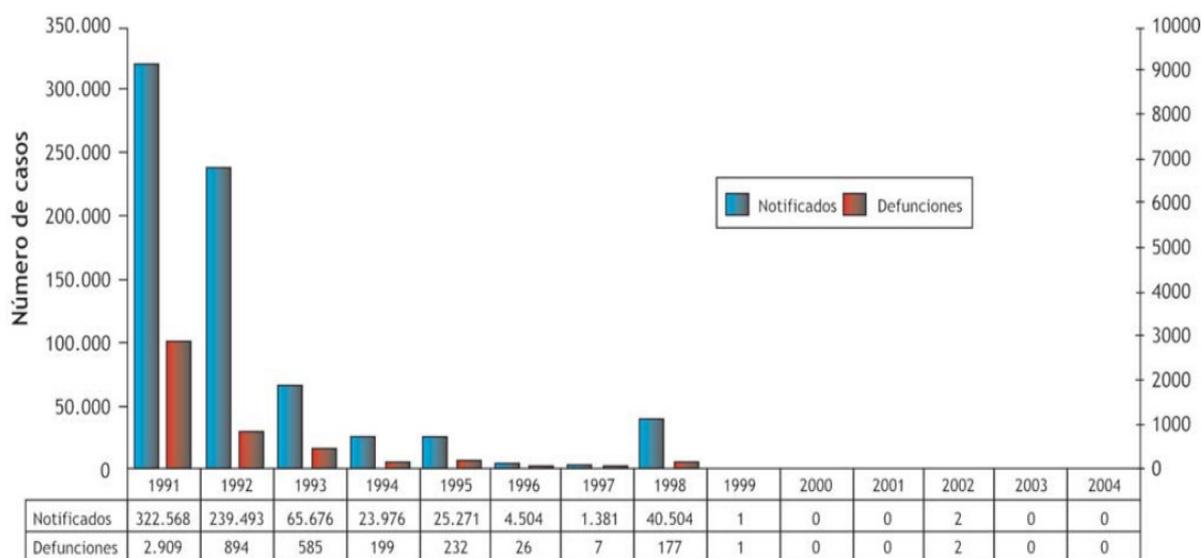
*Nota.* Tomado de “Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1,” por A. Safa, G. B. Nair, y R.Y.C. Kong, 2009, *Trends in microbiology*, 18(1), p. 48. Copyright 2009 por Elsevier Ltd.

En Latinoamérica se han experimentado dos grandes epidemias de Cólera en su historia moderna, una en 1991 y otra en 2010 (Domman et al., 2017). En 1991, el cólera reemergió en América Latina (Pichel et al., 2003), en forma de una epidemia explosiva que comenzó en Perú

y se dispersó posteriormente por el sur y Centroamérica (Reimer et al., 2011). El causante de esta epidemia se identificó como *V. cholerae* serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba. Los primeros casos se detectaron en Chancay (Lima), luego en Chimbote (Ancash), Piura, Callao y Lima posteriormente se extendió a todas las regiones del Perú (Maguiña, et al., 2010), para 1993 había alcanzado casi todo el continente americano (Gavilán y Martínez, 2011). A fines de 1992, un total de 731,312 casos de cólera y 6,323 muertes se reportaron en 21 países del hemisferio Oeste (Cameron et al., 1994).

## Figura 2

*Casos de cólera notificados en Perú de 1991 a 2004.*



*Nota.* Tomado de Casos de cólera según notificación, Perú 1991-2004 de protocolos de vigilancia epidemiológica – parte 1: cólera, 2006, Ministerio de Salud / Dirección General de Epidemiología.

En 1992 se detectó un nuevo serogrupo, O139 que causó un brote de Cólera en India (Madras) y otros países de Asia (Dutta et al., 2013; Kanampalliwar y Singh, 2020) como Bangladesh (Borroto, 1997; Huapaya et al., 2005), a este nuevo serogrupo se denominó

Bengala (Dixit et al., 2014; Faruque et al., 1998), causante de cólera epidémico. Este serogrupo se detectó en Perú, en 2004 al sur de Lima y mediante la prueba de PCR se indicó que no era portadora del gen de la toxina colérica (Huapaya et al., 2005).

En octubre de 2010, tras el terremoto en Haití se desencadenó una epidemia por *V. cholerae*, resultando en más de 385 000 personas infectadas y 5800 muertes hasta 7 julio de 2011 (Reimer et al., 2011).

Al final de la epidemia se reportó 797000 personas afectadas y 9400 fallecidos (Domman et al., 2017), la fuente de la epidemia permanece controversial sin embargo se cree que fue importada por las fuerzas de paz de Naciones Unidas que arribaron de Nepal (Dixit et al., 2014).

Mediante secuenciamiento completo de genomas se demostró que ambas epidemias en Latinoamérica fueron el resultado de la introducción intercontinental de linajes de circulación global (7PET) y no derivaron de linajes locales. La información de secuenciamiento de genomas no sustenta la hipótesis que El Niño fue responsable por la introducción del Cólera en el Perú en 1991 mediante el transporte a larga distancia de patógenos acuáticos desde Asia a través de un corredor biológico o por el surgimiento de linajes locales (Domman et al., 2017).

Otros brotes causado por *V. cholerae* en América, incluyen los brotes en Venezuela en 1996 y 1998 (Fernández y Alonso, 2017) y en México durante el 2013 en la región de Hidalgo, México, se identificó como *V. cholerae* O1, serotipo Ogawa, biotipo El Tor, el cual se presume que fue resultado de la importación del clon de Haití (Domman et al., 2017), el análisis detallado de los patrones de bandas confirmó que las cepas eran indistinguibles a la cepa causante de los brotes de Haití, República Dominicana y Cuba (Díaz et al., 2017).

En 1995, se realizó un estudio que identificó una nueva variante de *V. cholerae* O1 denominada “Amazonia” en Brasil, esta variante caracterizada por AP-PCR, se diferenció de los cuatro principales grupos patogénicos como Clásico, El Tor, Gulf y Bengal (Coelho et al., 2005).

En India entre 2002 y 2010, se detectaron 281 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 no-O139, denominados NAG'S (No aglutinantes), toxigénicos y no toxígenos que han causado enfermedad diarreica en India y otros países incluido Haití (Dutta et al., 2013).

Otros brotes en fuera del continente americano se produjeron en Zambia durante 2009, 2010 y 2016 (Mwape et al., 2020); Irán en 2011 y 2015 (Hajia y Sohrabi, 2019) y Kenia 2007, 2010 y 2015 a 2017 (Bundi et al., 2019). Solo en el 2013, 22 países de África han reportado 56 329 casos de cólera, incluyendo 1366 muertes con una tasa de fatalidad de 2.43% (Adewale et al., 2016).

Estudios que integran la investigación epidemiológica, clínica y ambiental, proporcionan nuevas evidencias que demuestran la importancia del clima y las condiciones ambientales en la dispersión de epidemias causadas por *Vibrio*. La dinámica epidémica asociada con la aparición de infecciones causadas por *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en 1991 y 1997 respectivamente en Perú apoya la teoría de dispersión transoceánica de las infecciones por *Vibrio* (Gavilán y Martínez, 2011).

#### ***2.1.4. Aislamiento e identificación de V. Cholerae***

El aislamiento de *V. cholerae* a partir de muestras clínicas (heces), se realiza utilizando como medio de enriquecimiento agua alcalina peptonada (APA) y como medio selectivo agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS).

La muestra se coloca en un tubo con agua alcalina peptonada a pH 8,5, para el enriquecimiento bacteriano, a 35 – 37°C por un periodo de 6 - 8h, el pH no inhibe el crecimiento del *V. cholerae*, pero sí el de otros microorganismos, usualmente es necesario hacer este enriquecimiento para aumentar la recuperación en los medios de aislamiento primario (Rojas et al., 2006).

Después del enriquecimiento, se subcultiva una asada en agar TCBS, un medio selectivo, donde las colonias sospechosas de *V. cholerae* se observan redondas, ligeramente convexas, de apariencia cremosa que miden de 2 a 4mm de diámetro y de color amarillo (por la fermentación de la sacarosa). El cultivo en TCBS se incuba a 35 – 37°C por un periodo de 18 - 24h (Bravo y Guillén, 2011; Rojas et al., 2006).

La identificación de especie se realiza mediante pruebas bioquímicas utilizando medios de cultivo diferenciales como agar TSI (Triple Sugar Iron) y LIA (Lysine Iron Agar) y pruebas auxiliares como, prueba de oxidasa y prueba de la “cuerda”.

En agar TSI, se observa la fermentación de la glucosa por la acidificación del medio en el fondo del tubo virando el indicador a color amarillo, sin producción de gas glucosa ni ácido sulfhídrico y en medio de cultivo LIA, se observa la decarboxilación de la lisina o presencia de lisina descarboxilasa, se mantiene el color del medio, pico y fondo de color violeta, también se coloca una tira de papel con reactivo de Gilles en el medio LIA que se torna color grosella, que indica producción de indol (Instituto Nacional de Salud [INS], 1997).

La prueba de la cuerda se basa en la capacidad que tienen las colonias de *V. cholerae* de producir una sustancia mucosa, cuando se emulsionan en una solución de desoxicolato sódico al 0,5%, se aprecia la formación del cordón o cuerda al levantar suavemente el asa de siembra (INS, 1997).

La prueba de oxidasa, se utiliza para detectar la presencia de la enzima citocromo C oxidasa, esta, cataliza el transporte de electrones de compuestos donantes (NADH) a receptores de electrones (por lo general el oxígeno). Esta prueba es positiva para *V. cholerae* y se evidencia por la coloración grosella (Rojas et al., 2006).

La PCR (Reacción en cadena de polimerasa) para *V. cholerae* permite identificar la presencia del microorganismo y genes asociados a virulencia en muestras clínicas, ambientales y de alimentos (agua, plancton, mejillones). También se han desarrollado protocolos de PCR para identificar genes que codifican los antígenos somáticos de los serogrupos epidémicos O1 y O139, muy útil para la resolución de cepas rugosas, autoaglutinantes o que presentan reacciones débiles con los antisueros (World Health Organization [WHO], 2010).

El género y especie se identifica por amplificación de un fragmento del gen *Vc-m* (16S-23S) de 300pb, mientras que, para detectar la presencia de la toxina del cólera, CT, se amplifica un fragmento del gen *ctxA* de 564pb que codifica para la subunidad A de la toxina. Otro PCR se ha desarrollado para identificar el gen *tcp*, que codifica la proteína estructural de la fimbria TCP, del alelo El Tor. El fragmento amplificado consta de 451pb (WHO, 2010).

Existen diversos ensayos de PCR tanto convencional como PCR en tiempo real, algunos protocolos están diseñados para identificar varios genes en una única reacción, por ejemplo, el ensayo desarrollado para identificar cuatro genes, toxina del cólera (*ctxA*), hemolisina (*hlyA*), *rfb*-específico para O1 y *rfb*-específico para O139 (Huang et al., 2009).

### **2.1.5. Ecología de *V. cholerae***

*V. cholerae* es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, tanto en ríos, como en estuarios y ambientes marinos, encuentra condiciones favorables en aguas caracterizadas por niveles moderados de salinidad, alto contenido de nutrientes, temperaturas cálidas, pH

neutro o ligeramente alcalino y presencia de macrófitas acuáticas, fitoplancton, zooplancton, peces, moluscos y crustáceos (Borroto, 1997), sobrevive y se multiplica asociada al plancton, independientemente de la aparición de infecciones humanas (Mirande et al., 2007). Se ha sugerido que la multiplicación de los vibriones también se da en copépodos (Constantin de Magny y Colwell, 2009) y tiene lugar en el exoesqueleto quitinoso; donde *V. cholerae* secreta quitinasa, lo que le permite utilizar la quitina como fuente de nutrientes (Borroto, 1997).

Los cambios en los niveles de temperatura y salinidad del agua de mar tienen una asociación directa con la aparición de brotes infecciosos (Gavilán y Martínez, 2011). En periodos inter-epidémicos no es posible recuperar *V. cholerae* O1 empleando los métodos de cultivo tradicionales (Colwell y Grimes, 2000), también se ha demostrado la existencia de la forma VNC (viable no cultivable) a la cual “entra” *V. cholerae* en respuesta a condiciones desfavorables de nutrientes y ambientales, como baja concentración de nutrientes, temperaturas, pH o salinidad distintos a los óptimos (Colwell y Huq, 1994). Se postula que las formas VNC explicarían la manera en que *V. cholerae* se mantiene en el ambiente durante los periodos inter-epidémicos. Las formas VNC pueden revertir al estado cultivable, manifestando plenamente su capacidad de infección, patogenicidad y transmisibilidad (WHO, 2010).

En el océano Pacífico se presume la existencia de formas VNC que revirtieron a viables cultivables (VC) (Mirande et al., 2007), también se ha mostrado que *V. cholerae* es capaz de colonizar ecosistemas de agua dulce en su forma viable, aunque no necesariamente cultivable (VNC), si encuentra sustratos orgánicos e inorgánicos que favorezcan su supervivencia (Borroto, 1997). En países donde el cólera permanece endémico *V. cholerae* está presente en reservorios acuáticos naturales de manera permanente, esto ofrece una explicación para la permanencia de un foco endémico de cólera durante periodos inter-epidémicos (Narendrakumar et al., 2020).

Las investigaciones sobre nuevas variantes ayudan a comprender el probable origen sobre que variantes patogénicas provienen de un ancestro no patogénico y que los eventos naturales contribuyen a su aptitud evolutiva (Safa et al., 2010).

Para explicar la aparición de cólera en el Perú, se propusieron diferentes mecanismos, entre ellos, la dispersión mediante el agua de lastre de los barcos y la transmisión humana, aunque ninguna de estas dos teorías se ha podido demostrar (Gavilán y Martínez, 2011). Otra propuesta indicaba que el agente infeccioso ya estaba presente en el medio ambiente, y que el calentamiento de las aguas producido por la llegada del fenómeno de El niño provocó el aumento de este organismo en el medio ambiente alcanzando dosis infectivas (Gavilán y Martínez, 2011; Maguiña, et al., 2010).

En 1998, Mouriño-Perez propone la hipótesis sobre el movimiento de aguas de Asia a Perú durante el fenómeno del Niño, esto pudo provocar el transporte de las poblaciones patógenas de *V. cholerae* que atrapadas en estas aguas llegaron a Perú durante el Niño de 1991, causando el inicio de la epidemia (Gavilán y Martínez, 2011).

