

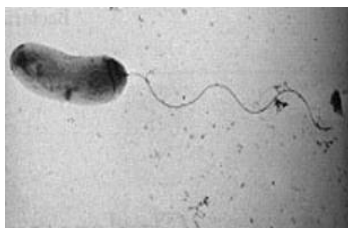
ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS
DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRAN"

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

MAESTRIA MICROBIOLOGIA MOLECULAR
5ta COHORTE

TÍTULO DEL TRABAJO:

Vibrio cholerae no-O1 asociado a diarreas: factores de virulencia y diversidad
genética de un patógeno emergente en Latinoamérica.



Autor: María Rosa Viñas

Director: Mariana Pichel

Lugar de trabajo: Servicio Enterobacterias.

Departamento Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

ANLIS "Dr Carlos G. Malbrán"

2016

Agradecimientos

La presentación del estudio realizado me ha dado la oportunidad de escribir, luego de recopilar datos, analizar y desde lo realizado desde la época de la epidemia de cólera continuar con la investigación de *V. cholerae* con las tecnologías actuales.

En la investigación debo reconocer la participación y la experiencia de profesionales de diferentes áreas que he considerado en el estudio, como así el apoyo familiar sosteniéndome en la continuación y finalmente poder plasmar lo investigado y estudiado a los fines de aportar en el ámbito del diagnóstico y vigilancia de este enteropatógeno.

Sin más, debo agradecer a todos lo que aportaron y me acompañaron en cuanto correcciones, sugerencias y guía haciendo factible alcanzar el objetivo del estudio.

Bioq. María Rosa Viñas

INDICE

Páginas

I.- Introducción	1
1.- Género <i>Vibrio</i> spp., especie <i>Vibrio cholerae</i> :	1
Taxonomía y antecedentes históricos	
2.- Mecanismos de patogénesis de <i>Vibrio cholerae</i>	4
3.- <i>Vibrio cholerae</i> no-O1	12
4.- Manifestaciones clínicas	13
5.- Ecología de <i>V. cholerae</i>	15
6.- Transmisión de <i>V. cholerae</i>	17
7.- Epidemiología de <i>V. cholerae</i>	18
8.- Diversidad genética de <i>V. cholerae</i>	20
9.- Emergencia de nuevas cepas toxigénicas	21
10.- Vigilancia de <i>V. cholerae</i> no-O1 en América Latina	23
11.- Vigilancia de <i>V. cholerae</i> en Argentina	24
12.- Hipótesis	26
II.- Objetivos y justificación del proyecto	26
1- Objetivos generales	27
2- Objetivos específicos	28
III - Materiales y Métodos	29
1.- Selección de aislamientos de <i>V. cholerae</i> no-O1.	29
2.- Caracterización fenotípica de los aislamientos.	32
3.- Caracterización genotípica de los aislamientos – Detección de genes de virulencia por PCR	35
4.- Ensayo “in vivo” de enterotoxigenidad en asa ligada de conejo.	41
5.- Evaluación de la diversidad genética mediante el análisis de macrorestricción por electroforesis en campo pulsado (PFGE).	41
6.- Análisis de los datos.	43

6.1- Análisis e interpretación de los patrones electroforéticos obtenidos por PFGE.	43
6.2- Análisis estadístico.	44
IV.- Resultados	44
1.- Identificación y caracterización feno-genotípica de los aislamientos	44
2.- Ensayo “in vivo” en asa ligada de conejo en una selección de aislamientos de <i>V. cholerae</i> no-O1 por perfil genotípico	58
3.- Análisis de la diversidad genética: aplicación de PFGE	60
V.- Discusión y Conclusiones	66
VI.- Resumen	73
VII.- Referencias bibliográficas	75
VIII.- Anexo	85

I. Introducción

1.- Género *Vibrio* spp., especie *Vibrio cholerae*: Taxonomía y antecedentes históricos.

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* que comprende, además, otros seis géneros por sus propiedades bioquímicas y estudios genéticos. Especies patogénicas para el humano han sido descritas e incluídas en tres de dichos géneros: el género tipo *Vibrio* (10 especies), *Photobacterium* y *Grimontia* (una especie de cada uno) (Abbott *et al.*, 2011). El Subcomité Internacional sobre taxonomía de *Vibrio* spp. acordó la definición para el género *Vibrio* en 1966 (Sakasaka R, 1992), siendo el porcentaje (%) molecular de guanina citosina de ADN del 38 al 51% entre las especies.

Los miembros del género *Vibrio*, son bacilos curvos Gram negativos, no esporulados, aeróbicos y facultativos anaerobios, móviles por la presencia de flagelos en medios líquidos ó sólidos. La mayoría de las especies son oxidasa positiva (excepto *V. metschnikovii*), fermentan glucosa con producción de ácido pero no gas. Su crecimiento se ve estimulado por la presencia de sodio (2 al 3%) y muchas especies son halofílicas; requiriendo un pH entre 7,6 y 8,6, su crecimiento se ve inhibido a un pH menor a 5.6 (Sakasaka R, 1992); no requieren vitaminas o aminoácidos (Farmer III *et al.*, 2003); y tienen la capacidad de digerir quitina. Una particularidad del género es que todas las especies hasta ahora estudiadas poseen dos cromosomas (Okada *et al.*, 2005): uno de mayor tamaño, entre 3 y 4 Mb, que contiene la mayoría de los genes necesarios para el crecimiento y otro pequeño de tamaño más variable (0.8 – 2.4 Mb), portador de genes que codifican para la adaptación a determinados nichos ambientales (Iida y Kurokawa, 2006).

Entre las especies patogénicas, *V. cholerae* y *V. mimicus*, pueden crecer sin la adición de cloruro de sodio al medio de cultivo, pero difieren en su crecimiento en medios con sacarosa (Manual de Procedimientos Aislamiento, Identificación, Caracterización de *Vibrio cholerae*, 2010; Abbott SL, 2011). *V. cholerae* y otras especies tales como *V. mimicus*, *V. parahemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii* y *V. harveyi* han sido asociadas a cuadros de diarrea e infecciones extraintestinales como septicemia e infecciones de tejido blando.

En base a propiedades bioquímicas pueden ser clasificadas las especies de *V. cholerae* y diferenciarse de otros organismos fenotípicamente similares tales como *Plesiomonas* y

Aeromonas también aislados de especímenes clínicos (Abbott SL, 2011; Manual de Procedimientos Aislamiento, Identificación, Caracterización de *Vibrio cholerae*, 2010).

La **especie V. cholerae** fue descrita por primera vez en 1854 por Pacini en Italia como bacilo Gram negativo, curvo, anaerobio facultativo y móvil; y en 1883 por Robert Koch, quien puso en evidencia en Egipto, en la India y Tolón (Francia), la multiplicación del “*bacilo comma*” durante la epidemia de cólera. La subcomisión para la taxonomía de *Vibrio* agrupó bajo el mismo nombre de *Vibrio cholerae* cepas fenotípicamente similares pero distintas en cuanto a su poder patogénico y potencial epidémico como *V. cholerae* serogrupo O1 y cepas pertenecientes a otros antígenos somáticos O (Dodin *et al.*, 1992), nomenclatura que aún sigue vigente.

V. cholerae serogrupo O1 se ha aislado en un contexto clínico característico y ha sido asociado como agente bacteriano a una severa enfermedad diarreica, conocida desde épocas remotas, e identificada como cólera desde 1817 (Colwell *et al.*, 1996).



Morfología de *Vibrio cholerae*. Microscopía de “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) Dr William A. Clark.

El cólera se ha presentado como una enfermedad epidémica desde la antigüedad y las manifestaciones clínicas de la infección varían desde una infección asintomática hasta diarrea severa con deshidratación. La patología en su forma más grave se caracteriza por una profusa

diarrea acuosa, vómitos y deshidratación con gran pérdida de sales y agua; y sin tratamiento podría terminar con un desenlace fatal. Estas manifestaciones clínicas fueron atribuidas a la presencia de la toxina de cólera (CT por la sigla en inglés “cholera toxin”) en *V. cholerae*, que fue demostrada en 1959 por científicos de la India (De SN, 1959). En 1987 se identificó un factor de virulencia adicional, implicado en la adherencia de *V. cholerae* a células intestinales que se denominó “toxin coregulated pilus” (TCP) (Taylor *et al.*, 1987). El espectro de enfermedad de cólera en áreas endémicas incluye infección asintomática (75%), intermedia a moderada (entre 18% al 5%) y la forma más severa (2%). Las personas infectadas que no presentan síntomas pueden excretar vibrios en sus heces durante 7 a 14 días, siendo un punto a considerar en la diseminación de la enfermedad. (Manual de procedimientos. Detección de patógenos asociados a Enfermedad Diarreica Aguda, incluyendo *Vibrio cholerae*, 2011).

Los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 han sido asociado con casos esporádicos de diarrea y con infecciones invasivas (Morris *et al.*, 1990, 1994; Janda *et al.*, 1988); y han sido reconocidos en reservorios ampliamente distribuidos en el medio ambiente acuático (Colwell *et al.*, 2006). Durante algunos años se cuestionó el potencial patogénico de *V. cholerae* no-O1, pero hoy existen evidencias de que estas cepas, aisladas tanto en el sudeste asiático donde el cólera ha sido endémico durante siglos como en áreas no endémicas, poseen codificación genética para diferentes factores de virulencia. Según datos del CDC, en los últimos años se ha incrementado el número de casos reportados de infecciones causadas por *Vibrio* spp., resultando *V. cholerae* no-O1 en tercer lugar luego de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, especies comúnmente observadas en muestras clínicas de casos notificados en EEUU (Janda *et al.*, 1988).

De acuerdo a las características del lipopolisacárido O presente en la membrana externa, *V. cholerae* se puede clasificar en más de 206 serogrupos o serovares (Yamai *et al.*, 1997). El serogrupo O1 de *V. cholerae* que se diferencia en biotipo Clásico y El Tor; por sus características feno-genotípicas; ha sido el responsable de las siete pandemias de cólera ocurridas hasta el presente y hasta el año 1992 se creía que sólo las cepas de este serogrupo podían causar brotes epidémicos y diseminación pandémica. Sin embargo, en octubre de 1992 comenzó en India, Bangladesh un brote de cólera causado por una cepa perteneciente a un serogrupo desconocido hasta ese momento, que luego se denominó O139, constituyéndose en el paradigma de una enfermedad emergente ya que se trató de un “nuevo” agente etiológico de cólera. Más tarde, se demostró que esta cepa denominada *V. cholerae* O139 Bengal resultó una variante del clon de la

séptima pandemia con un cambio a nivel del antígeno somático O (Reeves, 1998). Por otra parte, hay evidencias de cepas de los serogrupos O1 y O139 que no poseen la toxina CT aislados del ambiente y que fueron aislados de casos de diarrea en nuestro país y a nivel mundial (Pichel *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 1995; Dalsgaard *et al.*, 1996; Faruque *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2007).

Además de la emergencia del O139, otros serogrupos no-O1, no-O139 de *V. cholerae* fueron asociados a casos de cólera como el serogrupo O37 que provocó un brote en Sudán en 1968 (Zinnaka y Carpenter, 1972) y los aislamientos del serogrupo O141 que se han aislados repetidamente en los EEUU a partir de 1984 asociados a casos de cólera (Crump *et al.*, 2003). En contraste con *V. cholerae* O1, la mayoría de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de origen clínico se asocian a casos de gastroenteritis (67%) y, en inmunocomprometidos, infecciones extraintestinales como septicemia (15%), infecciones de herida (9%) y a otras infecciones extraintestinales incluyendo afección pulmonar, de oído y del tracto urinario (3%) (Daniels *et al.*, 2000).

2.- Mecanismos de patogénesis de *Vibrio cholerae*

El estudio de la distribución de los distintos genes asociados a virulencia en cepas de *V. cholerae* permite evaluar el potencial patogénico de las mismas. La mayoría de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 presentan otros mecanismos enterotoxigénicos diferentes a los asociados a cólera epidémico. A excepción de la emergencia de *V. cholerae* O139 en el continente asiático se ha reportado un bajo porcentaje de aislamientos *V. cholerae* no-O1 portadores de genes de la toxina CT y del factor de colonización TCP. Sin embargo, al estudiar aislamientos de *V. cholerae* no-O1 es importante identificar los principales factores de virulencia asociados a las cepas epidémicas de serogrupos O1/O139, con fines diferenciales en el diagnóstico y para determinar el potencial patogénico.

La toxina CT está codificada en un fago filamentoso y lisogénico llamado CTXΦ (Waldor y Mekalanos, 1996) que posee una estructura de transposón que se denominó el “cassette de virulencia” de *V. cholerae* compuesto por una región central de 4,5 kb y una o varias copias de una región regulatoria del fago RS. La región central contiene los genes *ctxAB*, que codifican para las subunidades A y B de la toxina CT, y otros genes accesorios. Por otra parte, estudios en los que se deletaron los genes que codifican para esta toxina, mostraron que estas mutantes podían aún causar diarreas leves o moderadas en voluntarios (Levine *et al.*, 1988). Esto llevó al

descubrimiento de toxinas adicionales producidas por esta especie, que se denominaron “zonula occludens toxin” (Zot) (Fasano *et al.*, 1991) y “accessory cholera enterotoxin” (Ace) (Trucksis *et al.*, 1993). El profago CTXΦ, en condiciones adecuadas puede transferirse a otras cepas de *V. cholerae* susceptibles (Waldor *et al.*, 1996; Murphy y Boyd, 2008).

Entre otros de los factores de virulencia, el factor de colonización esencial TCP, actúa además como receptor para el fago CTXΦ (Waldor *et al.*, 1996). Tanto la estructura exacta del profago, como el sitio y número de copias de éste en los cromosomas de *V. cholerae*, es variable, y constituye una de las diferencias genéticas entre las cepas del biotipo Clásico y El Tor (Nandi *et al.*, 2003). Entre las cepas biotipo El Tor, el profago CTX está localizado en un largo cromosoma (cromosoma I) 842 pb “downstream” de un críptico ligado a la toxina (TLC) que mostró ser el genoma de un fago satélite y flanqueado por secuencias repetitivas referidas como elemento RS1, otro genoma de un fago satélite. Se han determinado diferentes arreglos CTX-RS1 entre las cepas *V. cholerae* O1 El Tor.

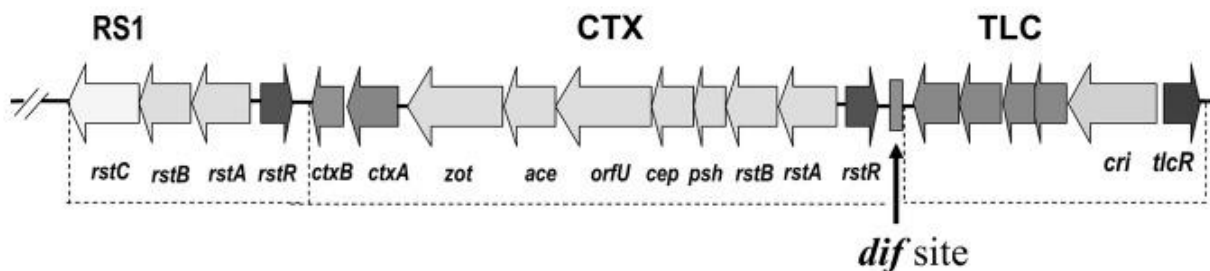


Figura N°1. Estructura cromosómica de RS1, profago CTX y grupo de genes TLC en *V. cholerae*.

Marcos de lectura abierta se muestran como flechas, y el rectángulo entre CTX y TLC representa el sitio de integración (*dif* site).

Fuente: Figura reproducida de Faruque *et al.*, 2012.

El fago CTXΦ en *V. cholerae* O1 biotipo Clásico está localizado en ambos cromosomas y sin el elemento RS1.

La adquisición de genes *ctxAB* y genes regulatorios por un profago CTX, y su integración genómica incrementan el “fitness” o capacidad de adaptación dado que CTX confiere una ventaja selectiva a la célula huésped formando lisógenos estables, induciendo la producción de CTX y promoviendo la diseminación bacteriana. Adicionalmente, estudios genómicos han identificado en cepas de la séptima pandemia, islas genómicas denominadas VSP-I y VSP-II que

también estarían involucradas en el “fitness” evolutivo y la diseminación de este clon. Se ha demostrado que estas islas se escinden y forman productos extracromosomales y pueden ser transferidas horizontalmente a otras cepas de *V. cholerae* susceptibles (Faruque *et al.*, 2012).

