



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN
GENÉTICA EN CEPAS DE *Vibrio cholerae* PACINI, 1854
(VIBRIONALES: VIBRIONACEAE) AISLADOS EN
PERÚ, 1991-2016.**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

AUTORA

Carrascal Huyhua, Melissa Yvon.

ASESORES:

Lic. Gloria Sáez Flores.

Dr. Ronnie Gustavo Gavilán Chávez.

Dr. Oscar Roberto Escalante Maldonado.

JURADOS:

Mg. Yupanqui Siccha, Gisela F.

Dr. Iannacone Oliver, José A.

Mg. Salas Asencios, Ramsés.

LIMA-PERÚ

2018

DEDICATORIA

A Dios merecedor de toda honra y toda gloria.

A mis padres Morayma Huyhua C. y Juan Carrascal S., mis tíos Wilfredo Huyhua C. e Iluminado Huyhua C. y mi hermana Belinda Huyhua H., porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones, demostrarme siempre su cariño y sus consejos para hacer de mí una mejor persona. Además, a mis sobrinas Giusy Crisóstomo H. y Giulianna Crisóstomo H. por darme la alegría e inocencia que solo ustedes saben brindar.

A mis seres queridos que no están físicamente con nosotros, mis abuelos Pedro Huyhua B., Valentina Carrillo C., Manuel Carrascal y Francisca Sánchez C., mis tíos Víctor Huyhua C. y Modesto Huyhua C., y mis queridas mascotas, pero sé que desde el cielo siempre me cuida y me guía para que todo salga bien.

A mis amigas Catherine Apaza A., Janet Huancachoque M., Keare Barazorda M. y Milagros Carrillo T., agradezco de corazón tener a mis amigas en mi vida, porque cada una de ellas representa un momento y una vivencia diferente, por ser quienes me mostraban con sus hechos lo que es la verdadera amistad.

“Lo que somos, es el regalo de Dios para nosotros. En lo que nos convertimos, es el regalo de nosotros para Dios”.

Eleanor Powell

AGRADECIMIENTOS

Agradecer primero a Dios porque es mi fortaleza, gracias a él he logrado concluir mi carrera.

Agradezco a mis padres, que fueron mi inspiración en todo momento para seguir adelante en culminar la tesis tan importante en mi vida, me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre preservar a través de sus sabios consejos.

Le agradezco a mi institución la Universidad Nacional Federico Villarreal es especial a la escuela de Biología, gracias a mis maestros por sus esfuerzos, paciencia y dedicación nos guiaron por el mejor de los caminos para lograr ser un buen profesional que concierne en la vida y mi futuro. En especial agradecer a la Mg. C. Blga. Gloria Sáenz por su apoyo incondicional, su dedicación y amor a los estudiantes.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud por el apoyo financiero y de manera especial al Dr. Ronnie Gustavo Gavilán Chávez Blgo y al Dr. Oscar Roberto Escalante Maldonado Blgo por haberme guiado con sus consejos, apoyo y asesoramiento, el plasmar mi trabajo de investigación en este documento.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud porque cada uno con sus valiosas aportaciones hicieron posible para la realización de la tesis y por la gran calidad humana que me han demostrado con su amistad, su apoyo y enseñanza.

A todos les debo gratitud por su paciencia y consideración, les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hace crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero y estimo mucho y nunca los olvidare.

RESUMEN

Vibrio cholerae es una bacteria que habita normalmente en ambientes marinos (regiones tropicales y subtropicales). *V. cholerae* toxigénico es el agente causal del cólera cuya enfermedad es de importancia para la salud global. El objetivo de este estudio es caracterizar y analizar la variación genética de cepas de *V. cholerae* aisladas durante el período 1991-2016 en Perú. Se incluyeron un total de 88 cepas correspondientes 04 cepas ambientales y 84 cepas clínicas de *V. cholerae* durante el período 1991-2016, dichas cepas fueron recuperadas de la colección de cepas del Instituto Nacional de Salud. Todas las cepas fueron confirmadas como *V. cholerae* mediante análisis microbiológico (bioquímico y serológico). Asimismo, las muestras fueron analizadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa para identificar 02 marcadores del serogrupo y 02 marcadores de especie, además determinar la frecuencia y evidenciar la distribución de los 15 marcadores moleculares relacionados a genes de virulencia (análisis multilocus) de *V. cholerae* toxigénico con el serogrupo y su distribución durante el periodo epidémico (1991-2002) y post epidémico (2003-2016). En este estudio se analizaron 88 cepas de *V. cholerae*, de las cuales 84 fueron obtenidas de muestras clínicas y 04 de muestras ambientales. Todas las cepas fueron re-aisladas y confirmadas como *V. cholerae* tipificadas por microbiología, serológico y molecular. Mediante el análisis molecular multilocus asociados con genes de virulencia reveló que las 73 (03 ambientales y 70 clínicas) cepas aisladas durante periodo epidémico pertenecieron al serogrupo O1 y fueron toxigénicas, las que presentaron mayoritariamente los 15 marcadores multilocus. Durante el periodo post epidémico solo se recuperó una cepa clínica de *V. cholerae* O1 Inaba no toxigénica, la cual presentó solo 5 de 15 marcadores multilocus entre los que destaca la ausencia de los genes CTX, pTLC, VPI y WASA-1. Se recuperaron 14 cepas no-O1/no-O139 (3 ambientales y 11 clínicas), las cuales presentaron solo 6 de 15 marcadores multilocus, y solo se identificó la presencia del marcador stn/sto en 01 cepa clínica del periodo epidémico.

Asimismo, se observó que el marcador WASA-1 característico del clon epidémico de América Latina, estuvo presente solo en cepas O1 del periodo epidémico. Durante el periodo epidémico predominó las cepas de *Vibrio cholerae* O1 toxigénico, las cuales presentaron poca variación genética y se observó la presencia del marcador WASA-1 de la epidemia de Latinoamérica en la década de los 90s. Durante el periodo post-epidémico no se identificó cepas de *Vibrio cholerae* toxigénicas a excepción de una cepa O1 que no presentaba genes de virulencia tales como el ctxAB, toxR, tcpA, ace, zot y orfU, así como el marcador WASA-1. Este es el primer estudio reportado a nivel nacional, es de base lineal, una herramienta útil, facilita la información sobre la variación genética de los genes multilocus de *V. cholerae* al comienzo de la década de los 90s hasta el año 2016.

Palabras claves: *Vibrio cholerae*, serogrupo, toxinas, cólera, genes de virulencia, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Vibrio cholerae is a bacterium that typically inhabits marine environments (tropical regions and subtropical). *V. cholerae* toxigenic is the causal agent of cholera whose disease is of importance for global health. The objective of this study is to characterize and analyze the genetic variation of strains of *V. cholerae* isolated during the period 1991-2016 in Peru. It included a total of 88 strains corresponding to 04 environmental strains and 84 clinical isolates of *V. cholerae* during the period 1991-2016, these strains were recovered from the collection of strains of the National Institute of Health. All the strains were confirmed as *V. cholerae* through microbiological analysis (biochemical and serological). Also, the samples were analyzed by polymerase chain reaction to identify 02 markers in the serogroup and 02 markers of species, in addition to determine the frequency and show the distribution of the 15 molecular markers related to virulence genes (analysis multilocus) of *V. cholerae* toxigenic with the serogroup and distribution during the epidemic period (1991-2002) and post-epidemic (2003-2016). In this study we analyzed 88 strains of *V. cholerae*, of which 84 were obtained from clinical samples and 04 from environmental samples. All the strains were re-isolated and confirmed as *V. cholerae* typified by microbiology, serological and molecular. Using the molecular analysis multilocus associated with virulence genes revealed that the 73 (03 environmental and 70 clinics) strains isolated during epidemic period belonged to serogroup O1 and were toxigenic, which presented mostly the 15 markers multilocus. During the post-epidemic period only recovered a strain clinic of *V. cholerae* O1 Inaba not toxigenic, which presented only 5 of 15 markers multilocus between which it emphasizes the absence of genes CTX, pTLC, VPI and WASA-1. Recovered 14 strains non-O1/non-O139 (3 environmental and 11 clinics), which submitted only 6 of 15 markers multilocus, and were only identified the presence of the marker *stn/sto* in O1 ECA clinic of the epidemic period.

It was also observed that the marker WASA-1 characteristic of clone epidemic of Latin America, was only present in strains or1 of epidemic period. During the epidemic period prevalence strains of *Vibrio cholerae* O1 toxigenic, which presented little genetic variation and it was observed the presence of the marker WASA-1 of the epidemic in Latin America in the decade of 90s. During the period post-epidemic is not identified strains of *Vibrio cholerae* O1 toxigenics with the exception of a strain that presented no virulence genes such as the ctxAB, toxR, tcpA, ace, zot and orfU, as well as the marker WASA-1. This is the first study reported at the national level, is linear basis, a useful tool, provides information about the genetic variation of genes multilocus of *V. cholerae* at the beginning of the decade of the 90s until the year 2016.

Key words: *Vibrio cholerae*, serogroup, toxins, cholera, virulence genes, polymerase chain reaction.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEORICO	14
2.1. ANTECEDENTES	14
2.2. GENERALIDADES	20
2.2.1. Definición del cólera	20
2.2.2. Definición de <i>Vibrio cholerae</i>	23
2.2.3. El genoma de <i>Vibrio cholerae</i>	26
2.2.4. Ciclo de vida de <i>V. cholerae</i>	26
2.2.5. Patogenicidad, factores de virulencia de <i>V. cholerae</i>	27
3. MATERIALES Y METODOS	36
4. RESULTADOS	46
4.1. Caracterización fenotípica	46
4.1.1. Tipificación microbiológica y serológica	46
4.2. Caracterización genotípica	47
4.2.2. Distribución genotípica de O1 y no-O1/no-O139 desde 1991 al 2016 en Perú.	53
5. DISCUSION	56
6. CONCLUSION	60
7. RECOMENDACIONES	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62
9. ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. TASA DE INCIDENCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LOS CASOS DE CÓLERA EN PERÚ. FUENTE MINSA.	22
FIGURA 2. TASA DE INCIDENCIA DEL COMPORTAMIENTO DEL CÓLERA EN PERÚ (1991-2001). FUENTE MINSA.	23
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ORGANIZACIÓN GRUPO DE GENES DE LA TOXINA RTX EN V. CHOLERAEE.	32
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ORGANIZACIÓN GENÉTICA DEL LOCUS HLY (~ 8,2 KB) EN V. CHOLERAEE.	35
FIGURA 5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS AISLAMIENTOS DE CEPAS V. CHOLERAEE O1 Y NO-O1/NO-O139.	39
FIGURA 6. ESQUEMA DE LA ELECTROFORESIS DE AGAROSA 2%. AMPLICONES OBTENIDOS PARA EL GEN VCO1 EN CEPAS DE V. CHOLERAEE.	49
FIGURA 7. ESQUEMA DE LA ELECTROFORESIS DE AGAROSA 2%. AMPLICONES OBTENIDOS PARA EL GEN VC Y TCPA EN CEPAS DE V. CHOLERAEE.	49
FIGURA 8. DIAGRAMA GENERAL DEL MAPEO POR PCR DE LOS GENES DE RTX (RTXA Y RTX C) EN CEPAS DE V. CHOLERAEE.	49
FIGURA 9. DIAGRAMA GENERAL DEL MAPEO POR PCR DE LOS GENES DE CTX (CTXAB, ZOT, ACE Y ORFU), VPI (TCPA Y ToxR) Y pTLC EN CEPAS DE V. CHOLERAEE.	50
FIGURA 10. DIAGRAMA GENERAL DEL MAPEO POR PCR DE LOS GENES DE HEMOLISINAS (HLYA, HLYB Y HLYC), Y OMPW EN CEPAS DE V. CHOLERAEE.	51
FIGURA 11. DIAGRAMA GENERAL DEL MAPEO POR PCR MULTIPLEX DE LOS GENES DEL FAGO WASA-1 (WASA 1A Y WASA 1C) EN CEPAS DE V. CHOLERAEE	52
FIGURA 12. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2%. AMPLICONES OBTENIDOS PARA EL GEN STN/STO EN CEPAS DE V. CHOLERAEE	53
FIGURA 13. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS EN CEPAS DEL SEROGRUPO NO-O1/NO-O139.	54
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS EN CEPAS DEL SEROGRUPO O1	55
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE V. CHOLERAEE.	72
FIGURA 16. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE V. CHOLERAEE, LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS EN EL MEDIO TSI AL 1% NaCl Y EN EL MEDIO LIA AL 1% NaCl.	72
FIGURA 17. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE VIBRIO CHOLERAEE, LAS PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CEPAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES DE V. CHOLERAE AISLADAS EN PERIODO EPIDÉMICOS Y POST EPIDÉMICO EN PERÚ.	40
TABLA 2. GENES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.	43
TABLA 3. SECUENCIA DE LOS CEBADORES Y LAS CONDICIONES DE REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PCR UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO	44
TABLA 4. TIPIFICACIÓN DE LAS 88 CEPAS DE V. CHOLERAE MEDIANTE SEROLOGÍA Y PCR.	47
TABLA 5. TABLA DE CONTINGENCIA DEL ANÁLISIS MULTILOCUS DE V. CHOLERAE DURANTE Y POST DE LA EPIDEMIA DEL CÓLERA, CONTINUA EN LA TABLA 6 Y 7.	77
TABLA 6. TABLA DE CONTINGENCIA DEL ANÁLISIS MULTILOCUS DE V. CHOLERAE DURANTE Y POST DE LA EPIDEMIA DEL CÓLERA, CONTINUA EN LA TABLA 7.	78
TABLA 7. TABLA DE CONTINGENCIA DEL ANÁLISIS MULTILOCUS DE V. CHOLERAE DURANTE Y POST DE LA EPIDEMIA DEL CÓLERA.	79

1. INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados con *Vibrio cholerae* patogénico, es un bacilo Gram negativo cuyo hábitat natural son los ambientes marinos y dulceacuícolas, y en asociaciones de moluscos y crustáceos. Esta bacteria patogénica posee varios genes asociados a la virulencia que le confieren las características para infectar al humano (Thompson et al., 2005). Los genes asociados a la virulencia son productos bacterianos o componentes estructurales que contribuyen a la virulencia o patogenicidad (Prescott et al., 2002).

La primera pandemia de cólera fue en Asia (Bangladesh-India) en 1871, que luego se diseminó a los países de Europa provocando alta mortalidad. Posteriormente se reportaron además 6 pandemias lo que desencadenó la distribución global total de esta enfermedad.

El cólera llegó en casi todos los países de América con excepción de Uruguay y las islas del Caribe debido a la séptima pandemia, que comenzó en Indonesia en 1961. Hasta que llegó al Perú en 1991, la propagación del cólera influyó ciertos factores sociales, culturales, sanitarias y ambientales desfavorables como el fenómeno de oscilación del sur El Niño. En el Perú se reportó el último caso de cólera en el 2001, por el Ministerio de Salud (MINSA). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que esta enfermedad podría re-emerger debido *V. cholerae* presentes en el litoral peruano como reservorios naturales (Vega et. al., 2010), considerando además su alta tasa de mutación y los múltiples factores que afectan su epidemiología.

Por lo tanto, es importante identificar los genes asociados a la virulencia que nos provea claves esenciales para la biología y evolución de este microorganismo ayudándonos a comprender como el patógeno sobrevive dentro y fuera del huésped y su patogenicidad, además, proporciona información importante para el desarrollo de vacunas y diagnóstico (Field *et al.*, 2004).

Actualmente, la información sobre la variación genética asociada a la virulencia de *V. cholerae* en el Perú es escasa y debido a su gran importancia, arriba descrita, es crucial determinar el perfil de genes asociados a la virulencia y evaluar si existe variación genética entre las cepas aisladas en Perú durante los años 1991 hasta 2016, para elaborar un efectivo plan de prevención contra posibles nuevos brotes de cólera.

El objetivo de la presente Tesis es caracterizar y analizar la variación genética de las cepas de *Vibrio cholerae* en el Perú desde 1991 hasta el 2016.

2. MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES

Huguet et.al. (2000) en su investigación “**Tipificación molecular del *Vibrio cholerae* O1 en el Perú**”, para optar el título de biólogo celular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este estudio de ribotipificación en 75 cepas de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 permitió identificar tres variantes ribotípicas, referidas como Per1, Per2 y Per3, aisladas durante el periodo 1991 - 1999 en el Perú. Los resultados mostraron una aparición constante y mayoritaria de la variante Per1. La variante Per1 fue reportada tanto en la etapa epidémica y endémica del cólera, poniendo en evidencia la alerta de un mismo grupo clonal en los brotes epidémicos del Perú. Mientras que Per2 y Per3 se relacionaron exclusivamente con la etapa endémica. Estas variantes ribotípicas fueron comparadas con la variante ribotípicas de aislamientos asiáticos (Tailandia), los resultados mostraron altos índices de similitud entre los ribotipos Per1, Per2 y Per3. Evidenciándose una estrecha relación entre las cepas peruanas y los aislamientos asiáticos.

Nair et. al. (2009) en su investigación “**Las cepas peruanas *Vibrio cholerae* O1 El Tor poseen una región distinta en la isla patogenicidad *Vibrio* II en la séptima pandemia**”. Tuvo como objetivo caracterizar y comparar una colección de cepas ambientales y clínicas de *Vibrio cholerae* O1 aisladas desde el inicio de la epidemia de cólera en América Latina en 1991 a 2003, de múltiples localidades en Perú. Además, se compararon con las cepas de *V. cholerae* O1 de la séptima pandemia con las cepas del remanente del mundo (Asia, África, Australia y Europa) utilizando perfiles de genes de virulencia multilocus y secuenciación de ADN. Se concluyó que las cepas peruanas, euroasiáticas y africanas pertenecían al mismo complejo clonal, y que las cepas peruanas representaban variantes que habían evolucionado independientemente para un tiempo relativamente transitorio. Como estos ORF en VSP-II de cepas peruanas son únicos y

conservados, podrían constituir la base para rastrear el origen de las cepas peruanas y de la pandemia latinoamericana.