#### **2.1.6. Epidemiología molecular de *V. cholerae***

La epidemiología molecular surge de la integración de la biología molecular a la epidemiológica tradicional, está enfocada al estudio a nivel molecular de los microorganismos con el fin de determinar su distribución, prevenir enfermedades infecciosas en poblaciones humanas y de animales y sus posibles interacciones. La aplicación de la biología molecular en la epidemiología sirve para la identificación de subtipos microbianos y sus relaciones lo que permite, identificar brotes tanto en la fase de detección como en la de contención y resolución (Fernández et al., 2013), identificar la fuente de contaminación y las rutas de diseminación, evaluar si un aislamiento es parte del brote o si se relaciona con casos esporádicos, confirmar la asociación con un vehículo o vector, determinar si una infección es nueva o recurrente y

realizar un análisis de clonalidad (Neoh et al., 2019). La tipificación epidemiológica está basada en la suposición de que los genotipos multilocus usados como marcadores epidemiológicos son estables en el espacio y el tiempo, esto es verdad solo si el flujo genético es raro o ausente en la población bajo estudio (Riaño et al., 2003).

Varias técnicas moleculares han aportado información epidemiológica, entre ellas, AFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados) que fue descrita como una técnica para detectar fragmentos de restricción genómico por amplificación de PCR, utilizando un número limitado de primers (Jiang et al., 2000), entre otras se encuentran la ribotipificación por RFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción), MEE (electroforesis de enzimas multilocus), RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), MLST (tipificación multilocus de secuencias), y PFGE, electroforesis en gel de campo pulsado, considerada una de la herramientas más importantes en la subtipificación molecular de bacterias (Zamudio et al., 2011).

A nivel mundial se han organizado redes de vigilancia basada en la epidemiológica molecular, una de estas es la red Pulsenet establecida por CDC, para facilitar la subtipificación de bacterias de transmisión alimentaria que compara patrones obtenidos por PFGE de un país con los obtenidos en otros (Swaminathan et al., 2001). Perú integra esta red, con quienes comparte los perfiles genéticos PFGE de las cepas patógenas aisladas de ETA (Zamudio et al., 2011).

### ***2.1.7. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)***

La electroforesis en gel de campo pulsado, PFGE por sus siglas en inglés, fue desarrollada por Schwartz y Cantor en 1984 (Cardozo et al., 2013), como una variante de la electroforesis en gel de agarosa. Schwartz et. al. introdujo el concepto sobre que las moléculas de ADN mayores a 50kb pueden ser separados en un gel de agarosa mediante el uso de campos

eléctricos alternados (Basim y Basim, 2001). Esta técnica es considerada el “Gold Standard” de la tipificación molecular de microorganismos bacterianos, permite separar moléculas de ADN que tienen un tamaño desde 20 kb hasta 10 Mb (Barret et al., 2006; Rahaman et al., 2015). Es considerada como una técnica molecular de tercera generación para la tipificación bacteriana posterior al análisis de plásmidos y uso de enzimas de restricción (Neoh et al., 2019).

El resultado de la PFGE es un patrón electroforético (perfil de ADN), altamente específico que permite examinar múltiples variaciones a lo largo del genoma con el objetivo de identificar con precisión cepas específicas y vincularlas a brotes (Gautom, 1997). En Perú, el Instituto Nacional de Salud (INS) ha usado PFGE para subtipificar los aislamientos relacionados con diferentes brotes de enfermedades de transmisión alimentaria causadas por bacterias (Zamudio et al., 2011).

La PFGE se basa en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y para esto utiliza enzimas con baja frecuencia de corte que generan un número relativamente pequeño de fragmentos grandes de ADN, generalmente 10 a 30 con tamaños que van desde 10 a 800 Kb (Fernández et al., 2013), estos fragmentos son sometidos a la influencia de dos campos eléctricos, que forman ángulos cercanos a la perpendicularidad y cambian de manera alterna (pulsos). Las moléculas grandes son elongadas a lo largo de la dirección del campo eléctrico con el fin de penetrar a través de los poros del gel (Cardozo et al., 2013), los fragmentos de ADN se muestran finalmente en un gel de agarosa como un patrón de bandas discretas o “ADN fingerprint”.

Este método altamente resolutivo permite establecer el grado de similaridad genética entre aislamientos epidemiológicamente relacionados de manera que se puede realizar una discriminación genotípica de las poblaciones bacterianas (Zamudio et al., 2011), con el propósito de determinar clusters o confirmar brotes de enfermedades. Esta técnica es aplicada

con fines epidemiológicos por su sensibilidad, reproducibilidad y alto índice discriminatorio (Fernández et al., 2013; Struelens, 1996).

En la electroforesis se incluye una cepa control previamente caracterizada junto con los aislamientos a estudiar, de acuerdo a los protocolos de la Red PulseNet la cepa utilizada como patrón universal es *Salmonella* Braenderup H9812 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2017). La obtención de resultados esperados con la cepa control indica que, los pasos previos a la electroforesis y las condiciones de corridas son apropiadas, y los resultados son reproducibles.

La enzima de restricción adecuada para PFGE debe tener relativamente pocos sitios de corte y brindar fragmentos grandes del ADN blanco, el principal factor de selección es la base de composición del % de contenido G+C del ADN blanco (Basim y Basim, 2001). Para la digestión del ADN de *V. cholerae* se utiliza la enzima *NotI* que tiene una secuencia de reconocimiento de 8pb, 5'-GC↓GGCCGC-3' (Mahalingam et al., 1994), es de corte poco frecuente en genomas con contenido de G+C cerca de 35-55%, mientras que la enzima *XbaI* reconoce una secuencia de 5pb 5'-T↓CTAGA-3' (Basim y Basim, 2001), es utilizada para la digestión de la cepa control *Salmonella* Braenderup.

**Tabla 1**

*Enzimas de restricción más usadas en PFGE.*

Enzima	Secuencia palindrómica (5' ----> 3')	%AT	%GC
<i>ApaI</i>	GGGCC^C	0	100
<i>AscI</i>	GG^CGCGCC	0	100
<i>NotI</i>	GG^GGCCGC	0	100
<i>SmaI</i>	CCC^GGG	0	100
<i>Sse8387I</i>	CCTGCA^GG	25	75
<i>XbaI</i>	T^CTAGA	50	50

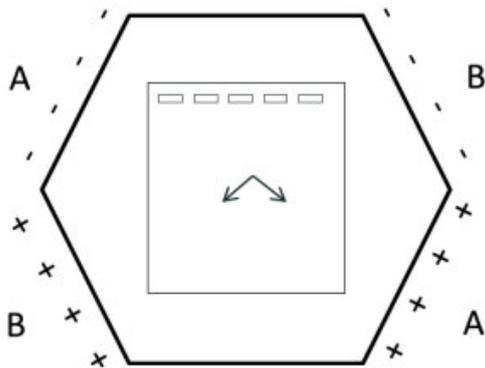
*Nota.* Tomada de “Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*”, por A.M. Cardozo, L.F. Ramón, R.A. Poutou-Piñales, A.K. Carrascal-Camacho y D.C. Zambrano, 2013, *Universitas scientiarum*, 18(2), p. 207.

### **SISTEMA CHEFF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field)**

Existen varios sistemas de campo eléctrico aplicados en PFGE entre estos está el sistema CHEFF. Este sistema evita los efectos de distorsión de ambos bordes de la cámara y electrodos pasivos, contiene 24 puntos de electrodos en un contorno hexagonal, produce un campo eléctrico uniforme para que el ADN avance en línea recta, y usa un ángulo de reorientación de  $120^\circ$  (Basim y Basim, 2001), posee una unidad de “Switch” que controla la reorientación de los ángulos entre campos eléctricos; sin embargo no proveen un cambio rápido suficiente para mejorar la separación de moléculas de DNA menor a 50kb.

### **Figura 3**

*Sistema de campo eléctrico CHEFF.*



*Nota.* Tomada de “Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*”, por A.M. Cardozo, L.F. Ramón, R.A. Poutou-Piñales, A.K. Carrascal-Camacho y D.C. Zambrano, 2013, *Universitas scientiarum*, 18(2), p. 207.

### ***2.1.8. Análisis de perfiles de ADN***

Consiste en la comparación de los perfiles de ADN obtenidos a partir de la electroforesis de cada aislamiento y así obtener el grado de relación genética entre estos, puede realizarse de manera visual o asistida por algún software para el análisis de imágenes (Fernández et al., 2013).

El análisis visual de los perfiles basado en el criterio de tipificación de cepas bacterianas propuesto por Tenover et al. (1995); indica que si dos patrones no difieren en sus bandas, se consideran indistinguibles y por lo tanto las cepas analizadas se asocian a un brote; si dos patrones difieren de dos a tres bandas, se consideran estrechamente relacionados; si estos difieren de cuatro a seis bandas, se consideran posiblemente relacionados; y si difieren en siete o más bandas, se consideran diferentes (Cardozo et al., 2013; Neoh et al., 2019). En resumen, para establecer la relación genética de los perfiles se asignan cuatro categorías para los aislamientos que son: indistinguibles, estrechamente relacionados, posiblemente relacionados y no relacionados (Tenover et al., 1995).

Para el análisis computarizado de los perfiles mediante software se puede utilizar Bionumerics® (Applied Maths, Bélgica), este programa permite normalizar las condiciones de migración de los perfiles electroforéticos entre experimentos diferentes, por lo que se pueden almacenar los perfiles en una base de datos (Fernández et al., 2013; Neoh et al., 2019). Algunas de sus medidas obligan al usuario a tomar decisiones críticas durante el análisis, en particular para la asignación de bandas anormales y para la interpretación de perfiles estrechamente relacionados (Cardozo et al., 2013).

La relación genética entre cepas basada en el número y tamaño de las bandas del ADN, se expresan como porcentaje de similaridad (Struelens, 1996). Para determinar la similaridad uno de los coeficientes más utilizados es el coeficiente Dice.

$$S_D = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Coeficiente Dice:

a: : número de fragmentos en común de dos perfiles.

b y c: : número de fragmentos que pertenecen solo a uno de los perfiles.

A partir de las matrices de distancia obtenidas, pueden construirse árboles o “dendrogramas” empleando un método de agrupamiento como UPGMA (método de agrupamiento en pares sin asignación de peso utilizando medias aritméticas) (Fernández y Alonso, 2017), de esta manera se ilustra gráficamente la relación entre los aislamientos.

### III. MÉTODO

#### 3.1. Tipo de Investigación

Esta investigación fue de tipo descriptiva, observacional y retrospectiva.

#### 3.2. Ámbito temporal y espacial

Se realizó la caracterización microbiológica y molecular de aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 obtenidos durante 1991 a 1995 en diferentes regiones de Perú. Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos (LRNE) y Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular (LBBM) del Instituto Nacional de Salud (INS).

#### 3.3. Variables

- Perfiles de ADN de *V. cholerae*
- Serotipos
- Fecha de aislamiento.

#### 3.4. Población y muestra

La población está conformada por los aislamientos *Vibrio cholerae* obtenidos en Perú durante el periodo 1991 a 1995, y la muestra en estudio está comprendida por los aislamientos de *V. cholerae* obtenidos de diferentes regiones del Perú que ingresaron al Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS) durante los años 1991 a 1995.

### 3.5. Instrumentos

- Recopilación de información epidemiológica a partir de los registros de la época.
- Pruebas bioquímicas: determinación de género y especie.
- Pruebas serológicas: determinación de serotipos de *V. cholerae*, Ogawa o Inaba.
- PCR: determinación de gen de la toxina colérica.
- PFGE: determinación de perfiles de ADN.
- Bionumerics® versión 7.6, Applied Maths, Bélgica (software bioinformático): determinación de la similaridad entre perfiles de ADN y construcción de dendrogramas.

### 3.6. Procedimientos

Se seleccionó 140 aislamientos de *V. cholerae* O1 obtenidos a partir de hisopados rectales, que ingresaron al INS entre 1991 y 1995, almacenados a -80 °C, que forman parte del cepario del Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos (LRNE) del INS. Distribuidos por años de la siguiente manera: 50 aislamientos de 1991, 30 aislamientos de 1992, 20 aislamientos de 1993, 20 aislamientos de 1994 y 20 aislamientos de 1995, recibidos a través de la red de laboratorios a nivel nacional procedentes de 12 regiones que comprenden: Lima, Lambayeque, Callao, Piura, La Libertad, Ancash, Puno, Cusco, Huánuco, Loreto, Amazonas y Madre de Dios.

Se registró la información correspondiente a los aislamientos encontrados en el registro de ingreso de muestras de *V. cholerae* O1 de los años 1991 a 1995 incluyendo los datos epidemiológicos tales como el serotipo, edad, sexo, tipo de muestra y lugar de procedencia.

### **3.6.1. Viabilidad de los aislamientos de *V. cholerae***

Para evaluar la viabilidad de los aislamientos se inoculo 0,5mL de las muestras descongeladas gradualmente, en 10mL de agua alcalina peptonada (APA) al 1% con pH 8,6 e incubado por 6-8 h a 37°C, posteriormente se tomó una asada de la superficie del medio APA y se sembró en el medio selectivo TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) y se incubó a 37°C por 24h. (INS, 1997).

En el medio TCBS, las colonias sospechosas de *V. cholerae* se observan de color amarillo, redondas, cremosas y ligeramente convexas, de 2 a 4 mm, estas colonias que muestran la morfología típica, se cultivaron en medio TSA (Agar Trypticosa Soya) para realizar posteriormente pruebas presuntivas rápidas: oxidasa y prueba del cordón, también se cultivaron en medios de diferenciación para su identificación bioquímica (INS, 1997).

### **3.6.2. Caracterización microbiológica**

**3.6.2.1. Pruebas bioquímicas en medio de cultivo TSI.** A partir de una colonia sospechosa de *V. cholerae* en medio TSA de 18h de crecimiento, se realiza el cultivo en el medio diferencial TSI (Triple Sugar Iron) a 37°C (INS, 1997), la lectura se efectuó después de 18h. Se observó el fondo del tubo de color amarillo que indica la acidez del medio por la degradación de la glucosa y la parte superior del plano inclinado de color rojo, sin formación de gas a partir de glucosa ni hidrógeno sulfurado. La lectura esperada para *V. cholerae* es K/A (INS, 1997).

**3.6.2.2. Pruebas bioquímicas en medio de cultivo LIA.** A partir de la misma colonia sospechosa de *V. cholerae* en medio TSA, se realiza el cultivo en el medio diferencial LIA (Lysine Iron Agar) a 37°C (INS, 1997), la lectura se efectuó a las 18h. Se observó la descarboxilación de la lisina (fondo y plano inclinado de color morado intenso), indicando la alcalinidad del medio. La lectura esperada para *V. cholerae* es K/K que indica la alcalinidad. Pevio a la incubación se colocó una tira de papel de filtro impregnada con reactivo de Gilles, si la colonia es *V. cholerae* se espera que la parte impregnada se torne de color rosado o fucsia que indica la producción de Indol (INS, 1997).