Aunque se ha demostrado que *V. cholerae* produce una variedad de productos extracelulares que tienen efectos deletéreos sobre las células eucariotas; la diarrea masiva inducida por esta bacteria es causada por la toxina de cólera (CT), cuyo blanco intracelular es la adenilato ciclasa (Kaper *et al.*, 1994). La toxina CT es una toxina ADP-ribosilante compuesta por dos subunidades, secretada por la bacteria mediante un sistema de secreción de tipo II (Thiagarajah y Verkman, 2005). La subunidad B forma un pentámero y se une a los receptores gangliósidos GM₁ de los enterocitos (Figura N°2). Esto acerca a la subunidad A (que se ha clivado en las subunidades A₁ y A₂) a la superficie celular. El complejo GM₁-CT es traslocado por la membrana y entra al sistema de tráfico celular por endocitosis. Al llegar al retículo endoplasmático, la subunidad A₁ se separa del complejo y se trasloca al citosol. Esta subunidad actúa ribosilando la cadena α de la proteína G_s que altera su conformación y no puede hidrolizar su GTP lo que resulta en la activación sostenida de la adenilato ciclasa provocando un aumento de AMP cíclico que aumenta la secreción de cloruros. A su vez, se bloquean los canales que absorben sodio y cloruros. Esto provoca un flujo de agua y electrolitos desde la sangre y tejidos corporales hacia el lumen.

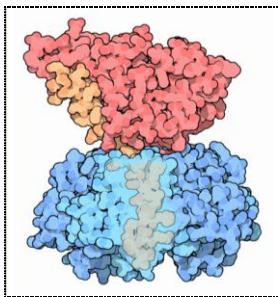


Figura N°2. Toxina de cólera (cholera toxin, CT).

Subunidad A, rojo y naranja, enzimática

Subunidad B (pentamérica), azul, de unión al receptor

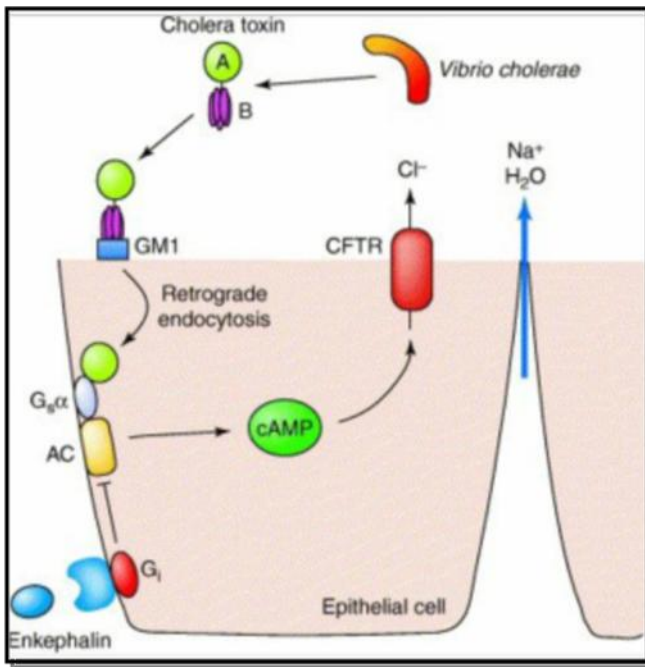


Figura N°3. Esquema de acción de la toxina de cólera.

Referencias: AC adenilato ciclasa; CFTR regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (canal de cloruros).

Fuente: Figura reproducida de Thiagarajah y Verkman, 2005.

Estudios a nivel genómico, han detectado polimorfismo a nivel de la subunidad B de la toxina de cólera (*ctxB*) en aislamientos de *V. cholerae* O1 recuperados de la India, y más recientemente de Nigeria, Sudán, Etiopía, Nepal y del brote epidémico en Haití. Esta última cepa de *V. cholerae* O1 que presenta atributos del biotipo Clásico y características del “fitness” ambiental del biotipo El Tor; ha sido denominada como *V. cholerae* El Tor alterado o híbrido (Hasan *et al.*, 2012). Para esta variante de *V. cholerae* y otras identificadas en regiones endémicas, se han desarrollado técnicas basadas en PCR para la diferenciación a nivel de biotipo de la toxina CT (Morita *et al.*, 2008).

La limitada distribución de CTXΦ entre los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 no-O139 es posiblemente a causa de la baja distribución de TCP, receptor para CTXΦ, en estas cepas (Faruque *et al.*, 2012), aunque se han identificado cepas *V. cholerae* no-O1 toxigénicas principalmente en países endémicos para cólera, evidenciando la transferencia genética entre aislamientos.

La proteína estructural de la fimbria TCP está codificada en el gen *tcpA*, en la isla de patogenicidad VPI por “*Vibrio* Pathogenicity Island”, (Faruque *et al.*; 1998) y presenta alta variabilidad según lo descrito recientemente (Nandi *et al.*, 2000). Esta hipervariabilidad en la superficie de la bacteria le permite escapar del reconocimiento por el sistema inmune del huésped.

Además de codificar para el pili TCP, la isla VPI de 40 kb, posee un grupo de genes que codifican para un factor de colonización accesorio ACF y genes reguladores como *toxT*, *tcpI*, *tcpP* y *tcpH* que participan de la cascada reguladora de ToxR, genes que codifican para integrasas y transposasas relacionados con movilidad (*int*) y otros genes de función desconocida como *aldA* (aldehído dehidrogenasa). *TcpI* es un regulador negativo de *tcpA*, subunidad estructural de la fimbria TCP, que se localiza en la membrana interna, tiene alta homología con proteínas de quimiotaxisceptoras de metilos (MCPs) (sensores ambientales) y es activado en ambientes alcalinos (Häse *et al.*, 1998). La presencia de los genes de la isla VPI-1 está asociada a funciones de adherencia, liberación de la toxina CT, formación de biofilms y expresión del receptor del fago CTXΦ.

A nivel diagnóstico, la aplicación de técnicas basadas en PCR permiten la diferenciación de los *tcpA* alelos específicos de biotipos El Tor / Clásico, como la identificación del gen regulador *tcpI* y los genes *ald* e *int*, como marcadores de la isla VPI (Vital Brazil *et al.*, 2002).

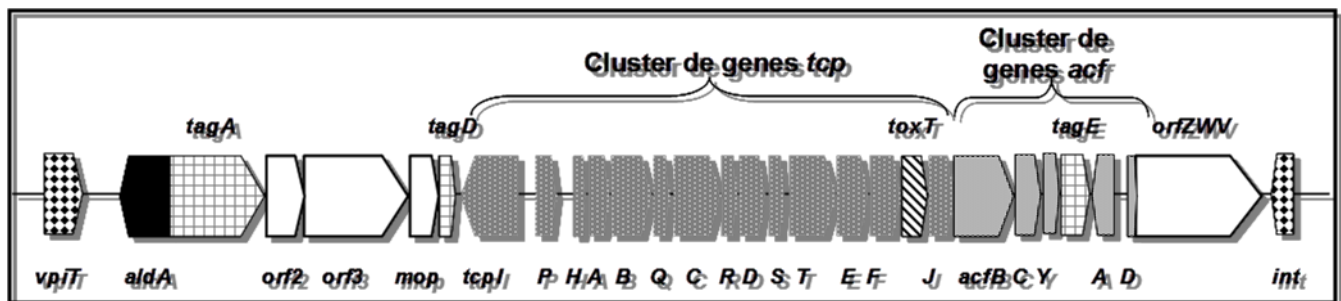


Figura N°4. Representación esquemática de la isla VPI-1 de la cepa *V. cholerae* O1 El Tor N16961.

Se ha demostrado que la isla VPI-1 puede ser transferida entre aislamientos del serogrupo O1 (O'Shea y Boyd, 2002) y también hay evidencias de que VPI-1 se escinde y circulariza (Rajanna *et al.*, 2003).

Entre otros factores asociados a adherencia, se ha descrito una neuraminidasa codificada en la isla de patogenicidad (VPI-2), que cliva el ácido siálico de los gangliósidos presentes en las células eucariotas (Jermyn WS, 2002). Se cree que esta enzima aumenta la sensibilidad de las células hospedadoras a la toxina CT, ya que expone al gangliósido GM₁, receptor de la toxina. La neuraminidasa está habitualmente asociada a cepas toxigénicas; sin embargo, también ha sido descrita en aislamientos de *V. cholerae* O1 no toxigénicos como en la variante Amazonia (Figueiredo SC, 2005).

Por otra parte, la hemaglutinina / proteasa codificada por el gen *hap* tiene un rol relevante para *V. cholerae* en el medio ambiental. Además de CT y TCP, otros factores de virulencia han sido identificados en aislamientos de *V. cholerae* tales como: proteína reguladora (ToxR), hemolisinas (HLY), citotoxinas (RTX) y toxina termoestable (ST) entre otros.

ToxR, es una proteína de trans-membrana que funciona como un regulador que participa en la activación de la expresión de los genes de virulencia que codifican para CT, TCP y otros factores de colonización accesorios (Childers y Klose, 2007). La transcripción de los genes del regulón ToxR responde a diversos estímulos ambientales por mecanismos no caracterizados en los que intervendría la presencia de mucus, sales biliares y condiciones de pH, osmolaridad y temperatura.

La hemolisina El Tor o citolisina de *Vibrio cholerae* (VCC), ha sido ampliamente estudiada. Esta proteína identificada en *V. cholerae* O1 biotipo “El Tor”, ha sido purificada y caracterizada como una “pore-forming toxin” (toxina formadora de poro), citolisina que tiene la capacidad de permeabilizar células eucariotas al formar poros heptaméricos de diámetro interno de 1-2 nm en la membrana en un mecanismo dependiente del colesterol (Zitser *et al.*, 1999) que ha sido demostrado en varias líneas celulares (Chinen *et al.*, 1996; Zitser *et al.*, 1997). Diversos estudios reportaron efectos citotóxicos y de vacuolización *in vitro*, con variantes que dependen de la línea celular utilizada y la concentración de citolisina (Coelho *et al.*, 2000; Figueroa-Arredondo *et al.*, 2001; Mitra *et al.*, 2000; Moschioni *et al.*, 2002).

Saka y col. (2007) propusieron un modelo en que el fenómeno de vacuolización se debe a la respuesta celular en defensa a la alteración del balance osmótico por VCC, por el que la célula endocita la citolisina que luego entra en la vía autofágica que lleva a la degradación de VCC y a la supervivencia de la célula, pero cuando los niveles de VCC son demasiado altos, la célula no logra compensar el desbalance osmótico y muere. Más recientemente, Saka y col. (2008) reportaron que VCC produce apoptosis dependiente de la formación de poros en el modelo de

asa ligada de conejo, donde hay acortamiento de las vellosidades intestinales y alteraciones vasculares, sugiriendo que esta citolisina puede estar cumpliendo un rol en la patogénesis de las cepas CT negativas. Esta citolisina es expresada por la mayoría de los aislamientos de *V. cholerae* biotipo El Tor y asociada a la virulencia de *V. cholerae* no-O1. Por el contrario las cepas del biotipo Clásico poseen una delección de 11 pb (Rader y Murphy, 1988) en el gen *hlyA*, por lo que sólo producen una proteína truncada. El gen *hlyA* se encuentra en el cromosoma II y codifica para una pro-proteína de 80 kDa.

Entre otros factores de virulencia, se pueden mencionar la toxina termoestable (NAG-ST) originalmente recuperada de *V. cholerae* no-O1 denominado entonces “no aglutinable” (Nair *et al.*, 1994). Esta hemolisina es capaz de causar acumulación de fluidos en ensayos realizados en conejo, pero a diferencia de la respuesta a CT, el fluido es sanguinolento y con mucus (Kaper *et al.*, 1994). Estudios en voluntarios han mostrado claramente que NAG-ST juega un rol en la patogénesis de la gastroenteritis provocada por *V. cholerae* no-O1 (Nair *et al.*, 1994) ya que actúa estimulando la actividad de guanilato ciclase que induce la absorción de calcio extracelular, promoviendo la secreción de cloruros y bicarbonato con alteración generalizada de las proteínas de membrana y/o inhibiendo la absorción de Na⁺ y agua (Hoque *et al.*, 2004).

La toxina NAG-ST, codificada por el gen *stn/sto* es un péptido de 17 aminoácidos semejante a la toxina termoestable ST de *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC), siendo también resistente al calentamiento a 100°C (Arita *et al.*, 1986) y se encuentra en un bajo porcentaje de cepas de *V. cholerae* no-O1.

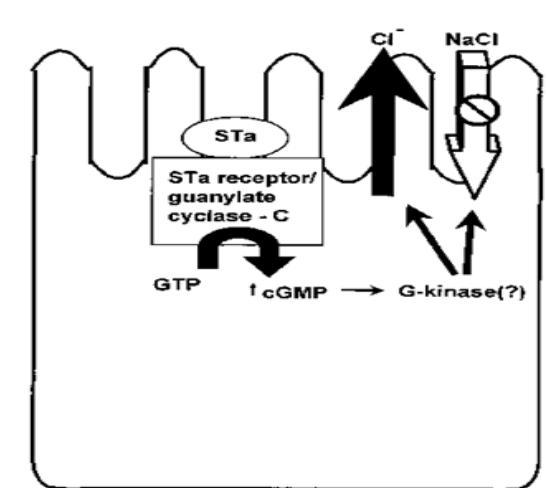


Figura N°5. Mecanismo de patogénesis de NAG-ST

Fuente: Figura según Guandalini S *et al.*, 1982; Manual de Procedimientos. Detección de patógenos asociados a Enfermedad Diarreica Aguda, incluyendo *Vibrio cholerae*. Bs As, 2011.

Otro de los factores asociados a patogenicidad de *V. cholerae*, es la denominada citotoxina de la familia “repeats-in-toxin” (RTX). **RTX** es un polipéptido de gran tamaño, 484 kDa que produce “cross-linking” de filamentos de actina, formando dímeros, trímeros y multímeros de actina que provocan la despolimerización de las fibras y redondeamiento de las células eucariotas (Fullner y Mekalanos, 2000; Sheahan *et al.*, 2004). Esta unión con los filamentos de actina causa un incremento en la permeabilidad llevando al daño del tejido e inducción de respuesta inflamatoria asociados con citotoxicidad en células Hep-2 (Lin *et al.*, 1999; Fullner *et al.*, 2000). La citotoxina RTX está codificada por el gen *rtxA* de 13.635 pb, que forma parte de un grupo de genes *rtxA*, *B*, *C*, *D*, *E* organizados en dos operones que se encuentran río abajo del elemento CTX (Boardman *et al.*, 2004). Este grupo de genes no es funcional en las cepas de *V. cholerae* del biotipo Clásico por mutaciones presentes en los genes *rtxABC*.

Estudios realizados en el análisis de la secuencia genómica de *V. cholerae* no-O1 no-O139 con actividad patogénica en animales sugieren que estas cepas son portadoras de un sistema de secreción tipo III (TTSS) dentro de la región VPI-2 codificado por genes *vcs* y relacionados al “cluster” TTSS2 identificado en un clon pandémico de *Vibrio parahaemolyticus* (Dziejman *et al.*, 2005). **TTSSs**, sistema de secreción de tipo III es un complejo especializado de secreción utilizado por bacterias Gram-negativas para traslocar factores de virulencia o proteínas efectoras directamente a las células hospedadoras donde alteran la maquinaria celular en su propio beneficio (Galán y Wolf-Watz, 2006; Dziejman *et al.*, 2005). Se observó que este grupo de genes estaba presente en diferentes aislamientos de *V. cholerae* no-O1 no-O139 de origen humano y ambiental, y proponen que dicho sistema puede tener una función en la virulencia y en la capacidad de supervivencia de la bacteria.

A nivel diagnóstico la utilización de técnicas moleculares para la caracterización de aislamientos *V. cholerae* no-O1 CT y/o TCP positiva que ponen en evidencian la transferencia genética de elementos genéticos móviles se puede completar con la determinación de los denominados marcadores genotípicos de biotipo Clásico/El Tor (CL/ET). Entre ellos: el gen *tcpA* alelo CL/ET; el gen *ctxB* CL/ET de la subunidad B de la toxina de cólera; el gen *rstR* CL/ET, regulador transcripcional del fago (Morita *et al.*, 2008, Alam *et al.*, 2010), y la identificación de islas genómicas VSP-I y VSP-II por “*Vibrio* Seventh Pandemic Island” principalmente asociadas a cepas pandémicas de *V. cholerae* (Faruque *et al.*, 2012)

El estudio de estos genes, como también los demás genes descritos, asociados a virulencia podría indicar el potencial patogénico de los aislamientos *V. cholerae* no-O1.

3.- *Vibrio cholerae* no-O1

Vibrio cholerae no-O1 ha sido asociado con casos de gastroenteritis e infecciones extraintestinales; y con cuadros de septicemia registrados en pacientes inmunocomprometidos. La infección es adquirida por consumo de mariscos y/o de agua contaminados. También se han descrito, al igual que en otras especies de *Vibrio* naturales de ambientes acuáticos, infecciones de heridas y tejido blando, por exposición de la piel injuriada al agua.