Morais et.al. (2009) en su tesis de doctorado “**Diversidad genética de aislados ambientales de *Vibrio cholerae* de la Amazonia Brasileña**”, para optar el título de Doctor en Biología de Agentes Infecciosos y Parasitarios. Universidad Federal de Instituto de Ciencias Biológicas. Tuvo como objetivo estudiar la diversidad genética de aislados de esta especie, de ambientes fluviales de la Amazonia brasileña. Un total de 148 aislados de *V. cholerae* no-O1/no-O139 (NAGs) y O1 ambientales de la Amazonía, obtenidos entre 1977 y 2007, fueron caracterizadas y comparadas con las muestras clínicas de *V. cholerae* O1 de la sexta y séptima pandemias. Se utilizaron los perfiles de PFGE, para determinar la relación clonal entre *V. cholerae* no-O1/no-O139 y O1 ambientales y clínicos. La presencia de genes de virulencia (hlyA / hem, hlyB, hlyC, rtxA, rtxC, tcpA, ctx, zot, ace, stn / sto) e integrones de clase 1, 2 y 3 (intI 1, 2 y 3), fue se analizó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. El análisis de los perfiles de macro-restricción reveló que los NAGs no presentaron una gran diversidad genética comparada a los *V. cholerae* O1. Los aislados de NAG y O1 se separaron en distintos grupos y la mayoría de los O1 ambientales presentó relación clonal con aislados clínicos de la séptima pandemia de cólera. La distribución de los genes de virulencia entre los NAGs es diferente a la de los O1. Los O1 fueron positivos para todos los genes de virulencia estudiados a excepción de stn / sto e integrones de clase 1, 2 y 3. Algunos *V. cholerae* O1 ambientales pertenecientes a la séptima pandemia, presentaron una extensa pérdida de genes. Diferentes NAGs fueron positivos para los genes stn / sto e intI 1. Se encontraron dos alelos del gen aadA (aadA2 y aadA7). De modo interesante, los *V. cholerae* O1 ambientales pertenecientes al período pandémico, tan solo fueron aislados durante el período de la última epidemia de cólera en la región Amazónica brasileña (1991-1996).

Morais et.al. (2013) en su investigación **“Estudio poblacional y genético de *Vibrio cholerae* del ambiente de la Amazonía confirma que el profago WASA-1 es el principal marcador de la cepa epidémica que circula en la región”**. *Vibrio cholerae* es un habitante natural de muchos ambientes fluviales en el mundo. Los biotipos que albergan grupos similares de genes predominantes con la virulencia son los agentes causantes del cólera epidémico, no obstante, la mayoría de las cepas son inofensivas para los humanos. Desde 1971, la vigilancia ambiental de *V. cholerae* potencialmente patógena ha resultado en el aislamiento de muchas cepas del ecosistema acuático de la Amazonia brasileña. La totalidad de estas cepas provienen de los serogrupos no-O1/no-O139 (NAG), aunque, las cepas O1 toxigénicas se aislaron durante la epidemia de cólera en América Latina en la región (1991-1996). Se analizaron una colección de cepas de *V. cholerae* ambientales de la Amazonía brasileña pertenecientes a períodos pre epidémicos (1977-1990), epidémicos (1991-1996) y posteriores a la epidemia (1996-2007) en la región. Estudiaron la presencia de genes relacionados con la virulencia adentro de la especie y la relación genética entre las cepas. Estas variables y la información disponible sobre las cepas se utilizaron para construir un prototipo bayesiano de dependencia multivariante para distinguir la trascendencia de cada variable para determinar las demás. Algunos genes relacionados con las cepas epidémicas se encontraron en NAG ambientales durante y a posteriori de la epidemia. Se reportó una diversidad significativa entre el contenido del gen relacionado con la virulencia entre las cepas O1 aisladas del medio ambiente durante el período epidémico, sin embargo, no de los aislados clínicos, que se analizaron como controles. A pesar de esta diversidad, estas cepas exhibieron perfiles de PFGE similares. Los perfiles de PFGE fueron significativos al tiempo que se separaron los clones potencialmente epidémicos de las cepas indígenas. No se observó una correlación significativa con la fuente, el lugar o el período de aislamiento. La presencia del profago WASA-1 se correlacionó significativamente con los serogrupos,

los perfiles PFGE y la presencia de genes relacionados con la virulencia. Este estudio proporciona una amplia caracterización de la población ambiental de *V. cholerae* de la Amazonía y asimismo destaca la importancia de identificar marcadores genéticos definidos con precisión, como el profago WASA-1 para la vigilancia del cólera.

Romero et.al. (2013) en su investigación **“PCR en tiempo real para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua, febrero-marzo 2012”**, para optar el título de maestría en ciencias con mención en Microbiología Médica. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Tuvo como objetivo estimar la efectividad de un PCR en tiempo real para la detección de *V. cholerae* en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua. Además, investigó en los aislamientos de *V. cholerae* la presencia de genes de virulencia asociados a causar diarrea en seres humanos. Los resultados de este estudio descriptivo transversal adonde se analizaron 111 muestras de aguas superficiales encaminadas a la recreación humana demostraron que la técnica molecular PCR en periodo real presentó una excelente eficiencia con una sensibilidad del 98.4 %, especificidad 86.9 %, valor predictivo positivo 91.4 %, valor predictivo negativo 97.5 %, el término de detección fue para el gen *toxR* de $1,0 \times 10^2$ Ufc/ml y para el gen *ctxA* $1,0 \times 10^1$ Ufc/ml. El 56.7 % de las muestras analizadas resultaron positivas para el aislamiento de *V. cholerae* no-O1/no-O139. Solo 2 muestras (1.8%) resultaron positivas para *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor y no hubo aislamiento de *V. cholerae* O139. Se identificaron 6 perfiles de genes asociados a virulencia y en el 45 % de las muestras se detectó la presencia de uno o dos genes codificadores de toxinas patógenas para el humano. Sin embargo, los aislados de *V. cholerae* ninguno presentó genes de virulencia destacados a epidemias como es el caso del gen *ctxA* codificador de la subunidad A de la toxina colérica y el gen de adhesión a las células intestinales *tcpA*. Por lo que los análisis moleculares en este estudio sugieren que los *V. cholerae* aislados en las aguas superficiales

destinadas a la recreación humana no son capaces de producir epidemias de cólera en Nicaragua.

Sánchez et. al. (2014) en su investigación **“Cólera: historia de un gran flagelo de la humanidad”**, para optar el título de microbióloga. Clínica Estomatológica Docente La Vigía, Camagüey. Tuvo como objetivo profundizar los conceptos sobre el cólera y su historia. Se tratan aspectos conocidos con la etiología de la enfermedad, patogenia, cuadro clínico, tratamiento, epidemiología y prevención. El cólera es una enfermedad de origen multicausal adonde intervienen factores biológicos, ambientales, sociales, políticos y culturales, la cual está resurgiendo como un problema sanitario en muchos países. Para su erradicación es ineludible mejorar una fuerte promoción de salud en la sociedad, garantizar atención rápida a los enfermos e impedir la desorganización de la estructura social y económica en pro de la calidad de vida del ser humano.

Valderrama et. al. (2014) en su investigación **“Aproximación al análisis de la epidemia del cólera en Trujillo metropolitano f.s. XX”**, para optar el título de licenciado en historia. Universidad Nacional de Trujillo. Tuvo como objetivo investigar el impacto de la población en Trujillo Metropolitano, producida por la epidemia del cólera, entre los años de 1991 a 1995. En este período Trujillo atravesó una crisis económica, que provocó una recesión y alta inflación. Políticamente, el Estado no tuvo presencia significativa, fue inexistente en los distintos lugares del país. Enmarcando las condiciones previas a la aparición de la epidemia a Trujillo. En este proceso, se planteó como objetivos de investigación: analizar el impacto social, económico y político. Describe su origen del cólera y su arribada al Perú como las condiciones geo históricas, económicas, políticas y sociales de la ciudad de Trujillo durante las décadas ochenta y noventa; estos factores facilitaron la propagación o expansión de la enfermedad; se explicó el impacto económico, afectando el comercio nacional e internacional en la exportación de productos marinos, harina de pescado, vegetales y el turismo, en lo político se describió la reacción del gobierno

central y local tomando decisiones e implementando medidas de prevención para la salud, y en lo social el alto número de casos presentados originó el desabastecimiento de medicinas y problemas de atención de salud, en lo cultural inició un cambio de hábitos en la higiene tanto personal como en el consumo de alimentos.

Ibarra et. al. (2014) en su investigación **“*Vibrios no epidémicos y Vibrio cholerae O1* asociados a enfermedades diarreicas agudas. Evento climatológico “El Niño” - 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo”** para optar el título de laboratorista de Fisiología, Genética y Ecología Microbiana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tuvo como objetivo aislar e identificar *Vibrio cholerae O1* y especies de *Vibrios* no epidémicos asociados a casos de enfermedad diarreica aguda (EDA) durante 1998, adentro del evento climatológico “El Niño” Oscilación del Sur (ENOS). Materiales y métodos: Durante los meses de verano de 1998 se realizó 70 coprocultivos de pacientes con EDA admitidos en la exposición de emergencia del Hospital Nacional Dos de Mayo de Lima. Se estudió colonias aisladas en Agar TCBS. Los aislados fueron sometidos a pruebas bioquímicas y serológicas para la identificación de *Vibrio cholerae O1*. La identificación de *Vibrios* no epidémicos y otros *Vibrios* patogénicos se realizó tomando en consideración las características descritas en el Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey (1994). Los resultados indican que el mayor número de casos estudiados estuvieron asociados a *Vibrio cholerae O1* como agente etiológico único (64,3%) o relacionados a otras especies de *Vibrio* (4,2%). Se relata 2 casos *V. vulnificus* (2,9%) y 3 *V. parahaemolyticus* (4,3%) como agentes etiológicos de diarrea aguda. Conclusiones: La asociación de *Vibrio cholerae O1* con otras especies de *Vibrios* no epidémicos permitiría establecer una relación directa entre las infecciones diarreicas estudiadas y el ENOS.

2.2. GENERALIDADES

2.2.1. Definición del cólera

El cólera es una enfermedad infecto-contagiosa, provoca una diarrea acuosa y profusa con deposiciones semejantes al agua de arroz, además de vómitos, rápida deshidratación, acidosis, colapso circulatorio, y detención rápida de líquidos y electrolitos intra y extracelulares causada por la presencia del *Vibrio cholerae* en el intestino delgado.

2.2.1.1. El cólera en el mundo

La enfermedad del cólera se remonta a los tiempos de Hipócrates y Buda y posiblemente incluso antes (Mata et.al., 1992). Sin embargo, la historia moderna del cólera comenzó en 1817. Durante el siglo XIX se identificaron los agentes etiológicos responsables del cólera y muchas otras enfermedades infecciosas. En 1883, Robert Koch demostró que el cólera es producido por una bacteria en forma de vírgula (Mata et.al., 1992), más tarde fue denominada *V. cholerae* (Pacini et.al., 1854). Hasta 1960, *Vibrio cholerae* fue considerada la única especie patógena para el hombre.

Se han registrado siete pandemias de cólera durante los últimos cien años o más. Se originó la “Primera Pandemia” en el Asia en el delta del Ganges (Bangladesh-India) y se diseminó a través de varios países europeos mientras tanto la séptima pandémica fue aislada en la isla Célebes en Indonesia de Sulawesi en 1961 y a posteriori en África y América Latina.

En América latina aumentaron los sucesos del cólera por la venida del fenómeno del Niño en Ecuador y Perú (Thompson et al., 2005) y el huracán Mitch, que afectó principalmente a Guatemala, Honduras y Nicaragua, con daños a la infraestructura sanitaria y la reubicación de refugiados en asilados precarios (Alonso et. al., 2009).

En octubre de 2010 la epidemia de cólera reemergió en Haití, el país más pobre de América Latina, devastado entonces por el terremoto que en enero de ese año asoló al país dejando un saldo de 250 000 muertos, 300 000 lesionados y 1,3 millones de habitantes sin cobijo, quienes fueron desplazándose en consolidaciones sanitarias desfavorables, dándose así las condiciones propicias para el desarrollo de un brote epidémico (Walton et. al., 2011). La epidemia de cólera de Haití se inició en el departamento de Artibonite, expandiéndose rápidamente al resto del país y, en noviembre del mismo año, llegó a la vecina República Dominicana, un país con mayor desarrollo y mejor preparado que Haití para hacer frente a emergencias de salud.

2.2.1.2. El cólera en el Perú

El cólera llegó el 23 de enero de 1991 se notificaron los primeros casos en Chancay cerca de Lima y, casi simultáneamente, en Chimbote, 400 km al norte de Chancay. Este agente fue aislado de las heces de los pacientes afectados correspondió a *V. cholerae*, serovariedad O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba. A lo largo de varias décadas previas al brote de 1991, las condiciones políticas, sociales, ambientales, ecológicas, económicas y sanitarias desfavorables, al tiempo que se incrementaban las migraciones del campo a la ciudad a raíz del terrorismo, la guerra interna y el aumento en la temperatura de las aguas debido al fenómeno de El Niño, lo cual provocó una proliferación de fitoplancton y crustáceos marinos que son reservorios naturales del género de *Vibrio* (Colwell et. al., 1996). Por lo cual la enfermedad del cólera se propago por medio del agua y alimentos contaminados. Más aún, la población presentaba factores biológicos predisponentes para desarrollar la enfermedad, tales como la elevada frecuencia de gastritis por *Helicobacter pylori* (Thompson et. al., 2001), que causa hipocloridia, y la frecuencia del grupo sanguíneo O, el cual se asocia a un cuadro clínico de cólera más severo por causas que se desconocen. Luego la epidemia fue

declinando progresivamente, hasta que en 1998 se registró un aumento significativo de casos de cólera y defunciones presumiblemente por la reaparición del fenómeno de El Niño. Los 2 últimos casos reportados del cólera fue entre los años 2001 y 2002 por MINSA (Figura 1 y 2).

Por lo recién expuesto, el cólera en América Latina se considera una enfermedad reemergente, ya que reapareció después de una disminución significativa de su incidencia, favorecida por factores sociales, culturales y ambientales.

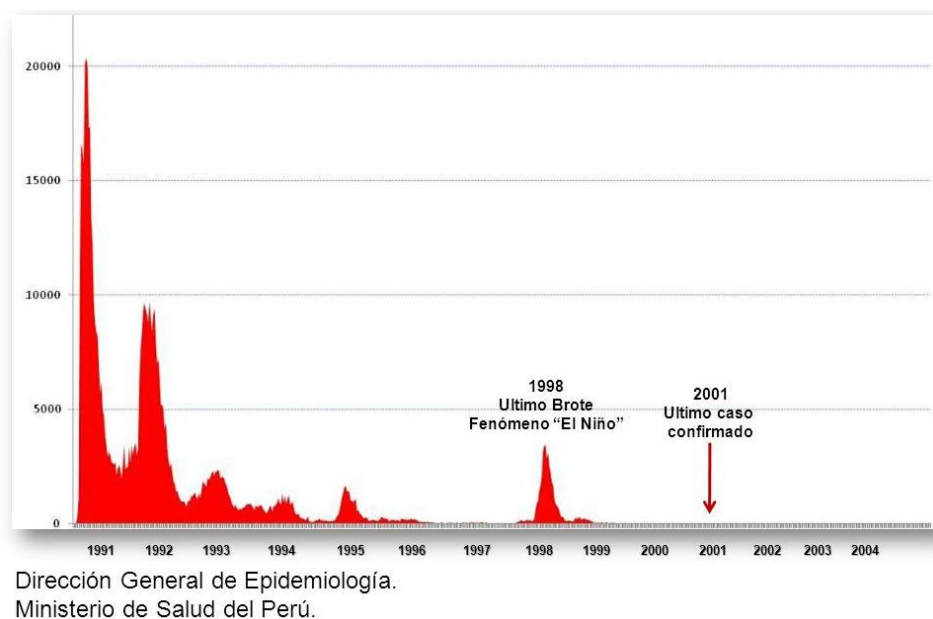


Figura 1. Tasa de incidencia epidemiológica de los casos de cólera en Perú. Fuente MINSA.

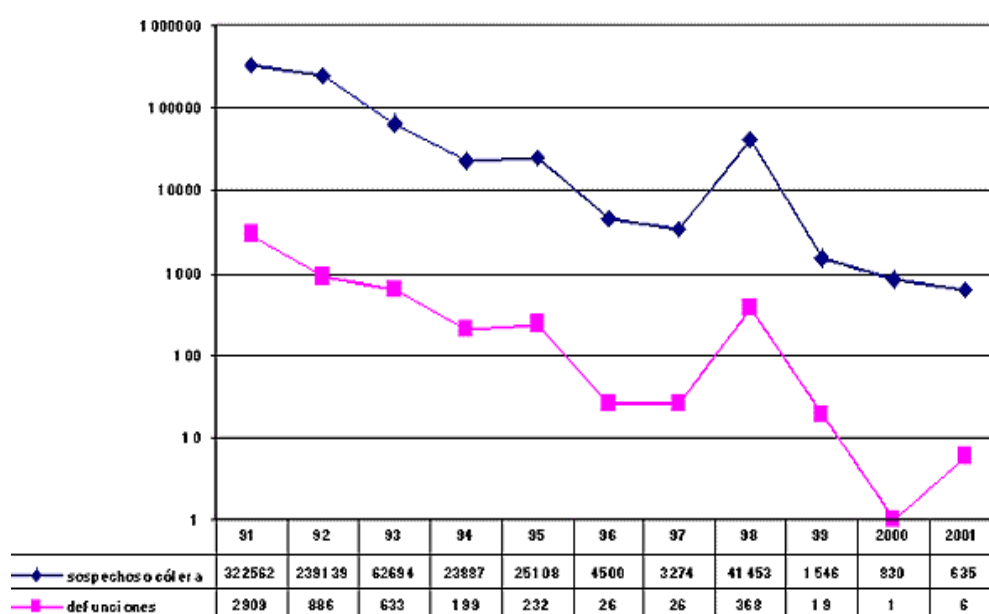


Figura 2. Tasa de incidencia del comportamiento del cólera en Perú (1991-2001).
Fuente MINSa.