**3.6.2.3. Prueba oxidasa.** Para esta prueba se utilizó el método indirecto en papel, sobre un trozo de papel filtro se colocó 2-3 gotas del reactivo de oxidasa (N-N dimetil parafenilenodiamino oxalato al 1% en solución acuosa), y sobre el papel impregnado, se extiende con un mondadientes estéril una colonia, a partir de TSA. La coloración violeta oscuro que aparece entre 30 y 60 seg indica un resultado positivo. Se utilizó como control positivo *P. aeruginosa* ATCC 27853 y control negativo *E. coli* ATCC 25922 (INS, 1997).

**3.6.2.4. Prueba de la cuerda.** Se colocó sobre un portaobjeto una gota de desoxicolato de sodio al 0.5% y se realizó una suspensión con el cultivo. Para *V. cholerae* la prueba es positiva, mostrándose la formación de una cuerda al levantar suavemente el asa de siembra (INS, 1997).

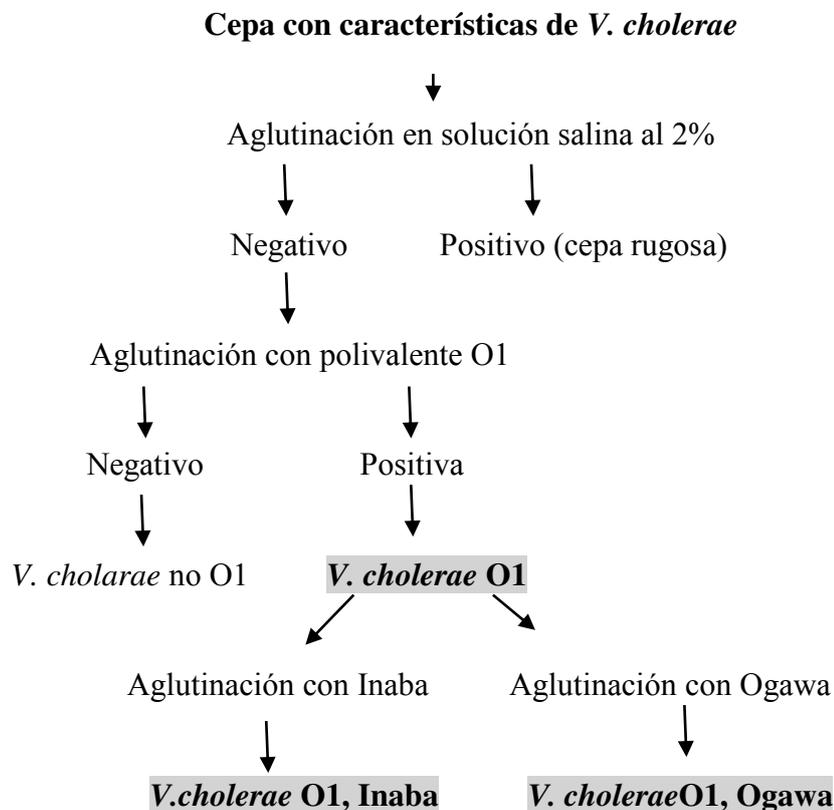
**3.6.2.5. Pruebas serológicas.** La serotipificación de *V. cholerae* se realizó con antisuero polivalente O1, y antisueros específicos para identificar los serotipos Inaba y Ogawa, a partir de un cultivo en medio TSA.

Sobre una lámina de vidrio se preparó 2 suspensiones del cultivo con una gota de solución salina cada una, sobre una de las suspensiones se colocó una gota de antisuero

polivalente O1 de *V. cholerae*, la otra suspensión se usó como control para verificar que no ocurra aglutinación espontánea. Se mezcló las suspensiones con el asa de siembra e inmediatamente se movió la lámina en vaivén, la lectura se realizó antes de un minuto, si se observa la presencia de grumos de aglutinación la prueba es positiva. Si la prueba es positiva con el antisuero O1 se ensaya con antisueros Inaba y Ogawa, de la misma manera (INS, 1997).

#### Figura 4

*Flujograma para determinar serogrupo y serotipos de V. cholerae O1.*



*Nota.* Adaptada de “Manual de procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*”, por M.I. Caffer, R. Terragno, S. González, M.R. Viñas, M. Pichel, y N. Binsztein, 2007, *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*. Centro Regional de Referencia para América. Buenos Aires: WHO Global Salm Surv, p.16.

### 3.6.3. Caracterización molecular

**3.6.3.1. Amplificación de fragmentos de los genes *V-cm* y *CtxA*.** Para confirmar la identificación de *V. cholerae* y la presencia de toxina del cólera en los aislamientos obtenidos, se efectuó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para identificar la región 16S-23SrRNA de *V. cholerae*, y otra prueba PCR para identificar el gen *CtxA*, que codifica la subunidad A de la toxina del cólera, los primers utilizados se indican en la tabla 2.

La extracción de ADN de cultivos de *V. cholerae*, se realizó mediante el método del hervido, conocido como “boilling”; se tomó una asada del cultivo de *V. cholerae* de 24h de crecimiento en TSA y se suspendió en 500µL de agua de grado molecular, esta suspensión se sometió a 100°C por 10 min en “baño maría”, con el fin de lisar las células por calor, luego se dejó enfriar y se centrifugó a 12000 rpm por 2 min para precipitar los detritos celulares. Se recogió 200µL del sobrenadante que contiene el ADN y se transvasó a un microtubo estéril. El ADN se almacenó a -20 °C, de estos, 3µL se utilizaron posteriormente como templado para la reacción de PCR.

La amplificación de los fragmentos *V-cm* y *CtxA* por PCR se realizó de acuerdo al protocolo del Servicio Enterobacterias – INEI-ANLIS “Dr. C. G. Malbrán” 2010, modificado según las condiciones del laboratorio. La mezcla de reacción para ambas pruebas se muestra en la tabla 3 y 4, el control negativo que se utilizó para la prueba fue la cepa *E. coli* ATCC 25922, y como control positivo la cepa *V. cholerae* ATCC 14033, también se realizó una reacción como control de reactivos con agua de grado molecular. Las condiciones de ciclado para la PCR se muestran en la tabla 5.

**Tabla 2**

*Primers utilizados para identificar V. cholerae y toxina del cólera.*

Blanco	Primers	Secuencia ( 5'-3' )	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>V. cholerae</i>	pVC-F2	5'- TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG - 3'	300	Chun et al. (1999)
VC 16S-23SrRNA	pVCm-R1	5'- AGTCACTTAACCATAACAACCCG - 3'		
<i>CtxA</i>	CT 94F	5'- CGCGCAGATTCTAGACCTCCTG - 3'	564	Rivera et al. (2003)
	CT614R	5'- CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC - 3'		

*Nota.* Adaptada de “Manual de procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*”, por M.I. Caffer, R. Terragno, S. González, M.R. Viñas, M. Pichel, y N. Binsztein, 2007, *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*. Centro Regional de Referencia para América. Buenos Aires: WHO Global Salm Surv, p.34.

**Tabla 3**

*Mezcla de reacción de PCR para identificar Vc-m16S-23S de V. cholerae.*

Componentes	Stock [ ]	Final [ ]	Vol. 1X (µL)
Buffer	10 X	1	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50mM	3	1,5
dNTP's	10mM	0,8	2
pVC-F2	10uM	0,8	2
pVCm-R1	10uM	0,8	2
Taq Polimerasa	5U/ul	1,25	0,25
H <sub>2</sub> O			11,75
ADN			3
Volumen total (uL)			25

*Nota.* Adaptada de “Manual de procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*”, por M.I. Caffer, R. Terragno, S. González, M.R. Viñas, M. Pichel, y N. Binsztein, 2007, *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*. Centro Regional de Referencia para América. Buenos Aires: WHO Global Salm Surv, p.35.

**Tabla 4**

*Mezcla de reacción de PCR para identificar Ctx-A (toxina colérica).*

Componentes	Stock [ ]	Final [ ]	Vol. 1X (uL)
Buffer	10 X	1	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50mM	3	1,5
dNTP's	10mM	0,8	2
CT 94F	10uM	0,4	1
CT 614R	10uM	0,4	1
Taq Polimerasa	5U/ul	1,25	0,25
H <sub>2</sub> O			13,75
ADN			3
Volumen total (uL)			25

*Nota.* Adaptada de “Manual de procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*”, por M.I. Caffer, R. Terragno, S. González, M.R. Viñas, M. Pichel, y N. Binsztein, 2007, *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*. Centro Regional de Referencia para América. Buenos Aires: WHO Global Salm Surv, p.35.

**Tabla 5**

*Condiciones de ciclado para la amplificación Vc-m y ctxA.*

Etapas	Temperatura (C°)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	2 min
Desnaturalización	94	45 s
Alineamiento	61	45 s
Extensión	72	45 s
Extensión final	72	10 min

} 30  
ciclos

*Nota.* Adaptada de “Manual de procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*”, por M.I. Caffer, R. Terragno, S. González, M.R. Viñas, M. Pichel, y N. Binsztein, 2007, *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*. Centro Regional de Referencia para América. Buenos Aires: WHO Global Salm Surv, p.35.

Los productos de PCR se detectaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando como buffer de corrida TAE 0.5X (Tris-Ácido Acético EDTA) y corriendo un

voltaje de 100V durante 50 minutos. Para calcular el tamaño de los fragmentos obtenidos, se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb. Las bandas esperadas se tiñeron con Bromuro de Etidio al 1% y visualizaron con un sistema de fotodocumentación UV.

**3.6.3.2. Subtipificación molecular de *V. cholerae* O1.** La subtipificación molecular de *V. cholerae* O1 por PFGE se realizó según el protocolo estandarizado de la Red PulseNet Internacional, desarrollado por el CDC, USA (CDC, 2017); con modificaciones sugeridas por el grupo de trabajo del servicio de enterobacterias, Departamento de Bacteriología, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Se modificó el tiempo de la electroforesis de acuerdo a las condiciones del equipo CHEF mapper Bio-rad® del INS. El tiempo total de electroforesis de 19h se modificó a 17,5 h, en el bloque 1 se cambió de 13 h a 12 h y en el bloque 2 de 6h a 5,5h. Se subtipificaron 91 aislamientos confirmados como *V. cholerae* O1 con presencia de toxina de cólera.

Se preparó una suspensión celular de *V. cholerae* de una densidad óptica de 0.9 calculada a 610nm de longitud de onda, luego se mezcló 100 uL de cada suspensión celular con 100 uL de agarosa SKG al 1% y 5ul de proteinasa K (20mg/mL), esta mezcla se colocó en moldes pequeños para que solidifiquen.

Estos bloques (plugs) de agarosa se sumergieron en 5mL de buffer de lisis celular (ver anexo 2) con 25uL de proteinasa K y colocados en baño maría con agitación por 2h a 54°C, una vez concluida la lisis celular, se realizaron 6 lavados de los bloques de agarosa para eliminar residuos celulares producidos durante la lisis celular, los 2 primeros lavados se realizan con 15 mL de agua de grado molecular y los siguientes con 15 mL de buffer Tris-EDTA (ver anexo 2) por 15 m cada uno a 50°C.

El ADN fijado en los bloques de agarosa se sometió a la actividad de enzimas de restricción, *NotI* para *V. cholerae* y *XbaI* para la cepa patrón *Salmonella* Braenderup H9812 (marcador de peso molecular) por 6h.

La electroforesis se realizó en un equipo CHEF Mapper bio-rad<sup>®</sup>, con un programa de 2 bloques, las condiciones de separación en el primer bloque fueron de 2s a 10s durante 12,5 h, seguido de un segundo bloque de 20s a 25s por 5.5 h, en un campo eléctrico de 6V/cm y un ángulo de 120°. Los geles obtenidos se tiñeron con Bromuro de Etidio 0,1% y se realizó la captura de imágenes en un sistema fotodocumentador Chemidoc XRS<sup>®</sup>.

#### **3.6.4. Análisis bioinformático**

El análisis de los perfiles de ADN obtenidos se realizó con el programa bioinformático Bionumeris<sup>®</sup> versión 7.6 (Applied Maths, Bélgica), las imágenes en formato TIFF se normalizaron usando como estándar universal el patrón de la cepa *Salmonella* Braenderup H9812 en cada gel contra la referencia en la base de datos del software. Los perfiles de PFGE fueron comparados utilizando el coeficiente Dice, obteniendo una matriz de distancias calculadas que se representaron gráficamente a través de dendrogramas, utilizando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). El agrupamiento de los perfiles de ADN - PFGE se hizo utilizando una ventana de tolerancia de bandas de 1% y optimización de posición 1%.

Se realizó el análisis de los dendrogramas creados, en función de la comparación y agrupación de los perfiles de ADN, en estos gráficos nos indican un valor de similaridad que va desde 0 a 100%, los agrupamientos con un índice superior al 95% se consideran clonales (Rafique et al., 2016).

### **3.7. Análisis de datos**

- Índice de similaridad DICE para realizar la comparación de los perfiles de ADN generados por PFGE.
- La elaboración de dendrograma se realizará por el método de agrupamiento UPGMA.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Viabilidad de los aislamientos

A partir de 140 aislamientos procesados, registrados como *V. cholerae* O1 se obtuvieron 91 (67.8%) aislamientos viables (ver anexo 3) distribuidos en 12 regiones del país de la siguiente manera:

**Tabla 6**

*Distribución de aislamientos viables por regiones.*

Regiones	1991	1992	1993	1994	1995	Total	%
Piura	3	2	0	0	0	5	5,5
Lambayeque	1	0	1	5	0	7	7,7
La Libertad	5	0	1	0	0	6	6,6
Chimbote	0	0	0	0	4	4	4,4
Lima	9	12	4	4	6	35	38,5
Callao	0	0	2	0	1	3	3,3
Cusco	0	0	1	0	0	1	1,1
Puno	1	0	3	0	0	4	4,4
Amazonas	4	0	0	0	0	4	4,4
Loreto	11	1	0	0	3	15	16,5
Huánuco	0	0	2	0	0	2	2,2
Madre de Dios	0	0	0	5	0	5	5,5
Total	34	15	14	14	14	91	100,0

### 4.2. Caracterización microbiológica

#### 4.2.1. Pruebas bioquímicas en medio de cultivo TSI

El 100% de aislamientos en medio TSI dio como resultado, K/A<sup>-</sup>, es decir acidificación del medio en el fondo del tubo y alcalinidad en el plano inclinado, no hubo formación de gas a partir de glucosa, ni presencia de hidrogeno sulfurado.