La mayoría de las infecciones ocurren en los meses cálidos, aunque se presentan casos durante todas las estaciones. Puede ocurrir la transmisión persona a persona e inclusive se ha reportado el estado de portador con un corto periodo de excreción (1 a 7 días) de los microorganismos, y con mayor tiempo de excreción en portadores crónicos con infección biliar crónica (Sanyal *et al.*, 1992).

En las áreas endémicas para cólera, como en India, se identificó *V. cholerae* no-O1 asociado a casos de diarrea aguda en el 30% del total de pacientes hospitalizados con muestras positivas para *V. cholerae* (Chatterjee *et al.*, 2009).

En las áreas geográficas no endémicas para cólera, como EEUU, los casos de gastroenteritis asociada a *V. cholerae* no-O1 predominan sobre las infecciones de *V. cholerae* O1, siendo los casos de diarrea de menor severidad (Janda *et al.*, 1988).

En el brote epidémico de Haití del año 2010 se identificó *V. cholerae* O1 como agente causal y simultáneamente en ese período se recuperaron aislamientos de *V. cholerae* no-O1 en el 21% de las muestras clínicas (Hasan *et al.*, 2012).

En nuestro país, a partir del año 1992 con la emergencia de *V. cholerae* O1, *V. cholerae* no-O1 fue investigado y se determinó su presencia tanto en muestras clínicas como ambientales (Rivas *et al.*, 1996).

Aunque *V. cholerae* no-O1 han sido implicado principalmente como agente etiológico de casos esporádicos, se han reportado brotes de diarrea con síntomas desde mediana a severa deshidratación, incluso “cholera-like disease” (cuadros similares a cólera) en países como India, Sudán, Checoslovaquia, EEUU y otros países de América (Chatterjee, *et al.* 2009; Dalsgaard *et al.*, 1995, Rivas *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 1998). Estos brotes fueron registrados en diferentes ambientes, incluyendo cruceros, centros sanitarios y en el contexto de la comunidad.

Entre los serogrupos de *V. cholerae* no-O1 que han sido implicados como causales de enfermedad “cholera-like”; se han reportado los serogrupos O141 y O75 en EEUU y en otras regiones endémicas (Dalsgaard *et al.*, 2001); O37 en Sudán y Checoslovaquia (Chatterjee *et al.* 2009). Otros serogrupos asociados a casos de diarrea en diferentes países fueron entre otros, O10 y O12 aislados en Perú en 1994 (Dalsgaard *et al.*, 1995); O10 en India, y brotes causados por cepas de múltiples serogrupos como el ocurrido en India en 1996 (Sharma *et al.*, 1998).

En Tailandia se identificaron aislamientos de *V. cholerae* no-O1 NAG-ST asociados a un brote epidémico que ocurrió en un campo de refugiados en el año 1990 (Bagchi *et al.*, 1993). Estudios realizados en esa región, de muestras clínicas, ambientales y muestreos del área de producción de camarones entre los años 1992 al 1993, determinaron la prevalencia de *V. cholerae* positivos para la enterotoxina NAG-ST asociados principalmente a los serogrupos O6 y O14 (Dalsgaard *et al.*, 1995).

Se han reportado otros serogrupos de *V. cholerae* con potencial patogénico por la detección de genes asociados a virulencia principalmente en países de regiones endémicas: por ej. un “cluster” (grupo) de aislamientos *V. cholerae* con la isla de patogenicidad VPI (serogrupos O77, O80, O115), *V. cholerae* VPI - profago CTX (serogrupos O53, O65, O48) ó *V. cholerae* VPI - profago CTX Φ (serogrupos O27, O37, O8, O26, O44, O49, O105, O141 y O191). Estos estudios señalan que la presencia de genes *ctxAB* (fago CTX Φ) y/o *tcpA* (TCPI) en *V. cholerae* es crítica por la información del potencial patogénico. En adición, el análisis genómico comparativo realizado por diferentes grupos de trabajo ha permitido diferenciar cepas pandémicas *V. cholerae* O1/O139 y otros serogrupos con el mismo “background” genético tales como O27, O37, O53 y O65 de otros cepas no epidémicas asociadas a varios serogrupos de *V. cholerae* (Dziejman *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002).

4.- Manifestaciones clínicas de *V. cholerae* no-O1

Los cuadros de gastroenteritis causados por infección por *V. cholerae* no-O1 cursan con síntomas de diferente grado de severidad, desde moderado a severo, presentándose en general como diarrea acuosa; y en baja proporción como diarrea sanguinolenta (Janda *et al.*, 1988; Sanyal *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1994; Daniels *et al.*, 2000; González Fraga *et al.*, 2009). La gastroenteritis por *V. cholerae* no-O1 suele ser autolimitada y se presenta con dolores

abdominales; que pueden estar acompañados por vómitos, calambres y ocasionalmente con fiebre. Como se mencionó antes, algunas cepas pueden desencadenar cuadros de diarrea severa denominada “cholera-like disease”, con un mayor grado de deshidratación; estos cuadros estarían asociados a factores de virulencia enterotóxicos en las cepas causales y/o al estado del huésped. En pacientes inmunocomprometidos y con enfermedades de base se han registrado casos de septicemia e infecciones extraintestinales por *V. cholerae* no-O1.

Entre las infecciones extra-intestinales se han citado una variedad de infecciones tales como: apendicitis aguda, peritonitis, colecistitis aguda, otitis media, neumonía, meningoencefalitis, septicemia (Sanyal *et al.*, 1992; Kahn *et al.*, 2007) y menos común de tejido blando, celulitis y fasciitis necrotizante (Daniels *et al.*, 2000). Los casos de bacteriemia han sido asociadas con inmunosupresión, HIV, cuadros oncohematológicos, enfermedad vascular periférica, diabetes, gastrectomía, hepatopatías y cirrosis (Janda *et al.*, 1988; Morris *et al.*, 1990; Blanche *et al.*, 1994; Calduch Broseta *et al.*, 2003; El-Hiday AH *et al.*, 2006; Zárate *et al.*, 2011). El grado de fatalidad en pacientes cirróticos con bacteriemia por *V. cholerae* no-O1 ha sido reportado desde un 23,8% al 61,5%. (Safrin *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1996). Estas lesiones indicarían que estas cepas podrían tener propiedades invasivas en adición a su enterotoxigenidad (Sharma *et al.*, 1998). En los últimos años, la disponibilidad del uso de equipos automatizados para diagnóstico microbiológico en los laboratorios clínicos, ha facilitado la identificación de *V. cholerae* no-O1 como agente causal de infecciones extraintestinales, celulitis, infecciones de oído, heridas; así como asociadas a sepsis en pacientes con inmunosupresión o enfermedad hepática de base (Morris *et al.*, 1990).

El amplio rango en la presentación de los síntomas observado en las infecciones por *V. cholerae* no-O1 en pacientes inmunocompetentes, es probablemente relacionado a la presencia o ausencia de varios factores de virulencia, indicando otros mecanismos enterotoxigénicos diferentes a los casos de cólera (Janda *et al.*, 1988). En contraste con las cepas epidémicas de *V. cholerae* O1 o O139; la patogénesis y los factores de virulencia de *V. cholerae* no-O1 con capacidad para causar enfermedad diarreica no está claramente definida.

Por lo tanto la ocurrencia de enfermedades asociadas a la infección por *V. cholerae* depende de la particular combinación de genes de virulencia en la cepa infectante con el estado de salud del huésped ante la exposición a una fuente ambiental y/o alimento contaminado.

5.- Ecología de *V. cholerae*

V. cholerae es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, tanto ríos y lagos, como estuarios y ambientes marinos. El medio acuático ha sido reconocido como reservorio y vehículo para la transmisión de *V. cholerae* en numerosos estudios y diferentes áreas geográficas (Colwell *et al.*, 1996). Los más importantes moduladores de la concentración ambiental de *Vibrio* spp. son la temperatura y salinidad del agua, con registros de alto número de microorganismos en aguas de 17°C a 35°C conteniendo 2 a 25% de salinidad (Janda *et al.*, 1988). Si bien especies de *Vibrio* tales como *V. cholerae* y *V. mimicus* requieren mínimas cantidades de sodio, estos microorganismos pueden ser encontrados en ríos y lagos, especialmente en áreas de estuario, además de los ambientes marinos.

En el ambiente *Vibrio cholerae* pueden entrar en un estado referido como viable pero no cultivable (VNC), en respuesta a condiciones desfavorables de nutrientes y ambientales: baja concentración de nutrientes, temperatura, pH o salinidad distintos a los óptimos (Colwell *et al.*, 1994, 2006) y en la que aún retiene el proceso metabólico básico. Se postula que las formas VNC explicarían la manera en que *V. cholerae* se mantiene en el ambiente durante los períodos inter-epidémicos. La asociación con el fito y zooplancton, en particular con copépodos, a través de la actividad quitinasa de *Vibrio cholerae*, facilitaría la sobrevivencia del microorganismo en el ambiente acuático, asegurando su persistencia por largo tiempo en condiciones adversas. En condiciones adecuadas, las formas VNC pueden revertir al estado cultivable, manifestando plenamente su capacidad de infección, patogenicidad y transmisibilidad.

V. cholerae como reservorio de diferentes genes de virulencia en el ambiente ha sido investigado en diferentes áreas de la Región y otros continentes representando un potencial riesgo para la salud humana (Binsztein *et al.*, 2004; González Fraga *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2001; Alam *et al.*, 2006).

En estudios posteriores a los brotes epidémicos de la década de los 90' de Argentina, se realizaron muestreos ambientales como parte de la vigilancia en el área estuarial del Río de la Plata y en la plataforma marina bonaerense en Argentina. Los resultados demostraron la presencia de *V. cholerae* asociado a fitoplancton y zooplancton durante todas las estaciones y se observó que en este estado *V. cholerae* puede persistir en un amplio rango de salinidad y temperatura. Además se recuperaron aislamientos de *V. cholerae* no-O1 cultivable durante los meses cálidos en aguas de baja salinidad del área estuarial (Binsztein *et al.*, 2004).

Otros estudios de muestreo ambiental realizados en los ríos Salí y Lules de la provincia de Tucumán, mostraron que en el 37% de las muestras de VNC que confirmaron el antígeno somático O1 por inmunofluorescencia y PCR fueron negativas para los factores de virulencia asociados a cólera epidémico (*ctxA* y *tcpA* alelo El Tor) (Aulet *et al.*, 2007). Adicionalmente fue recuperado *V. cholerae* no-O1 no-O139 cultivable en el 36% de las muestras analizadas. De la investigación realizada en el norte del país, se puede inferir que los ríos son reservorios de cepas de *V. cholerae*, donde las altas temperaturas con alta concentración de nutrientes orgánicos podrían permitir la persistencia en el ambiente. Si bien, en ninguno de los aislamientos *V. cholerae* no-O1 no-O139 fueron detectados los factores de virulencia asociados a los de cólera epidémico; el factor de virulencia mayormente determinado fue la hemolisina y se encontraron otros genes asociados a virulencia, identificados en menor frecuencia (*toxR*, *stn* y *tcpI*). También se determinó resistencia a ampicilina en 21 a 45% de los aislamientos en diferentes muestreos. A continuación se muestran los sitios de muestreo como parte del monitoreo ambiental realizado en el país.



Figura N°6 - Mapa que señala las zonas de muestreo en los ríos de la Provincia de Tucumán (*), en el Río de la Plata (zona A, ■), en la zona estuarial (zona B, △) y en la zona marina (zona C, + y la estación fija, ●) de la Provincia de Buenos Aires.

Fuente: Figura traducida de González Fraga *et al.*, 2007.

A nivel regional, en estudios realizados en muestras ambientales de Brasil (agua marina, agua residual, de ríos, sedimentos marinos y moluscos) los genes *ctx* y *tcp* fueron identificados en todos los aislamientos *V. cholerae* O1/O139 del estudio, junto con los genes *tcpI*, el regulador *toxR* y el gen de la hemolisina *hly*. Entre los aislamientos *V. cholerae* no-O1 (n=39) la frecuencia de ocurrencia de los genes fue 98,8% para *toxR*; 97,1% para *hly* y 0,6% para *ctxAB*, con una baja frecuencia de combinación *ctxA* / *tcpA* alelo Clásico y *ctxA* / *tcpA* alelo El Tor.

Un hallazgo de interés fue la identificación de cepas *V. cholerae* no-O1 negativas para *ctxAB* pero portadoras de los genes *tcpA* alelo El Tor (9/39), y en menor frecuencia *tcpA* alelo Clásico (2/39) indicando la presencia de cepas ambientales con otro potencial patogénico (Rivera *et.al.*, 2001).

Estudios ambientales realizados en Bangladesh, en áreas endémicas para *V. cholerae*, usando como técnica de tamizaje PCR para los genes *ctxA* y *rfb* para los serogrupos O1/O139 asociados a cólera epidémico identificaron un reservorio alternativo para el gen *ctx*, debido a que algunos aislamientos ambientales de *V. cholerae* no-O1 resultaron portadores del gen de la toxina (Alam *et.al.*, 2006).

Otro estudio realizado en muestras provenientes de sistemas de acuicultura de camarones de una zona costera de la India identificó por PCR *V. cholerae* no-O1 positivo para el gen *ctx* en 7% de las muestras de agua del estanque (7/42), mostrando el uso de técnicas moleculares como tamizaje en el análisis de riesgo de muestras de peces y crustáceos para determinar cepas potencialmente patógenas (Madhusudana *et al.*, 2013).

6.- Transmisión de *V. cholerae*

Según lo referido anteriormente, los ecosistemas acuáticos actúan como reservorios y vehículos de transmisión de *V. cholerae*, ya que constituyen su hábitat natural.

La infección por *V. cholerae* es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados consumidos crudos o insuficientemente cocidos. Uno de los tipos de alimento involucrados son los moluscos bivalvos que se contaminan en el medio marino, como almejas, ostras y mejillones. En estos bivalvos, *V. cholerae* puede ser no sólo contaminante de superficie, sino estar presente en su tracto intestinal, ya que estas especies son filtradoras y concentran el microorganismo (Costagliola y col., 2000). Los mariscos llegan a concentrar 300 veces en 24 hs las bacterias del

agua contaminada, lo que reduce el plazo de aparición de los síntomas en el caso de intoxicación alimentaria. Los productos alimenticios de origen marino como las algas, los residuos de peces, pueden estar contaminados con *Vibrio* spp. y por lo tanto, también los productos desecados que derivan de ellos, harina de pescado o algas secas (Dodin, 1992).

El riesgo de exposición a *V. cholerae* ambiental ha ido incrementándose en la población inmunocompetente por mayor movilización de personas a lugares endémicos, consumo de mariscos crudos o semicocidos contaminados, y el uso de agua recreacional contaminada. Además se ha identificado la susceptibilidad a las infecciones por *V. cholerae* de la población inmunocomprometida que puede presentar cuadros más severos ante la misma fuente de infección (Janda *et al.*, 1988). Los pacientes con enfermedades de base en el hígado, como cirrosis, y/o enfermedad maligna hematológica han sido descriptos como de alto riesgo para bacteriemia por *V. cholerae* no-O1 (Abbott *et al.*, 2011).

7.- Epidemiología de *V. cholerae*

La naturaleza autóctona de *V. cholerae* O1 es un importante factor en la epidemiología del cólera, principalmente en las áreas endémicas. En las áreas consideradas no endémicas para cólera, es importante considerar los antecedentes de la región, teniendo en cuenta la posibilidad de forma viables VNC y/o reservorios ambientales de genes de virulencia que podrían hacer factible la emergencia de nuevas variantes de *V. cholerae*.

A raíz de la séptima pandemia que comenzó en el sur de Asia en 1961 y llegó a África en 1971, el cólera reemergió en América Latina en enero de 1991 (Levine *et al.*, 1991), luego de 100 años, en forma de una explosiva epidemia que comenzó en Perú. En Argentina, entre 1992 y 1999 ocurrieron siete brotes de cólera, principalmente en el norte del país, y en períodos estivales. La emergencia de *V. cholerae* biotipo El Tor y su diseminación, está asociada con diversificación genómica progresiva, adquisición de elementos genéticos móviles y adaptación a diferentes ambientes a partir de un ancestro (Taviani *et al.*, 2010; Mujetra *et al.*, 2011; Faruque *et al.*, 2012). Estudios recientes; (Garza *et al.*, 2012) identificaron una isla genómica denominada WASA (West African-SouthAmerican) asociada a la cepa epidémica de Latinoamérica que se diferencia de otras cepas epidémicas por la adquisición de un bacteriófago que acarrea genes posiblemente relacionados con el “fitness” bacteriano y supervivencia en el medio ambiente. Se realizaron estudios para determinar la prevalencia de este fago en cepas epidémicas de América Latina

aplicando PCR dirigida a tres genes del genoma bacteriano del fago: glycosil hidrolasa, RNA polimerasa y una enzima kinasa, resultando positivas cepas de Perú, Guyana y Brasil aisladas entre 1991 y 2004; y negativas cepas epidémicas de Asia y Africa. Las características singulares a nivel genómico de la cepa epidémica de *V. cholerae* de América Latina, refuerza la hipótesis monofilética de esa epidemia. Este linaje se demostró que acarrea genes del fago y de una isla de patogenicidad alterada de la séptima pandemia denominada VSP-II (Garza *et al.*, 2012). Así, la identificación de la islas VSP-I, VSP-II permite caracterizar distintas variantes del clon epidémico *V. cholerae* El Tor de la séptima pandemia (Dziejman *et al.*, 2002).