2.2.2. Definición de *Vibrio cholerae*

El género *Vibrio* Pacini, 1854, fue descrita en muestras de intestino de un cadáver fallecido por el cólera por Pacini et.al., 1854. Esta bacteria es autóctona de diversos ambientes acuáticos en todo el mundo (Colwell et.al., 1996). *Vibrio cholerae* es una bacteria patogénica que conforman la familia *Vibrionaceae*. La categoría taxonómica de *V. cholerae* es:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria.

Clase: Gammaproteobacteria.

Orden: Vibrionales.

Familia: Vibrionaceae.

Género: *Vibrio*.

Especie: *V. cholerae*.

V. cholerae son bacilos bacterianos Gram negativo, presenta un diámetro entre 0,5 a 0.8 μm y entre 1,4 a 2,4 μm de largo, de forma recta o curva, anaerobios facultativos, móviles la mayoría por medio de un único flagelo polar (Alonso et al., 2009), es una especie bien definida sobre las bases de pruebas bioquímicas en el agar triple

azúcar al 1% de cloruro de sodio (agar TSI al 1% de NaCl) es A/A (cuña amarilla/fondo amarillo, no produce gas, no produce hidrogeno sulfurado (H₂S) a 18–24 horas, en agar hierro lisina al 1% de cloruro de sodio (agar LIA al 1% de NaCl) es K/K (cuña púrpura/fondo púrpura) a 18–24 horas, oxidasa positiva (+), cuerda mucoide positivo (+), sensibilidad al agente Vibriostático O: 129 positivo (+), lactosa negativo (-), lisina / ornitina descarboxilasa son positivas (+), arginina deshidrolasa negativo (-), indol positivo (+).

La presencia de antígenos somáticos termoestables O, ha asentido determinar más de 200 serogrupos de *V. cholerae*. Solamente el serogrupo O1 es considerado más virulento y el O139 es el agente causal del cólera (Alonso et. al., 2009), una forma grave de enfermedad diarreica en seres humanos con alta mortalidad y morbilidad (Kaper et al., 1995). Los serogrupos no-O1/no-O139, suelen aislarse de fuentes ambientales, produce casos esporádicos auto limitantes de gastroenteritis, diarreas ligeras.

2.2.2.1. Clasificación de *V. cholerae*

2.2.2.1.1. *V. cholerae* O1:

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

2.2.2.1.2. *V. cholerae* non-O1/non-O139:

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

2.2.2.1.3. *V. cholerae* O139 Bengal:

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

En general, este microorganismo aparenta ser un híbrido de una cepa O1 con una cepa no-O1/no-O139. En características de virulencia importante, especialmente, toxina colérica (CTX) y pilus co-regulador de toxina (tcpA), *V. cholerae* O139 es indistinguible de *V. cholerae* O1 El Tor. Sin embargo, esta bacteria no produce el LPS O1 y carece del antígeno O1.

2.2.3. El genoma de *Vibrio cholerae*

En el año 2000 se publicó la determinación y estudio de la secuencia genómica completa de *V. cholerae* El Tor (Heidelberg et al., 2000). El genoma consiste en dos cromosomas circulares de 2.961.146 pb (cromosoma 1) y 1.072.314 pb (cromosoma 2). Existe una acentuada irregularidad en la distribución de los genes conocidos entre ambos cromosomas.

La mayoría de los genes que codifican la replicación y reparación del ADN, transcripción, traducción, biosíntesis de la pared celular, y una variedad de vías catabólicas y biosíntesis, están codificados en el cromosoma 1. Además, la mayoría de los genes esenciales para la patogenicidad, como la toxina colérica, el pilus co-regulado con toxina, los lipolisacáridos y la maquinaria de secreción de proteínas extracelulares, además están localizados en el cromosoma 1.

En contraste, el cromosoma 2 contienen una gran parte de genes hipotéticos (ORFs) y genes de función desconocida (59%), en comparación con el cromosoma 1 (42%). Existen varios ORF con funciones aparentemente idénticas en ambos cromosomas que probablemente se adquirieron a través de transferencia lateral de genes.

La secuencia genómica confirma la presencia de un gran sistema de captura de genes, conocido como isla de integrones. Los casetes de este súper integrón aparentemente codifican funciones adaptativas y se ha evaluado una gran diversidad entre las cepas toxigénicas y no toxigénicas (Pang et al., 2007).

2.2.4. Ciclo de vida de *V. cholerae*

Se considera que *V. cholerae* posee un ciclo de vida dual, dado su doble carácter de patógeno humano y microorganismo ambiental. Al ingresar al humano, los vibriones inducen genes tempranos críticos para la colonización del intestino delgado. Luego de la colonización y proliferación, se inducen genes tardíos, que aumentan la capacidad de aclimatación en los estados posteriores de la infección y/o la transición al ambiente acuático. Una vez que *V. cholerae* es excretado las heces al

medio ambiente, puede tanto persistir por largos períodos de tiempo (Marrero et.al., 2014), como subsistir por un corto tiempo, hasta ser ingerido por un nuevo hospedero humano (Marrero et.al., 2014). Sin embargo, las señales ambientales y los sistemas reguladores modulan los procesos de adaptación.

V. cholerae es un microorganismo anaerobio facultativo, propiedad adquirida durante la evolución, debido a las ventajas adaptativas que ofrece en su ciclo de vida. Las concentraciones de oxígeno bajas son señales fisiológicas presentes en el tracto gastrointestinal humano (Marrero et.al., 2014). Cuando los vibriones ingresan al estómago, el duodeno y el yeyuno próximo; así como durante la colonización de la célula epitelial en las vellosidades del íleo, encuentran un ambiente microaerobio (Marrero et.al., 2014). En el lumen del íleo, al igual que en el intestino grueso, las bacterias hallan un ambiente anaerobio (Marrero et.al., 2014).

2.2.5. Patogenicidad, factores de virulencia de *V. cholerae*

El género *Vibrio* posee múltiples factores de virulencia que le confieren las características para infectar al humano (Thompson *et al.*, 2005). Los factores de virulencia son productos bacterianos o componentes estructurales que contribuyen a la virulencia o patogenicidad (Prescott *et al.*, 2002).

Tales genes asociados a la virulencia pueden constar de mecanismos de adhesión, movilidad, secreción de componentes líticos y la destreza de crecer deprisa en condiciones con bajos nutrientes (Thompson *et al.*, 2005). La identificación de los genes asociados a la virulencia provee claves fundamentales para la biología y evolución de un microorganismo, ayuda a comprender como un patógeno sobrevive adentro del huésped y causa agravo, por otra parte, proporciona información importante para el desarrollo de tratamiento de cura, diagnóstico y/o presencia de microorganismos de interés (Field *et al.*, 2004).

2.2.5.1. Adherencia

La adhesión bacteriana a la superficie de la mucosa intestinal del huésped es el primer acercamiento crucial en la patogénesis de las infecciones bacterianas a través de las interacciones y los receptores que se encuentran en la mucosa del huésped (Jackson et al., 1998).

2.2.5.1.1. Pili o fimbriae

La colonización en la envoltura de la mucosa generalmente depende de la producción de apéndices filamentosos en la superficie de las bacterias patógenas, estas estructuras son llamados pili o fimbriae, los cuales regularán la adherencia de la bacteria a los receptores específicos del hospedador.

El pili de la toxina co-regulada (TCP) es el único factor de colonización intestinal, probablemente regula la adhesión al contener adhesinas bacterianas, las cuales se unen a los receptores de la superficie de las células epiteliales intestinales. Además, contribuye al proceso de colonización e incrementa las interacciones célula a célula en la superficie de la mucosa. La proteína estructural de fimbria TCP esta codificada en el gen *tcpA*, que presenta alta variabilidad. Esta hipervariabilidad en la superficie de la bacteria le permite escapar del reconocimiento por el sistema del hospedero. Además, actúa como receptor para el fago *ctxA*, que contiene los genes para la síntesis de CT.

El TCP de *V. cholerae* es un pili de 20.5 kDa de la familia tipo IV, codificado por los genes *tcpA* (subunidad A), y la secuencia del N-terminal en extremo homóloga a la N-terminal de otras subunidades de pili de una gran variedad de bacilos patógenos.

2.2.5.2. Las hemaglutininas

Las hemaglutininas (HAs), tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos se conoce como la hemaglutinación, está correlacionada con la capacidad de adherencia en *V. cholerae* y *V.*

parahaemolyticus. Las HAs pueden admitir receptores específicos de unión en los hematíes de diferentes hospederos.

2.2.5.2.1. La proteasa de la membrana externa (OMP)

Es una hemaglutinina de la membrana externa no fimbrial, consiste de una cadena simple de polipéptidos de 39 kDa. Desempeñan un papel importante en la fisiología bacteriana, contribuyendo a su supervivencia tanto en el huésped como en el ambiente (Reidl et. al., 2002; Prouty et. al., 2006). En *Vibrio* se han detectado cuatro proteínas de membrana OmpW, OmpS, OmpU y OmpT. Donde OmpW muestran propiedades adhesivas y de resistencia a bilis, demostrando su importancia en la colonización de *V. cholerae* a células epiteliales. Se cree que la resistencia a la bilis se deba a las propiedades de permeabilidad de OmpW, debido a que produce poros de tamaño pequeño y pueden excluir selectivamente a los aniones tóxicos de la bilis de la célula, permitiendo así a la bacteria sobrevivir en el intestino (Wibbenmeyer et al., 2002).

2.2.5.3. Secreción de componentes líticos

Estas bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas.

2.2.5.3.1. Toxina tipo cólera (CT)

La toxina tipo cólera (CT) es una enterotoxina formada por una subunidad A y 5 subunidades B. Las subunidades B se unen a receptores específicos, el gangliósido G1, en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Después de la unión, la subunidad A es trasladada al citosol de la célula huésped, activando la enzima adenilciclase, la cual incrementa los niveles del monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico), originando una alteración en el transporte activo de los electrolitos, causando la excreción de iones cloro de las células intestinales y disminuyendo la absorción del complejo NaCl, dando por resultado un flujo de agua en el intestino

se produce la diarrea (Prescott *et al.*, 2002; Riemann *et al.*, 2006). La CT está codificada en el operón *ctxAB*, el cual se encuentra en el genoma del bacteriófago filamentosos CTX ϕ , el cual tiene un genoma de 6.9 kb y el gen *ctx* está localizado en el segmento 4.5 kb. Los genes implicados en la morfogénesis del bacteriófago CTX ϕ participa la proteína hipotética (*orfU*), *tcpA*, *zot*, *ace* y *pTLC*.

2.2.5.3.2. Toxina de la zónula occludens (ZOT)

La toxina de la zónula occludens (*zot*) aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal afecta las uniones intracelulares. El gen que codifica una proteína para el ensamblaje del virión de la toxina de zónula occludens, está localizado seguidamente de *ctx* en la región de 4.5 kb. La secuencia de aminoácidos de la proteína *zot* no muestra ninguna homología con otras toxinas bacterianas. El *zot* de *V. cholerae* se encuentra localizada en la membrana externa, la cual tiene una estructura modular, donde la región N-terminal (33 kDa) permanece asociada a la membrana bacteriana y el fragmento con la C-terminal (12 kDa) es secretado extracelularmente, su mecanismo de acción causa la separación en las uniones estrechas del epitelio, además, puede causar diarrea por pérdida de agua y electrolitos dentro del lumen bajo la fuerza de presión hidrostática.

2.2.5.3.3. Enterotoxina accesoria del cólera (Ace)

La enterotoxina accesoria del cólera (*Ace*) es hidrofóbica, codificada por el gen *ace* de *V. cholerae*. Su mecanismo de acción es capaz de inducir la acumulación de líquidos, causando el movimiento de electrolitos e incrementando el diferencial del potencial (PD) lo que da inicio a la diarrea. Así mismo, existe semejanza entre *ace* y la familia de transporte de iones ATPasas. El gen *ace* está localizado inmediatamente del gen *zot* (Trucksis *et al.*, 1993).

2.2.5.3.4. Enterotoxinas

Se ha detectado que *V. cholerae* no-O1/no-O139 al igual que *V. cholerae* O1 (no muy frecuente) pueden producir un enterotoxina termoestable de 17 aminoácidos está muy relacionada con la toxina termoestable producida por *Escherichia coli*, la cual al asociarse a su receptor en la células de la superficie del intestino, de la familia de los guanilato ciclasa unidos a la membrana, incrementa los niveles intracelulares de monofosfato de guanidina cíclico (GMP cíclico), los cuales activan dos proteínas cinasas (cinasa G y cinasa A). su mecanismo de acción es inducir la fosforilación del canal del ion cloruro, provocando flujo de salida de electrolitos (cloro y agua) (Ghosh *et al.*, 1998). Los genes de la enterotoxina termoestable (ST) codificada por el gen *stn*, asimismo producen otra toxina termoestable muy semejante (ST) codificada por el gen *sto* (Vicente *et al.*, 1997). Los genes que codifican la enterotoxina termoestable producido generalmente por *V. cholerae* no-O1/no-O139 y en algunos casos por *V. cholerae* O1, están flanqueados por repeticiones directas de 123pb, lo que sugiere que esta toxina ha sido introducida dentro de *V. cholerae* por medio de un transposón. La virulencia de *V. cholerae* no-O1/no-O139 depende de la habilidad de colonizar el intestino y la producción del gen *stn/sto*.

2.2.5.3.5. Toxinas RTX:

La superfamilia de la toxina RTX es un conjunto de citosinas, hemolisinas y leucotoxinas producidas por el género *Vibrio*. Pertenece a una clase de toxinas MARTX (Chow *et. al.*, 2001). El gen *martx* codifica seis proteínas: la citoxina MARTX o proteína activadora de la toxina A (RtxA) (Figura 3), una aciltransferasa o proteína activadora de la toxina C (RtxC) (Figura 3), una proteína de fusión de membrana (RtxD), un sistema de transportadores ABC (RtxB y RtxE), este grupo de genes esta físicamente ligada a elemento CTX del genoma de *V. cholerae*, pero su actividad es independiente. Su mecanismo de acción causa la desintegración del citoesqueleto de actina en las células huésped a través de la

alteración de G-actina y la destrucción de Rho GTPasas (Welch et.al., 2001). Además, puede contribuir a la reactogenicidad de algunas cepas de *V. cholerae* usada en vacunas.

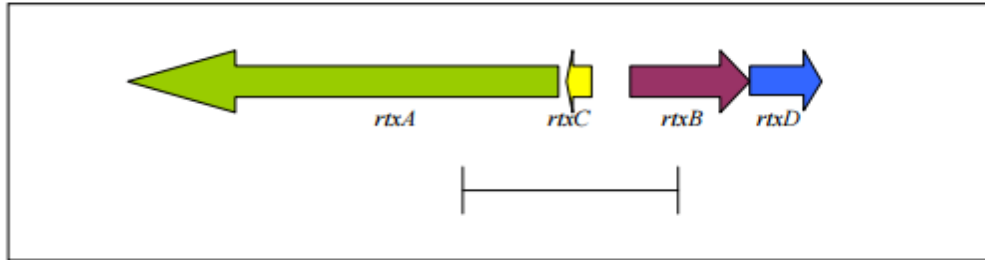


Figura 3. Representación esquemática de la organización grupo de genes de la toxina RTX en *V. cholerae*. Los marcos de lectura abierta se muestran como flechas que corresponden a la dirección de transcripción. La barra representa la eliminación se encuentra en biotipo clásico (Raskin et. al., 2004).

2.2.5.4. Sistemas de secreción

Todas las bacterias poseen mecanismos para exportar las proteínas que producen, siendo un paso de vital importancia para aquellas que están en contacto con las bacterias patógenas. Existen diferentes mecanismos por los cuales, las bacterias patógenas secretan proteínas al ambiente extracelular o al interior del citosol de la célula huésped (Wilson et. al., 2006). Se ha distinguido que *V. cholerae* presenta el sistema de secreción tipo III, el cual secreta a las proteínas al ambiente extracelular o al interior de las células huésped, a través de proteínas de la membrana interna y externa, proteínas del espacio del periplasma y componentes que se extienden hacia afuera de la superficie celular como una estructura de aguja, el cual inyecta las proteínas efectoras (factores de virulencia) al interior de la célula huésped evadiendo así la respuesta inmune y

promoviendo su patogenicidad (Wilson et. al., 2006; Alam *et al.*, 2011).

2.2.5.5. Cascada regulatoria

2.2.5.5.1. ToxR:

La regulación y expresión de genes para el crecimiento y sobrevivencia depende de la proteína reguladora ToxR, coordinadamente regulada por un mecanismo que envuelve 3 componentes conocidos: ToxR, ToxS y ToxT. La proteína ToxR, una proteína transmembrana de 32 kDa, es el regulador máster y su expresión depende de condiciones de crecimiento ambientales (temperatura de incubación, pH, osmolaridad, sales biliares, tensión de oxígeno, presión hidrostática y composición de aminoácidos del medio). En *V. cholerae* la expresión de los genes de virulencia está coordinada bajo el control de la proteína ToxR, la cual, activa 17 genes de virulencia. ToxR es una proteína transmembranal que se une y activa al promotor del operón que codifica a la toxina del cólera. Además, ToxR controla la transcripción de ToxT, cuyo producto es responsable directo de la activación de variados genes de virulencia bajo el control de ToxR (DiRita *et al.*, 1991). El gen *toxR* es responsable de regular la virulencia en la expresión de los genes de *V. cholerae*. Así mismo, codifica un activador transcripcional que controla producción de la del cólera (CT), la biogénesis TCP de la pilus corregulador de toxina (*tcpA*) y a los genes *acf*, entre otros (Chaparro *et al.*, 2010). Este gen está bien distribuido en cepas de *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139 y *V. cholerae* no-O1/no-O139 por lo que lo convierte en un excelente marcador de referencia para *V. cholerae*.