**Figura 5**

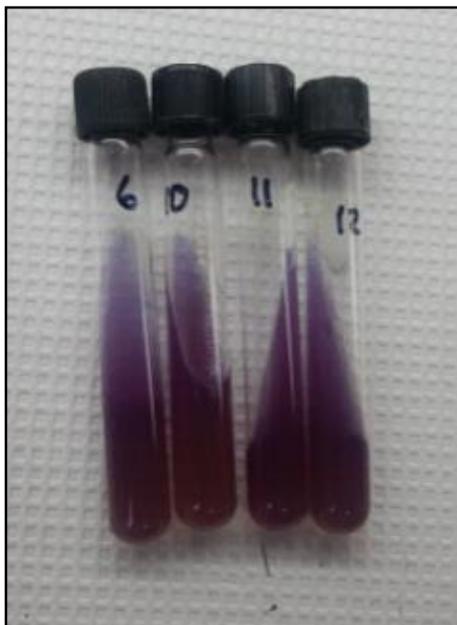
*Aislamientos en medio TSI, después de 18h de incubación a 37°C.*

**4.2.2. Pruebas bioquímicas en medio de cultivo LIA**

El 100% de aislamientos en medio LIA mostró como resultados en medio LIA K/K<sup>+</sup>, es decir descarboxilación de la lisina y positivo para la producción de indol.

**Figura 6**

*Aislamientos en medio LIA, después de 18h de incubación a 37°C.*

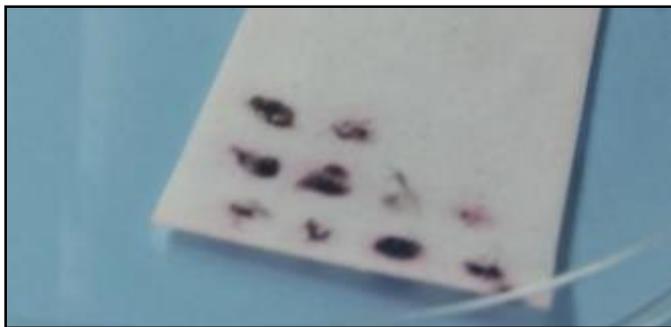


#### 4.2.3. Prueba oxidasa

El 100% de los aislamientos fueron positivos para la prueba de oxidasa, es decir se observó formación de color violeta oscuro que indica la presencia de enzimas oxidadas. Se utilizó como control positivo *P. aeruginosa* ATCC 27853 y control negativo *E. coli* ATCC 25922.

#### Figura 7

*Aislamientos sobre papel de filtro embebido en reactivo de Kovacs.*



#### 4.2.4. Prueba de la cuerda

El 100% de los aislamientos fueron positivos para la prueba de la cuerda, se observó formación de sustancia viscosa a manera de cuerda al levantar suavemente el asa de siembra.

#### Figura 8

*Aislamiento positivo para prueba de la cuerda.*



#### 4.2.5. Pruebas serológicas

El 100% de los aislamientos aglutinaron con antisueros O1, de los 91 aislamientos 45 (49,5%) aglutinaron con el antisuero específicos para serotipo Inaba y 46 (50,5%) aglutinaron con el antisuero específico para serotipo Ogawa. No se presentó ningún aislamiento del serotipo Hikojima.

**Tabla 7**

*Frecuencia de serotipos de V. cholerae por años.*

Año	Inaba	%	Ogawa	%
1991	30	88.2	4	11.8
1992	6	40.0	9	60.0
1993	2	14.3	12	85.7
1994	3	21.4	11	78.6
1995	4	28.6	10	71.4
Total	45	49.5	46	50.5

### 4.3. Caracterización molecular

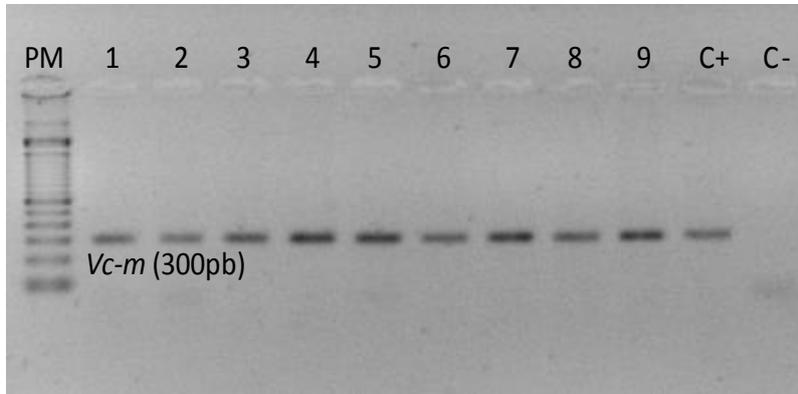
#### 4.3.1 Amplificación de los fragmentos *V-cm* y *CtxA*

La amplificación de ADN por PCR confirmó los resultados de la identificación de especie *V. cholerae*, por pruebas bioquímicas y se demostró la presencia del gen de la toxina del cólera, *ctxA*, en el 100% de los aislamientos.

Para identificar la especie *V. cholerae* por PCR se amplificó un segmento del gen *V-cm* que consta de 300 pb y para identificar la subunidad A de la toxina colérica se amplificó un fragmento de 564pb.

**Figura 9**

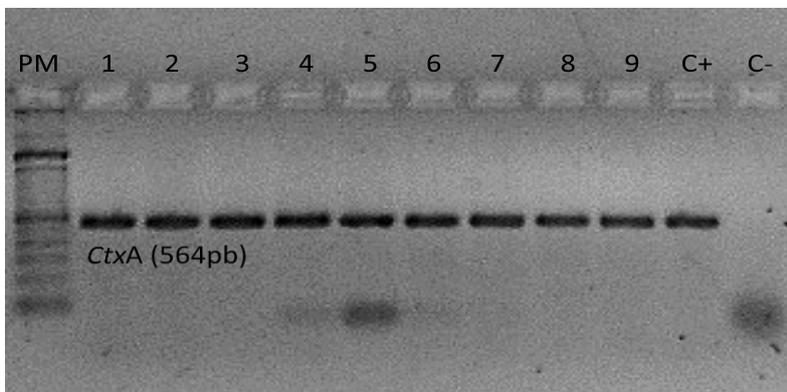
*Gel de amplificación del fragmento de Vc-m de 300pb.*



*Nota.* 1- 9: aislamientos de *V. cholerae* de 1992, PM: Marcador de peso molecular de 100pb, C+: cepa *V. cholerae* ATCC 14033, C-: Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Figura 10**

*Gel de amplificación del fragmento de CtxA de 564pb.*



*Nota.* 1- 9: aislamientos de *V. cholerae* de 1992, PM: Marcador de peso molecular de 100pb, C+: cepa *V. cholerae* ATCC 14033, C-: Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

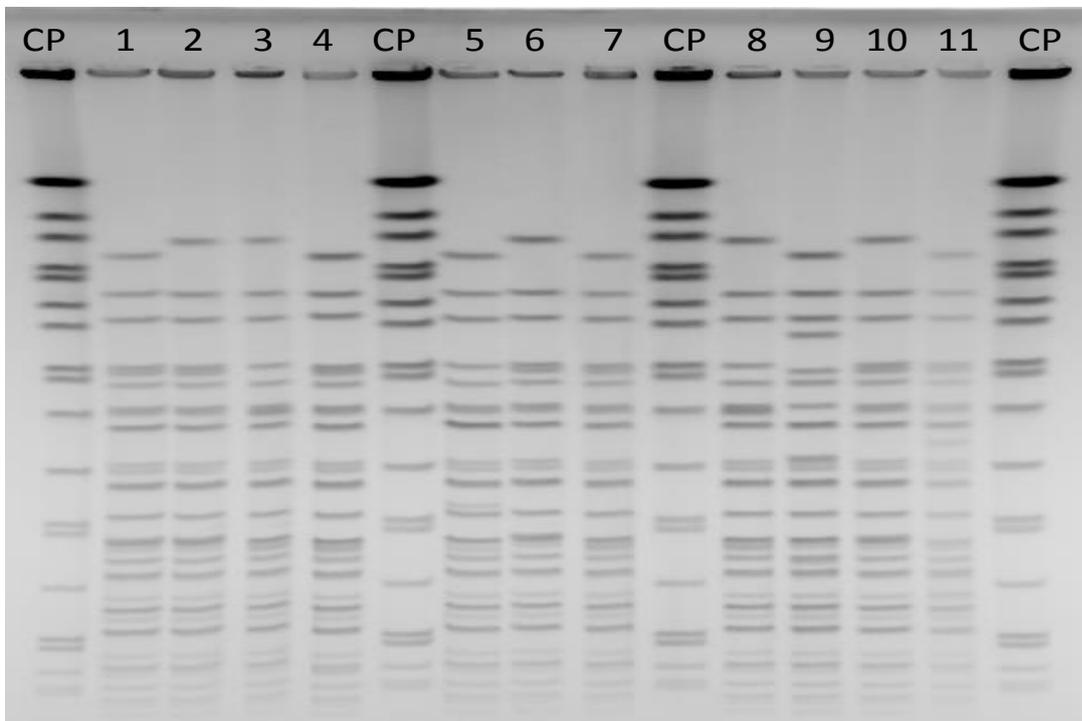
**4.3.2. Subtipificación molecular de *V. cholerae* O1**

La cepa patrón, *Salmonella enterica* Ser. Braenderup H9812 mostró el patrón de bandas esperado, la banda más pequeña se ubicó a 1.5cm antes del final del gel. Los resultados de la

subtipificación son las imágenes de los geles que muestran los patrones que serán ingresados al programa Bionumerics. Se obtuvieron perfiles con 21 fragmentos como mínimo, La banda de mayor tamaño fue de 398.4 kb y la de menor tamaño fue de 20.5kb aproximadamente acuerdo a la comparación con valores establecidos para la cepa patrón *Salmonella* Braenderup H9812 en el software Bionumerics.

### Figura. 11

*Gel de subtipificación molecular por PFGE, con enzima de restricción NotI.*



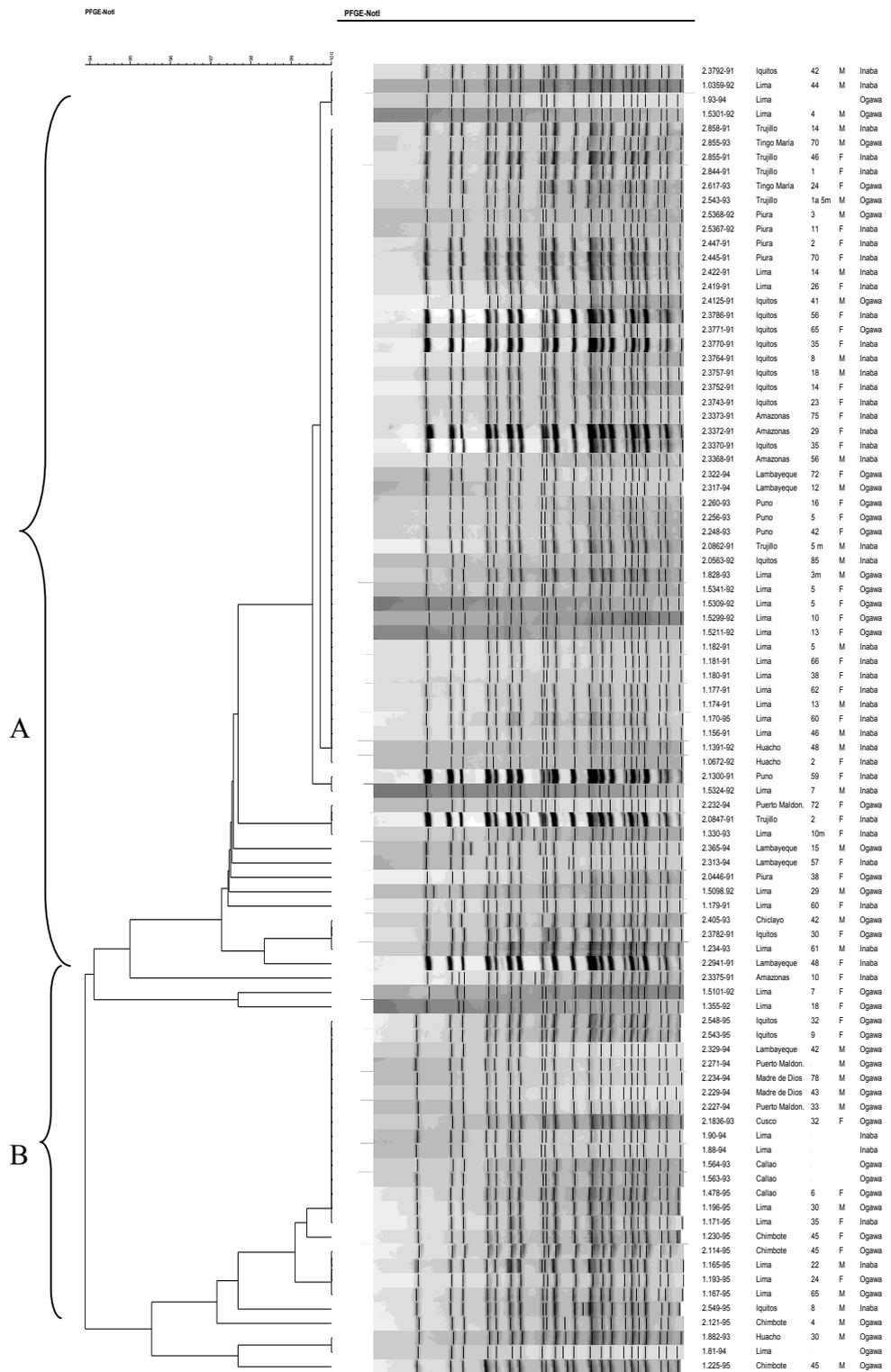
*Nota.* 1-11 aislamientos de *V. cholerae*, CP: Cepa patrón *Salmonella enterica* Ser. Braenderup H9812.