En áreas donde el cólera es endémico, *V. cholerae* es un agente etiológico de diarrea comúnmente aislado en niños y adultos (Faruque *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1998; Abott *et al.*, 2011); con una incidencia del 30% de *V. cholerae* no-O1 de casos de diarrea aguda del total de aislamientos de *V. cholerae* recuperados de la India (Chatterjee *et al.*, 2009).

Actualmente en la región de América se ha reportado la emergencia de la variante *Vibrio cholerae* O1 en Haití en octubre del 2010 (Ali *et al.*; 2011), referida como *V. cholerae* El Tor alterado o híbrido (Hasan *et al.*, 2012). Luego del terremoto en enero de 2010, el 21 de Octubre de ese año se confirma el brote de cólera y al 27 de octubre se registraron 4.722 casos y 303 muertes, que afectó principalmente a mayores de 5 años, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2010. Desde noviembre a diciembre ocurre diseminación a todo el país y se detectaron casos en países vecinos de la región, como República Dominicana, Cuba y México. Hasta la semana epidemiológica (SE) 48 de 2015 se notificó un total de 30.654 casos de cólera en tres países de América Central: Cuba (65), Haití (30.080) y República Dominicana (509). Haití concentra el 98% del total de casos notificados en la región según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2015. En el contexto del brote epidémico de Haití se identificaron principalmente aislamientos de *V. cholerae* O1 y simultáneamente aislamientos de *V. cholerae* no-O1 no-O139 (Hasan *et al.*, 2012).

En nuestro país, la vigilancia activa realizada en los años 90' permitió la detección de *V. cholerae* no-O1 junto a las cepas epidémicas O1. Posteriormente sólo se detectaron algunos casos de cólera esporádicos en los años 1999 y 2005, y *V. cholerae* no-O1 se continuó recuperando de aislamientos humanos y ambientales con menor frecuencia en el marco de una vigilancia nacional sistemática pero menos intensiva (Moroni y col., 2014).

8.- Diversidad genética de *Vibrio cholerae*

El estudio de la diversidad genética permite establecer relaciones entre los aislamientos de *V. cholerae*. Diferentes técnicas de subtipificación se han aplicado para investigaciones epidemiológicas y estudios evolutivos principalmente de los serogrupos asociados a brotes epidémicos como O1 y O139. Estudios que se han extendido también a otros serogrupos de *V. cholerae* asociados a casos esporádicos y brotes (Sharma *et al.*, 1998; Beltrán *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2012; Rahaman *et al.*, 2015). Entre las diferentes técnicas de subtipificación molecular se destacan ribotipificación, electroforesis en campo pulsado (PFGE, de “pulsed-field gel electrophoresis”) (Mahaligam *et al.*, 1994, Cameron *et al.*, 1994; Dalsgaard *et al.*, 1995, 1996; Kam *et al.*, 2003) y técnicas basadas en PCR (Singh *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 1998; Pichel *et al.*, 2003); mientras que MLST (multilocus sequence typing) se ha aplicado para estudios evolutivos de *V. cholerae* (Kotetishvili *et al.*, 2003; González Fraga, 2010).

PFGE ha mostrado ser altamente discriminatorio para la subtipificación molecular de aislamientos de *V. cholerae* O1 y O139 asociados a epidemia. Esta metodología ha sido usada para vigilancia epidemiológica molecular en el monitoreo de la diseminación de este patógeno como en la emergencia de nuevos clones epidémicos. Por esta técnica, se evidenció que los aislamientos de *V. cholerae* O139 identificados en Asia resultaron relacionados genéticamente con los aislamientos del serogrupo O1 asociado a la séptima pandemia, aunque desde 1992 han surgido nuevas variantes de este patógeno (Faruque *et al.*, 1994; Faruque *et al.*, 2003). Estos mismos resultados se han observado utilizando técnicas más modernas que estudian los polimorfismos en las secuencias repetitivas (Danin-Poleg *et al.*, 2007) o analizando la composición de cassettes de genes móviles en el integrón de *V. cholerae* (Labbate *et al.*, 2007; Quiroga, 2010).

Estudios de MLST y RFLP (restriction fragment length polymorphism analyses) permitieron determinar linajes diferentes entre las cepas de distintos serogrupos de *V. cholerae* asociados a casos “cholera like disease” procedentes de diferentes países de áreas endémicas de India, Tailandia, China, Corea. Se identificaron aislamientos *V. cholerae* VPI, CTX de los serogrupos O27, O37, O53, y O65 que formaron parte del “cluster” de las cepas epidémicas y aislamientos de *V. cholerae* VPI (n=11), de los cuales 7/11 CTX de los serogrupos O8, O26, O44, O48, O49,

O77, O80, O105, O115, O141 O191 resultaron de “background” genético diferente respecto a cepas epidémicas (Li *et al.*, 2002).

Estudios de análisis genómico comparativo demostraron la presencia en aislamientos de *V. cholerae* O139 de origen humano y ambiental de la isla de patogenicidad de la séptima pandemia VSP-II asociada al clon pandémico *V. cholerae* O1, y entre los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 no-O139 fueron identificadas en un bajo porcentaje variantes de VSP-II asociadas a cepas no epidémicas (Taviani *et al.*, 2010).

En nuestro país se comenzó estudiando la diversidad genética de los aislamientos de *V. cholerae* O1 de la epidemia de cólera y de la “variante de Tucumán” (*V. cholerae* O1 CT negativa) con técnicas basadas en PCR como RAPD (Pichel *et al.*, 2003). Luego se implementó PFGE según Dalsgaard, 1996; y desde 2007 el protocolo estandarizado que se utiliza para la vigilancia molecular en el marco de la Red PulseNet (Cooper *et al.*, 2006). Esta técnica, se aplicó en aislamientos del serogrupo O1 asociados a brotes epidémicos del país, como a serogrupos O1/O139 CT negativos determinándose que no están relacionados genéticamente con las cepas epidémicas (Pichel *et al.*, 2003), similar a lo observado en estudios realizados en otros países (Coelho *et al.*, 1995). Además, esta técnica de PFGE estandarizada está siendo aplicada en aislamientos de *V. cholerae* no-O1 recuperados desde 1992 de casos esporádicos y algunos brotes reportados por epidemiología (Moroni y col., 2014).

9.- Emergencia de nuevas cepas toxigénicas

A nivel molecular, los principales genes patogénicos de *V. cholerae* se encuentran en regiones del cromosoma en forma de “clusters” o islas de patogenicidad, teniendo la capacidad de ser propagados horizontalmente (Karaolis *et al.* 1998, Heidelberg *et al.*, 2000). La adquisición de elementos móviles brinda a las bacterias nuevas estrategias para sobrevivir en condiciones ambientales cambiantes y en nuevos reservorios. Estos elementos aumentan considerablemente la tasa de evolución de las bacterias. La evolución de cepas patogénicas de *V. cholerae* incluye entre otros factores, la incorporación al genoma de fagos que participan en la transferencia horizontal de genes, seguido de un proceso de selección bacteriana que favorece la emergencia y diseminación de nuevos clones (Faruque *et al.*, 2012). Esto sugiere que cepas ambientales pueden volverse más virulentas para el hombre a través de la adquisición de genes de patogenicidad.

Como ya se mencionó, entre los elementos genéticos móviles, el más estudiado en *V. cholerae* es el fago filamentoso CTX Φ que lleva los genes de la toxina CT y entre otros, las islas de patogenicidad presentes en cepas epidémicas de *V. cholerae*: VPI-1 y VPI-2 (Taylor *et al.*, 1987; Karaolis *et al.*, 1998; Jermyn y Boyd, 2002), VSP-I (Dziejman *et al.*, 2002) y VSP-II (O'Shea *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la isla VPI-1 puede ser transferida entre aislamientos (O'Shea y Boyd, 2002) y también hay evidencias de que VPI-1 se escinde y circulariza (Rajanna *et al.*, 2003). Recientemente, estudios demostraron que VPI-2, VSP-I y VSP-II, también pueden escindirse y formar complejos circulares (Murphy y Boyd, 2008). Estas evidencias explicarían la capacidad de transferir horizontalmente genes asociados a virulencia ya sea por conjugación, transducción o transformación.

Estudios de comparación genómica revelaron que aproximadamente el 6% del genoma de *V. cholerae* O1 El Tor cepa N16961 (cepa de referencia O1 CT positiva de la séptima pandemia de cólera) fue detectado inusualmente en ciertos aislamientos de *V. cholerae* no-O1 no-O139 de países endémicos para cólera (Dziejman *et al.*, 2002). Análisis comparativos a nivel genómico de *V. cholerae* no-O1 no-O139 mostraron la posible ocurrencia de eventos de transferencia horizontal de genes asociados a la biosíntesis del antígeno O. Sin embargo, la adquisición de VPI y CTX Φ se observó más frecuentemente que el intercambio de regiones de biosíntesis de antígeno O de cepas epidémicas (Li *et al.*, 2002). También cabe destacar la presencia del integrón de 126 Kb (también llamado superintegrón) presente en el cromosoma II de *V. cholerae* que posee, en el caso de la cepa N16961, 179 cassettes genéticos móviles (Labbatte *et al.*, 2007).

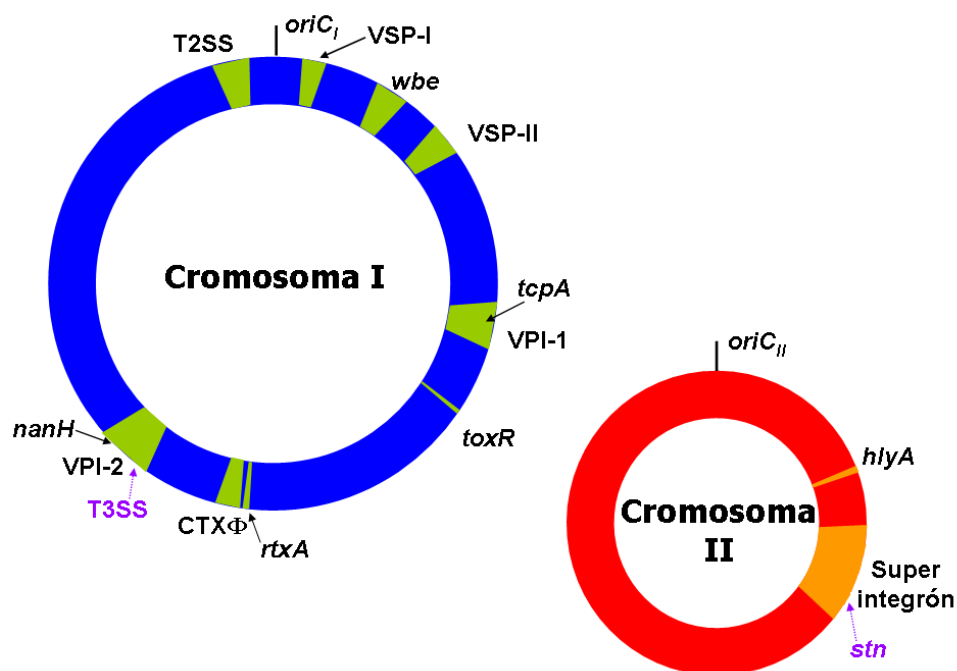


Fig. N°7. Esquema: cromosomas de la cepa N16961 (*V. cholerae* O1 El Tor)

(Los elementos marcados en color lila no están presentes en las cepas de referencia de *Vibrio cholerae* O1 CT+).

Posteriormente, estudios evolutivos refieren como cepas intermedias en la evolución a cepas epidémicas que acarrean un “set” incompleto de genes en “clusters”, con menor potencial de virulencia (Faruque *et al.*, 2012).

Por ende, la emergencia de nuevas cepas es factible en este microorganismo tan versátil por su capacidad de adquirir elementos móviles, que dependen de las condiciones del ambiente para la ocurrencia de estos eventos de transferencia y la presencia de reservorios de genes asociados a virulencia. De hecho, la vigilancia de este microorganismo realizada en diversas regiones ha permitido detectar la emergencia de nuevos clones (Nair *et al.*, 2002; Alam *et al.*, 2010, 2012)

10.- Vigilancia de *V. cholerae* no-O1 en América Latina.

A nivel regional, existen registros sobre *V. cholerae* no-O1 en Latinoamérica.

En febrero de 1994, fue registrado un brote en Lima, Perú de casos de diarrea con deshidratación, asociado a aislamientos de *V. cholerae* no-O1 negativos para la toxina de cólera y factor de colonización TCP. Los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 resultaron de siete

serogrupos diferentes, siendo prevalentes O10 (21%) y O12 (65%), con patrones similares entre ellos por ribotipificación, y susceptibles a agentes antimicrobianos. Se observó acumulación de fluído en asa ligada de conejo sin diferencias significativas entre ambos serogrupos (Dalsgaard *et al.*, 1995).

En Cuba, en un estudio realizado con 250 niños menores de 5 años con gastroenteritis se aisló en el 8,5% de los casos *V. cholerae* no-O1 (Bravo y col., 1998). Entre 1996 y 2005, se caracterizaron en el Laboratorio Nacional de Referencia de Cuba 422 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de casos de diarrea aguda; se observó la presencia de factores de virulencia tales como gelatinasa, hemolisina, elastasa y adherencia a células Hep-2. En ese estudio se identificaron 9 aislamientos portadores de toxina termoestable asociados a un brote de transmisión hídrica en 2001, cuya relación genética se demostró por PFGE (Bravo y col., 2007).

11.- Vigilancia de *V. cholerae* en Argentina.

En Argentina, entre 1988 y 1990 se estudiaron 4363 niños menores de 5 años con diarrea en siete centros diferentes del país, pero no se aisló en ningún caso *V. cholerae* no-O1 a pesar de haberlo buscado sistemáticamente. En el año 1992, simultáneamente con la aparición de *V. cholerae* O1, comienza el aislamiento de *V. cholerae* no-O1 tanto en humanos como en el ambiente (Rivas y col., 1996).

Luego de la reemergencia de cólera en América en la década de los 90', se llevó a cabo en nuestro país la creación de la Red Nacional de Cólera y Gastroenteritis Bacterianas en 1991; y luego como la Red Nacional de Diarreas y Patógenos de Transmisión Alimentaria (RND y PTA), que realiza la vigilancia de enteropatógenos, entre ellos *V. cholerae*. En ese marco de vigilancia intensiva de aislamientos de *V. cholerae* O1 asociados a casos de cólera y del ambiente, se recuperaron también aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de pacientes con diarrea y del ambiente. Entre febrero de 1992 a febrero de 1995 se realizó un estudio en la ciudad de Orán, Salta detectándose 41 casos de gastroenteritis asociada a *Vibrio cholerae* no-O1 no toxigénicos, con una frecuencia de aislamiento del 0,9%, entre los casos de diarrea. El 51,2% de los casos correspondió a mayores de 15 años, con diarrea, vómitos y deshidratación leve a moderada. De los pacientes pediátricos, requirieron hospitalización los niños desnutridos con diarrea prolongada. El 19,5% de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 presentó resistencia a la ampicilina y 4,9%, a trimetoprimasulfametoxazol (Rivas, 1996). Entre diciembre de 1999 y enero

de 2000, ocurrió en Orán (provincia de Salta) un brote de diarrea que afectó a niños y adultos, que duplicó el número de coprocultivos esperados para la época del año; se recuperó *V. cholerae* no-O1 de diez pacientes y nueve aislamientos de fuentes de agua de la zona (incluidos en este estudio).

La vigilancia de *V. cholerae* no fue sistemática en los años siguientes al 2000, con variación en la búsqueda del microorganismo entre las diferentes regiones, ya que la vigilancia más activa se mantuvo en el norte del país donde se registró el mayor número de casos de cólera durante los brotes epidémicos. Se realizaron estudios de investigación y de brotes: entre ellos, se investigó la presencia de *V. cholerae* en muestras clínicas y del ecosistema acuático de Tucumán entre 2003 al 2005, donde fueron recuperados *V. cholerae* no-O1 con diferentes perfiles de virulencia (González Fraga *et al.*, 2007, 2009).