2.2.5.6. Hemolisinas

Las hemolisinas son exotoxinas que actúan sobre la membrana de los hematíes causando la ruptura de la célula donde la hemoglobina o los iones son liberados (Zhang et. al., 2005). Las

hemolisinas son probablemente las toxinas más frecuentes entre las especies patógenas del género *Vibrio*. La expresión de las hemolisinas en algunos *Vibrios* es regulada por las condiciones de accesibilidad de hierro en el interior del hospedador durante la infección. La acción de la hemolisina no solo se limita a los eritrocitos, asimismo afectan a varios tipos de células leucocitaria, incrementando así su virulencia.

2.2.5.6.1. Alfa-hemolisina (HlyA):

Es la toxina más ampliamente distribuida de *Vibrios* patógenos. La alfa-hemolisina enterotoxigénica (HlyA) de *V. cholerae* es codificada por el gen *HlyA* (Figura 4). Causa diversos efectos citotóxicos, secreta la toxina citolítica produce vacualización e incremento de lisis celular o apoptosis en hematíes y en otras células del epitelio intestinal, contribuye a la patogenicidad de *V. cholerae* (Zhang et. al., 2005).

2.2.5.6.2. Proteína de secreción de hemolisina (Hly B):

La proteína de secreción de hemolisina (HlyB) de *V. cholerae* es codificada por el gen *HlyB* (Figura 4). Es un transductor quimiotáctico, su función es supervisar el estado de los nutrientes del medio ambiente en las bacterias.

2.2.5.6.3. La lipasa lactonizante (Hly C):

La lipasa lactonizante (HlyC) de *V. cholerae* es codificada por el gen *hlyC*, una proteína de 30 kDa o 33 kDa (Figura 4). La lipasa puede actuar sobre las células para la destrucción del sistema inmune del huésped hidrolizar la membrana lipídica y ácidos grasos. Ayuda en la ruptura de la capa de moco que protege el epitelio intestinal, aumentando entonces la capacidad colonizadora.

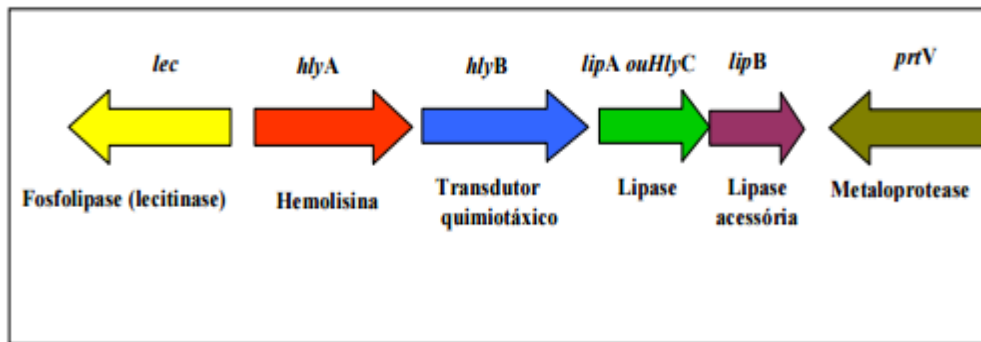


Figura 4. Representación esquemática de la organización genética del locus Hly (~ 8,2 kb) en *V. cholerae*. Los marcos de lectura abierta se muestran como flechas que corresponden a la dirección de la transcripción (Raskin et. al., 2004).

2.2.5.7. Supervivencia y resistencia

Para que una bacteria exprese sus factores de virulencia, es indispensable que tenga la habilidad de sobrevivir las condiciones adversas a las que se enfrenta, como es la evasión de las defensas del hospedero, la habilidad de obtener nutrientes, así como la capacidad de sobrevivir bajo condiciones inhibitorias.

Las bacterias que producen infecciones sistémicas extracelulares usualmente poseen una cápsula polisacárido en su superficie celular, la cual, incrementa su supervivencia al exponer o enmascarar sus estructuras superficiales hidrofóbicas necesarias para la adherencia durante la colonización, o bien, protegen a la bacteria contra las defensas del huésped, como los macrófagos, fagos.

2.2.5.7.1. Proteína de replicación de fago Cri (pTcI)

La proteína de replicación de fagos Cri (pTcI) es una proteasa necesaria para la secreción de la toxina colérica (CT) y para el acoplamiento de un apéndice extracelular llamado hemaglutinina manosa-sensible (MSHA). Esta hemaglutinina no es un factor de virulencia, no obstante, está implicada en la aparición de biofilms, característica que se ha observado

recientemente en ambientes acuáticos, pues facilitaría la supervivencia de la bacteria.

2.2.5.7.2. Alanina aminopeptidasa (WASA 1)

La inserción del fago de 50 kb integrado en el gen alanina aminopeptidasa ha sido denominado WASA-1. Es un distinguido marcador del clon epidémico de América Latina (Garza et al., 2012). El profago desoxirribonucleósido quinasa (WASA-1a) y el profago RNA polimerasa (WASA-1c) exclusivos de las cepas del oeste africano y sudamericana.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales, equipos y reactivos:

- Las cepas de *V. cholerae* fueron re-aislados de muestras clínicas y ambientales de 1991 al 2016 de la colección del cepario de investigación del Instituto Nacional de Salud (INS)-Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos (LRNE)
- Se utilizaron los siguientes equipos:

- ✓ Balanza analítica.
 - ✓ Estufa de 37° C.
 - ✓ Vórtex.
 - ✓ Autoclave.
 - ✓ Termociclador PCR.
 - ✓ Refrigeradora.
 - ✓ Baño María.
 - ✓ Mechero de Bunsen.
- Se usaron los siguientes materiales:
 - ✓ Placas Petri.
 - ✓ Asa bacteriológica.
 - ✓ Tubo de ensayo (16x150 – 8x75 – 13x100).
 - ✓ Pipetas de vidrio (1ml – 5ml – 10ml).
 - ✓ Matraz de Erlenmeyer (50ml – 250ml – 500ml).
 - ✓ Tips autoclavables y estériles.
 - ✓ Eppendorf de 0.5ml y 1.5ml estériles.
 - Se prepararon los siguientes medios (Anexo 1):
 - ✓ Medio agar cromógeno para *Vibrio* (agar CHROM *Vibrio*).
 - ✓ Medio Agar Soya Trypticasa con 1% de cloruro de sodio (agar TSA al 1% de NaCl).
 - ✓ Medio caldo Trypticasa de soya con 1% de cloruro de sodio (caldo TSB 1% de NaCl).
 - ✓ Medio agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (agar TCBS).
 - ✓ Medio de Enriquecimiento agua peptonada alcalina al 1% de cloruro de sodio (APA al 1% NaCl).
 - ✓ Medio agar-hierro-triple azúcar al 1% de cloruro de sodio (agar TSI al 1% de NaCl).
 - ✓ Medio agar lisina hierro al 1% de cloruro de sodio (agar LIA al 1% de NaCl), caldo glicerol al 1% de NaCl.
 - Se emplearon los siguientes reactivos:
 - ✓ Buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X.
 - ✓ Solución Salina estéril (0,85%).
 - ✓ Reactivo de Oxidasa.

- ✓ Agua destilada estéril.
- ✓ Reactivo dexosicolato de sodio al 0.5%.
- ✓ Alcohol de 70%.
- ✓ Alcohol de 96%.
- ✓ Kit de extracción de DNA de cultivos bacterianos de Qiagen.
- ✓ Kit PCR convencional de Invitrogen.
- ✓ Primers de *V. cholerae*.

3.1.1. **Recolección y manipulación de muestras**

3.1.2. **Caracterización microbiológica:**

De 700 cepas de *V. cholerae* se reactivaron un total de 88 cepas, de la cuales 74 cepas fueron del serotipo O1 y 14 cepas fueron del serotipo no-O1/no-O139. Las 84 cepas fueron aisladas de muestras clínicas y 4 cepas fueron aisladas de muestras ambientales de diferentes departamentos de Perú en el período epidémico (1991-2002) y post epidémico (2003-2016), como se observa en la Tabla 1 y Figura 5. Todas las cepas provenían parte de la colección del cepario de investigación de *V. cholerae* del LRNE-INS.

Se usaron controles positivos como *V. cholerae* O1 ATTC 14033 y *Vibrio cholerae* O139 y los controles negativos como *Salmonella infantis* y *Vibrio parahaemolyticus*.



Figura 5 Distribución geográfica de los aislamientos de cepas *V. cholerae* O1 y no-O1/no-O139. Las cepas O1 provienen de Lima, Callao, Cusco, Ayacucho, Cajamarca, Lambayeque, Piura, Ancash, Loreto Madre de Dios, Puno y Moquegua presentadas en estrellas de color rojo se indica en el mapa del Perú. Las cepas no-O1/no-O139 provienen de Lima, Callao, Ayacucho y Lambayeque presentadas en estrellas de color negro se indica en el mapa del Perú.

Tabla 1. Cepas clínicas y ambientales de *V. cholerae* aisladas en periodo epidémico y post epidémico en Perú.

		Durante la epidemia	Posterior de la epidemia	Total
Total de cepas		78	10	88
Fuentes clínicas	Coprocultivos / heces.	67	6	73
	Hisopado rectal	10	1	11
Fuentes ambientales	Agua de grifo	1	0	1
	Agua de acequia	0	1	1
	Agua de rio	0	2	2
Departamentos de procedencia	Lima	47	6	53
	Ancash	3	0	3
	Ayacucho	5	0	5
	Cajamarca	1	0	1
	Callao	1	2	3
	Cusco	2	0	2
	Lambayeque	4	2	6
	Loreto	10	0	10
	Madre de Dios	2	0	2
	Moquegua	1	0	1
	Piura	1	0	1
Puno	1	0	1	

Estas 88 cepas se incubaron en caldo APA 1% para su enriquecimiento, por 6 horas a 37°C. Luego se sembraron en agar CHROM-*Vibrio* y agar TCBS para ser identificadas fenotípicamente, estas placas se incubaron por 24 horas a 37 °C (OMS et. al., 2002).

Se inocular una colonia aislada del TCBS- agar ó CHROM-agar *Vibrio* en el medio TSI al 1% de NaCl y en el medio LIA al 1% de NaCl, se realiza una estriada y puntura e incubándose por 24 horas a 37 °C.

Del agar TCBS ó del agar TSI al 1% de NaCl se resiembra en agar TSA a 24 horas a 37°C para realizar las demás pruebas complementarias, finalmente se realiza crioconservación en el cepario de LRN Enteropatógenos. (Anexo 3).

3.1.2.1. Pruebas complementarias:

Para la prueba de la oxidasa es mediante de colonias obtenidas y aisladas en agar TSA. Se colocan dos gotas del reactivo de oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina al 1%) sobre un pedazo de papel filtro en una caja de Petri. Se extiende el cultivo sobre el papel filtro humedecido con un mondadientes estéril (OMS et. al., 2002).

La prueba del hilo (desoxicolato) se realiza en un portaobjetos o en una placa Petri de plástico, se agrega una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5% y se suspenden una colonia del agar TSA de 24 horas (OMS et. al., 2002).

3.1.2.2. Serología:

Para el análisis serológico, se toma las colonias del agar TSA de 24 horas, se someten a la prueba de aglutinación con antisuero polivalente O1. Los aislamientos que no aglutinen con el antisuero polivalente al serogrupo O1 se probaran con el antisuero O139, si la reacción con el antisuero O1 ó O139 es positiva, se identificará como presuntiva *Vibrio cholerae* O1 ó O139. Posteriormente el *Vibrio cholerae* O1 positivo se someterá a confirmación mediante aglutinación con antisueros monovalentes o antisueros Ogawa o Inaba o Hikojima (OMS et. al., 2002). Si no aglutina, se identificará como *V. cholerae* no-O1/no-O139.

3.1.3. Caracterización molecular

3.1.3.1. Extracción de DNA

Para la extracción del DNA cromosómico de las 88 cepas de *Vibrio cholerae* se realizó el siguiente procedimiento: a partir del agar TCBS se tomó una colonia y se cultivó en agar TSA 1% por 18 a 24 horas de incubación de 37°C. Se toma 3-4 colonias a partir de un aislamiento en una placa de agar TSA se inocularon en caldo TSB 1% de NaCl se incubó a 37° por 16-18 horas. Posteriormente, se alícuota 1,5 ml del caldo TSB 1% al eppendorf estéril, se sometió a extracción de DNA utilizando un kit comercialmente disponible

(DNA easy Blood & Tissue Kit, Qiagen) estandarizado por el laboratorio de Enteropatógenos (Anexo 4).

3.1.3.2. Cuantificación

Se tomó 1 µl de muestra de DNA de *Vibrio cholerae* transferido al lector del nanodrop, medir la densidad óptica (OD) a 260nm. Para analizar la pureza de la muestra para obtener la concentración adecuada, tomar una segunda lectura a 280 nm. Determinar la relación de OD a 260nm / 280 nm. Si ésta es aproximadamente 2 (de 1,6 a 2) la absorción es mayoritariamente debida a ácidos nucleicos.

3.1.3.3. Amplificación de secuencias específicas y genes de virulencia de los de *Vibrio cholerae* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los genes estudiados se observan en la tabla 2. Los protocolos utilizados en este estudio están basados del estudio de la “Diversidad genética aislados ambientales de la Amazonia Brasileira” por Morais et.al., 2009, Compostela, Instituto Nacional de Neoplásicas (INEN) y otros prototipos modificados por LNRE.

Los parámetros de las reacciones de amplificación por PCR se componen de agua ultra pura molecular estéril, 2.5 µl del tampón de reacción 10X, 1.5 µl de 50 mM MgCl₂, 2.5 µl de 10 mM dNTP, 250 ng o 10 µM de cada cebador estudiado (Tabla 3), 0.3 µl de 5 U/µl Taq DNA polimerasa y 3µL de DNA de *Vibrio cholerae*. Las condiciones óptimas de la mezcla se representan en la tabla 3.

3.1.3.4. Visualización de productos de PCR

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2 %, con regulador TAE 1X. El marcador de tamaño molecular empleado es de 100pb (Sigma). La corrida electroforética es de voltaje constante (100 V). Los patrones de bandas generados se visualizaron en un transiluminador de luz UV, usando bromuro de etidio como revelador y las imágenes generadas es almacenada en una computadora.

Tabla 2. Genes utilizados en el estudio.

Ref.	Genes	Abrev	Primers	Taq Locus	Locación secuencia
O1/O139 Multiplex- PCR (Lipp et al., 2003)	<i>V. cholerae</i> O1 (lps)	VCO1	VCO1-F2 VCO1-R2	lps	cds
	<i>V. cholerae</i> O139 (lps)	VCO139	VCO139-F2 VCO139-R2	lps	cds
Multiplex- PCR (Lipp et al., 2003)	16S-23SrRNA (Especie <i>V. cholerae</i>)	Vc-m	pVC-F2 pVC-mR1	16S-23SrRNA	cds
	Factor de colonización	tcpA El Tor	TCP 72F TCP 477R	VC0828	Cromosoma I; NC_002505.1
(Thompson et al., 2001)	Proteína de la membrana externa	ompW	ompW F ompW R	VC0633	Cromosoma I; NC_002505.1.
Multiplex- PCR (Morais et al., 2013)	Fago desoxirribonucleósido quinasa	wasa-1a	WASA1aF WASA1aR	O3Y_07005	IEC224 (NC_016944.1)
	Fago RNA polimerasa	wasa-1c	WASA1cF WASA1cR	O3Y_07235	IEC224 (NC_016944.1)
(Morais et al., 2013)	Enterotoxina del cólera subunidad AB	ctxAB	ctxAB-F ctxAB-R	VC1456-VC1457	Cromosoma I; NC_002505.1
(Morais et al., 2013)	La toxina zónula occludens	zot	zot-F zot-R	VC1458	Cromosoma I ; NC_002505.1.
(Morais et al., 2013)	Enterotoxina del cólera accesorio	ace	ace-F ace-R	VC1459	Cromosoma: I ; NC_002505.1
(Thompson et al., 2001)	Proteína hipotética	orfU	orfU-F orfU-R	VC1460	Cromosoma I ; NC_002505.1.
(Morais et al., 2013)	Proteína activadora de la toxina A	rtxA	rtx A-F rtx A-R	VC1451	Cromosoma I, NC_002505.1
(Morais et al., 2013)	Proteína activadora de la toxina C	rtxC	rtx C-F rtx C-R	VC1450	Cromosoma I; NC_002505.1
(Thompson et al., 2001)	La toxina del cólera activador transcripcional	toxR	toxR-F toxR-R	VC0984	Cromosoma I ; NC_002505.1
(Morais et al., 2013)	Proteína de replicación de fagos Cri	ptcI	pTLC -F pTLC -R	VC1469	Cromosoma I ; NC_002505.1
(Morais et al., 2013)	Enterotoxina termoestable	stn/sto	stn/sto-F stn/sto-R	M85198.1	M85198.1
(Morais et al., 2013)	Hemolisina	hlyA	hlyA-F hlyA-R	VCA0219	Cromosoma: II ; NC_002506.1
(Morais et al., 2013)	Proteína de secreción de hemolisina	hlyB	hlyB-F hlyB-R	VCA0220	Cromosoma II ; NC_002506.1
(Morais et al., 2013)	Lipasa lactonizante	hlyC	hlyC-F hlyC-R	VCA0221	Cromosoma: II ; NC_002506.1

Tabla 3. Secuencia de los cebadores y las condiciones de reacciones de amplificación de PCR utilizadas en el presente trabajo