#### 4.4. Análisis bioinformático

Los resultados muestran 21 perfiles comprendidos en el periodo 1991 - 1995, que conforman dos clusters con una similaridad de 93,9%, en el primer cluster (A), observamos 14 perfiles con una similaridad de 94,1%, constituido por todos los aislamientos de 1991 y 1992 (49/66) 74,2% y en menor proporción aislamientos de 1993, 1994 y 1995 (17/66) 25.8%, mientras que en el segundo cluster (B) hay siete perfiles distintos con una similaridad de 95.5% que pertenecen en su totalidad a 1993, 1994 y 1995 (25/25). La diversidad genética de los 91 aislamientos basados en el índice de similaridad Dice es 93.9%. Se observa también dos perfiles más frecuentes en cada “cluster”, en el cluster A uno con 45 repeticiones, nominado como perfil dos (P2) y en el segundo cluster uno con 15 repeticiones, nominado perfil 15 (P15) (Ver anexo 5). El perfil P2 se encuentra en ocho de las regiones, mientras que el perfil P15 se encuentra en siete regiones que incluye las regiones en las que no se encuentra el perfil P2. La variación entre el cluster A y B es la posición de la primera banda de mayor tamaño, en el primer cluster se encuentra cercana a la banda de 336.5kb de la cepa patrón, en el cluster B se encuentra al nivel de la banda de 398.4 kb de la cepa patrón. No hay relación entre la variable serotipo y perfil de ADN debido a la seroconversión así, el perfil uno (P1) contiene cuatro aislamientos, dos Inaba y dos Ogawa, P2 tiene 45 aislamientos 29 Inaba y 16 Ogawa, el perfil cuatro (P4) tiene tres aislamientos dos Inaba y uno Ogawa, el perfil 10 (P10) tiene tres aislamientos uno Inaba y dos Ogawa, el perfil 15 (P15) tiene 15 aislamientos tres Inaba y 12 Ogawa, el perfil 17 tiene cuatro aislamientos uno Inaba y tres Ogawa. P2 se puede considerar el perfil epidémico, ya que tiene la mayor frecuencia 45/91. La máxima distancia genética fue 93,9 y la mínima fue 100.

**Figura 12**

*Dendrograma del grado de relación genética entre aislamientos de V. cholerae O1.*



## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización bioquímica y molecular de *V. cholerae* es fundamental para comprender la dinámica de las pandemias de Cólera, esta ayuda a establecer los mecanismos de prevención y control de la enfermedad (Díaz, 2017). La caracterización molecular de *V. cholerae* nos permite analizar la variabilidad genética y así establecer si una población bacteriana presenta una dispersión clonal en tiempo y espacio o no.

Depender solo de la caracterización molecular no es lo recomendable, se deben considerar también los perfiles bioquímicos, susceptibilidad microbiana, factores de virulencia y presencia de flagelos (Barret et al., 2006). En la presente investigación se desarrolló pruebas bioquímicas para la identificación de la especie, pruebas serológicas, y dentro de la caracterización molecular se usó los marcadores *V-cm* y *CtxA* mediante una prueba de PCR convencional para identificar el factor de virulencia *CtxA* (gen de la subunidad A de la toxina colérica) y la subtipificación molecular mediante PFGE para obtener perfiles de ADN y evaluar la variabilidad.

Dalsgaard et al. (1997), caracteriza 50 aislamientos de *V. cholerae* de Lima mediante PFGE y ribotipificación encontrando ocho perfiles de ADN por PFGE y cuatro por ribotipificación en el periodo 1991 a 1995, demostrando que PFGE presenta un mayor poder de discriminación, siendo de suma utilidad para el estudio de la variabilidad genética. El análisis de los perfiles se realizó de manera visual, ya que el software para análisis de perfiles de ADN por PFGE se desarrolló a partir de 1996 (Bionumerics®) y 1998 (GelCompar®), hoy en día el análisis de los perfiles se realiza de manera asistida por software, para esta investigación se utilizó Bionumerics® v.7.6, que nos permitió comparar una mayor cantidad de pruebas.

Se obtuvo 91 perfiles de ADN que comprenden 21 perfiles diferentes. Los más frecuentes fueron el perfil dos (P2) 49,45% (45/91), y el perfil 15 (P15) 16,48% (15/91). La presencia del perfil dominante P2, reportado en el presente trabajo, reafirma el momento endémico del cólera en el Perú.

Se determinaron dos clusters denominados A y B, el primero incluye a los todos los aislamientos (100%) de 1991 y 1992 y el segundo incluye solo aislamientos de 1993, 1994 y 1995 que comprenden al 68% (17/25) de los aislamientos de estos años. El cluster A también contiene el 40,47% (17/42) de los aislamientos de 1993, 1994 y 1995.

De acuerdo a la distribución cronológica de los perfiles, P2, está relacionado con el inicio de la epidemia en el Perú y los últimos brotes reportados en 1992; en tanto que el perfil P15 que fue aislado en los años 1993, 1994 y 1995, se relacionan con el descenso de la curva epidémica.

Esta investigación aporta una base de datos nacional necesaria para el análisis por PFGE de cepas de *V. cholerae* O1 aisladas en el futuro, esto hará más eficaz la comparación con las nuevas cepas debido a la excelente repetibilidad de la prueba y elevado poder de discriminación (Fernández et al., 2013). Las extensas bases de datos de perfiles de ADN por PFGE que existen a nivel mundial demuestran la utilidad de PFGE en la tipificación de bacterias (Neoh et al., 2019), esto hace que este estudio se puede sumar a otro grupo de estudios de otros países para incrementar la base de datos pública de perfiles de ADN y analizar la variabilidad por áreas geográficas de Latinoamérica y el mundo, mediante el uso de plataformas que nos permitan compartir los perfiles, como es la Red PulseNet AL y El Caribe, del que Perú es miembro (Zamudio et al., 2011).

Los aislamientos documentados en esta investigación, de la etapa epidémica de Cólera, sufrieron pocos cambios genéticos, esto se confirma por el índice de similaridad Dice que fue 93.4% para los 91 aislamientos, e indica que están estrechamente relacionados. Se presentaron diferencias mínimas en el número y posición de los fragmentos de ADN que indica la poca diversidad de los aislamientos de *V. cholerae* analizados por PFGE. Dalsgaard (1997) y Huguet (2000) en sus estudios también reconocen la variabilidad genética de *V. cholerae*, indicando que en la etapa epidémica en Perú en cinco años hubo variabilidad de los perfiles genéticos. Aunque en Perú no se han detectado casos desde 2002, en países endémicos como Ghana, se identificó tres clusters entre los años 2011 a 2014 demostrando la variabilidad genética de esta bacteria a través del tiempo (Eibach et al., 2016; Feglo y Sewurah, 2018). En Venezuela, la investigación sobre los brotes de 1996 y 1998 también confirman que *V. cholerae* se somete a frecuentes cambios genéticos que le permiten mejorar su desempeño en su hábitat, por lo cual esta especie ha evolucionado rápidamente (Fernández y Alonso, 2017).

Basados en los estudios de Huguet et al. (2000) usando la ribotipificación se encuentra coincidencia con nuestros resultados en cuanto a la presencia de un cluster obtenido para los aislamientos de *V. cholerae* O1 de 1991 y 1992, Huguet denominó a este ribotipo Per1, de distribución uniforme y mayor frecuencia, sin embargo encuentra 2 perfiles diferentes para los años 1993 a 1996, denominados Per 2 y Per 3 que solo difieren entre ellos en una banda, en este estudio se determinó que durante 1993 a 1995 hubo 7 perfiles, denominados P15 a P21 pero que forman un solo cluster con un índice de similitud Dice de 95.5%. Per 2 y Per 3 se aisló de 1993 a 1996. Per1 se relacionó a brotes epidémicos, y sería similar al perfil P2 obtenido en esta investigación.

El ribotipo Per 1, dio como resultado una identidad total con la variante ribotípica de Tailandia, alcanzando el 92% apareciendo todos los años (Huguet et al., 2000).

Cada uno de los perfiles P1, P2, P4, P10, P15 y P17 presentan aislamientos serotipo Inaba y Ogawa, lo que demuestra que serotipos diferentes pueden presentar perfiles indistinguibles, esto se debe a la seroconversión, que se da por una mutación puntual del operón *rfbT* (encargado de la seroconversión) (Bundi et al., 2019; Dalsgaard et al., 1997; Kam et al., 2003), que no incluye un sitio de restricción para la enzima *NotI*, pero pone en evidencia puntos de mutación en el operón *rfbT* (Dalsgaard et al., 1997), los aislamientos de *V. cholerae* pueden sufrir seroconversión o cambiar entre serotipo Inaba y Ogawa (Fernández y Alonso, 2017; Garg et al., 2000).

No se encontró relación entre los perfiles de ADN con respecto a la distribución por regiones, esto concuerda con estudios similares realizado en Ghana (Eibach et al., 2016) y en India (Narendrakumar et al., 2020).

La variación de los perfiles de ADN puede atribuirse a inserciones, deleciones o mutaciones que no necesariamente representan variabilidad genética, por esto como regla general una similaridad superior a 95 % se suele considerar como aislamientos clonales (Kanampalliar y Singh, 2020; Mwape et al., 2020; Rafique et al., 2016), y si es menor a 95% se consideran como perfiles no clonales. Los perfiles con una similaridad menor a 92% se consideran de diferentes clusters (Mwape et al., 2020). El umbral cuantitativo de similaridad utilizado como definición de trabajo de un clon debe ser ajustado a las especies estudiadas, al sistema de tipificación usado en el marco del tiempo y el espacio del estudio (Struelens, 1996). Por esto, para esta investigación se consideró el umbral cuantitativo de similaridad de 94% ajustado para *V. cholerae*.

En general, la similaridad de los perfiles no se puede considerar como una medida exacta de la distancia genética, ya que las posiciones de las bandas no son independientes. Un evento genético (mutación, inserción o delección) en el sitio de restricción, como regla general,

puede generar de una a tres bandas de diferencia en los perfiles de ADN observados, por ejemplo, una mutación conducirá a la pérdida del sitio y de los 2 fragmentos de restricción originales emergerá un fragmento más grande (Barret et al., 2006). La observación que 2 o más aislamientos tengan perfiles de PFGE indistinguibles debe considerarse que los aislamientos comparten un ancestro común (Swaminathan et al., 2001).

La relación clonal de las cepas de Latinoamérica de *V. cholerae* ET y las aisladas en Asia conduce a algunos investigadores a concluir que la epidemia Latinoamericana fue una extensión de la séptima pandemia en el hemisferio oeste (Alam et al., 2014; Faruque et al., 1998).

La transferencia horizontal de genes (THG) suele ser también una de las formas como *V. cholerae* presentaría variabilidad genética como indican estudios realizados por Okada et al. (2012) que determinaron 12 linajes de *V. cholerae* O1 biotipos clásico y El Tor, a partir de 23 aislamientos, concluyendo que *V. cholerae* ha sufrido recombinación extensiva por THG. El caso contrario es el de Haití donde se señala que el brote de Haití es clonal y mediante secuenciamiento genético se evidencia que no hay adquisición de genes por THG (Katz et al., 2013). Otras investigaciones sugieren que la presión de la selección ambiental origina poblaciones heterogéneas en áreas endémicas de cólera y que pocas cepas podrían evolucionar en clones patogénicos. Cuando las variantes El Tor reemplazaron a el Clásico como la principal cepa epidémica, la THG y los eventos de recombinación genética podrían haber ocurrido entre los biotipos coexistentes (en hospederos humanos o ambientales) dando lugar a nuevas variantes (Safa et al., 2010).

Estudios por PFGE de cepas de *V. cholerae* de México obtenidas entre 2007 a 2011 mostraron ser similares a los de la etapa endémica comprendida entre 1991 y 2001 y se reportaron como diferentes de las de Haití (epidemia de 2010) y Sudáfrica, sin embargo durante el brote de 2013 causado por el serogrupo O1, serotipo Ogawa se estudiaron 4 aislamientos de

*V. cholerae* mediante PFGE y mostraron 97% de similaridad con una cepa aislada en Cuba procedente del brote de 2010 en el Caribe, la estructura genómica de estos aislamientos fue similar a la de *V. cholerae* cepa 2010 EL-1786 identificada durante la epidemia de Haití de 2010, las cepas encontradas en México en 2013 demostraron ser indistinguible de la cepa que causó el brote en Haití, República Dominicana y Cuba (Díaz et al., 2014).

Los resultados obtenidos por PFGE fueron confirmados mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y concluyen que las estructuras genómicas de estos cuatro aislamientos son similares entre sí y similares al brote de Haití y menos similares a otros descritos en años anteriores (Díaz, 2017). A parte de los estudios de PFGE se considera una necesidad realizar el secuenciación de todo el genoma (WGS) de cepas de *V. cholerae* que causan brotes, para comprender la historia genómica del cólera, ya que el WGS brinda mayor poder de discriminación de clones bacterianos comparado con PFGE (Bundi et al., 2019; Neoh et al., 2019).

A pesar que el secuenciación de nueva generación (NGS) es una herramienta que puede aportar mayor información que PFGE por su alto poder de discriminación para la caracterización de *V. cholerae*, hasta hoy es muy costosa (Neoh et al., 2019), por lo tanto, PFGE resulta siendo aún una herramienta muy útil, que nos brinda información importante para la caracterización molecular. La investigación epidemiológica se enriquece con herramientas moleculares como la PFGE, PCR, la secuenciación genómica y los análisis filogenómicos (Díaz, 2017).

Es muy importante monitorear continuamente la aparición de las variedades porque mejorará la comprensión de la evolución de nuevos clones de *V. cholerae*

## VI. CONCLUSIONES

- La caracterización molecular de *Vibrio cholerae* O1 por PFGE permitió diferenciar aislamientos que eran idénticos por pruebas bioquímicas y serológicas.
- La relación entre todos aislamientos muestra un índice de similaridad de 93.4%, y conforman dos grupos, un grupo con un perfil predominante P2 para los años 1 991 y 1 992 con 94,1% de similaridad y otro grupo con un perfil predominante P15 para los años 1993, 1 994 y 1 995 que presentó 95,5% de similaridad. Estos hallazgos encontrados demuestran que los perfiles de ADN están estrechamente relacionados.
- *Vibrio cholerae* O1 ha sufrido pocos cambios genéticos desde su emergencia en Perú en 1991 hasta 1995. Hay variabilidad por años.
- Los serotipos Inaba y Ogawa pueden presentar perfiles de ADN indistinguibles lo que indica que no se puede determinar diferencias entre perfiles de ADN por serotipo mediante PFGE. No hay variabilidad por serotipos.
- En perfil P2 es el más frecuente se considera el perfil epidémico para Perú, es el que se presenta en mayor frecuencia, 49,45% (45/91).
- En cuanto a la distribución cronológica, el P2 mantiene una frecuencia alta, estando relacionada con el inicio de la epidemia en el Perú y los últimos brotes reportados en 1992; en tanto que el pulstotipo P15 fue aislado en los años 1993, 1994 y 1995, y se relacionan con el descenso de la curva epidémica.