En el marco de la RND posterior a los brotes epidémicos de cólera, los aislamientos de *V. cholerae* notificados han sido identificados como *V. cholerae* no-O1, asociados principalmente a casos esporádicos de diarrea y en menor proporción a infecciones extra-intestinales, de las provincias del norte y centro del país; en baja frecuencia respecto a otros enteropatógenos bajo vigilancia. Entre las excepciones, se registró un caso de cólera reportado en Santa Fe en 1999 y otro caso esporádico en el año 2005 en un paciente adulto de la provincia del Chaco. Se han registrado algunos brotes causados por *V. cholerae* no-O1: en una institución de salud (Santa Fe, 2008) y en el contexto de la comunidad (Tucumán, 2007) y aislamientos de infecciones extra-intestinales de pacientes inmunosuprimidos y/o con enfermedad de base (Moroni y col., 2014).

Con respecto al perfil de sensibilidad a antimicrobianos, tanto en aislamientos humanos como ambientales de *V. cholerae* recuperados entre 1992 y 2000 en Argentina, se observaron bajos niveles de resistencia, excepto para un grupo de cepas multirresistentes de *V. cholerae* O1 que causaron un brote en el norte de nuestro país en 1997 (Petroni *et al.*, 2002). En el marco de la Red WHONET como parte de la vigilancia nacional se determinó en 669 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 no-O139 una resistencia intermedia a ampicilina en clínica (29%) y ambiental (32%) (Petroni y Melano, 2004).

La emergencia de *V. cholerae* no-O1, serogrupo O139, como agente causal de brotes epidémicos desde 1992, sumado a la evidencia de transmisión de los genes responsables de la virulencia entre aislamientos de *V. cholerae* (Waldor *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002) y los

antecedentes epidemiológicos de *V. cholerae* en el país; planteó la necesidad de profundizar el estudio de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 en Argentina.

12.- Hipótesis

- Los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 asociados a casos de diarrea e infecciones extra-intestinales en nuestro país presentan diversos determinantes de virulencia que podrían encontrarse también en cepas de origen ambiental.
- En base a la capacidad de las cepas de *V. cholerae* de intercambiar material genético y la posible presencia de numerosos serogrupos de *V. cholerae* en reservorios ambientales, es de esperar gran variabilidad genética entre los aislamientos circulantes en Argentina, de origen clínico y del ambiente.
- Los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 circulantes en Argentina pertenecientes a determinados subtipos genéticos pueden presentar perfiles de virulencia con mayor potencial patogénico.

II.- Objetivos y justificación del proyecto

La patogénesis de *V. cholerae* como agente causal de cólera ha sido mundialmente reconocida e investigada, sin embargo la capacidad y/o potencial patogénico de *V. cholerae* no-O1 no está tan estudiada y definida, a pesar de ser un reconocido agente etiológico de gastroenteritis e infecciones extra-intestinales. Sumado a esto, la emergencia de una nueva cepa *V. cholerae* no-O1 con características epidémicas en India, serogrupo O139 en 1992; destacan la necesidad de la vigilancia de otros serogrupos de *V. cholerae*. Por otra parte, en las últimas décadas se ha demostrado que varios factores de virulencia son codificados en elementos genéticos móviles que hacen factible la transmisión de genes entre las bacterias, dando lugar a la emergencia de nuevas variantes identificadas a nivel mundial (Alí *et al.*, 2011; Alam *et al.*, 2012). La transferencia genética horizontal ha jugado un rol esencial en la evolución de cepas de *V. cholerae* pandémicas, llevando a investigadores en el tema a deducir que las cepas ambientales pueden representar un reservorio de nuevas cepas potencialmente epidémicas. Por eso, cobra

importancia estudiar a la par de las cepas de *V. cholerae* aisladas de casos clínicos, cepas aisladas del ambiente.

En nuestro país en el marco de la Red Nacional de Diarreas y Patógenos de Transmisión Alimentaria (RND y PTA) 1758 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 fueron derivados desde 1992 a 2014 al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR). De estos aislamientos, un total de 869 fueron de origen clínico, aislados principalmente de pacientes con gastroenteritis, en su mayoría niños, y en baja proporción de infecciones en inmunocomprometidos (HIV), con enfermedad hepática (cirrosis), oncológica (leucemia) o desnutrición (neonato de bajo peso), reportadas en los últimos años (Moroni y col., 2014). Entre los aislamientos de origen ambiental (N= 889) se recibieron cepas de ríos, lagunas, estuarios, arroyos, pozos de agua, efluentes, derivados al LNR en el marco de monitoreos ambientales e investigaciones (González Fraga *et al.*, 2007) y como parte del estudio de brotes.

Esta investigación propone determinar la presencia y distribución de distintos factores de virulencia descriptos hasta ahora en *V. cholerae* en aislamientos de serogrupo no-O1 circulantes en Argentina, de origen clínico y ambiental. Los resultados contribuirán al mejor conocimiento de este agente causal de diarrea y enfermedades extra-intestinales en Argentina. El período de estudio (desde 1992 al 2003) comprende desde la implementación de vigilancia activa de cólera a partir de la epidemia en América Latina en 1991 hasta el año 2003, cuatro años después de la detección del último caso clínico de cólera en el país.

Por otra parte, la caracterización de los aislamientos de origen humano y ambiental en Argentina, y sus relaciones genéticas, permitiría la identificación de cepas con potencial epidémico, en base a la presencia de clones prevalentes y/o portadores de factores de virulencia asociados comúnmente a clones epidémicos. Además el conocimiento y la identificación de los factores de virulencia asociados a *V. cholerae* no-O1 se podría aplicar al diseño de un flujograma diagnóstico por técnicas moleculares para la identificación y caracterización rápida y específica de *V. cholerae*, contribuyendo a su vigilancia.

1.- Objetivos generales

- Caracterizar feno-genotípicamente y establecer la diversidad genética de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 de origen humano y ambiental circulantes en Argentina.

2.- Objetivos específicos

- Estandarizar ensayos de PCR para la detección de factores de virulencia de *V. cholerae* no-O1.
- Investigar la presencia de factores de virulencia descriptos en *V. cholerae* no-O1 en aislamientos de diferentes áreas del país recuperados desde 1992 hasta 2003, de origen humano y ambiental: toxina termoestable (NAG-ST) y otros factores accesorios y/o recientemente identificados como hemolisina (*hly*), gen regulador *toxR*, citotoxina (*rtxA*), sistema de secreción tipo III (*vcs*), entre otros .
- Evaluar la presencia de factores de virulencia asociados a *V. cholerae* O1 epidémico y O139, causantes de cólera: enterotoxina de cólera (CT), fimbria “toxin coregulated pilus” (TCP), gen *tcpI* marcador de la isla de patogenicidad VPI y otros factores accesorios.
- Evaluar la diversidad genética entre aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de origen humano, de distintas regiones de Argentina y comparar dichas cepas con aislamientos de origen ambiental en el periodo de estudio.
- Crear una Base de Datos Nacional de subtipos genéticos de *V. cholerae*.
- Identificar subtipos genéticos de *V. cholerae* no-O1 con mayor potencial patogénico y/o epidémico.

En base a los objetivos e hipótesis de trabajo se realizó el siguiente diseño del estudio detallado en las secciones:

Sección III.- Materiales y Métodos

- 1.- Selección de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 para el estudio (periodo 1992 a 2003).
- 2.- Caracterización fenotípica de los aislamientos.

- 3.- Implementación y/o estandarización de diferentes ensayos de PCR como herramienta diagnóstica y de caracterización genotípica para la identificación de factores de virulencia. Aplicación de PCR para el análisis de los aislamientos seleccionados.
 - 4.- Ensayo de enterotoxigenidad en asa ligada de conejo en un subgrupo de aislamientos seleccionados por perfil genotípico. Trabajo colaborativo, realizado en el Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC).
 - 5.- Estudio de la diversidad genética por electroforesis en campo pulsado (PFGE). Creación de Base de Datos Nacional para subtipos genéticos de *V. cholerae*.
 - 6.- Análisis de los datos.
- Continuación en las secciones:
- Sección IV.- Resultados
- Sección V.- Discusión y Conclusiones.

III.- Materiales y Métodos

1.- Selección de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 en el período de estudio (1992-2003)

Entre los años 1992 a 2003 se recibieron en el Departamento de Bacteriología, INEI - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” un total de 1302 aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1 que fueron recuperados en el transcurso de la epidemia de cólera de los '90 y los cuatro años posteriores, en el marco de la vigilancia de la RND y PTA y proyectos de investigación desarrollados en el mismo período. Del total, 740 correspondieron a aislamientos de origen humano y 562 a aislamientos ambientales.

Se seleccionaron 170 aislamientos *V. cholerae* no-O1 para el estudio de distribución de factores de virulencia, incluyendo cepas procedentes de diferentes regiones de Argentina, recuperadas en distintos años. Entre las cepas seleccionadas, se incluyeron 20 aislamientos correspondientes a un brote de gastroenteritis ocurrido en Orán, Salta, en enero-febrero del año 2000: 11 aislamientos de origen humano y 9 ambientales. Del total de 170 aislamientos, 111 fueron de origen clínico, incluyendo los aislamientos del brote de Salta, y 59 de origen ambiental. Los aislamientos fueron recuperados en 8 provincias de Argentina (Sección III, Tabla Nº1). La selección de los aislamientos esporádicos de origen humano fue realizada teniendo en cuenta la

inclusión de aislamientos de diferentes años y provincias, como también la asociación a casos de gastroenteritis (96,4%) e infecciones extra-intestinales (3,6%), estos últimos recibidos habitualmente con muy baja frecuencia en el LNR. Un subgrupo de 30 aislamientos de los 170 fueron seleccionados en base a su perfil de genes asociados a virulencia y estudiados para evaluar el potencial enterotoxigénico en asa ligada de conejo. Este mismo grupo de aislamientos se analizó por técnicas de subtipificación molecular a fin de determinar la diversidad genética, aplicando con el protocolo estandarizado de PFGE del CDC, USA (Cooper, 2006, ver punto 5), mientras que la totalidad (n=170) fue estudiado por PFGE según Dalsgaard, 1996.

Tabla N°1. Aislamientos de *V. cholerae* no-O1 seleccionados de Argentina (1992-2003)

Provincia	Humano n (%)	Ambiental n (%)	N° total (%)
Salta	47 (42,3)	18 (30,5)	65 (38,2)
Buenos Aires	23 (20,7)	6 (10,2)	29 (17,0)
Tucumán	17 (15,3)	6 (10,2)	23 (13,5)
Jujuy	5 (4,5)	12 (20,3)	17 (10,0)
Mendoza	10 (9,0)	6 (10,2)	16 (9,4)
Santa Fe	7 (6,3)	3 (5,1)	10 (5,8)
Córdoba	2 (1,8)	6 (10,2)	8 (4,7)
Formosa	0 (0)	2 (3,4)	2 (1,2)
N° Total/país	111 (100)	59 (100)	170 (100)

1.a.- Aislamientos de origen humano:

Las cepas de origen humano (n=111) fueron aisladas de casos de diarrea acuosa de moderada a severa magnitud, en algunos casos con registro de sangre y pus (6,3%), a veces acompañados de vómitos; en 46/111 casos hubo registro de diferentes grados de deshidratación de leve a grave, calambres y fiebre. En cuatro casos se recuperó *V. cholerae* de hemocultivos, en pacientes inmunosuprimidos con cuadros de sepsis (tres procedentes de Buenos Aires y uno de Mendoza). La mayoría de los casos clínicos de los aislamientos estudiados (n=111) se registraron en niños menores de 5 años (72%) con un promedio de 24 meses, y el resto en adultos con un promedio de 40 años de edad. Las regiones con el mayor porcentaje de aislamientos incluídos en la selección fueron: la región Noroeste destacándose la provincia de Salta (42,3%) cuyos aislamientos procedían principalmente de las localidades de Tartagal, Orán, Salvador Mazza y

Colonia Santa Rosa, seguido de las provincias de Tucumán y Jujuy, donde se notificó la mayor cantidad de casos por *V. cholerae* no-O1 en el periodo analizado. En segundo lugar, los aislamientos de la región Central: representados por la provincia de Buenos Aires y de Capital Federal (20,7%), de Santa Fe y Córdoba. La región Oeste estuvo representada principalmente por aislamientos de la provincia de Mendoza (10%).

Como se mencionó antes, también se incluyeron en el estudio 11 aislamientos de origen humano (dos aislamientos de un mismo paciente con diferente fecha de recuperación de la muestra) de un brote que fue registrado en la ciudad de Orán, Salta, por la Dirección de Epidemiología de dicha provincia entre la semana epidemiológica 52 del año 1999 a semana 2 del 2000. Los casos del brote fueron detectados en niños menores de 5 años de edad (desde 23 meses a 3 años) y en adultos (desde 33 a 56 años). Entre los pacientes afectados, ocho personas residían en seis fincas ubicadas a ambos lados de la ruta provincial 50, entre dos arroyos, y dos procedían de la ciudad de Orán, de dos barrios diferentes.

1.b.- Aislamientos de origen ambiental:

Los aislamientos de origen ambiental (59) provenían de diferentes fuentes: pozos de agua, acequias, efluentes, canales de riego, agua de río, de estuario, laguna y arroyo. Las muestras procedían principalmente de las provincias de la Región Noroeste: Salta, Jujuy y Tucumán (61%), seguido de la Región Central (25,4%): Buenos Aires (provistas en su mayoría por el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero – INIDEP, Mar del Plata), Córdoba, Santa Fe y Mendoza (10,2%) (Tabla N°1).

Entre los aislamientos de origen ambiental se incluyeron también los nueve aislamientos provenientes de muestras de agua recuperados en la investigación del brote detectado en Salta, Orán en el año 2000. Estos aislamientos se recuperaron de agua de pozo de las fincas (n=6), laguna (n=2), arroyo (n=1) como posibles fuentes de infección para los residentes de la zona.

1.c.- Conservación de los aislamientos:

Todos los aislamientos estuvieron conservados en la colección de cultivos del Servicio Enterobacterias del Departamento Bacteriología del INEI- ANLIS “Carlos G Malbrán”, como suspensión en caldo Tripticasa Soja (TSB) con 30% de glicerol a -70°C.

1.d.- Controles positivos y negativos

Se utilizaron para los ensayos fenotípicos y genotípicos las siguientes cepas de referencia: *V. cholerae* no-O1 ATCC 25872 (*ctxAB*⁺), *V. cholerae* O1 Clásica ATCC 14035 (*ctxAB*⁺), *V. cholerae* O139 4260B (*ctxAB*⁺), RC 66 *V. cholerae* no-O1 (NAG-ST⁺), RC55 *V.mimicus*, cepa autóctona *V. cholerae* O1 Ogawa (*ctxAB*⁺) ST10568 y cepa control del CDC *Salmonella* Braenderup (para PFGE). Las cepas fueron gentilmente remitidas por la Dra Irma Rivera (Universidad de San Pablo, Brasil) y el Dr Clifford Clark (National Laboratory for Enteric Pathogens, Canadá).

Para el ensayo en asa ligada de conejo realizado en el marco de un trabajo colaborativo con el Dr. Alex Saka, (Dpto Bioquímica Clínica, CIBICI, FCQ, UNC) se utilizó la siguiente cepa control: *V. cholerae* O1 biotype El Tor EP1/151 CT+ (colección *V. cholerae* CIBICI-CONICET).

2.- Caracterización fenotípica de los aislamientos

En base al flujograma propuesto en el marco de la RND y PTA (Sección III. Fig. N° 1), los aislamientos derivados al LNR como *V. cholerae* de muestras fecales se sembraron en agua peptonada alcalina (APA) y se incubó a 37°C de 6 a 8 hs como medio de enriquecimiento. Luego se sembró en medio selectivo Agar Tiosulfato Citrato sales Biliares Sacarosa (TCBS, Sección III. Fig. N°2) y agar tripticasa soja (TSA). De las colonias fermentadoras características de *Vibrio cholerae* en agar TCBS, se realizaron repiques en estría de TSA para las pruebas bioquímicas. A partir del TSA se realizaron las pruebas bioquímicas mínimas de identificación de *V. cholerae*: fermentación de azúcares en medio Kigler o Hierro Tres Azúcares (TSI), decarboxilación de Lisina (LIA) e Indol del triptófano y se hizo un nuevo repique en TSA para realizar posteriormente pruebas bioquímicas complementarias y la serotipificación (Manual de Procedimientos. Aislamiento, Identificación, Caracterización de *Vibrio cholerae* Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, 2010).