Primers	Secuencia	Peso	Stock (µM)	X (µl)	Activación	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Elongación	Ciclo
VCO1-F2	3' CAACAGAATAGACTCAAGAA 5'	647pb	10	2.5	94°C /02min	94°C /1 min	55°C /01 min	72°C /02 min	72°C /10 min	30
VCO1-R2	5' TATCTTCTGATACTTTTCTAC 3'									
VCO139-F2	3' TTACCAGTCTACATTGCC 5'	741pb	10	2.5	94°C /02min	94°C /1 min	55°C /01 min	72°C /02 min	72°C /10 min	30
VCO139-R2	5' CGTTTCGGTAGTTTTTCTGG 3'									
pVC-F2	3' TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG 5'	300 pb	10	2	94°C /02min	94°C /45 seg	60°C /45seg	72°C /45 seg	72°C /10 min	30
pVC-mR1	5' AGTCACTTAACCATAACAACCCG 3'									
ompW F	3' CAC CAA GAA GGT GAC TTT ATT GTG'5	304 pb	20	1.25	94°C/05min	94°C/30 seg	60°C/30seg	72°C/60 seg	72°C/7 min	30
ompW R	5'GGT TTG TCG AAT TAG CTT CAC C 3'									
ctxAB-F	3'CGGGCAGATTCTAGACCTCCT'5	982 pb	20	1.6	94°C/05min	94°C /30 seg	60°C /30seg	72°C /60 seg	72°C /7 min	30
ctxAB-R	5'CGATGATCTTGGAGCATTCCCA 3'									
ctxA-F	3'CGGGCAGATTCTAGACCTCCT'5	564 pb	20	1.6	94°C/05min	94°C /30 seg	60°C /30seg	72°C /60 seg	72°C /7 min	30
ctxA-R	5'CGATGATCTTGGAGCATTCCCA 3'									
TCP 72F	3' CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG 3'	451 pb	10	2.5	94°C /05min	94°C /30 seg	60°C /30seg	72°C /60 seg	72°C /7 min	30
TCP 477R	5' CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG 3'									
WASA1aF	3'CTTCCGGCGTCATTGGGCGT 5'	853pb	10	1.5	94°C /05min	94°C /30 seg	60°C /30seg	72°C /1 min	72°C /3 min	35
WASA1aR	5'CGGTGTAGCGGGTGACGTGG 3'									
WASA1cF	3'CCGCTTGAATCAACCACGGTCACA 5'	486 pb	10	1.5	94°C /05min	94°C /30 seg	60°C /30seg	72°C /1 min	72°C /3 min	35
WASA1cR	5'CGAGGGAAACATTGGGGCGGG 3'									
ace-F	3'TAAGGATGTGCTTATGATGGACACCC 5'	314 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	53°C /30seg	72°C /30 seg	72°C /3 min	35
ace-R	5'GGTGATGAATAAAGATACTCATAGG 3'									

zot-F	3'TAAACCTTGAACGCATAG 5'	840 pb	10	0.6	94°C /05min	94°C /30 seg	47°C /30seg	72°C /30 seg	72°C /3 min	35
zot-R	5'CGCCCATAGACCACGATA 3'									
orfU-F	3'GCTGCATTTATCCTTATTGCC 5'	770 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	55°C /30seg	72°C /01 min	72°C /3 min	35
orfU-R	5'TGTAACCAAACGCCTCGAC 3'									
rtx A-F	3'CTGAATATGAGTGGGTGACTTACG 5'	417 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	56°C /30seg	72°C /01 min	72°C /3 min	30
rtx A-R	5'GTGTATTGTTTCGATATCCGCTACG 3'									
rtx C-F	3'CGACGAAGATCATTGACGAC 5'	263 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	56°C /30seg	72°C /30 seg	72°C /3 min	30
rtx C-R	5'CATCGTCGTTATGTGGTTGC 3'									
hly A-F	3'GAGCGTAATGCGAAGAATGC 5'	604 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	53°C /30seg	72°C /01 min	72°C /3 min	35
hly A-R	5'GAGTCAGTTTTTGGTTACAGG 3'									
hly B-F	3'CAAGCCTTCGCCAATAAC 5'	622 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	54°C /30seg	72°C /01 min	72°C /3 min	35
hly B-R	5'CCACTTTTTTCCCTTCACC 3'									
hlyC-F	3'AAATCCGCCACTTCTCTTC 5'	653 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	54°C /30seg	72°C /01 min	72°C /3 min	35
hlyC-R	5'AATCAAAGCCACCAAGCC 3'									
toxR-F	3'TCGGATTAGGACACAAC 5'	560 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	50°C /30seg	72°C /01 min	72°C /3 min	35
toxR-R	5'CTGCGAGGGGAAGTAAGAC 3'									
pTLC -F	3'CTACGCCAGACCATCAAACAG 5'	699 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	56°C /30seg	72°C /01 min	72°C /3 min	35
pTLC -R	5'CACCCTCACTCAGGTTTTGC 3'									
stn/sto-F	3'GAGAAACCTATTCATTGCA 5'	216 pb	10	1.6	94°C /05min	94°C /30 seg	48°C /30seg	72°C /30 seg	72°C /3 min	35
stn/sto-R	5'GCAAGCTGGATTGCAAC 3'									

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización fenotípica

4.1.1. Tipificación microbiológica y serológica

En este estudio se analizaron 88 cepas de *V. cholerae*, los cuales habían sido identificados previamente mediante pruebas microbiológicas y serológicas, confirmadas como *V. cholerae* (por LANARE). Estos re-aislados fueron obtenidos de 84 muestras clínicas y 4 muestras ambientales, desde 1991 al 2016, en Perú. El departamento predominante fue Lima seguido del departamento de Loreto por presentar mayor frecuencia de cepas de *V. cholerae* O1 que no-O1/no-O139 (Tabla 4).

En el análisis microbiológico, los resultados mostraron una incidencia altamente hipotética del género *Vibrio*, porque todas las cepas crecieron en agar-CHROM *Vibrio*, sus colonias fueron turquesas (cromógeno); en agar TCBS, sus colonias fueron amarillas (sacarosa positiva); en agar TSI al 1% NaCl fueron A/A⁻, en agar LIA al 1% NaCl fueron K/K⁺, en la prueba de la oxidasa fueron positivos y en la prueba de la cuerda fueron positivos (Anexo 2).

Para el estudio serológico, los resultados mostraron existencia de dos serogrupos, los cuales las 74 cepas mostró aglutinación con el antígeno termoestable O del liposacárido (LPS) pertenecientes al serogrupo O1. De las cuales 31 cepas del serogrupo O1 fueron del serotipo Inaba y 41 cepas del serogrupo O1 fueron serotipo Ogawa. Además, las 02 cepas de fase rugosa fueron confirmadas como *V. cholerae* serogrupo O1 por PCR, utilizando 02 iniciadores específicos de serogrupo (VCO1 y VCO139) y 02 marcadores de especie (Tabla 4). Singularmente, en las 14 cepas no existió reacciones antigénicas de ninguna de O1 y Bengal O139, se le denomina serogrupo de *V. cholerae* no-O1/ no-O139 (NAG).

Tabla 4. Tipificación de las 88 cepas de *V. cholerae* mediante serología y PCR.

Período	Codificación	Serología				Total	PCR			
		O1		Fase rugosa	no-O1/ no-O139		VCO1	VCO139	no-VCO1/ no - VCO139	VCO139
		Inaba	Ogawa							
Epidémico	LIMA	22	20	1	4	47 ^C	43	0	4	
	PIURA	1	0	0	0	1 ^C	1	0	0	
	PUNO	1	0	0	0	1 ^C	1	0	0	
	AYACUCHO	2	2	0	1	5 ^C	4	0	1	
	LORETO	1	9	0	0	10 ^C	10	0	0	
	CUSCO	2	0	0	0	2 ^C	2	0	0	
	CALLAO	0	0	1	0	1 ^C	1	0	0	
	LAMBAYEQUE	1	3	0	0	4 ^C	4	0	0	
	MADRE DE DIOS	0	2	0	0	2 ^C	2	0	0	
	ANCASH	0	3	0	0	3 ^C	3	0	0	
	MOQUEGUA	0	1	0	0	1 ^A	1	0	0	
	CAJAMARCA	0	1	0	0	1 ^C	1	0	0	
	Post epidémico	LIMA	1	0	0	5	6 ^C	1	0	5
		LAMBAYEQUE	0	0	0	2	2 ^{C/A}	0	0	2
CALLAO		0	0	0	2	2 ^A	0	0	2	

Nota: Las cepas proviene de aislamientos de muestra ambiental (A) y muestra clínico (C).

4.2. Caracterización genotípica

4.2.1. Caracterización molecular por PCR

Se cuantificaron todas las cepas, las concentraciones de ADN fueron entre 55.5 ng/uL a 175.6 ng/uL, se utilizaron para las amplificaciones de las reacciones de PCR.

Para el estudio de confirmación de *V. cholerae* se utilizó un marcador de especie *V. cholerae* (VC), tiene un peso molecular 300 pb, se evidencio en todos los re-aislados de las 88 cepas de *V. cholerae* (Fig. 7).

Para el estudio de serotipos de *V. cholerae*, se utilizaron 01 marcador de serogrupo VCO1, tiene un peso molecular de 647 pb, se evidencio en las 74 cepas (Figura 6).

Se realizó el análisis molecular multilocus por amplificación por PCR, el cual se fundamenta en las amplificaciones de las regiones de los genes implicados a la morfogénesis del bacteriófago filamentoso lisogénico CTX ϕ , otros genes que están relacionados con los fenotipos de virulencia, toxinas desconocidas, integración genómica de los elementos relacionados con la virulencia de las cepas *V. cholerae*. Tales como los genes codificadores de la toxina del cólera, ctxA y ctxB forman un operón ctxAB tiene un peso molecular de 982 pb, el gen zot (enterotoxina) tiene un peso molecular de 840pb, el gen ace tiene un peso molecular de 314pb, el gen orfU tiene un peso molecular de 770pb, el gen pTLC tiene un peso molecular de 699pb, el gen ompW tiene un peso molecular de 304 pb. Los genes de la isla de patogenicidad VSP-1 son el gen tcpA tiene un peso molecular de 451pb (receptor del bacteriófago CTX ϕ), y el gen toxR tiene un peso molecular de 560pb (regula la expresión de ctxAB y TCP), y otras toxinas desconocidas, entre ellas destaca la toxina RTX conformada por el gen rtxA tiene un peso molecular de 417pb, y el gen rtxC tiene un peso molecular de 263pb, los cuales son codificadas por un elemento genético situado muy cerca del lugar de inserción del genoma CTX ϕ , y las hemolisinas HLY (exotoxinas) como el gen hlyA tiene un peso molecular de 604 pb, el gen hly tiene un peso molecular de 622pb y el gen hlyC tiene un peso molecular de 653pb. La toxina termoestable ST (stn / sto) es exclusivo de *V. cholerae* no-O1/no-O139, y la inserción del fago WASA-1 (marcador distinguido del clon epidémico latinoamericano) consta del gen wasa1a tiene un peso molecular de 853 pb, y el gen wasa 1c tiene un peso molecular de 486 pb, exclusivamente de las cepas sudamericanas. Las amplificaciones de estas regiones se observan en las Figuras 8 al 12.

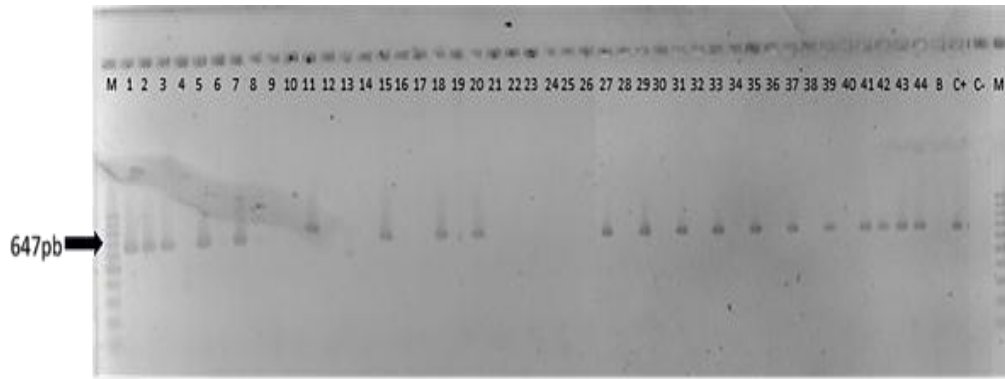


Figura 6. Esquema de la electroforesis de agarosa 2%. Amplicones obtenidos para el gen VCO1 en cepas de *V. cholerae*. Primer para un amplicón de 647pb. M: marcador de 100 pb; carriles 1 (4.148-99), 2 (2.177-99), 3 (259-99), 5 (2.509-03), 7 (1.457-10), 15 (1.074-94), 18 (1.094-94), 20 (2.232-94), 27 (3.226-95), 29 (1.2050-98), 31 (2.2432-98), 33 (2.2435-98), 35 (1.356-92), 37 (1.177-91), 39 (1.180-91), 41 (1.236-91), 42 y 43 (1.258-93), 44 (1.1300-91) cepas de *V. cholerae* serogrupo O1 excepto el carril 11 (1.124-93) cepa de *V.cholerae* O139; patrón positivo *V. cholerae* O1 ATCC 14033 (C+); patrón negativo *S. infantis* (C-).

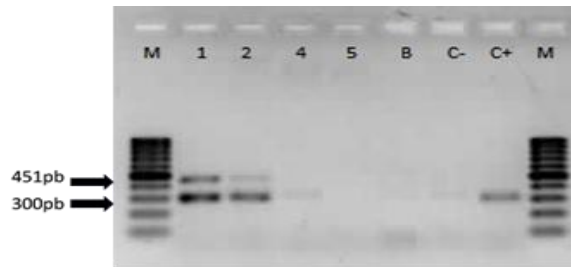


Figura 7. Esquema de la electroforesis de agarosa 2%. Amplicones obtenidos para el gen *vc* y *tcpA* en cepas de *V. cholerae*. Primers para un amplicón de 300pb (*vc*) y 451pb (*tcpA*). M: marcador de 100 pb; carriles 1 (1.0356-00), 2 (2.008-03), 3 y 4 (2.027-03) 5 (1.024-07) cepas aisladas de *V. cholerae* serogrupo noO1 noO139; patrón positivo *V. cholerae* O1 ATCC 14033 (C+); patrón negativo *S. infantis* (C-).

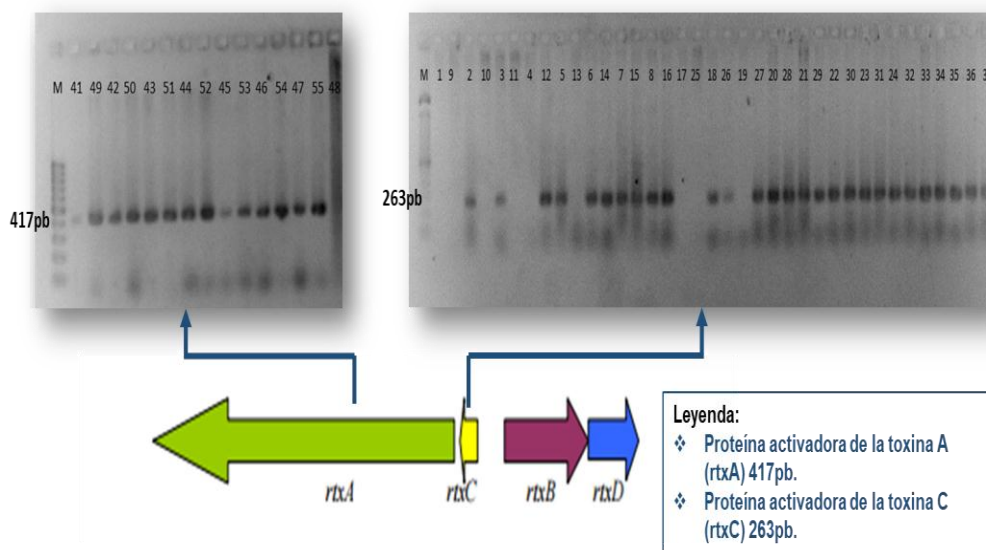


Figura 8. Diagrama general del mapeo por PCR de los genes de RTX (*rtxA* y *rtxC*) en cepas de *V. cholerae*, muestran las regiones que fueron amplificadas.

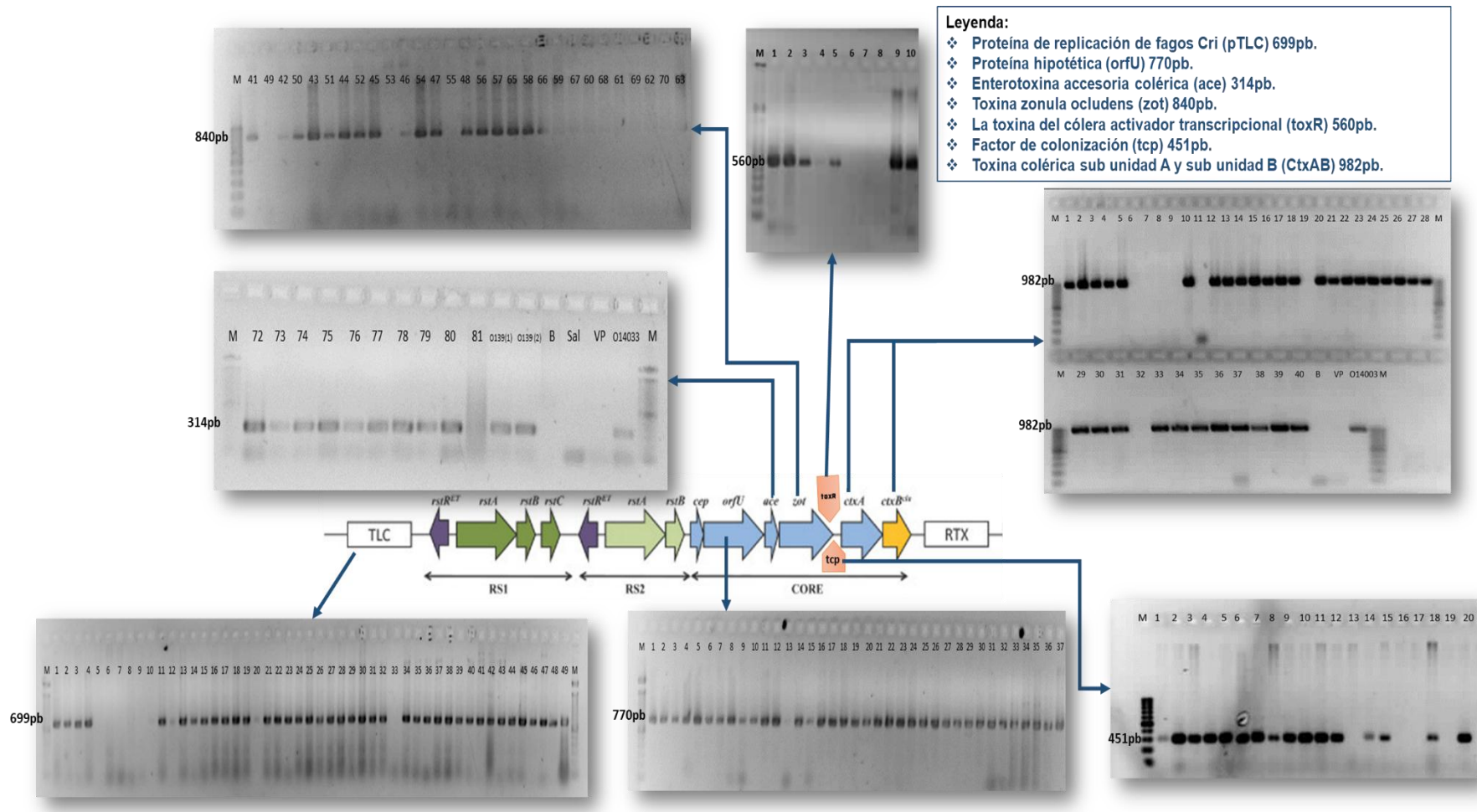


Figura 9. Diagrama general del mapeo por PCR de los genes de CTX (ctxAB, zot, ace y orfU), VPI (tcpA y ToxR) y pTLC en cepas de *V. cholerae*, muestran las regiones que fueron amplificadas.