## VII. RECOMENDACIONES

- Las condiciones del protocolo de PFGE en cuanto al tiempo de los lavados de los plugs, restricción enzimática “*in situ*” y electroforesis son modificables de acuerdo a las condiciones de cada laboratorio. En la presente investigación se incrementó en dos el número de lavados con el objetivo de obtener bandas más nítidas al eliminar la mayor cantidad de restos celulares. Es muy importante que la restricción enzimática sea completa ya que si la restricción es incompleta las moléculas de ADN proporcionarán un perfil falso pudiendo presentar más fragmentos, algunos con tamaño esperado y otros más grandes, que aparecen al comienzo del gel, por recomendación en el protocolo se amplió el tiempo de restricción enzimática de seis a ocho horas.
- En esta investigación usamos PFGE como una herramienta para caracterizar los aislamientos de *V. cholerae* retrospectivamente, en la actualidad también podemos usar la PFGE como diagnóstico molecular rápido para identificar brotes ya que puede confirmar un brote si todos los perfiles son idénticos, sobre todo en bacterias que presentan poca variación de sus perfiles en el transcurso del tiempo, como se ha observado en *V. cholerae*.
- Se recomienda elaborar un estudio comparativo por PFGE con muestras representativas de otras zonas del Perú y de países de la región, así como muestras ambientales y de reservorios acuáticos.
- Se recomienda realizar el secuenciamiento genético de los aislamientos que fueron parte de este estudio, y fueron más frecuentes como el perfil P2 y P15, ya que es posible que dos aislamientos con perfiles idénticos por PFGE presenten más diferencias que dos aislamientos con perfiles de PFGE diferentes.

- Actualmente el secuenciamiento de nueva generación (NGS) es más usado para analizar la variabilidad genética, sin embargo, la electroforesis en campo pulsado no deja de ser una herramienta muy importante para el estudio de la variabilidad genética y epidemiología del cólera.
- Se recomienda el uso de una segunda enzima como *SfiI* para evaluar si existe variabilidad genética de estos aislamientos.

## VIII. REFERENCIAS

- Adeyemi, A. K., Pazhani, G. P., Abiodun, I. B., Afolabi, O., Kolawole, O. D., Mukhopadhyay, A. K., y Ramamurthy, T. (2016). Unique clones of *Vibrio cholerae* O1 El Tor with Haitian type ctxB allele implicated in the recent cholera epidemics from Nigeria, Africa. *PLoS One*, *11*(8), 1-10.
- Alam, M., Rashed, S. M., Mannan, S. B., Islam, T., Lizarraga, M. L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Mendez, J.L., Navarro, A., Watanabe, H., Ohnishi, M., Hasan, N.A., Huq, A., Sack, B., Colwell, R.R., y Cravioto, A. (2014). Occurrence in Mexico, 1998–2008, of *Vibrio cholerae* CTX+ El Tor carrying an additional truncated CTX prophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(27), 9917-9922.
- Arakawa, E., Murase, T., Matsushita, S., Shimada, T., Yamai, S., Ito, T., y Watanabe, H. (2000). Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates from domestic and imported cases of cholera in Japan. *Journal of clinical microbiology*, *38*(1), 424-426.
- Bahamonde, C., y Stuardo, V. (2013). La epidemia de cólera en América Latina: reemergencia y morbimortalidad. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *33*(1), 40-46.
- Barrett, T.J., Gerner-Smidt, P., y Swaminathan, B. (2006). Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathogens & Disease*, *3*(1), 20-31.
- Basim, E., y Basim, H. (2001). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turkish Journal of Biology*, *25*(4), 405-418.

- Boonkerd, N., Na-Ubon, M., Tongtawe, P., Thanongsaksrikul, J., Bodhidatta, L., Tapchaisri, P., Chaicumpa, W., y Srimanote, P. (2019). Evolution among O1 hybrid and El Tor variant *Vibrio cholerae* O1 strains in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 50(4), 688-702.
- Borroto, R.J. (1997). La ecología de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 en ambientes acuáticos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1, 3-8.
- Bravo, N., y Guillén, A. (2011). Reporte histórico: Primer Aislamiento de *Vibrio cholera* serogrupo O1 biovar El Tor serovar Inaba durante la epidemia de cólera en el Perú- 1991. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 136-139.
- Bundi, M., Shah, M. M., Odoyo, E., Kathiiko, C., Wandera, E., Miring'u, G., Guyo, S., Langat, D., Morita, K., y Ichinose, Y. (2019). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017. *Microbiology and immunology*, 63(9), 350-358.
- Byun, R., Elbourne, L. D., Lan, R., y Reeves, P. R. (1999). Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. *Infection and immunity*, 67(3), 1116-1124.
- Caffer, M.I., Terragno, R., González, S., Viñas, M.R., Pichel, M., y Binsztein, N. (2007). Manual de procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*. *Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia del WHO para América del Sur. Buenos Aires: WHO Global Salm Surv*, 1-46.

- Cameron, D.N., Khambaty, F.M., Wachsmuth, I.K., Tauxe, R.V., y Barrett, T. J. (1994). Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*, 32(7), 1685-1690.
- Cardozo, A. M., Ramón, L.F., Poutou, R.A., Carrascal, A.K., y Zambrano, D.C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas scientiarum*, 18(2), 203-222.
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2017). Standard operating procedure for Pulsenet PFGE of *vibrio cholerae* and *vibrio parahaemolyticus*.  
<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/vibrio-pfge-protocol-508c.pdf>
- Coelho, A., Andrade, J., Vicente, A., y Salles, C. A. (1995). New variant of *Vibrio cholerae* O1 from clinical isolates in Amazonia. *Journal of clinical microbiology*, 33(1), 114-118.
- Colwell, R. R., y Grimes, D. J. (2000). Semantics and strategies. En Colwell, R. R y Grimes, D. J. (Eds.), *Nonculturable microorganisms in the environment* (pp. 1-6). ASM Press.
- Colwell, R. R., y Huq, A. (1994). Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. En Wachsmuth, I. K., Blake, P. A. y Olsvik, O. (Eds.), *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives* (pp. 117-133). ASM Press.
- Constantin de Magny, G. y Colwell, R. (2009). Cholera and climate: A demonstrated relationship. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 120, 119-28.

- Dalsgaard, A., Skov, M., Serichantalergs, O., Echeverria, P., Meza, R., y Taylor, D. (1997). Molecular evolution of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Lima, Peru, from 1991 to 1995. *Journal of clinical microbiology*, 35(5), 1151-1156.
- Díaz, J.A. (2017). El análisis molecular de la secuencia del genoma completo de aislados clínicos de *Vibrio cholerae* en México en 2013 revela la presencia de la cepa causante de la epidemia de Haití en 2010. *Gaceta Médica de México*, 153(Sup 2), S91-S101.
- Díaz, J.A., Hernández, I., López, I., Ortiz, J., González, E., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., y Ramírez-González, J.E. (2014). Genome sequence of *Vibrio cholerae* strain O1 Ogawa El Tor, isolated in Mexico, 2013. *Genome announcements*, 2(5), e01123-14.
- Dirección General de Epidemiología [DGE]. (2006). Protocolos de vigilancia epidemiológico – Parte 1. Cólera p.9. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1382-1.pdf>
- Dixit, S. M., Johura, F.T., Manandhar, S., Sadique, A., Rajbhandari, R. M., Mannan, S. B., Rashid, M., Islam, S., Karmacharya, D., Watanabe, H., BradSack, R.B., Cravioto, A., y Alam, M. (2014). Cholera outbreaks (2012) in three districts of Nepal reveal clonal transmission of multi-drug resistant *Vibrio cholerae* O1. *BMC infectious diseases*, 14(1), 1-11.
- Domman, D., Quilici, M. L., Dorman, M. J., Njamkepo, E., Mutreja, A., Mather, A. E., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Grimont, P.A.D., Lizárraga, M.L., Bouchier, C., Aanensen, D.M., Kuri-Morales, P., Tarr, C.L., Dougan, G., Weill, F. y Thomson, N. R. (2017). Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. *Science*, 358(6364), 789-793.
- Dutta, D., Chowdhury, G., Pazhani, G. P., Guin, S., Dutta, S., Ghosh, S., K. Rajendran, Nandy, R.K., Mukhopadhyay, A.K., Bhattacharya, M.K., Mitra, U., Takeda, Y., Nair, G.B., y

- Ramamurthy, T. (2013). *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerging infectious diseases*, 19(3), 464-467.
- Eibach, D., Herrera-Leon, S., Gil, H., Hogan, B., Ehlkes, L., Adjabeng, M., Kreuels, B., Nagel, M., Opore, D., Fobil, J.N., y May, J. (2016). Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* associated with a large cholera outbreak in Ghana in 2014. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(5), e0004751.
- Faruque, S. M., Albert, M. J., y Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(4), 1301-1314.
- Feglo, P. K., y Sewurah, M. (2018). Characterization of highly virulent multidrug resistant *Vibrio cholerae* isolated from a large cholera outbreak in Ghana. *BMC research notes*, 11(1), 1-6.
- Fernández Cuenca, F., López Cerero, L., y Pascual Hernández, Á. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(Supl 1), 20-25.
- Fernández, S., y Alonso, G. (2017). Tipificación molecular de aislados de *Vibrio cholerae* O1 causantes de dos brotes de cólera en Venezuela. *Rev. Inst. Nac. Hig*, 48(1-2), 82-98.
- García, M., Pulido, M. A., Rivero, A., y Torre, J. (2010). Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(52), 3489-3496.
- Garg, P., Nandy, R.K., Chaudhury, P., Chowdhury, N.R., De, K., Ramamurthy, T., Yamasaki, S., Bhattacharya, S.K., Takeda, Y., y Nair, G.B. (2000). Emergence of *Vibrio cholerae*

- O1 biotype El Tor serotype Inaba from the prevailing O1 Ogawa serotype strains in India. *Journal of clinical microbiology*, 38(11), 4249-4253.
- Gautom, R.K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157: H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of clinical microbiology*, 35(11), 2977-2980.
- Gavilán, R. G., y Martínez, J. (2011). Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 109-115.
- Ghosh, R., Sharma, N. C., Halder, K., Bhadra, R. K., Chowdhury, G., Pazhani, G. P., Shinoda, S., Mukhopadhyay, A.K., Nair, G.B., y Ramamurthy, T. (2016). Phenotypic and genetic heterogeneity in *Vibrio cholerae* O139 isolated from cholera cases in Delhi, India during 2001–2006. *Frontiers in microbiology*, 7, 1250.
- González, S., Villagra de Trejo, A., Pichel, M., Figueroa, S., Merletti, G., Caffer, M.I., Castillo, M.C., y Binsztein, N. (2009). Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(1), 11-19.
- Hajia, M., y Sohrabi, A. (2019). *In silico* characteristics for re-emerging possibility of *Vibrio cholerae* genotypes in Iran. *New microbes and new infections*, 31(C), 100577.
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C., y

- Fraser, C.M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406(6795), 477-483.
- Hendriksen, R.S., Price, L.B., Schupp, J.M., Gillece, J.D., Kaas, R.S., Engelthaler, D.M., Bortolaia, V., Pearson, T., Waters, A.E., Upadhyay, B.P., Shrestha, S.D., Adhikari, S., Shakya, G., Keim, P.S., y Aarestrup, F.M. (2011). Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. *mBio*, 2(4), e00157-11.
- Huang, J., Zhu, Y., Wen, H., Zhang, J., Huang, S., Niu, J., y Li, Q. (2009). 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*, 75(22), 6981-6985.
- Huapaya, B., Padilla, C., Suárez, V., y Gavilán, R. (2005). Aislamiento de *Vibrio cholerae* O139 en el sur de Lima, Perú, diciembre 2004. *Boletín del Instituto Nacional de Salud*, 11, 10-12.
- Huguet, J., Arias, I. y Montoya, Y. (2000). Tipificación molecular del *Vibrio cholerae* O1 en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 17(1-4), 9-13.
- Instituto Nacional de Salud (INS). (1997). *Manual de Laboratorio cólera* (3.ª ed.).
- Jiang, S. C., Matte, M., Matte, G., Huq, A., y Colwell, R. R. (2000). Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and environmental microbiology*, 66(1), 148-153.
- Kam, K.M., Luey, C.K.Y., Tsang, Y.M., Law, C.P., Chu, M.Y., Cheung, T.L., y Huen-Chiu, A.W. (2003). Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 and O139 by pulsed-field gel

- electrophoresis in Hong Kong: correlation with epidemiological events from 1994 to 2002. *Journal of clinical microbiology*, 41(10), 4502-4511.
- Kanampalliwar, A., y Singh, D. V. (2020). Virulence Pattern and Genomic Diversity of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Strains Isolated From Clinical and Environmental Sources in India. *Frontiers in microbiology*, 11, 1838.
- Katz, L. S., Petkau, A., Beaulaurier, J., Tyler, S., Antonova, E.S., Turnsek, M.A., Guo, Y., Wang, S., Paxinos, E.E., Orata, F., Gladney, L.M., Stroika, S., Folster, J.P., Rowe, L., M. Freeman, M.M., Knox, N., Frace, M., Boney, J., Graham, M., Hammer, B.K., Boucher, Y., Bashir, A., Hanage, W.P., Van Domselaar, G., y Tarr, C.L. (2013). Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single-source introduction to Haiti. *mBio*, 4(4), e00398-13.
- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Chen, Y., Kreger, A., Sulakvelidze, A., Sozhamannan, S., y Morris Jr. J.G., (2003). Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2191-2196.
- Liao, F., Mo, Z., Chen, M., Pang, B., Fu, X., Xu, W., Jing, H., Kan, B., y Gu, W. (2018). Comparison and evaluation of the molecular typing methods for toxigenic *Vibrio cholerae* in Southwest China. *Frontiers in microbiology*, 9, 905.
- Lü, H., Yuan, Y., Sun, N., Bi, Z., Guan, B., Shao, K., Wang, T. y Bi, Z. (2017). Characterization of *Vibrio cholerae* isolates from 1976 to 2013 in Shandong Province, China. *Brazilian journal of microbiology*, 48(1), 173-179.

- Luo, Y., Ye, J., Jin, D., Ding, G., Zhang, Z., Mei, L., Octavia, S., y Lan, R. (2013). Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *BMC microbiology*, 13(1), 1-12.
- Maguiña, C., Seas, C., Galán, E., y Santana, J. (2010). Historia del cólera en el Perú en 1991. *Acta Médica Peruana*, 27(3), 212-217.
- Mahalingam, S., Cheong, Y.-M., Kan, S., Yassin, R. M., Vadivelu, J., y Pang, T. (1994). Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*, 32(12), 2975-2979.
- Mirande, V., Tracanna, B., Seeligmann, C., Cangemi, R., Aulet, O., Cecilia, M., Silva, C., y Binsztein, N. (2007). Ecología de *Vibrio cholerae* en relación al fitoplancton y variables fisicoquímicas en ríos de Tucumán (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(3-4), 195-209.
- Mwape, K., Kwenda, G., Kalonda, A., Mwaba, J., Lukwesa-Musyani, C., Ngulube, J., Smith, A.M., y Mwansa, J. (2020). Characterisation of *Vibrio cholerae* isolates from the 2009, 2010 and 2016 cholera outbreaks in Lusaka province, Zambia. *The Pan African Medical Journal*, 35.
- Narendrakumar, L., Jaikumar, V. S., Chandrika, S. K., y Thomas, S. (2020). Epidemiological and pathogenic characteristics of Haitian variant *V. cholerae* circulating in India over a decade (2000–2018). *Microbial Pathogenesis*, 149, 104538.
- Neoh, H. M., Tan, X. E., Sapri, H. F., y Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103935.