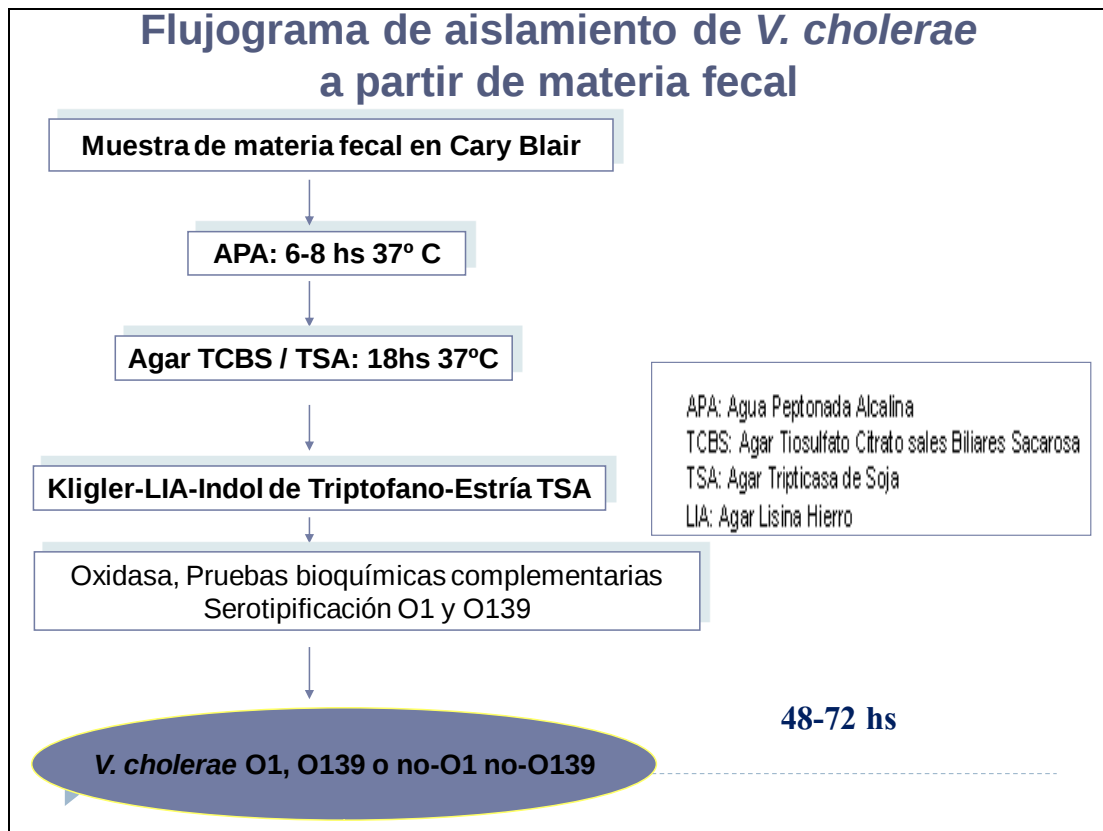


Figura N°1. Flujograma para el aislamiento e identificación de *V. cholerae* a partir de materia fecal.



Figura N°2. Colonias fermentadoras de sacarosa en medio TCBS, compatibles con *V. cholerae*

2.1.- Pruebas bioquímicas complementarias:

Se realizaron pruebas bioquímicas para la caracterización de todos los aislamientos de

V. cholerae: fermentación de glucosa (Hugh y Leifson), presencia de la enzima citocromo oxidasa, utilización de lisina y ornitina decarboxilasa (Moeller) y arginina dehidrolasas (Thornley), movilidad, producción de indol del triptofano, crecimiento en ausencia y en diferentes concentraciones de ClNa al 0%, 3%, 6% y 8% (Manual de Procedimientos *V. cholerae*, 2010; Dodin A, 1992). Las pruebas diferenciales de otras especies de *Vibrio* spp. se aplicaron según Abbott *et al.*, 2011; Tarr CL *et al.*, 2015).

2.2.- Identificación de serogrupo:

Se realizó el seroagrupamiento de todas las cepas para detección de serogrupos epidémicos, por aglutinación en lámina utilizando suero polivalente anti - *V. cholerae* O1 y suero monovalente anti - O139 (Instituto Nacional de Producción de Biológicos. Servicio Antígenos y Antisueros, ANLIS “C. G. Malbrán”). Algunos aislamientos de la selección (17 aislamientos correspondientes al brote de Salta y 13 aislamientos esporádicos) (Tabla N°4, sección IV Resultados), caracterizados como *V. cholerae* no-O1 fueron enviados al Centro de Referencia Internacional en Japón, (National Institute of Infectious Diseases, Japón), para determinar sus serogrupos, ya que no se dispone en el país de los antisueros necesarios para la identificación de todos los serogrupos.

2.3.- Prueba de Hemólisis:

Los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 fueron sembrados en placas de agar sangre de carnero al 10%, y se incubó 18-24 hs a 37°C para determinar la presencia de halos de hemólisis.

2.4.- Ensayo de ELISA para detección de la toxina CT

Este ensayo fue realizado en el Servicio Fisiopatogenia, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” a fin de evaluar la expresión de la toxina CT utilizando un enzima inmunoensayo (ELISA) en todos los aislamientos recibidos hasta 2003. A partir de ese año la detección de CT fue reemplazada por la identificación del gen *ctxA* por PCR y sólo se determinó la presencia de CT por ELISA en las cepas portadoras de *ctxA*. La técnica de ELISA se basa en la unión al gangliósido GM1, por parte de la toxina secretada al sobrenadante de cultivo. El revelado de la presencia de CT se realizó utilizando un suero policlonal anti-toxina en conejo, ya obtenido por el laboratorio y el correspondiente conjugado anti-especie.

3.- Caracterización genotípica de los aislamientos – Detección de genes de virulencia por PCR.

3.1.- Preparación del ADN cromosómico:

Para extraer el ADN, para los ensayos de PCR, se tomaron 3 a 5 colonias a partir del Agar Tripticosa Soya (TSA) de un cultivo puro y fueron resuspendidas en 500 µl de agua tridestilada. Esta suspensión fue hervida durante 10 min. y luego de una breve centrifugación (13.000 rpm, 1 - 2 min.), se empleó el sobrenadante como templado de la reacción de PCR.

3.2.- Ensayos de PCR:

Todos los ensayos de PCR fueron realizados utilizando como ADN templado, el ADN total extraído según el punto anterior. En la Tabla N°2 se detallan los oligonucleótidos empleados como “primers” o cebadores y en la Tabla N°3, las condiciones de amplificación de cada ensayo. Los protocolos aplicados habían sido estandarizados previamente en nuestro laboratorio o bien fueron implementados a partir de ensayos publicados en diferentes trabajos de investigación, para los cuales se ajustaron las condiciones óptimas para su aplicación en el Servicio de Enterobacterias, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Para la caracterización inicial de todos los aislamientos estudiados, se aplicó PCR como confirmación de las pruebas bioquímicas en la identificación de *V. cholerae* y para la detección simultánea de los genes que codifican la toxina CT y el factor de colonización TCP: se utilizó el ensayo de PCR - Múltiple que permite amplificar la región intergénica 16S-23S rRNA específica de *V.cholerae*, el gen *ctxA* que codifica la subunidad A de CT y el gen *tcpA* alelo El Tor, correspondiente a la subunidad estructural de TCP variante El Tor (Chun *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2001).

Se continuó la caracterización, con la identificación por PCR - Múltiple de los genes que codifican los antígenos somáticos O1 y O139 (Rivera *et al.*, 2003) para confirmación de los resultados obtenidos por serología y como diagnóstico en el caso de cepas rugosas.

Además de los factores asociados a virulencia en *V. cholerae* O1 epidémico *ctxA* y *tcpA* alelo El Tor, se determinó la presencia de otros genes de virulencia descriptos en *V.cholerae*: hemolisina

hlyA alelo El Tor / Clásico, regulador *toxR*, citotoxina *rtxA*, toxina termoestable *stn/o* y gen regulador *tcpI*. Se aplicaron protocolos de PCR – Múltiple para los genes asociados a virulencia: *hlyA* alelo El Tor / Clásico (Shangkuan *et al.*, 1995), genes de la toxina termoestable y gen regulador del TCP: *stn / tcpI* (Rivera *et al.*, 2001), genes de la isla de patogenicidad VPI-1, *ald* e *int* que codifican para una aldehído deshidrogenasa e integrasa (Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Vital Brasil *et al.*, 2002); y para los genes del sistema de secreción tipo III (*vcs*) (González Fraga S. *et al.*, 2007).

Los ensayos de PCR-Múltiple para *V. cholerae / ctxA / tcpA* alelo El Tor y PCR Múltiple para serogrupos O1/O139 habían sido implementados y estandarizados anteriormente en nuestro laboratorio a partir de muestras y/o de aislamientos (González Fraga S., Tesis doctoral, 2010).

En este estudio se realizó la estandarización de los ensayos de PCR incorporados para una completa caracterización, con ajuste de las concentraciones de los reactivos en el ensayo: principalmente “primers”, cloruro de magnesio y enzima Taq DNA polimerasa; teniendo en cuenta la temperatura de “melting” de los primers (Tabla N°3).

Para aquellos aislamientos que resultaron positivos para el gen regulador del factor de colonización TCP, *tcpI*, y/o para la subunidad A de la toxina CT, *ctxA*; se completó la caracterización con la aplicación de PCR para el gen *tcpA* alelo Clásico y con la detección del gen correspondiente a la subunidad B de la toxina biotipo El Tor / Clásico (Morita *et al.*, 2008).

Por último, en base a trabajos recientes que describieron la emergencia de la variante epidémica de *V. cholerae* O1 El Tor Híbrido en la Región de América en 2010; se implementó y estandarizó como parte de la vigilancia y caracterización de los aislamientos portadores de los genes que codifican para la toxina CT, la PCR denominada PCR - MAMA (Mismatch Amplification Mutation PCR Assay) (Morita *et al.*, 2008). Este ensayo permite detectar el polimorfismo de la subunidad B de CT específico de los biotipos Clásico / El Tor e Híbrido, y se aplicó además una PCR para confirmación de la subunidad B de la toxina de cólera (Mitra *et al.*, 2001). También se implementó una PCR para identificación del gen *tcpA* alelo Clásico variante del factor de colonización (Rivera *et al.*, 2001) a fin de completar la caracterización de los aislamientos positivos para genes de la isla VPI y negativos para el factor *tcpA* alelo El Tor (Fig. N°10, sección IV Resultados).

Todos los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en agarosa del 1,5 al 2%, según el tamaño esperado de los amplicones, en buffer TAE 1X. Se realizó la tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 min. y los geles fueron fotodocumentados con el filtro adecuado y luz UV en el equipo Gel Doc (Bio Rad).

Como controles, conjuntamente con los aislamientos estudiados se procesaron las cepas de referencias mencionadas en el punto N°1 y un control de mezcla de reacción sin templado. Para la electroforesis se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (GIBCO BRL).

Tabla N°2: “Primers” o cebadores utilizados en los ensayos de PCR

“Primers”	secuencia de “primers” (5′- 3′)	Amplicón (pb)	Referencia
VCO1-F2 VCO1-R2	CAACAGAATAGACTCAAGAA TATCTTCTGATACTTTTCTAC	647 (O1)	O1/O139
VCO139-F2 VCO139-R2	TTACCAGTCTACATTGCC CGTTTCGGTAGTTTTTCTGG	741 (O139)	(Rivera <i>et al.</i> , 2003)
pVC-F2 pVCm-R1	TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG AGTCACTTAACCATACAACCCG	300	VC 16S-23S rRNA (Chun <i>et al.</i> , 1999)
CT 94F CT 614R	CGCGCAGATTCTAGACCTCCTG CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	564	ctxA (Rivera <i>et al.</i> , 2001)
TCP 72F TCP 477R	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG	451	tcpA El Tor
<i>tcpA</i> Class R <i>tcpA</i> Class F	TTA CCA AAT GCA ACG CCG AAT G CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG	620	tcpA Clásico (Rivera <i>et al.</i> , 2001)
<i>toxR</i> 101F <i>toxR</i> 837R	CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG	779	toxR (Rivera <i>et al.</i> , 2001)
<i>stn/o</i> 67F <i>stn/o</i> 194R	TCGCATTTAGCCAAACAGTAGAAA GCTGGATTGCAACATATTTTCGC	172	stn/o (Rivera <i>et al.</i> , 2001)

“Primers”	Secuencia de “primers” (5´- 3´)	Amplicón (pb)	Referencias
<i>rtxA</i> -F <i>rtxA</i> -R	CTGAATATGAGTGGGTGACTTACG GTGTATTGTTTCGATATCCGCTACG	417	<i>rtxA</i> (Chow <i>et al.</i> , 2001)
<i>tcpI</i> 132-F <i>tcpI</i> 951-R	TAGCCTTAGTTCTCAGCAGGCA GGCAATAGTGTCGAGCTCGTTA	862	<i>tcpI</i> (Rivera <i>et al.</i> , 2001)
<i>aldA</i> -F <i>aldA</i> -R	CTAATAGCGAAACTTCGACTG AGGTGCAGTGCTTCAATTC	1229	<i>aldA</i> (Vital Brazil <i>et al.</i> , 2002)
<i>int</i> -F <i>int</i> -R	GATAAAGAGATCAAAGCC ATCTGCTTCCATGTGGG	1200	<i>int</i> (Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2001)
<i>vcsN</i> ₂ – F <i>vcsN</i> ₂ – R <i>vcsV</i> ₂ – F <i>vcsV</i> ₂ – R	GCAGTTGAGCCATTCCATTACAG CGACCAAACGAGATAATGCT CTATTTGGCTCACTTGATGGGGC GCCACATCATTGCTTGCTACC	500	<i>vcs</i> González Fraga (comunicación personal, 2007)
<i>ctxB</i> – F <i>ctxB</i> – R	GGTTGCTTCTCATCATCGAACCAC GATACACATAATAGAATTAAGGAT	375	<i>ctxB</i> (Mitra <i>et al.</i> , 2001)
MAMA EITor F MAMA EITor R	ACTATCTTCAGCATATGCACATGG CCTGGTACTTCTACTTGAAACA	186	<i>ctxB</i> El Tor (Morita <i>et al.</i> , 2008)
MAMA Clas F MAMA Clas R	ACTATCTTCAGCATATGCACATGG CCTGGTACTTCTACTTGAAACG	186	<i>ctxB</i> Clásica (Morita <i>et al.</i> , 2008)

Tabla N°3. Condiciones de los ensayos de amplificación por PCR para la caracterización de *V. cholerae*

PCR Implementación	“Primers” ó cebadores (ref. Tabla N°2)	Concentraciones en el Ensayo	Condiciones de la reacción
PCR Múltiple <i>V. cholerae</i> <i>ctxA</i> , <i>tcpA</i> El Tor	VC F2 - VC mR1 CT 94 F - CT 614 R TCP 72 F - TCP 477 F	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 2 mM primers VC 0,8 µM CT- TCP El Tor 0,4 µM dntp mix 0,2 mM Taq DNA pol 1,25 U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 45 seg a 94°C 45 seg a 60°C 45 seg a 72°C extensión final 10min 72°C
PCR Múltiple Serogrupos O1 / O139	VCO1 F2 - R2 VCO139 F2 - R2	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 1,5 mM primers VCO 0,4 µM dntp mix 0,2 mM Taq DNA pol 1 U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 52°C 90 seg a 72°C extensión final 10 min 72°C
PCR Múltiple gen <i>hlyA</i> (Clásico / El Tor)	489 F, 744 F - 1184 R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 2 mM primers <i>hly</i> 0,8 µM dntp mix 0,2 mM Taq DNA pol 0,75 U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 60°C 1 min a 72°C extensión final 10 min 72°C
PCR gen <i>toxR</i>	<i>toxR</i> 101 F - 837 R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 1,5 mM primers <i>toxR</i> 0,8 µM dntp mix 0,2 mM Taq DNA pol 0,625 U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 60°C 1 min a 72°C extensión final 10 min 72°C
PCR gen <i>rtxA</i>	<i>rtxA</i> F - <i>rtxA</i> R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 1,5 mM primers <i>rtxA</i> 0,8 µM dntp mix 0,2 mM Taq DNA pol 1U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 55°C 1 min a 72°C extensión final 10min 72°C
PCR Múltiple para los genes <i>tcpI</i> / <i>stn</i>	<i>stn</i> 67 F - 194 R <i>tcpI</i> 132 F - 951 R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 1,5 mM primers <i>tcpI</i> 0,4 µM <i>stn</i> 0,6 µM dntp mix 0,2 mM Taq DNA pol 1U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 55°C 1 min a 72°C extensión final 10min 72°C

PCR Implementación	“Primers” ó cebadores (ref. Tabla N°2)	Concentraciones en el Ensayo	Condiciones de la reacción
PCR <i>vcs</i> sistema de secreción tipo III	<i>vcsN₂</i> F - <i>vcsN₂</i> R <i>vcsV₂</i> F - <i>vcsV₂</i> R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 2 mM primers <i>vcs</i> 0,3 µM dntp mix 0,2 mM <i>Taq</i> DNA pol 1U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 52/ 55°C 2 min a 72°C extensión final 10min 72°C
PCR detección de los genes <i>aldA</i> e <i>int</i>	<i>int</i> R - <i>int</i> F <i>aldA</i> F - <i>aldA</i> R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 1,5 mM primers <i>int</i> 0,8 µM <i>ald</i> 1 uM dntp mix 0,2 mM <i>Taq</i> DNA pol 0,625/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 53°C 1 min a 72°C extensión final 7min 72°C
PCR Estandarización	“Primers” ó cebadores (Tabla N°2)	Concentraciones en el Ensayo	Condiciones de la reacción
PCR <i>tcpA</i> alelo Clásico	<i>tcpA</i> F - <i>tcpA</i> clásica R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 2 mM primers <i>tcpA</i> 0,25 µM dntp mix 0,2 mM <i>Taq</i> DNA pol 1U/25 µl	2 min a 95°C, 30 ciclos 1 min a 95°C 1 min a 60°C 1 min a 72°C extensión final 10min 72°C
PCR gen <i>ctxB</i>	<i>ctxB</i> F - <i>ctxB</i> R	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 1,5 mM primers <i>ctx</i> B 0,5 µM dntp mix 0,2 mM <i>Taq</i> DNA pol 1U/25 µl	2 min a 94°C, 30 ciclos 1 min a 94°C 1 min a 55°C 2 min a 72°C extensión final 10min 72°C
PCR – MAMA subunidad B de CT específica de biotipo El Tor / Clásico	<i>ctxB</i> F - <i>ctxB</i> R El Tor / Clásico	PCR Buffer 1 X Cl ₂ Mg 2 mM primers <i>ctxB</i> 0,25 µM dntp mix 0,2 mM <i>Taq</i> DNA pol 0,75U/20 µl	2 min a 96°C, 30 ciclos 10 seg. a 96°C 10 seg. a 55°C 30 seg. a 72°C extensión final 2 min 72°C

4.- Ensayo “in vivo” de enterotoxicidad en asa ligada de conejo en una selección de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 por perfil genotípico.