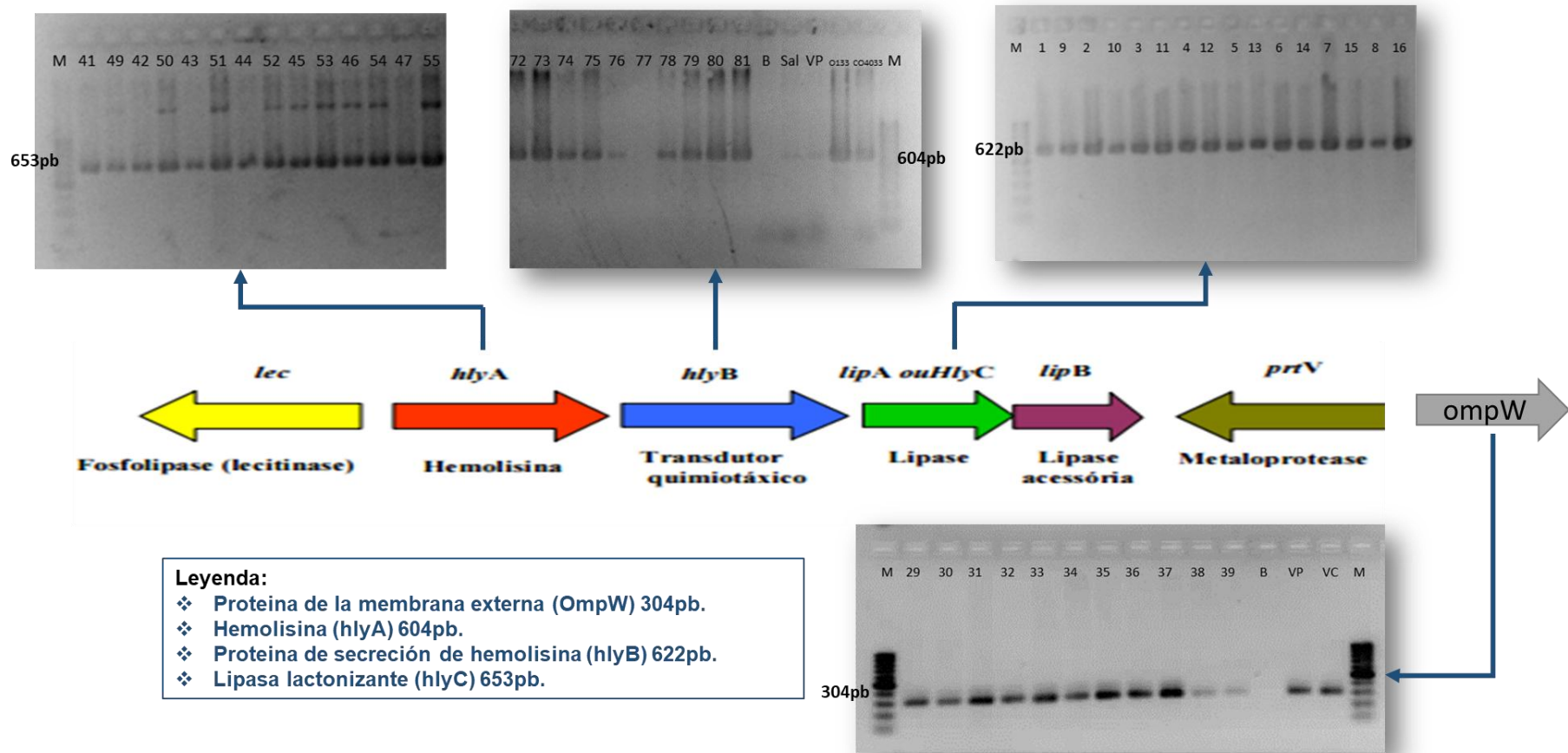


Figura 10. Diagrama general del mapeo por PCR de los genes de hemolisinas (*hlyA*, *hlyB* y *hlyC*), y *ompW* en cepas de *V. cholerae*, muestran las regiones que fueron amplificadas.

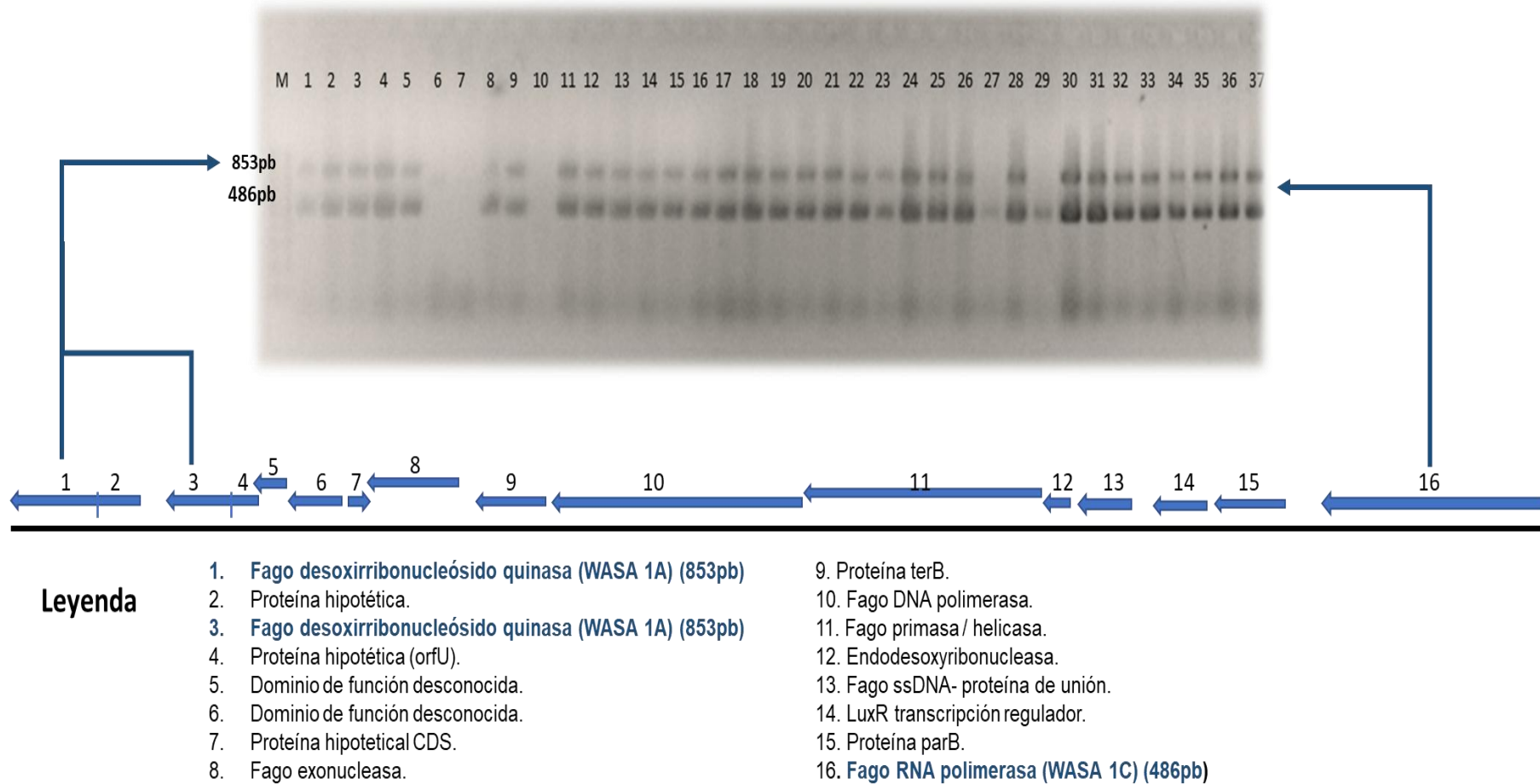


Figura 11. Diagrama general del mapeo por PCR multiplex de los genes del fago WASA-1 (WASA 1A y WASA 1C) en cepas de *V. cholerae*, muestran las regiones que fueron amplificadas

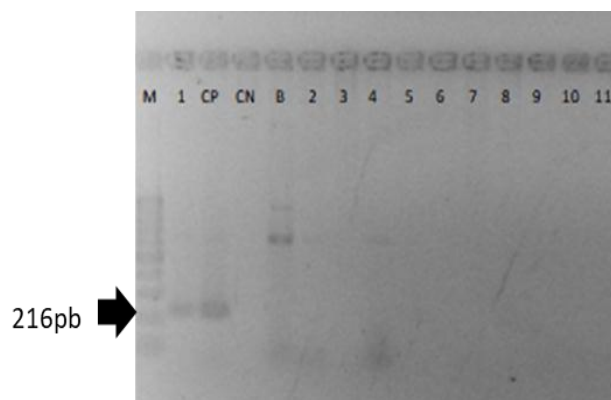


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Amplicones obtenidos para el gen *stn/sto* en cepas de *V. cholerae*. Primer para un amplicón de 216pb. M: marcador de 100 pb; carriles 1 (1.3875-92), 2 (2.008-03), 3 y 4 (2.027-03) 5 (1.024-07), 6 (2.738-09), 7 (1.057-09), 8 (1.373-10), 9 y 10 (1.457-10), 11 (1.124-93) cepas aisladas de *V. cholerae* serogrupo O1 y no-O1/no-O139; patrón positivo *V. cholerae* no-O1/no-O139 (CP); patrón negativo *S. infantis* (CN).

4.2.2. Distribución genotípica de O1 y no-O1/no-O139 desde 1991 al 2016 en Perú.

Al realizar el análisis inferencial sobre el análisis multilocus de genes asociados a la virulencia de *Vibrio cholerae* mediante tablas de contingencia y chi-cuadrado, como se observa en el Anexo 5, se comprueba la conformidad de la variación de los factores de virulencia de *Vibrio cholerae* (los genes *ctxAB*, *tcpA*, *wasA*, *wasB*, *wasC*, *pTLC*, *ace*, *zot*, *toxR*, *orfU*, *rtxA* y *hlyB*) está directamente relacionada con la distribución durante y posterior al período epidémico ($p < 0.05$). Mientras que para los genes *hlyA*, *hlyC*, *rtxC* no se comprueba la conformidad de la variación de los factores de virulencia de *V. cholerae*, no está directamente relacionada con la distribución durante y posterior al período epidémico ($p > 0.05$). El gen *stn/sto* está directamente relacionado con el serogrupo y no con su distribución durante y posterior al período epidémico ($p > 0.05$).

En el análisis genotípico, presenta quince perfiles diferentes, se observaron entre las 74 cepas en el período epidémico y post epidémico, como se observa en la Figura 14. El perfil más frecuente, presente en 45% de las 73 cepas O1 (aislados clínicos y ambiental) en el período epidémico, presentaron 14 de los 15 marcadores del análisis multilocus asociados a la virulencia de *V. cholerae* (*ctxAB*, *zot*, *ace*, *toxR*, *tcpA*, *orfU*, *pTLC*, *rtxA*, *rtxC*, *hlyA*, *hlyB*,

hlyC, WASA-1a, WASA-1c). Evidenciándose su distribución uniforme y mayor frecuencia del análisis molecular multilocus asociados a la virulencia de *V. cholerae*, siendo en primer lugar en Puno presente en una cepa O1, seguido de Lima presentes en 46 cepas O1 y por último en Ayacucho presentes en 4 cepas O1 (Figura 14). Mientras que, en el periodo epidémico, una cepa O1 (aislado clínico) proveniente de Lima, solo presenta los genes pTLC, rtxA, rtxC, hlyA, hlyB, y hlyC, no presenta la toxina colérica ctxAB y el fago WASA-1 (Figura 14)

Seis perfiles diferentes (genotipo) se observaron entre las 14 cepas no-O1/no-O139. El perfil más frecuente, presentes en 8% de las 14 cepas NAG, presentaron los genes rtxA, rtxC, hlyA, hlyB y hlyC en los períodos epidémico y post epidémico. Ninguna cepa NAG presentaron los genes ctxAB, tcpA, toxR, ace, zot y WASA-1. Una cepa del período epidémico presenta el gen de la toxina stn/sto, mientras que ninguna de las 74 cepas O1 presento este gen (Figura 13). Donde han sido obtenidos las mayores frecuencias de los genes asociados a la virulencia de *V. cholerae*, siendo mayor en Ayacucho presente en una cepa NAG, seguido de Callao presentes en 4 cepas NAG (Figura 13).

Código	<i>Vibrio cholerae</i>	GENES																	Departamento	Tipo de muestra					
		SEROGRUPO		ESPECIE		VPI					CTX		WASA		RTX		HLY				STN/STO				
		VCO1	VCO139	VCm	OmpW	TCP	ToxR	CtxAB	ACE	ZOT	OrfU	pTLC	was1a	was1c	RtxA	RtxC	HlyA	HlyB			HlyC	stn/sto			
1.3875-1992	no-O1/no-O139																						Lima	Heces	
1.015-1995	no-O1/no-O139																							Lima	Coproculativo
1.0147-1996	no-O1/no-O139																							Lima	Heces
2.0049-1996	no-O1/no-O139																							Ayacucho	Heces
1.0356-2000	no-O1/no-O139																							Lima	Heces
1.024-2007	no-O1/no-O139																							Lima	Heces
2.738-2008	no-O1/no-O139																							Lambayeque	Heces
1.057-2009	no-O1/no-O139																							Lima	Heces
1.255-2012	no-O1/no-O139																							Lima	Heces
5.580-2014	no-O1/no-O139																							Lambayeque	Agua Acrequia
1.164-2015	no-O1/no-O139																							Lima	Heces
3.315-2015	no-O1/no-O139																							Callao	Agua de río
1.534-2015	no-O1/no-O139																							Lima	Cepa ambiental
3.314-2015	no-O1/no-O139																							Callao	Agua de río
		14	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Figura 13. Distribución de genotipos en cepas del serogrupo no-O1/no-O139. La presencia y ausencia de genes relacionados con la virulencia están representados, respectivamente, por cuadrados **azules** (+) y **celestes** (-). Los colores que resaltan corresponden a las fuentes de aislamiento y periodos de la epidemia. El histograma debajo de cada figura corresponde a la frecuencia de cada gen. Los colores que resaltan corresponden a las fuentes de aislamiento. Las cepas destacadas de **mostaza** fueron aisladas de muestras clínicas y **celestes** fueron aisladas de muestras ambientales. El periodo epidémico del cólera (1991-2003) es la banda de color **rojo** y el periodo post epidémico del cólera (2004-2016) es la banda de color **amarillo**.

5. DISCUSION

El cólera es una enfermedad causada una variante toxigénico de *Vibrio cholerae*, la cual se transmite por alimentos y agua contaminados. Este patógeno representa una amenaza latente para la salud pública en Perú y globalmente debido a su potencial epidémico. A pesar de ser una enfermedad de relevancia nacional, existe poca información de las cepas de *V. cholerae* circulantes en el Perú. El presente estudio es el primero en describir el análisis molecular multilocus asociados con factores de virulencia de cepas de *V. cholerae* aisladas en Perú durante un periodo epidémico y post epidémico.

Epidemiología del cólera

La epidemiología de *V. cholerae* en el Perú se remonta con los reportes de los brotes epidémicos del cólera a principios del año 1991 (se evidencio aprox. 20 000 casos de cólera) y un segundo brote en el verano del año 1998 (se evidencio aprox. 4000 casos de cólera). En ambos brotes coincidentemente se manifestó la presencia del evento El Niño, el cual pudo promover la reproducción masiva de *Vibrios* generando reservorios naturales en el litoral peruano (Vega et. al., 2010), permitiendo a su vez alcanzar altas cargas de microorganismos en alimentos marítimos de consumo humano (Gavilán et.al., 2013). En el primer año los casos de cólera en Perú, aparecieron después de El Niño, en forma simultánea en las ciudades Chimbote, Iquitos, Lima, Callao y Piura. El cólera se extendió rápidamente hacia otros lugares del país y luego al resto del continente americano.

Durante el primer brote de 1991, el Perú el súbito incremento de casos de cólera estuvo relacionado a la coyuntura social y económica de Perú en esa época, ya que atravesó por una profunda crisis económica que elevó los índices de pobreza y desnutrición crónica (García et. al., 1991). Asimismo, se intensificaron las migraciones internas de las zonas rurales a

zonas urbanas permitiendo el flujo masivo de personas enfermas hacia las ciudades.

En este estudio se observa mayor prevalencia de cepas O1 toxigénicas proveniente del departamento de Lima y seguido por Loreto. Además, se evidencio la presencia de 17 genes entre las cepas O1 (aislados clínicos), mayor frecuencia en Puno, seguido en Ayacucho, tercero en Lima y finalmente en Loreto (Figura 14).