- Okada, K., Roobthaisong, A., Nakagawa, I., Hamada, S., y Chantaroj, S. (2012). Genotypic and PFGE/MLVA analyses of *Vibrio cholerae* O1: geographical spread and temporal changes during the 2007–2010 cholera outbreaks in Thailand. *PLoS One*, 7(1), e30863.
- Olarte, J. (1991). El germen del cólera. *Ciencias* (024), 43-50.
- Osei, F. B., Duker, A. A., y Stein, A. (2012). Cholera and Spatial Epidemiology. En Gowder, S. (Ed.), *Cholera* (pp. 1-18). IntechOpen.
- Pichel, M., Rivas, M., Chinen, I., Martín, F., Ibarra, C., y Binsztein, N. (2003). Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 124-134.
- Rafique, R., Rashid, M.-u., Monira, S., Rahman, Z., Mahmud, M., Mustafiz, M., Saif-Ur-Rahman, K.M., Johura, F.T., Islam, S., Parvin, T., Bhuyian, S.I., Sharif, M.B., Rahman, S.R., Sack, D.A., Sack, R.B., George, C.M., y Alam, M. (2016). Transmission of infectious *Vibrio cholerae* through drinking water among the household contacts of cholera patients (CHoBI7 trial). *Frontiers in microbiology*, 7, 1635.
- Rahaman, M., Islam, T., Colwell, R. R., y Alam, M. (2015). Molecular tools in understanding the evolution of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in microbiology*, 6, 1040.
- Reimer, A. R., Van Domselaar, G., Stroika, S., Walker, M., Kent, H., Tarr, C., Talkington, D., Rowe, L., Olsen-Rasmussen, M., Frace, M., Sammons, S., Dahourou, G.A., Boncy, J., Smith, A.M., Mabon, P., Petkau, A., Graham, M., Gilmour, M.W., y Gerner-Smidt, P. (2011). Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerging infectious diseases*, 17(11), 2113.

- Riaño, D. M., Valenzuela de Silva, E. M., Mantilla, J. R., y Agudelo-Calderón, C. A. (2003). Diversidad genética y estructura de la población de *Vibrio cholerae* en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 36-44.
- Robles, L. A., García, R. M., y López, J. T. (1999). Toxinas de *Vibrio cholerae*. Una revisión. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 46(4), 255-259.
- Rojas, N., Chaves, E., y García, F. (2006). Bacteriología Diagnóstica. *Universidad de costa rica Facultad de microbiología*.
- Safa, A., Bhuiyan, N. A., Alam, M., Sack, D. A., y Nair, G. B. (2005). Genomic relatedness of the new Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 to the classical and El Tor biotypes as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1401-1404.
- Safa, A., Nair, G. B., y Kong, R. Y. (2009). Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in microbiology*, 18(1), 46-54.
- Struelens, M. (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical microbiology and infection*, 2(1), 2-11.
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V., y Force, C.P.T. (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging infectious diseases*, 7(3), 382-389.
- Talkington, D., Bopp, C., Tarr, C., Parsons, M.B., Dahourou, G., Freeman, M., Joyce, K., Turnsek, M., Garrett, N., Humphrys, M., Gomez, G., Stroika, S., Boncy, J., Ochieng, B., Oundo, J., Klena, J., Smith, A., Keddy, K., y Gerner-Smidt, P. (2011). Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerging infectious diseases*, 17(11), 2122-2129.

- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D.H., y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233-2239.
- Trucksis, M., Michalski, J., Deng, Y. K., y Kaper, J. B. (1998). The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14464-14469.
- World Health Organization [WHO]. (2010). III Curso avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO – GFN) Diagnóstico de *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp por PCR. *Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*. Buenos Aires, 1-54.
- Zamudio, M. L., Meza, A., Bailón, H., Martínez, J., y Campos, J. (2011). Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 128-135.

## IX. ANEXOS

### ANEXO A

Preparación de medios de cultivo y reactivos para pruebas bioquímicas.

#### **APA 0.5 % (Solución peptona salina)**

Añadir 10g de Peptona, 5g de cloruro de sodio, en 1L de agua destilada. Ajustar pH 8.6 y esterilizar en autoclave.

#### **Medio de cultivo TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa)**

Añadir 88g a 1L de agua destilada estéril y llevar a ebullición hasta disolución completa. NO AUTOCLAVAR, verter en placas sin volver a calentar el medio y secar su superficie antes de usar. pH 8.6 +/- 0.2. Este es un medio selectivo se usará para el crecimiento de bacterias del genero *Vibrio* spp

#### **Medio TSI (Triple Sugar Iron)**

Añadir 65g a 1L de agua destilada y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave, verter en placas o tubos y secar su superficie antes de usar. pH 7.4 +/- 0.2. para evaluar producción de gas, hidrogeno sulfurado, sacarosa, glucosa y lactosa.

#### **LIA (Lisina Indol Agar)**

Añadir 34g a 1L de agua destilada y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave, verter en placas o tubos y secar su superficie antes de usar. pH 6.7 +/- 0.2. para evaluar producción de indol (Reactivo de Giles), y descarboxilación de la Lisina.

**TSA (Tryptone Soya Agar)**

Añadir 40g a 1L de agua destilada y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave, verter en placas o tubos y secar su superficie antes de usar. pH 6.7 +- 0.2. para conservar las cepas a temperatura ambiente.

**Caldo Glicerol**

Añadir 25ml de glicerol, 1g de peptona, 0.5g cloruro de sodio a 75mL de agua destilada 75 ml para completar 100ml. Repartir 1.5mL en tubos crioviales de 2mL. Ajustar pH a 7+-0.2 y esterilizar en autoclave. para la crioconservación de cepas a -80°C

**Reactivo de oxidasa**

Añadir 0.1g de reactivo N-N dimetil-p-fenilenodiamino oxalato, el cual es un indicador redox a 10mL de agua destilada estéril y repartir en 1 frasco oscuro de vidrio y refrigerar. para evaluar la presencia de la enzima citocromo oxidasa.

**Desoxicolato de sodio 0.5%**

Disolver 0.5g desoxicolato de sodio en 100mL de agua destilada esteril.

## ANEXO B

Preparación de reactivos para PFGE

### **Buffer TE (Tris10mM, EDTA 1mM)**

Tris 1 M, pH 8.0	10 mL	(8mL)
EDTA 0.5 M pH 8.0	2 mL	(1.6mL)
Agua estéril calidad molecular c.s.p.	1000mL	(800mL)

El buffer TE se usa para hacer los plug y para lavarlos después de la lisis celular.

### **Agarosa SeaKem Gold al 1% (Preparación de plug)**

Agarosa SeaKem Gold	0.5 g
Buffer TE	49.5 mL

### **Agarosa SeaKem Gold al 1% (Preparación de gel de electroforesis)**

Agarosa SeaKem Gold	1 g
Buffer TBE 0.5X	99 mL

### **Buffer de suspensión celular (BSC)**

Tris 1 M, pH 8.0	10 mL	(5mL)
EDTA 0.5 M, pH 8.0	20 mL	(10mL)
Agua estéril calidad molecular c.s.p.	100 mL	(50mL)

**Proteinasa K (20mg/mL)**

Proteinasa K Fungal                      100 mg

Agua estéril calidad molecular    5 mL

Alicuotar en fracciones de 300- 500  $\mu$ L y mantener a -20°C, al usarla mantenerla en hielo. Se usa para la preparación de plugs y la lisis celular.

**Buffer de lisis celular (BLC) (Tris 50mM, EDTA 50mM, Sarcosil 1% + 0.1 mg/mL de proteinasa K)**

Tris 1 M, pH 8.0                              25 mL (5mL)

EDTA 0.5 M, pH 8.0                        50 mL (10mL)

Sarcosyl 10%                                 50 mL (10mL) o

N-lauril-sarcosina, sal sódica            5g (1g)

Agua estéril calidad molecular c.s.p.    500 mL(100mL)

Agregar 25  $\mu$ L de proteinasa K (20mg/mL) por cada 5mL de BLC al momento de usar para una concentración final en el buffer de lisis de 0.1mg/mL de proteinasa K.

**Sarcosyl 10%**

N-lauril-sarcosina, sal sódica            10g (1g)

Agua calidad molecular c.s.p.            100mL (10mL)

**Buffer Tris- Borato EDTA 10X (TBE)**

Tris Base 0.9 M	108g
Ácido bórico 0.9 M	55g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	40mL
Agua grado molecular c.s.p.	1000 mL

**TBE 0.5X**

TBE 10X	125 mL
Agua calidad molecular	2375mL

**Bromuro de etidio 1%**

Bromuro de etidio 10mg/mL	10 $\mu$ L
Agua grado molecular c.s.p.	100 mL

**Preparación EDTA 0.5 M pH 8.0**

(EDTA  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ , PM :372.24)

Disolver 74,45g de EDTA en 300 mL de agua calidad molecular c.s.p. en un agitador magnético.

Ajustar pH con NaOH (disolviendo 10g en 50mL de agua calidad molecular c.s.p.).

Completar a un volumen de 400mL

## ANEXO C

Tabla 8

*Base de datos epidemiológicos de los aislamientos tipificados por PFGE.*

	Aislamiento	Región	Sexo	Edad	Fecha de aislamiento
1	1.156-91	Lima	M	46	4/02/1991
2	1.174-91	Lima	M	13	11/02/1991
3	1.177-91	Lima	F	62	7/02/1991
4	1.179-91	Lima	F	60	6/02/1991
5	1.180-91	Lima	F	38	6/02/1991
6	1.181-91	Lima	F	66	6/02/1991
7	1.182-91	Lima	M	5	3/02/1991
8	2.419-91	Lima	F	26	25/02/1991
9	2.422-91	Lima	M	14	25/02/1991
10	2.445-91	Piura	F	70	8/02/1991
11	2.0446-91	Piura	F	38	8/02/1991
12	2.447-91	Piura	F	2	8/02/1991
13	2.844-91	La Libertad	F	1	11/03/1991
14	2.0847-91	La Libertad	F	2	13/03/1991
15	2.855-91	La Libertad	F	46	8/03/1991
16	2.858-91	La Libertad	M	14	8/03/1991
17	2.0862-91	La Libertad	M	5 m	11/03/1991
18	2.1300-91	Puno	F	59	8/04/1991
19	2.2941-91	Lambayeque	F	48	19/03/1991
20	2.3368-91	Amazonas	M	56	26/06/1991
21	2.3370-91	Loreto	F	35	20/08/1991
22	2.3372-91	Amazonas	F	29	18/07/1991
23	2.3373-91	Amazonas	F	75	18/07/1991
24	2.3375-91	Amazonas	F	10	30/07/1991
25	2.3743-91	Loreto	F	23	27/08/1991
26	2.3752-91	Loreto	F	14	22/08/1991
27	2.3757-91	Loreto	M	18	21/08/1991
28	2.3764-91	Loreto	M	8	21/08/1991
29	2.3770-91	Loreto	F	35	20/08/1991
30	2.3771-91	Loreto	F	65	20/08/1991

	Aislamiento	Región	Sexo	Edad	Fecha de aislamiento
31	2.3782-91	Loreto	F	30	17/08/1991
32	2.3786-91	Loreto	F	56	17/08/1991
33	2.3792-91	Loreto	M	42	15/08/1991
34	2.4125-91	Loreto	M	41	16/08/1991
35	1.355-92	Lima	F	18	6/01/1992
36	1.0359-92	Lima	M	44	26/12/1991
37	2.0563-92	Loreto	M	85	14/11/1991
38	1.0672-92	Lima	F	2	18/01/1992
39	1.1391-92	Lima	M	48	25/01/1992
40	1.5098-92	Lima	M	29	11/03/1992
41	1.5101-92	Lima	F	7	13/03/1992
42	1.5211-92	Lima	F	13	25/03/1992
43	1.5299-92	Lima	F	10	23/03/1992
44	1.5301-92	Lima	M	4	23/03/1992
45	1.5309-92	Lima	F	5	25/03/1992
46	1.5324-92	Lima	M	7	27/03/1992
47	1.5341-92	Lima	F	5	3/03/1992
48	2.5367-92	Piura	F	11	24/03/1992
49	2.5368-92	Piura	M	3	25/03/1992
50	1.234-93	Lima	M	61	29/12/1992
51	2.248-93	Puno	F	42	29/12/1992
52	2.256-93	Puno	F	5	2/01/1993
53	2.260-93	Puno	F	16	6/01/1993
54	1.330-93	Lima	F	10m	4/01/1993
55	2.0405-93	Lambayeque	M	42	18/02/1993
56	2.0543-93	La Libertad	M	1a 5m	4/01/1993
57	1.563-93	Callao	M	5	5/02/1993
58	1.564-93	Callao	F	3	5/02/1993
59	2.0617-93	Huánuco	F	24	18/02/1993
60	1.828-93	Lima	M	3m	14/02/1993

	Aislamiento	Región	Sexo	Edad	Fecha de aislamiento
61	2.0855-93	Huánuco	M	70	15/04/1993
62	1.882-93	Lima	M	30	8/03/1993
63	2.1836-93	Cusco	F	32	8/03/1993
64	1.81-94	Lima	F	1	10/01/1994
65	1.88-94	Lima	M	5	12/01/1994
66	1.90-94	Lima	F	4	12/01/1994
67	1.93-94	Lima	M	5	3/01/1994
68	2.227-94	Madre de Dios	M	33	20/05/1994
69	2.229-94	Madre de Dios	M	43	20/05/1994
70	2.232-94	Madre de Dios	F	72	3/06/1994
71	2.234-94	Madre de Dios	M	78	30/06/1994
72	2.271-94	Madre de Dios	M	25	12/06/1994
73	2.313-94	Lambayeque	F	57	4/03/1992
74	2.317-94	Lambayeque	M	12	12/03/1992
75	2.322-94	Lambayeque	F	72	17/03/1992
76	2.329-94	Lambayeque	M	42	18/03/1992
77	2.365-94	Lambayeque	M	15	4/05/1993
78	2.114-95	Ancash	F	45	2/03/1995
79	2.121-95	Ancash	M	4	9/03/1995
80	1.165-95	Lima	M	22	20/01/1995
81	1.167-95	Lima	M	65	23/01/1995
82	1.170-95	Lima	F	60	31/01/1995
83	1.171-95	Lima	F	35	2/03/1995
84	1.193-95	Lima	F	24	6/04/1995
85	1.196-95	Lima	M	30	30/03/1995
86	1.225-95	Ancash	M	45	3/05/1995
87	1.230-95	Ancash	F	45	3/05/1995
88	1.478-95	Callao	F	6	11/05/1994
89	2.0543-95	Loreto	F	9	8/09/1995
90	2.0548-95	Loreto	F	32	5/09/1995
91	2.0549-95	Loreto	M	8	22/08/1995

## ANEXO D

Tabla 9

Resultados de pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares (PCR y PFGE).