Este ensayo fue realizado por el Dr. Alex Saka, en el marco de un trabajo colaborativo, en el Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, FCQ, UNC. Se realizó en una selección de aislamientos de origen humano y ambiental de diferentes perfiles genotípicos asociados a virulencia determinados por PCR (n= 30). El ensayo permitió determinar la acumulación de fluido (ml/cm) en asa ligada de conejo luego de inocular los sobrenadantes de los cultivos estudiados, como una medida del potencial enterotóxico (Bidinost *et al.*, 2004) de los aislamientos correspondientes (Tabla N°9, sección IV Resultados).

5.- Evaluación de la diversidad genética mediante el análisis de polimorfismo de macrorestricción por eletroforesis en campo pulsado (PFGE).

Al comienzo de este trabajo se determinó la diversidad genética de los 170 aislamientos en estudio aplicando el protocolo de PFGE para *V. cholerae* según Dalsgaard *et al.*, 1996. En el año 2006, se aprobó el protocolo estandarizado para la subtipificación de este microorganismo en el marco de la Red Pulsenet (Cooper *et al.*, 2006) y el LNR fue certificado por el CDC-USA para dicho protocolo desde 2007. Desde entonces, se aplicó el protocolo de PulseNet en los aislamientos recibidos prospectivamente y en una selección de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 del presente trabajo, incluyendo las mismas cepas con diferentes perfiles genotípicos estudiadas para la determinación de potencial enterotoxigénico (n= 30); esta selección comprendió aislamientos clínicos y ambientales de casos esporádicos y del brote detectado en Salta.

5.1.- Protocolo de PFGE con la enzima *NotI* (Dalsgaard *et al.*, 1996).

Se aplicó en los 170 aislamientos del estudio a partir de cultivos bacterianos incubados en TSA durante 18-24hs a 37°C. Se ajustó la DO (610 nm) a un valor de 5 en un volumen final de 200µl en buffer Tris-EDTA 100mM. A esa suspensión bacteriana se le agregó 10 µl de proteinasa K (20mg/ml) y se procedió a la inclusión en bloques de agarosa al 1,2% (agarosa “Seakem Gold”). Los bloques de ADN (“plugs”) fueron preparados mezclando partes iguales de suspensión bacteriana y agarosa. Posteriormente fueron sometidos a la lisis con proteinasa K en un baño de

agua a 55°C y luego de los lavados, los “plugs” fueron cortados y sometidos a digestión enzimática con la enzima de restricción *NotI* (25 U/plug) incubando de 18 a 24hs a 37°C.

Se utilizó como marcador de peso molecular: Lambda Ladder PFGE Marker (50 - 1.000 kb).

Las condiciones de electroforesis fueron:

Bloque 1. Switch-time: 6 seg. (8 hs),

Bloque 2. Switch-time: 15 seg. (9 hs),

Bloque 3. Switch-time: 25 seg (10 hs),

Temp.: 14 °C, Ang.: 120 °, Int.: 5,5 Volts/cm. Duración total: 27 hs.

5.2.- PFGE con la primera enzima *SfiI* y como segunda enzima *NotI*, según el protocolo estandarizado de la Red PulseNet – CDC, 2006.

Se aplicó en la selección de aislamientos (n= 30) que fue ensayada para asa ligada de conejo en el punto 4. Brevemente, según el protocolo estandarizado, a partir de los cultivos puros de *V. cholerae* no-O1 en fase estacionaria se ajustó la DO a 0,9 a 610nm para su inclusión en los bloques de agarosa y las condiciones especificadas según Cooper, 2006. Se realizó la digestión enzimática con *SfiI* (40 U a 50°C, 18-24 hs) para los 30 aislamientos y con *NotI* (30 unidades a 37°C, 18-24 hs) para aquellos aislamientos que mostraron perfiles de PFGE idénticos con *SfiI*.

Se utilizó la cepa *Salmonella* Braenderup como cepa estándar en el marco de la Red PulseNet - CDC para normalizar los geles (Hunter et al., 2005; Cooper et al, 2006) y poder comparar con nuevos subtipos genéticos ingresados en la Base de Datos Nacional, utilizando el software BioNumerics (Applied Maths, versión 4.6).

Las condiciones de electroforesis fueron:

Bloque1. Switch-time: 2 seg. - 10 seg (13 hs).

Bloque 2. Switch-time: 20 seg. - 25 seg. (4,5 hs).

Temp.: 14 °C, Ang.: 120 °, Int.: 6 Volts/cm. Duración total: 19 hs

Las corridas electroforéticas se realizaron en una unidad CHEF DR III (Bio Rad) en geles de agarosa “Seakem Gold” al 1% en buffer TBE (0,5X).

Luego de la corrida, el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 min., se decoloró con agua destilada y se fotografió usando una cámara equipada con el filtro adecuado (Gel Doc, Bio Rad). Posteriormente se realizó el análisis de los perfiles electroforéticos con el software BioNumerics.

6.- Análisis de los datos:

6.1.- Análisis e interpretación de los patrones electroforéticos obtenidos por PFGE

A partir del número de bandas compartidas entre pares de perfiles de PFGE se construyeron dendogramas de relación genética aplicando el coeficiente de similitud de Dice, y el análisis de Método de Grupo por Pares no Balanceados (UPGMA). Para esto se utilizó el software BioNumerics (Applied Maths). Al comienzo del estudio se tomó como patrón de estandarización al marcador de peso molecular Lambda Ladder PFGE Marker y se realizaron los análisis en forma visual. Más tarde, luego de la incorporación de los protocolos estandarizados de la Red PulseNet, se aplicó para el análisis de los geles realizados el protocolo correspondiente a *V. cholerae*, con 1,5 % tolerancia y 1,5 % de optimización.

Para la interpretación de la relación genética, no existen criterios universales, aunque ha sido propuesta por Tenover, en 1995 una guía para la interpretación de patrones de PFGE, la cual se puede aplicar para el estudio de brotes, en un número discreto de aislamientos (hasta 30) recolectados en períodos de uno a tres meses, siempre que el método resuelva al menos 10 fragmentos diferentes. Aplicando estos criterios, se pueden definir cuatro categorías de relación genética:

Indistinguibles: aislamientos que muestran patrones de bandas iguales.

Cercanamente relacionados: Sus patrones difieren en dos o tres bandas.

Posiblemente relacionados: Sus patrones muestran cuatro a seis bandas de diferencia.

No relacionados: Sus patrones difieren en más de seis bandas.

Dado que los 170 aislamientos de *V. cholerae* no- O1 de origen humano y ambiental analizados por PFGE, fueron recolectados en un largo período de tiempo (1992-2003) en diferentes regiones de Argentina, se consideraron los criterios de Tenover en el presente estudio sólo para el análisis de los aislamientos relacionados a una sospecha de brote, recuperados en Orán, Salta, en

diciembre 1999 a enero del 2000 y para los aislamientos clínicos esporádicos y ambientales con una relación temporo-espacial cercana.

6.2.- Análisis estadístico de los datos

La prueba del chi-cuadrado χ^2 Estadística no paramétrica fue aplicada en el análisis de los perfiles genotípicos determinados por PCR en los aislamientos de origen humano y ambiental. (Capriglioni C., 2005)

El análisis ANOVA-Tukey Kramer realizado en la Facultad Ciencias Químicas, Córdoba; se aplicó en el análisis de la acumulación de fluído en asa ligada de conejo con respecto a los perfiles genéticos determinados en una selección de aislamientos (n=30).

IV.- Resultados

1.- Identificación y caracterización feno-genotípica de los aislamientos

La mayoría de los aislamientos estudiados de origen humano y ambiental fueron identificados fenotípicamente como *V. cholerae*, con resultados negativos para producción de CT por ELISA - GM1 y presentaron las mismas características genotípicas por PCR: 168/170 (98,8%) fueron identificados como *V. cholerae* *ctxA* (-) *tcpA* alelo El Tor (-), es decir que no poseían los genes que codifican para la **toxina CT ó el factor de colonización TCP alelo El Tor** y pertenecían a los serogrupos **no-O1 no-O139** confirmado por PCR (Fig. N°3 y N°4). Entre las excepciones, se encontraron: un aislamiento de origen humano proveniente de Salta, Tartagal N°ST2761 (aislado el 10-02-93) perteneciente al serogrupo O139, *ctxA* (-) *tcpA* (-), y un aislamiento de origen ambiental (agua de una acequia), cepa N°J31W proveniente de Humahuaca, Jujuy (12-04-00) que resultó positivo para CT por ELISA (con un valor de 1,5 ng/ml de concentración de CT, menor respecto al control positivo *V. cholerae* O1 Ogawa CT+ que presentó un valor promedio superior a 2,0 ng/ml) y confirmado por PCR como *V. cholerae* no-O1 no-O139 *ctxA* (+) negativo para *tcpA* alelo El Tor (-) (Fig. N°3 y N°4) (Tablas N°5 y N°6).

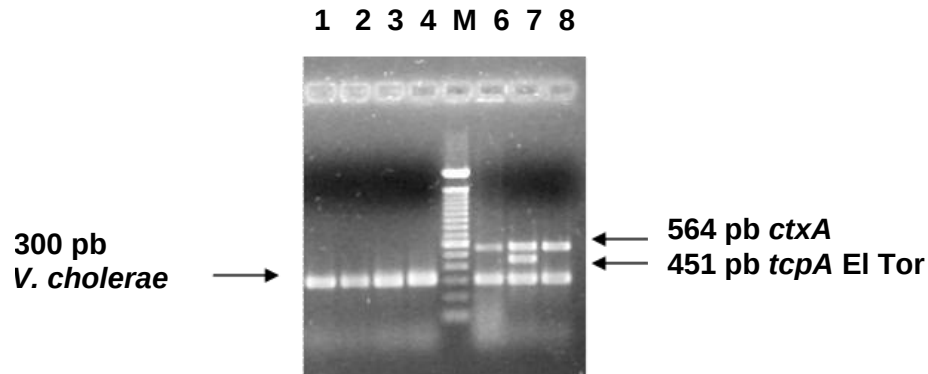


Figura N°3. PCR- Múltiple *V. cholerae* 16S-23S rRNA, *tcpA* El Tor, *ctxA*

Calles 1 a 2: aislamientos de *V. cholerae* no-O1 Me160, SO149 de origen humano; calles 3, 4 y 6: aislamientos de *V. cholerae* no-O1 SO42W, SO47W y J31W de origen ambiental; procedentes de diferentes provincias de Argentina; calle 7: control positivo *V. cholerae* O1 Ogawa ST10568 (*ctxAB*), calle 8: control positivo *V. cholerae* O1 Clásica ATCC 14035 (*ctxAB*). M: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder.

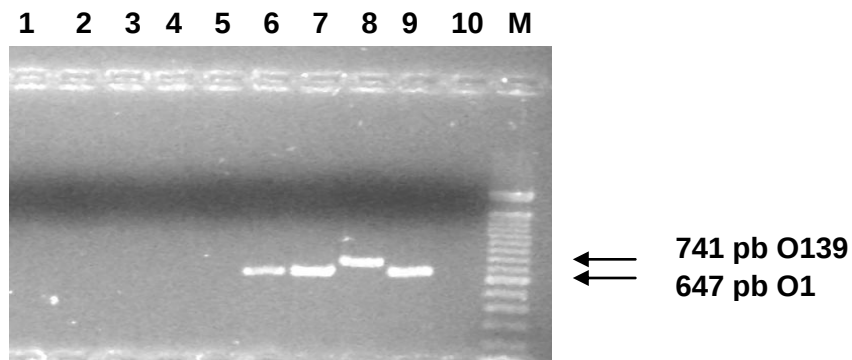


Figura N°4. PCR- Múltiple O1/O139 en aislamientos de *V. cholerae* no-O1

Calles 1 a 3: aislamientos de *V. cholerae* no-O1 M160, M3 y SO149 de origen humano; calles 4 y 5: *V. cholerae* no-O1 SO47W y J31W de origen ambiental, procedentes de diferentes provincias de Argentina; calle 6: control positivo *V. cholerae* O1 Clásico ATCC14035, calle 7: control positivo *V. cholerae* O1 Clásico El Tor O425, calle 8: aislamiento *V. cholerae* serogrupo O139 ST2761, calle 9: aislamiento de *V. cholerae* O1 El Tor ST 10568 (control O1), calle 10: mezcla de reacción, M: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder.

Entre los aislamientos de *V.cholerae* no-O1 seroagrupados en Japón por Shimada y colaboradores se identificaron los siguientes serogrupos: O2, O47, O109 y O75 correspondientes a casos de diarrea de pacientes procedentes de distintas provincias (Salta, Santa Fe y Buenos Aires); serogrupos O83, O2, O111 y O36, en 4 aislamientos recuperados de hemocultivo de pacientes con sepsis (Buenos Aires y Mendoza); y O6 (n=2), O96, O52 y O78 correspondientes a 4 aislamientos ambientales del estuario del Río de la Plata y un aislamiento de un pozo de agua de Santa Fe. Los aislamientos recuperados durante el brote ocurrido en Orán en el año 2000 presentaron 13 serogrupos diferentes entre 17 seroagrupados (Tabla Nº4).

Tabla N°4. Serogrupos identificados en aislamientos de *V. cholerae* no-O1 esporádicos y del brote de Orán, año 2000 (Shimada *et al.*)

Nombre de Aislamiento	Serogrupo	Origen	Fecha	Provincia	Clínica
Aislamientos esporádicos					
2E 1	O96	Ambiental	2003	Buenos Aires	
13E 1	O6	Ambiental	2003	Buenos Aires	
102E 4	O52	Ambiental	2003	Buenos Aires	
103E 4	O6	Ambiental	2003	Buenos Aires	
BA94407(35H)	O83	Humano	2001	Buenos Aires	sepsis
BA115018 (Cirillis)	O111	Humano	2002	Buenos Aires	sepsis
CF1290(36H)	O2	Humano	2002	Buenos Aires	diarrea con sangre
CF1341(37H)	O47	Humano	2002	Buenos Aires	diarrea
CF17170	O36	Humano	2002	Buenos Aires	sepsis (inmunosuprimido)
SF Torres/W (17W)	O78	Ambiental	1996	Santa Fe	
M545	O2	Humano	1993	Mendoza	sepsis, deshidratación
ST1400	O109	Humano	1992	Salta	diarrea
R3	O75	Humano	1993	Santa Fe	diarrea
Aislamientos del brote					
SGBarco	O2	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO34	O37	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO1272	O94	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO1285	O48	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO97	O8	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO149*	O49	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO207	O48	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO219	O104	Humano	2000	Salta	diarrea acuosa
SO283*	O49	Humano	2000	Salta	
SO19/W	O48	Ambiental	2000	Salta	
SO28/W	O14	Ambiental	2000	Salta	
SO39/W	O53	Ambiental	2000	Salta	
SO41/W	O27	Ambiental	2000	Salta	
SO42/W	O105	Ambiental	2000	Salta	
SO47/W	O37	Ambiental	2000	Salta	
SO49/W	O27	Ambiental	2000	Salta	
SO60/W	O4	Ambiental	2000	Salta	

*Aislamientos de *V. cholerae* no-O1 del mismo paciente y diferente fecha de toma de muestra.