Las condiciones sanitarias fueron desfavorables en el tratamiento de clorado y el sistema de distribución de abastecimiento de agua potable en Lima. Antes del cólera, el nivel de cloración en Lima fue 0,1 mg/l como en Iquitos y Chimbote, a excepción de Cajamarca su tratamiento de cloración era regular (Alfaro et al. 1994; Aurazo et. al., 1991; Canepa et. al., 1991). En la actualidad el sistema de clorado es de 50 a 100 mg de cloro por litro de agua. Estos requisitos son buena calidad sanitaria, destinados al consumo humano sin que afecten su salud, reduce en forma significativa los riesgos de contraer enfermedades infecto-contagiosas.

Es importante mencionar que no se han reportado casos clínicos de cólera de *V. cholerae* toxigénico, desde el año 2003 hasta la actualidad. Las acciones efectivas del Estado mediante SEDAPAL administran el sistema de clorado y el monitoreo de los sistemas de provisión de agua potable existentes en las áreas urbanas y rurales, además del monitoreo ambiental y vigilancia nacional de *V. cholerae* por el LRNE-INS.

Análisis molecular multilocus asociados a la virulencia de *V. cholerae*:

El análisis molecular multilocus asociados a la virulencia de *V. cholerae* aún no ha sido estudiado extensamente. En el presente se demuestra la presencia y distribución de los 15 genes relacionados con la virulencia (Figura 8 al 12) entre las cepas de *V. cholerae* en un intervalo de tiempo del período epidémico y post epidémico, como se observa en la Figuras 13 y 14. Además la tipificación microbiológica (Anexo 2),

serológica y molecular de especie y serogrupo de las cepas peruanas *V. cholerae* (Tabla 4) (Figura 6 y 7).

En el período epidémico se observó un claro predominio de *V. cholerae* O1 toxigénico en las 73 cepas peruanas, el cual se asocia directamente a la enfermedad del cólera (Morais et. al., 2013). Esto corresponde totalmente con la caracterización molecular del perfil de genes multilocus de virulencia específicos de *V. cholerae* toxigénica (Raskin, et al., 2004) como *ctxAB*, *zot*, *orfU*, *ace*, *rtxA*, *rtxC*, *toxR*, *pTLC*, *tcpA*, *hlyA*, *hlyC*, *hlyB* y *WASA-1* (Figura 14), podrían ser portados por un profago replicado como un plásmido en la especie *Vibrio cholerae* (Mekalanos et. al. 2004). Estos resultados indican que todas las cepas O1 del periodo epidémico fueron positivas para el gen profago *WASA-1*, refuerza su identidad como el gen del clon epidémico de América Latina (Morais et. al., 2013) y posiblemente estén relacionado con la expresión génica asociado a la virulencia. Esto puede ser debido a la adaptabilidad de *V. cholerae* a las condiciones fisicoquímicas y biológicas del ambiente y/o su fisiología estar adaptada para la interacción con el hospedero-hospedador (Merrell et al., 2002), por lo que no sería descartado la idea sobre la posibilidad que *Vibrio* adquiriera el profago mediante la interacción hospedero-fago-hospedador, a través del mecanismo de la transferencia génica horizontal en *V. cholerae* que genera genes indeterminados a lo largo del tiempo, debido por múltiples descendientes de un antecesor *V. cholerae* O1 El Tor.

En las cepas del período post epidémico se observó un claro predominio de *Vibrio cholerae* serogrupo no-O1/no-O139 no toxigénicas en las 14 cepas peruanas, los resultados fueron negativos para los genes *CTX* y positivas para otras toxinas *RTX* (*rtxA* y *rtxC*), las hemolisinas (*hlyA*, *hlyB* y *hlyC*); y el gen *stn/sto* presente en una cepa del periodo epidémico (Figura 13). Aparentemente no están involucrados en infección epidémicas, por lo general se asocian a pocos casos esporádicos de gastroenteritis leve está documentada (Briseño et al., 2009). Además, se observa una cepa de *V. cholerae* O1 no toxigénico (1.1457-2010) aislada

en el periodo post epidémico, presentó un perfil distinto, que fue reportado por Zamudio et.al., (2011) que encuentra que esta cepa O1 no es toxigénico por la ausencia de *ctxA*, caracterizado por PFGE. Dichas cepas no muestran patogenicidad, no presenta los genes de CTX (*ctxAB*, *ace*, *zot*, *pTLC*, *tcpA* y *toxR*), es decir, aparentemente hubo una pérdida de los genes asociados a la virulencia (como los genes de CTX) en las cepas ambientales.

Los resultados obtenidos en este estudio, concuerda con el hallazgo de Nair et. al., (2009), reportaron que las 76 cepas peruanas de *V. cholerae* O1 toxigénicas, mostraron la presencia de todos los genes VSP-I, RTX, *hlyA*, *tcpA*, *toxR*, *CtxAB* por PCR, eran virulentas en brotes epidémicos en los años 1991 al 2002. Una cepa no latinoamericana con *ctxA* positivo y el gen *ctxB* negativo, por ende, *ctxB* es de origen latinoamericano y de la séptima pandemia. Excepto, las 03 cepas peruanas carecían de los genes de VSP-I y *CtxAB*, se concluyó que no era toxigénica (2003).

En relación con la prevalencia de otro país, como en Brasil, es bastante similar con el hallazgo de la investigación de Morais et.al., (2009 y 2013) reportan que sus 104 cepas de *V. cholerae* del serogrupo no-O1/no-O139 (aislados ambientales y clínicos) durante el periodo pre epidémico, epidémico y post epidémico, no presenta toxigenicidad, los resultados son negativos para los genes CTX y positivos para otras toxinas como RTX, hemolisinas y *stn/sto*. Además, presentan 21 cepas de *V. cholerae* O1 toxigénicas, mayoritariamente presenta todos los genes de virulencia durante el periodo pre epidémico y epidémico, mientras que en el periodo post epidémico no presenta todos los genes multilocus asociados a la virulencia.

6. CONCLUSION

1. Durante el período epidémico predominó las cepas de *Vibrio cholerae* O1 toxigénico, las cuales presentaron poca variación genética y se observó la presencia del marcador WASA-1 de la epidemia de Latinoamérica en la década de los 90s, y posiblemente esté relacionado con la expresión génica asociado a la virulencia de *V. cholerae*.
2. Los genes HLY y RTX están presentes en el serogrupo O1 y no-O1/no-O139, dichos genes son independientes de los genes de CTX. Además, el gen *stn/sto* se presenta exclusivamente en la cepa del serogrupo no-O1/no-O139.
3. En el período epidémico del cólera en Perú ha sido originado por un clon toxigénico de *V. cholerae* O1 *El Tor* conjuntamente asociado con factores ambientales, sociales, culturales, económicos, ecológicos y sanitarios desfavorables, permitieron el incremento de casos en los años 1991 y 1998.
4. Durante el periodo post-epidémico no se identificó cepas de *Vibrio cholerae* toxigénicas, solo se evidencio una cepa de *V. cholerae* O1, lo cual no presentaron genes de virulencia tales como el *ctxAB*, *toxR*, *tcpA*, *ace*, *zot* y *orfU*, así como el marcador WASA-1.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda implementar el uso del análisis multilocus asociados a genes de virulencia de *V. cholerae* para la vigilancia del cólera a nivel nacional.
- ✓ Se recomienda que las cepas recuperadas durante este estudio sirvan para realizar posteriores estudios basados en secuenciación genómica.
- ✓ Se recomienda continuar la vigilancia de *Vibrio cholerae* para identificar nuevas variantes de este patógeno que puedan causar nuevos casos de cólera en el país.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alonso G., 2009. *Cólera y Vibrio cholerae*. Rev del Inst. Nac. Hig Rafael Rangel". 40(2):50-69.
- Briseño I., Puebla C., Guerra F., Jensen D., Núñez H., Ulloa M. & C. G. Osorio., 2009. *Septicemia fetal causada por Vibrio cholerae NO-O1, NO-O139 hemolítico en Chile, Caso clínico*. Revista Médica de Chile 9: 1193-1196. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bistream/123456789/8174/1/Alicia%20Herrera%20et%20al.%20molecular%20V.%20colera.pdf>
- Colwell R. (Ed), 1996. *Clima global y enfermedades infecciosas: el paradigma del cólera*. Science, 274 (5295). [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8953025>
- Chaparro, A.P., Khalid, S. & Klose. K.E., 2010. *Los quimiorreceptores que aceptan metilos dependientes de Toxt, AcfB y TcpI contribuyen a la colonización intestinal por Vibrio cholerae*. Federación de Sociedades Microbiológicas Europeas Cartas de Microbiología. 302: 99-105.
- Chow KH, Ng TK, Yuen KY. & Yam WC., 2001. *Detección del gen de la toxina RTX en Vibrio cholerae por PCR*. J Clin Microbiol 39(7):2594-7. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427575>
- DiRita, V.J., Parsot, C., Jander, G. & Mekalanos. J.J., 1991. *La cascada reguladora controla la virulencia en Vibrio cholerae*. Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias. 88: 5403-5407.

- Field, R.D., Y. Wang, O. Roswintiarti & Guswanto., 2004. *Un predictor basado en la sequía de los recientes eventos de neblina en el oeste de Indonesia*. Atmos. Environ. 38, 1869-1878, [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: doi: 10.1016/j.atmosenv.2004.01.011.
- García V., 1991. *Informe final de la primera epidemia de cólera en Perú y América en este siglo*. Lima, marzo.
- Gavilán, R. G., Zamudio, M. L., & Martínez-Urtaza, J., 2013. *Epidemiología Molecular y Variación Genética de Vibrio parahaemolyticus Patógeno en Perú*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(5), e2210. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002210>.
- Ghosh, A., Bhattacharya, J., Nair, G., Takeda, T. & Chakrabarti. M., 1998. *Aumento del Ca²⁺ + citosólico y activación de la actividad de guanilil ciclase unida a la membrana en enterocitos de rata por enterotoxina termoestable de Vibrio cholerae no O1*. Federación de Sociedades Microbiológicas Europeas Cartas de Microbiología. 160: 125-129.
- Heidelberg JF, Eisen J a, Nelson WC, Clayton R, Gwinn ML. & Dodson RJ., 2000. *Secuencia de ADN de ambos cromosomas del patógeno del cólera Vibrio cholerae*. Nature. 406(6795):477-83.
- Huguet J., Arias I. & Montoya Y., 2000. *Tipificación molecular del Vibrio cholerae O1 en el Perú*. Revi. Med. Exp. Perú; (17) p. 1-4. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a03v17n1-4.pdf>

- Ibarra Trujillo, J.; Delgado, A., & Alvarado, D., 2014. Vibrios no Epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 Asociados a Enfermedad Diarreica Aguda. Evento Climatológico. "El Niño" - 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo. Facultad de Medicina, 60(4), 251-256. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: doi:<http://dx.doi.org/10.15381/anales.v60i4.4382>
- Jackson, A.D., Dowling, R.B. & Wilson. R., 1998. *Interacción de bacterias y sus productos con tejidos en el cultivo de órganos. Métodos en Microbiología: Bacteria Patogénesis*. P. Williams, J. Ketley y G. Salmond (ed.), pp 73-74. Academic Press, Great Britain.
- Lipp, E. K., Rivera, I. N. G., Gil, A. I., Espeland, E. M., Choopun, N., Louis, V. R. & Colwell, R. R., 2003. *Detección ctxA de Vibrio cholerae en agua costera peruana y plancton por PCR. Microbiología Aplicada y Ambiental*. 69(6), 3676–3680. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3676-3680.2003>
- Marrero Domínguez Karen., 2014. “*Estudio proteómico y funcional de la adaptación de Vibrio cholerae El Tor C7258 al cultivo microaerobio y anaerobio en caldo Syncase*”. *Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas*. La Habana. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://bdigital.reduniv.edu.cu/index.php?page=13&id=676&db=2>
- Mata JL., 1992. *Cólera: historia, prevención y control*. EUNEC-EUCR. San José de Costa Rica, pp. 384.

- Merrell D., Butler S., Qadri F., Dolganov N., Alam A., Cohen M., Calderwood S., Schoolnik G. & Camilli A., 2002. *Propagación epidémica inducida por el huésped de la bacteria del cólera*. Rev. Nature, 417:642–645. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature00778>
- Morais LLCDS, Garza DR, Loureiro ECB, Vale ER, Santos DSADS. & Correa VC., 2013. *La población y el estudio genético de Vibrio cholerae del entorno amazónico confirman que el profago WASA-1 es el principal marcador de la cepa epidémica que circuló en la región*. PLoS One. 8(11):1-12. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081372>
- Morais LLCDS., 2009. *Diversidad genética de aislados ambientales de Vibrio cholerae de la Amazonia brasileña*. p. 148. Tesis de grado (Doctorado) - Universidad Federal de Pará, Instituto de Ciencias Biológicas, Belém, 2009. Programa de Post grado de Biología de Agentes Infecciosos y Parasitarios. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: http://www.baip.ufpa.br/arquivos_baip/teses_dissertacoes/lena_lilian_canto_sa.pdf
- Nair GB., Nusrin S1, Gil AI, Bhuiyan NA, Safa A, Asakura M, Lanata CF, Hall E, Miranda H, Huapaya B, Vargas G C, Luna MA, Sack DA. & Yamasaki S., 2009. *Las cepas peruanas Vibrio cholerae O1 El Tor poseen una región distinta en la séptima isla pandemia Vibrio II que las diferencias del prototipo séptima pandemia de cepas El Tor*. J Med Microbiol. Perú, 58 (Pt 3): 342-54. doi: 10.1099 / jmm.0.005397-0. [en

- línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208885>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2002. *Directrices para la calidad del agua potable - Segunda edición - Adición de agentes microbiológicos en el agua potable*. World Heal Organ. Geneva. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/who/drinkin3.pdf>
- Pacini F., 1854. *La observación microscópica y deducciones patológicas sobre el cólera asiático*. Memoria del Dr. Filippo Pacini: leer la Sociedad-médica física de Florencia, en su reunión del 10 de diciembre 1854 Florencia: Tip. Federigo Bencini, Revista italiana médico, Toscana, pp 397 y 405. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: http://badigit.comune.bologna.it/books/pacini/scorri_big.asp?direction=next&ID=1
- Pang B, Yan M, Cui Z, Ye X, Diao B. & Ren Y., 2007. *La diversidad genética de Vibrio cholerae toxigénicos y no tóxicos de los serogrupos O1 y O139 reveló mediante hibridación genómica comparativa basada en matriz*. *J. Bacteriol.* 189(13):4837-49. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/189/13/4837.short>
- Prescott L., Harley J. & Klein D., 2001. *Microbiología*. 5th ed. McGraw-Hill Compañías., Boston.
- Prouty, M.G. & Klose. K.E. V., 2006. *Vibrio cholerae: la genética de la patogénesis y la persistencia ambiental*. La Biología de Vibrios. F.L Thompson, B. Austin. y J. Swings (ed.), pp 313-316. ASM Press. Washington, D.C.

- Raskin, D., Bina, J. & Mekalanos, J., 2004. *Análisis genómico y genético de Vibrio cholerae*. ASM News, 70:57-62. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <https://www.asmmusa.org/ccLibraryFiles/znw002040176p.pdf>
- Reidl, J. & Klose. K.E., 2002. *Vibrio cholerae y cólera: fuera del agua y dentro del huésped*. Federación de Sociedades Microbiológicas Europeas Reviews Microbiology Reviews. 26: 125-139.
- Riemann, H. & Cliver. D., 2006. *Infecciones e intoxicaciones transmitidas por los alimentos*. 3th ed. Academic Press y Elsevier. España.
- Romero Oviedo & Francisco Enrique, 2013. *PCR en tiempo real para la detección de Vibrio cholerae en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua*. febrero-marzo 2012. Tesis (MSc en Microbiología Médica)-Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/retrieve/866>
- Sánchez Lera R.M, Pérez Vazquez I.A., 2014. *Cólera: historia de un gran flagelo de la humanidad*. Humanidades Médicas [revista en Internet]. 14(2): [aprox. 22 p.]. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.humanidadesmedicas.sld.cu/index.php/hm/article/view/514>
- Thompson F.L, Hoste B, Vandemeulebroecke K. & Swings J., 2001. *La diversidad genómica entre aislados de Vibrio de diferentes fuentes se determinó mediante polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados fluorescentes*. Syst Appl Microbiol. 24(4):520-38. [en

línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004700673>

- Thompson F.L, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Hoste B. & Munn C.B., 2005. *Filogenia e identificación molecular de Vibrios sobre la base del análisis de secuencia multilocus*. Appl Environ Microbiol. 71(9):5107-15.
- Trucksis, M., Galen, J., Michalski, J., Fasano, A. & Kaper. J., 1993. *Enterotoxina accesoria del cólera (Ace), la tercera toxina de un cassette de virulencia de Vibrio cholerae*. Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias. 90: 5267-5271.
- Valderrama Escobar, V. A., 2014. *Aproximación al estudio de la epidemia del cólera en Trujillo metropolitano* f.s xx. Universidad Nacional de Trujillo. Tesis de grado. Perú. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1821>
- Vegas de Cáceres, Ileana., 2010. *Cambio climático en el Perú* Costa Norte. MJ Bustamante. Primera edición:21-145. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible:<http://cdam.minam.gob.pe/novedades/cambioclimaticocostanorte.pdf>
- Vicente, A., Coelho, A. & Salles. C., 1997. *Detección de la secuencia del gen de la toxina termoestable de Vibrio cholerae y Vibrio mimicus mediante PCR*. Revista de Microbiología Médica. 46: 398-402.
- Walton D.A. & Ivers L.C., 2011. *Respondiendo al cólera en el terremoto de Haití*. Engl J Med. 364(1):3-5.
- Welch R.A., 2001. *RTX estructura y función de la toxina: una historia de numerosas anomalías y pocas analogías*

- en la biología de la toxina*. Curr Top Microbiol Immunol. 257:85-111. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11417123>
- Wibbenmeyer, J.A., Provenzano, D., Landry, C., Klose, K.E. y Delcour. A.H., 2002. *Vibrio cholerae OmpU, OmpW y OmpT, porinas afectadas de manera diferencial por la bilis*. Infección e Inmunidad. 70: 121-126.
- Wilson, J.W., 2006. *Mecanismo de secreción proteica bacteriana*. En Paradigmas Moleculares de Enfermedades Infecciosas. C. Nickerson y M. Schurr (eds.), pp 274-320. Springer., USA.
- Zamudio M., Meza A., Bailón H., Martínez J. & 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*. Rev. Perú Med Exp Salud Pública. Perú; 28(1): 128-35. [en línea] [Consultada: 22 diciembre 2017]. Disponible: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n1/a20v28n1.pdf>
- Zhang, X. & Austin. B. 2005. *Hemolisinas en las especies de Vibrio*. Journal of Applied Microbiology. 98: 1011-1019.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Preparación de medios y reactivos utilizados.