Aislamiento	Bioquímica				Serología		Molecular			
	TSI	LIA	Cuerda	Oxidasa	Serogrupo	Serotipo	V- cm	CtxA	Perfil PFGE	
1	1.156-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
2	1.174-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
3	1.177-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
4	1.179-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P9
5	1.180-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
6	1.181-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
7	1.182-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
8	2.419-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
9	2.422-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
10	2.445-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
11	2.0446-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P7
12	2.447-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
13	2.844-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
14	2.0847-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P4
15	2.855-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
16	2.858-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
17	2.0862-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
18	2.1300-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P3
19	2.2941-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P11
20	2.3368-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
21	2.3370-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2

22	2.3372-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
23	2.3373-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
24	2.3375-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P12
25	2.3743-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
26	2.3752-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
27	2.3757-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
28	2.3764-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
29	2.3770-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
30	2.3771-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
31	2.3782-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P10
32	2.3786-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
33	2.3792-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P1
34	2.4125-91	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
35	1.355-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P14

Aislamiento	Bioquímica				Serología		Molecular			
	TSI	LIA	Cuerda	Oxidasa	Serogrupo	Serotipo	V- cm	CtxA	Perfil PFGE	
36	1.0359-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P1
37	2.0563-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
38	1.0672-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
39	1.1391-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
40	1.5098-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P8
41	1.5101-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P13
42	1.5211-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
43	1.5299-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2

44	1.5301-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P1
45	1.5309-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
46	1.5324-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P3
47	1.5341-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
48	2.5367-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
49	2.5368-92	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
50	1.234-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P10
51	2.248-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
52	2.256-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
53	2.260-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
54	1.330-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P4
55	2.0405-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P10
56	2.0543-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
57	1.563-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
58	1.564-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
59	2.0617-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
60	1.828-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
61	2.0855-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
62	1.882-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P20
63	2.1836-93	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
64	1.81-94	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P20
65	1.88-94	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P15
66	1.90-94	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Inaba	+	+	P15
67	1.93-94	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P1
68	2.227-94	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
69	2.229-94	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
70	2.232-94	K/A- -	K/K+	+	+	O1	Ogawa	+	+	P4

— —	Aislamiento	Bioquímica				Serología		Molecular		
		TSI	LIA	Cuerda	Oxidasa	Serogrupo	Serotipo	V- cm	Ctx A	Perfil PFGE
71	2.234-94	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
72	2.271-94	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
73	2.313-94	K/A --	K/K +	+	+	O1	Inaba	+	+	P6
74	2.317-94	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
75	2.322-94	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P2
76	2.329-94	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
77	2.365-94	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P5
78	2.114-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P17
79	2.121-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P19
80	1.165-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Inaba	+	+	P17
81	1.167-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P17
82	1.170-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Inaba	+	+	P2
83	1.171-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Inaba	+	+	P15
84	1.193-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P17
85	1.196-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
86	1.225-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P21
87	1.230-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P16
88	1.478-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15

89	2.0543-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
90	2.0548-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Ogawa	+	+	P15
91	2.0549-95	K/A --	K/K +	+	+	O1	Inaba	+	+	P18

## ANEXO E

### Procedimiento Operativo Estándar (POE) para PFGE de *V. cholerae* de PulseNet para América Latina y El Caribe (PulseNet AL y C)

1. Preparación de la suspensión celular.
2. Preparación de los plugs.
3. Lisis celular.
4. Lavado de los plugs.
5. Digestión del ADN con enzimas de restricción *NotI*
6. Preparación del gel de corrida.

7. Electroforesis en campo pulsado.
8. Tinción y documentación del gel de agarosa.

**DIA 0: MAÑANA**

A partir de una cepa de *V. cholerae* en un tubo de TSA en plano inclinado, tomar una asada y sembrarla en caldo tripticosa soya (TSB), incubar a 37°C por 6h.

**DIA 0: TARDE**

Estriar en una placa de TSA una colonia aislada, para obtener crecimiento confluyente. incubar a 37°C por 14 -18 h.

**DIA 1: MAÑANA**

Adicionar 2mL de BSC en los tubos de vidrio de 13x100mm y con un hisopo humedecido con BSC remover parte del crecimiento de la placa, suspender las células en BSC y girar el hisopo sin generar aerosoles.

Ajustar la concentración de la suspensión celular a D.O. 0.9 (0.8-1.0) a 610 nm, al medir la concentración la suspensión debe estar a temperatura ambiente.

Transferir 100 µL de las suspensiones celulares a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL rotulados, y tenerlos a temperatura ambiente para adicionar la agarosa.

Adicionar 5 µL de proteinasa K y mezclar suavemente con el tip.

Agregar 100 µL de agarosa SeaKem Gold, mezclar pipeteando suavemente, evitar la formación de burbujas. Mantener la temperatura de la agarosa en un vaso de precipitado con agua caliente.

Distribuir parte de la mezcla en los pocillos de un molde reutilizable para plugs previamente rotulados, dejar solidificar por 15 min a temperatura ambiente o 5 min a 4°C.

Preparar en un frasco adecuado BLC y dispensar 5mL en tubos cónicos para centrifuga y adicionar 25 µL de proteinasa K en cada tubo.

Eliminar el exceso de agarosa de los plug con un bisturí.

Transferir los plug a los tubos rotulados de 50 mL con el BLC/Proteinasa K.

Incubar los tubos a 54°C con agitación por 2 h.

Calentar agua estéril de calidad molecular para que los plug puedan lavarse 2 veces con 15 ml por vez.

Bajar la temperatura del baño maría a 50°C.

### **DIA 1: TARDE**

Sacar los tubos del baño maría y descartar el BLC, los remanentes del BLC deben ser eliminados con la ayuda de papel toalla.

Adicionar 15 mL de agua estéril de calidad molecular a 50°C y colocar en baño maría en agitación por 10 – 15 min, repetir 2 veces. Después de cada lavado eliminar el agua y los remanentes con la ayuda de papel toalla.

Adicionar los 15 mL de buffer TE estéril a 50°C y colocar en baño maría en agitación por 10 – 15 min, repetir 4 veces. Después de cada lavado eliminar el buffer y los remanentes con la ayuda de papel toalla.

Adicionar 2 mL de buffer TE estéril a temperatura ambiente, sino se continua con la digestión del ADN, se puede almacenar a 4°C hasta que sea necesario.

**DIA 2: MAÑANA**

Rotular tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, incluidos 3 tubos para los controles de *Salmonella* serovar Braenderup.

Realizar una mezcla de reacción para la restricción enzimática del ADN de *V. cholerae* y *Salmonella* Braenderup H9812 de la siguiente manera:

<b>Reactivo</b>	<b>μL/plug</b>
Agua estéril	175μL
Buffer de Enzima	20μL
NotI o XbaI (10U/μL)	5μL
Volumen total	200μL

Nota: la enzima *NotI* se utiliza para *V. cholerae* y *XbaI* para *Salmonella* Braenderup H9812

Agregar 200 μL de la mezcla de la enzima de restricción a los tubos de microcentrífuga.

Mantener refrigerado.

Retirar los plug del buffer TE con una espátula y colocarlos en una placa Petri estéril.

Cortar una porción de 2 – 2.5 mm de espesor de los plug con un bisturí, y transferir la porción al tubo que contiene 200 μL de la mezcla de la enzima de restricción, mezclar suavemente por inversión, asegurarse que los plugs estén sumergidos en la mezcla de reacción.

Colocar el resto del plug en un criotubo de 2 mL conteniendo 1.5 mL de buffer TE y almacenar a 4° C.

Cortar 3 porciones de la cepa estándar con *XbaI* (40-50 unidades por plug) e incubar por al menos 2 h a 37°C. Proceder de acuerdo al POE de PFGE de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Shigella sonnei* Pulsenet AL y C.

Incubar por 6h a la temperatura correspondiente a cada enzima. *NotI* y *XbaI* a 37°C.

**DIA 2: TARDE**

Preparar buffer TBE 0.5X. a partir de TBE 5X o 10X, diluir con agua de calidad molecular (125ml Buffer TBE 10X con 2375mL de agua destilada).

Preparar agarosa SeaKem Gold (SKG) al 1% (1g para 100mL) en TBE 0.5X colocar en baño de agua a 50-60°C. 100mL para un gel de 14 cm.

Retirar los plug del baño de agua, sacar la mezcla enzima/buffer y adicionar 200  $\mu$ L de TBE 0.5X, e incubar a temperatura ambiente por 5 min.

Retirar los plugs de los tubos, colocar el peine sobre la mesa con la cara de siembra hacia arriba de los tubos, y ubicar los plugs en la parte inferior de los dientes del peine.

Colocar la cepa control en los carriles 1, 5 y 10 y las muestras en los carriles remanentes.

Eliminar el exceso de buffer con papel absorbente. Dejar que los plugs se sequen sobre el peine durante 15 min.

Colocar el peine en el molde del gel, verificar que los plugs estén correctamente alineados sobre la parte inferior de los dientes del peine, que el borde inferior de cada plug contacte completamente contra la plataforma negra, y que no haya burbujas.

Verter cuidadosamente la agarosa (enfriada a 50°C – 55°C) en el molde.

Colocar dentro de la cámara el marco negro para el gel y agregar 2-2.2 L de TBE 0.5X recién preparado y cerrar la unidad.

Encender el módulo de enfriamiento (14°C), la fuente de poder y la bomba (fijar en 70 para un flujo de 1L/min).

Retirar el peine del gel después que solidifique, 30min aproximadamente.

Rellenar los pocillos del gel con agarosa SKG 1% fundida, desensamblar y retirar las barras laterales. Mantener el gel en la plataforma y colocar el gel dentro del marco negro en la cámara para electroforesis y cerrarla.

Programar el equipo CHEF MAPPER con el programa de 2 bloques para *V. cholerae*, luego de la digestión:

Bloque 1: 2s – 10s, 13 h

Bloque 2: 20s-25s, 6 h

El tiempo puede variar de acuerdo a las condiciones de cada laboratorio, en caso de variarlo, se debe hacer de manera proporcional para cada bloque. Así por ejemplo para 17,5h, El bloque 1 será de 12h y El bloque 2 será de 5,5h.

Presionar **Multi-Estado**.

Programas con interrupciones: 0=NO (presionar enter al ingresar un comando o valor).

Ingresar la siguiente información:

BLOQUE 1 13 horas		BLOQUE 2 6 horas	
ESTADO 1	ESTADO 2	ESTADO 1	ESTADO 2
6.0 voltios <b>60°</b> Pulso I: 2s Pulso F:10s F de P: a=0	6.0 voltios <b>-60°</b> Pulso I: 2s Pulso F:10s F de P: a=0	6.0 voltios <b>60°</b> Pulso I: 20s Pulso F:25s F de P: a=0	6.0 voltios <b>-60°</b> Pulso I: 20s Pulso F:25s F de P: a=0

Presionar **START RUN**

Los tiempos de corrida en cada laboratorio pueden ser diferentes, deberán ser optimizados de manera que la banda más baja de la cepa referencial *S. braenderup* H9812 migre a 1.0 – 1.5 cm de la parte inferior del gel.

### **DIA 3: MAÑANA**

Cuando la electroforesis haya terminado, apagar el equipo, retirar el gel y teñir el gel con bromuro de etidio diluyendo 40 µL de la solución concentrada (10mg/mL) en 400 mL de agua destilada. Teñir el gel por 20-30 min en un recipiente cubierto.

Desteñir el gel en 500 mL de agua destilada por 60-90 min, cambiar el agua cada 20 min.

Capturar la imagen en el Gel Doc 1000 (sistema de documentación). Si el fondo interfiere con la resolución, desteñir por 30 a 60 min adicionales.

Guardar la imagen del gel en formato .img o .lsc, convertirlo en .tiff para su análisis con el programa BioNumerics.

Drenar el buffer de la cámara y descartar, enjuagar con 2L agua destilada. Si la unidad no se va a utilizar por varios días, hacer fluir agua por las mangueras, dejando funcionar la bomba por 5-10min antes de drenar el agua de la cámara.

## **ANEXO F**

Equipos utilizados para PFGE.

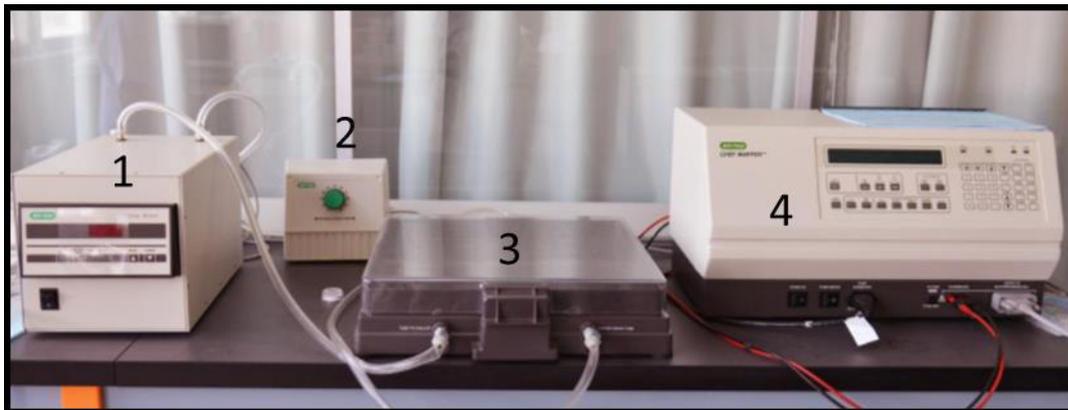
### **Figura 13**

*Espectrofotómetro – SPECTRONIC 21D*



**Figura 14**

*Equipo de electroforesis CHEF MAPPER - BIORAD®*



**1. Módulo de enfriamiento “cooler”, 2. Bomba de flujo, 3. Cámara de electroforesis, 4. Fuente de poder.**