Preparación del medio de cultivo Agua Peptonada Alcalina al 1% de NaCl (APA 1%).

Peptona..... 20 g.

NaCl..... 10 g.

Agua destilada..... 1 L.

Disolver y homogenizar a calor

Ajustar a pH 8.5

Autoclave a 121° C por 15 minutos

*En el proceso de esterilización se pierde ± 1 ml de caldo.

Preparación del medio de cultivo Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS)

TCBS..... 90 g.

Agua destilada estéril..... 1 L.

Disolver y homogenizar a calor

Ajustar a pH 8.5

Dispensar en placas Petri

*NO AUTOCLAVAR

Preparación del medio de cultivo CHROM agar-Vibrio

CHROM..... 74.7 g.

Agua destilada estéril..... 1 L.

Disolver y homogenizar a calor

Ajustar a pH 9

Dispensar en placas Petri

*NO AUTOCLAVAR

Preparación del medio de cultivo Trypticase Soya Agar al 1 % de NaCl (TSA 1% de NaCl)

TSA.....	40 g.
NaCl.....	10 g.
Agua destilada estéril.....	1 L.

Disolver y homogenizar a calor

Ajustar a pH 7.6

Autoclave a 121° C por 15 minutos Dispensar en las placas Petri.

Preparación del medio de cultivo caldo glicerol al 1% de NaCl.

Peptona.....	1.5 g.
NaCl.....	1 g.
Agua destilada.....	75 ml.
Glicerol.....	25 ml.

Disolver y homogenizar a calor

Ajustar a pH 7.6

Dispensar 1.8 ml en crioviales de 2 ml.

Autoclave a 121° C por 15 minutos.

Preparacion del buffer Tris-acetato-EDTA 50X (TAE 50X). (pH 8.0)

Trizma Base.....	121.00 g.
EDTA (0.5 M).....	50.00 ml.
Ácido Acético.....	28.55 ml.

ANEXO 2: Representación de la caracterización microbiológica de *Vibrio cholerae*.

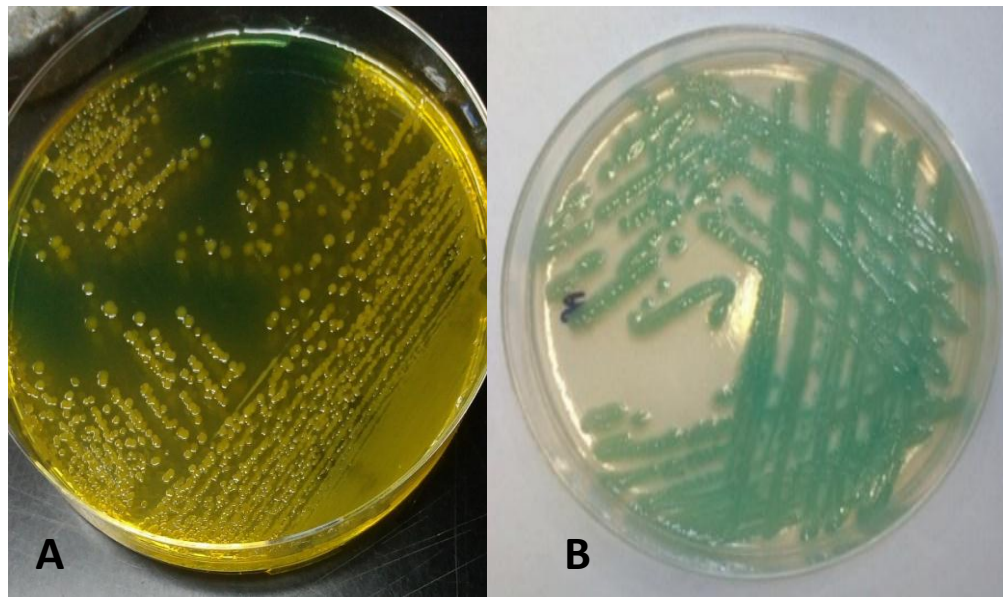


Figura 15. Representación gráfica de la caracterización fenotípica de *V. cholerae*. Las colonias son 2-3 mm de diámetro. A: en la placa con agar TCBS se observa colonias amarillas, brillantes, con el centro ligeramente levantado; B: en la placa con agar CHROM se observa colonias turquesas, con el centro ligeramente aplanado con centros opacos y bordes translúcidos.

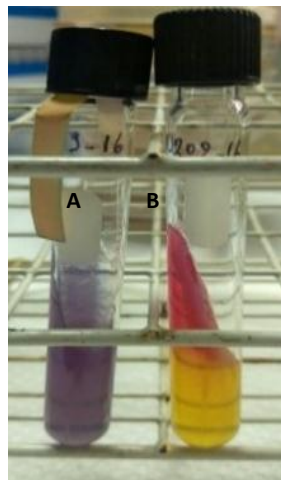


Figura 16. Representación gráfica de la caracterización fenotípica de *V. cholerae*, las pruebas bioquímicas en el medio TSI al 1% NaCl y en el medio LIA al 1% NaCl. A: en el medio agar TSI al 1% NaCl generalmente presenta reacciones de A/A⁻ (positivo la sacarosa, glucosa y lactosa; y no produce gas ni H₂S); B: En el medio agar LIA al 1% NaCl, *V. cholerae* es positivo para la reacción de descarboxilasa de lisina K/K⁺ e indol +.

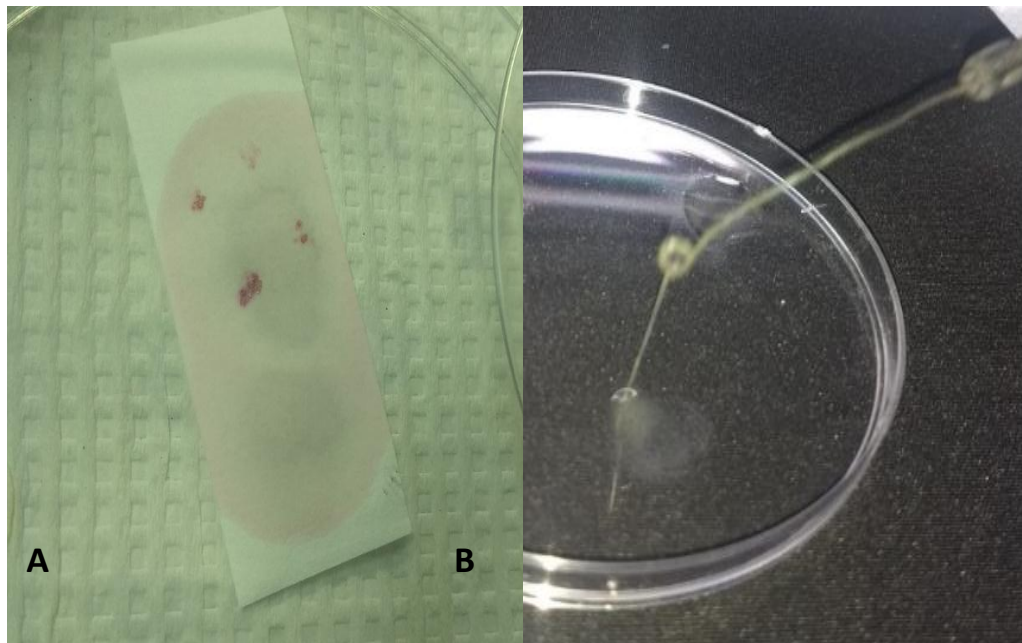


Figura 17. Representación gráfica de la caracterización fenotípica de *Vibrio cholerae*, las pruebas complementarias. La prueba de la oxidasa (A) se observa la reacción positiva para *V. cholerae* vira de color morado oscuro; y la prueba del hilo (B). La prueba será positiva cuando se forme una cuerda en medio de una mezcla viscosa.

ANEXO 3: Procedimiento de la crioconservación de cepas de *Vibrio*

1. Con asa de punta tomar un poco de la colonia y sembrar en tubo de ensayo con TSA inclinado al 1% de NaCl e incubar a 37°C por 8 horas.
2. Agregar 1.8 ml de caldo glicerol al 1 % de NaCl e incubar a 37°C por 3 horas.
3. Homogenizará por vortex el tubo de ensayo por 1 min.
4. Verter todo el contenido a un criovial estéril previamente rotulado, guardarlo en un criobox.
5. Almacenar a – 80 °C.

ANEXO 4: Procedimiento de la extracción de ADN a partir de cultivo bacteriano con DNasy Kit (QUIAGEN)

1. Centrifugar un máximo de 5×10^6 células por 3 minutos por 7,000rpm. Resuspender el pellet en 200ul de PBS (homogenizar bien con la micropipeta).
2. Adicionar 20 μ l de proteinasa K. Adicionar 200 μ l de buffer AL. Homogenizar con el vórtex. Incubar las muestras a 56°C por 10 min.
3. Adicionar 200 μ l de etanol (100%). Homogenizar con el vórtex.
4. Colocar 600ul del homogenizado y verter a una columna de spin que viene con su tubo colector. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
5. Colocar la columna de spin sobre un nuevo tubo colector.
6. Adicionar 500 μ l de buffer AW1. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
7. Colocar la columna de spin en un nuevo tubo colector.
8. Adicionar 500 μ l de buffer AW2, centrifugar por 3 minutos a 14,000rpm. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
9. Transferir la columna de spin a un tubo de microcentrífuga (eppendorff de 1.5ml).
10. Eluir el DNA adicionando 200 μ l de buffer AE al centro de la membrana de la columna de spin.
11. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 10,000rpm.
12. De manera opcional repetir nuevamente la elución agregando a la columna 150 μ l de buffer AE, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 10,000rpm por 1 minuto. Guardar el eppendorff en la refrigeradora a temperatura de -20 °C.

ANEXO 5: Análisis inferencial:

Prueba de la hipótesis

Formulamos las hipótesis estadísticas:

H1: La variación genética de los factores de virulencia de *Vibrio cholerae* está directamente relacionada con el serogrupo y su distribución durante y posterior al período epidémico.

H0: La variación genética de los factores de virulencia de *Vibrio cholerae* no está directamente relacionada con el serogrupo y su distribución durante y posterior al período epidémico.

Gen	X ²	Período epidémico y post epidémico			Serogrupo O1 y no-O1/no-O139		
		Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
VCO1	Chi-cuadrado de Pearson	46,294 ^a	1	0,000	88,000 ^a	1	0,000
ctxAB	Chi-cuadrado de Pearson	54,906 ^a	1	0,000	81,023 ^a	1	0,000
tcpA	Chi-cuadrado de Pearson	54,906 ^a	1	0,000	81,023 ^a	1	0,000
wasa-1a	Chi-cuadrado de Pearson	25,489 ^a	1	0,000	37,614 ^a	1	0,000
wasa-1c	Chi-cuadrado de Pearson	40,972 ^a	1	0,000	60,461 ^a	1	0,000
pTLC	Chi-cuadrado de Pearson	54,906 ^a	1	0,000	81,023 ^a	1	0,000
ace	Chi-cuadrado de Pearson	54,906 ^a	1	0,000	81,023 ^a	1	0,000
zot	Chi-cuadrado de Pearson	54,906 ^a	1	0,000	81,023 ^a	1	0,000
toxR	Chi-cuadrado de Pearson	54,906 ^a	1	0,000	81,023 ^a	1	0,000
orfU	Chi-cuadrado de Pearson	45,709 ^a	1	0,000	87,000 ^a	1	0,000
rtxA	Chi-cuadrado de Pearson	15,963 ^a	1	0,000	10,817 ^a	1	0,001
hlyB	Chi-cuadrado de Pearson	19,552 ^a	1	0,000	21,881 ^a	1	0,000

Interpretación:

Como el valor de sig. (valor crítico observado) $0,000 < 0,05$ rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alternativa, es decir, la variación genética de los factores de virulencia de *Vibrio cholerae* (ctxAB, tcpA, wasa 1a, wasa1c, pTLC, ace, zot, toxR, orfU, rtxA y hlyB) está directamente relacionada con el serogrupo y su distribución durante y posterior al período epidémico.

Gen	X ²	Período epidémico y post epidémico			Serogrupo O1 y no-O1/no-O139		
		Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
rtxC	Chi-cuadrado de Pearson	1,128 ^a	1	0,288	0,544 ^a	1	0,461
hlyA	Chi-cuadrado de Pearson	0,975 ^a	1	0,323	1,439 ^a	1	0,230
hlyC	Chi-cuadrado de Pearson	0,975 ^a	1	0,323	1,439 ^a	1	0,230
stn/sto	Chi-cuadrado de Pearson	0,130 ^a	1	0,719	5,346 ^a	1	0,021

Interpretación:

Como el valor de sig. (valor crítico observado) $> 0,05$ rechazamos la hipótesis alternativa y aceptamos la hipótesis nula, es decir, la variación genética de los factores de virulencia de *Vibrio cholerae* (gen hlyA, hlyC, rtxC) no está directamente relacionada con el serogrupo y su distribución durante y posterior al período epidémico. Excepto, el gen stn/sto está directamente relacionado con el serogrupo y no con su distribución durante y posterior al período epidémico.

Nota: los genes de especie de *V. cholerae* (VCO) y ompW estadísticamente no es significativa.

Tabla 5. Tabla de contingencia del análisis multilocus de *V. cholerae* durante y post de la epidemia del cólera, continua en la tabla 6 y 7.

Periodo				gen VCO1		gen VCO139	gen VC	gen ompW	gen WASA-1a		gen WASA-1c		gen orfU	
				Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Epidémico	<i>V.cholerae</i>	no-O1/ no-O139	n	5	0	5	5	5	5	0	5	0	5	0
			%	6,4%	0,0%	6,4%	6,4%	6,4%	6,4%	0,0%	6,4%	0,0%	6,5%	0,0%
		O1	n	0	73	73	73	73	12	61	4	69	0	72
			%	0,0%	93,6%	93,6%	93,6%	93,6%	15,4%	78,2%	5,1%	88,5%	0,0%	93,5%
	Total	n	5	73	78	78	78	17	61	9	69	5	72	
		%	6,4%	93,6%	100,0%	100,0%	100,0%	21,8%	78,2%	11,5%	88,5%	6,5%	93,5%	
Post epidémico	<i>V.cholerae</i>	no-O1/ no-O139	n	9	0	9	9	9	9	0	9	0	9	0
			%	90,0%	0,0%	90,0%	90,0%	90,0%	90,0%	0,0%	90,0%	0,0%	90,0%	0,0%
		O1	n	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
			%	0,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	0,0%	10,0%
	Total	n	9	1	10	10	10	10	0	10	0	0	1	
		%	90,0%	10,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	10,0%	

Tabla 6. Tabla de contingencia del análisis multilocus de *V. cholerae* durante y post de la epidemia del cólera, continua en la tabla 7.

Periodo				gen ctxAB		gen tcpA		gen pTLC		gen ace		gen zot		gen toxR			
				Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente		
Epidémico	<i>V. cholerae</i>	no-O1/ no-O139	n	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0		
			%	6,4%	0,0%	6,4%	0,0%	6,4%	0,0%	6,4%	0,0%	6,4%	0,0%	6,4%	0,0%		
		O1	n	0	73	0	73	0	73	0	73	0	73	0	73	0	73
			%	0,0%	93,6%	0,0%	93,6%	0,0%	93,6%	0,0%	93,6%	0,0%	93,6%	0,0%	93,6%	0,0%	93,6%
	Total	n	5	73	5	73	5	73	5	73	5	73	5	73	5	73	
		%	6,4%	93,6%	6,4%	93,6%	6,4%	93,6%	6,4%	93,6%	6,4%	93,6%	6,4%	93,6%	6,4%	93,6%	
Post epidémico	<i>V. cholerae</i>	no-O1/ no-O139	n	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0		
			%	90,0%	0,0%	90,0%	0,0%	90,0%	0,0%	90,0%	0,0%	90,0%	0,0%	90,0%	0,0%		
		O1	n	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		
			%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%		
	Total	n	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	
		%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	

Tabla 7. Tabla de contingencia del análisis multilocus de *V. cholerae* durante y post de la epidemia del cólera.

Periodo				gen rtxA		gen rtxC		gen hlyA		gen hlyB		gen hlyC		gen stn/sto	
				Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Epidémico	<i>V. cholerae</i>	no-O1/ no-O139	n	0	5	2	3	0	5	1	4	0	5	4	1
			%	0,0%	6,4%	2,6%	3,8%	0,0%	6,4%	1,3%	5,1%	0,0%	6,4%	5,1%	1,3%
		O1	n	0	73	6	67	7	66	1	72	7	66	73	0
			%	0,0%	93,6%	7,7%	85,9%	9,0%	84,6%	1,3%	92,3%	9,0%	84,6%	93,6%	0,0%
		Total	n	0	78	8	70	7	71	2	76	7	71	77	1
			%	0,0%	100,0%	10,3%	89,7%	9,0%	91,0%	2,6%	97,4%	9,0%	91,0%	98,7%	1,3%
Post epidémico	<i>V. cholerae</i>	no-O1/ no-O139	n	2	7	0	9	0	9	4	5	0	9	9	0
			%	20,0%	70,0%	0,0%	90,0%	0,0%	90,0%	40,0%	50,0%	0,0%	90,0%	90,0%	0,0%
		O1	n	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
			%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	0,0%	10,0%	10,0%	0,0%
		Total	n	2	8	0	10	0	10	4	6	0	10	10	0
			%	20,0%	80,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	40,0%	60,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%