Con respecto al estudio de genes de virulencia, el total de los aislamientos analizados de origen humano y ambiental resultaron positivos para el gen **hlyA** (Tabla N°6). El 59% de los aislamientos de origen humano y el 82% de origen ambiental mostraron por PCR productos compatibles con la hemolisina de *V.cholerae* alelo El Tor (presencia de los dos fragmentos: 481 pb y 738 pb), mientras que el resto presentó un solo fragmento amplificado, 481 pb compatible con otros alelos (Fig. N°5). Todas las cepas fueron analizadas fenotípicamente en un medio de agar-sangre de carnero al 10%, y se determinó la expresión de la hemolisina en el 100% de los aislamientos.

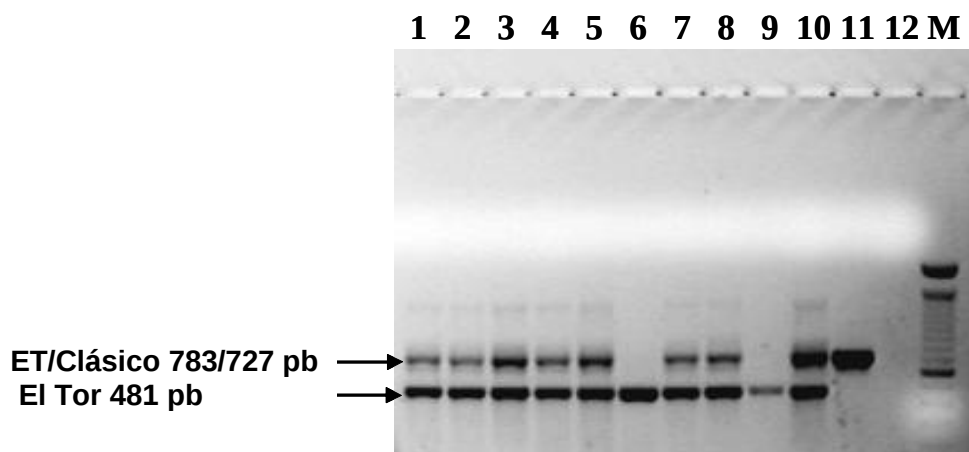


Figura N°5. PCR - Múltiple para detección del gen *hlyA* (Clásico y El Tor)

Calles 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9: aislamientos de *V. cholerae* no-O1 CF17170, M3, M545, M160, S0149, SO207 y BA115018 de origen humano; calles 2, 4: *V. cholerae* no-O1 F3W, SO47W ambiental procedentes de diferentes provincias de Argentina; calle 10: control positivo *V. cholerae* O1 Ogawa ST10568, calle 11: control positivo *V. cholerae* O1 Clásico ATCC 14035, calle 12: mezcla de reacción, M: marcador peso molecular 100 pb DNA Ladder

Casi la totalidad de las cepas humanas (97,3%) y ambientales (93,2%) fueron portadoras del gen regulatorio *toxR* asociado a la expresión fenotípica de CT y TCP (Fig. N°6), y del gen de la citotoxina *rtxA* en las cepas humanas (96,4%) y ambientales (96,6%) (Tabla N°5 y N°6).

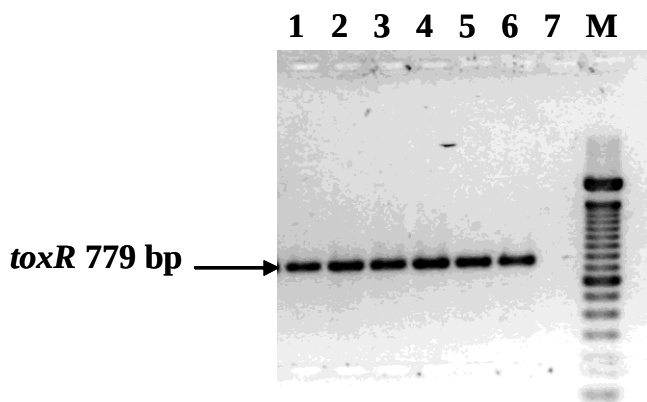


Figura N°6. PCR para detección del gen regulatorio *toxR*

Calles 1 a 4: aislamientos de *V. cholerae* no-O1 CF17170, M3, M545, M160 de origen humano y calle 5 *V. cholerae* no-O1 SO47W ambiental procedentes de Argentina; calle 6: control positivo *V. cholerae* O1 Clásico ATCC 14035, calle 7: mezcla de reacción, M: marcador peso molecular 100 pb DNA Ladder.

Con respecto a los otros genes asociados a virulencia de *V. cholerae*, el gen ***stn/o*** (+) que codifica para la toxina termoestable fue identificado en 5,9% de los aislamientos (Tabla N°6): en tres casos clínicos esporádicos (Buenos Aires y Salta) y en siete aislamientos del ambiente (Río Pilcomayo, Formosa; agua de pozo de fincas de Salta, y de canales y ríos de Córdoba (Río San Marcos, Suquía, Villa Dolores) (Fig. N°7).

Además, se investigó la presencia del gen ***tcpI*** como una forma de evaluar la presencia de la isla de patogenicidad VPI. Este gen se identificó en 10 aislamientos (5,9%): seis de casos clínicos (3 de Mendoza y 3 del brote de Salta) y cuatro del medio ambiente (2 de agua de canales de Córdoba, uno de pozo de fincas de Salta, y un aislamiento de una acequia de Jujuy que además fue portador del gen *ctxA*, cepa J31W) (Fig. N°7) (Tabla N°6). Todos los aislamientos *tcpI* positivos, resultaron portadores de los genes ***aldA*** e ***int***, también pertenecientes a la isla VPI, mientras que el resto de los aislamientos analizados mostró resultados negativos en la amplificación de estos genes.

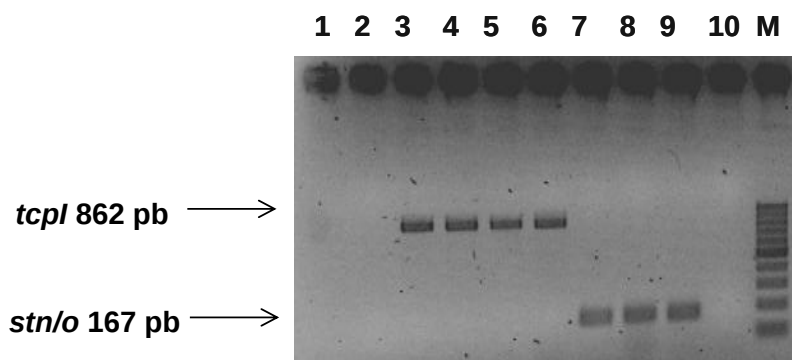


Figura N° 7. PCR - Múltiple para detección de los genes *tcpI* / *stn*:

Calles 1 a 5: *V. cholerae* no-O1 SO63 de origen humano, SO19W ambiental, M160, SO149 y Me3 (de origen humano), calle 6: control positivo para *tcpI* (+) *V. cholerae* O1 ST 10568 *ctxA*, *tcpA*, calle 7: *V. cholerae* no-O1 SO 28W ambiental, calle 8: *V. cholerae* no-O1 SO47W, calle 9: Control *V. cholerae* RC66 NAG-ST, calle 10: control de reactivos, M: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder.

En resumen, la caracterización genotípica para genes asociados a virulencia de *V. cholerae* en los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 analizados mostró un alta prevalencia de los genes *hly*, *toxR* y *rtxA* (entre 95,9% al 100%) y baja frecuencia de los genes *ctxA*, *stn* y *tcpA* (entre 0,6% y 5,9%) (Fig. N°8).

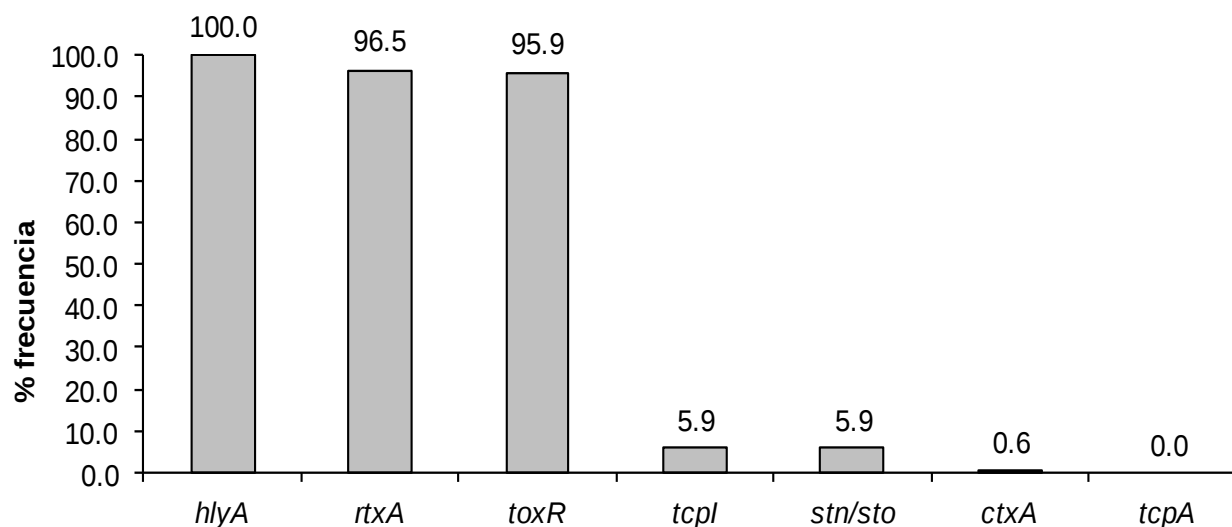


Figura N°8. Frecuencia (%) de genes asociados a virulencia en aislamientos de *V. cholerae* no-O1 (n=170)

No se observaron diferencias significativas en la distribución de genes asociados a virulencia entre aislamientos de origen clínico y ambiental (Tabla N°5), tanto para los genes de mayor prevalencia –*hlyA*, *toxR* y *rtxA*– como para los que se encontraron en baja frecuencia –*tcpA*, *stn/o*–, mientras que *ctxA* solamente se encontró en una cepa de origen ambiental.

Tabla N°5. Distribución de genes de virulencia en aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de origen humano y ambiental

Resultados PCR	N° de aislamientos n; (%)		Total
	Origen clínico	Origen Ambiental	
<i>hlyA</i> +	111; (100,0)	59; (100,0)	170; (100,0)
<i>rtxA</i> +	107; (96,4)	57; (96,6)	164; (96,5)
<i>toxR</i> +	108; (97,3)	55; (93,2)	163; (95,9)
<i>stn/o</i> +	3; (2,7)	7; (11,9)	10; (5,9)
<i>tcpI</i> +	6; (5,4)	4; (6,8)	10; (5,9)
<i>tcpA</i> +	0; (0)	0; (0)	0; (0)
<i>ctxA</i> +	0; (0)	1; (1,7)	1; (0,6)

El análisis de la distribución de los **perfiles genotípicos** de acuerdo al origen humano /ambiental para el perfil prevalente *V. cholerae hlyA, toxR, rtxA* resultó de 87,3% a 74,6% respectivamente. Con respecto a los otros perfiles determinados de menor frecuencia, el perfil *V. cholerae hlyA, toxR, rtxA, stn*; si bien resultó identificado entre los aislamientos de origen ambiental al 11,8% con respecto a los aislamientos de origen humano de 2,7%; no hay diferencia significativa (Test χ^2 , $p > 0,05$.; el valor de 0,05 es un valor establecido de acuerdo al nivel de confianza del 95%).

Tabla N°6. Distribución de perfiles genotípicos en aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de acuerdo al origen clínico o ambiental

Genotipo		Gen de virulencia						N° aislamientos n; (%)	Origen n; (%)	
VG	<i>hlyA</i>	<i>toxR</i>	<i>rtxA</i>	<i>stn</i>	<i>tcpI</i>	<i>tcpA</i>	<i>ctxA</i>		H	A
VG 1	+	+	+	-	-	-	-	141; (82,9)	97; (87,3)	44; (74,6)
VG 2	+	+	+	+	-	-	-	10; (5,9)	3; (2,7)	7; (11,8)
VG 3	+	+	+	-	+	-	-	9; (5,3)	6; (5,4)	3; (5,1)
VG 4	+	-	-	-	-	-	-	4; (2,4)	2; (1,8)	2; (3,4)
VG 5	+	-	+	-	-	-	-	3; (1,8)	1; (0,9)	2; (3,4)
VG 6	+	+	-	-	-	-	-	2; (1,2)	2; (1,8)	0; (0)
VG 7	+	+	+	-	+	-	+	1; (0,6)	0; (0)	1; (1,7)

H: Humano, A: Ambiental

Al analizar los perfiles genotípicos obtenidos entre los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, se observó el perfil prevalente *V. cholerae hlyA, toxR, rtxA* referido como VG1 con una frecuencia de 82,9% distribuído ampliamente en diferentes provincias del país en el período de estudio (1992 - 2003). Los demás perfiles genotípicos (VG2 a VG7) se encontraron en un bajo número de aislamientos, entre 0,6 y 5,9% de frecuencia y en diferentes provincias (Fig. N°9, Tabla N°7).

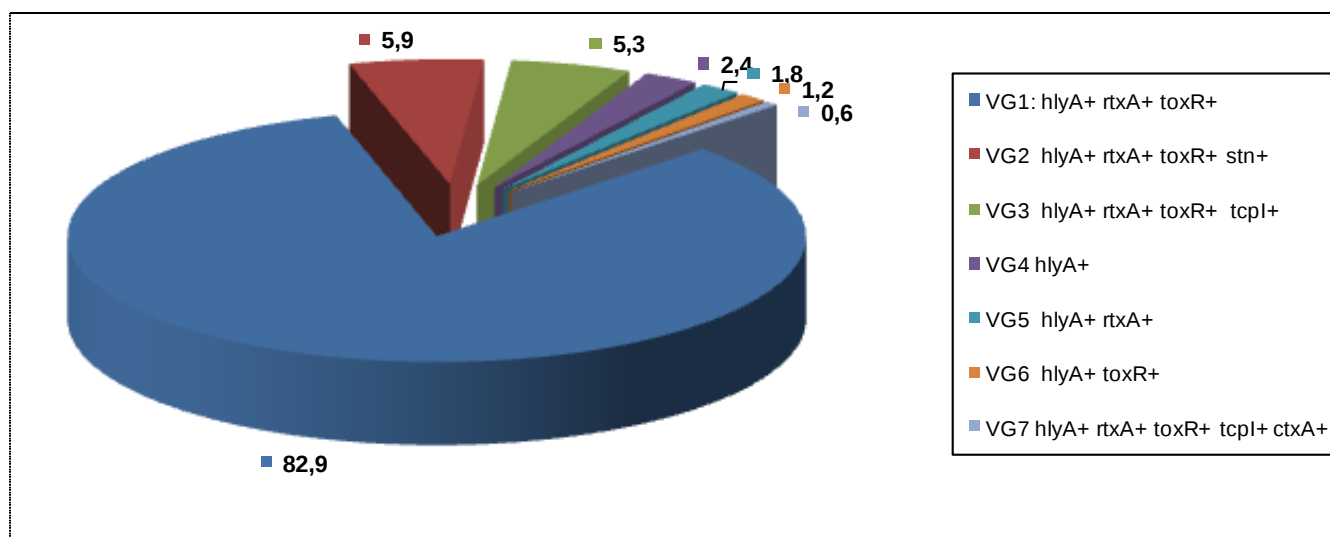


Figura N°9. Frecuencia de perfiles genotípicos (%) en aislamientos de *V. cholerae* no-O1 en Argentina.

VG1 - VG7: genotipos de virulencia de *Vibrio cholerae* N=170

Tabla N°7. Distribución de los perfiles genotípicos de virulencia de *V. cholerae* no-O1 en diferentes provincias (1992 - 2003).

Origen / N° aisl.	Fecha	Lugar de aislamiento, Provincia* (N° de aislamiento)	Perfil genotípico por PCR: VG1, VG2, VG3, VG4, VG5, VG6
Humano N° = 97 Ambiental N° = 44 N° Total = 141	1992 - 2003	SA (40), BA (21), TU (16), SFE (7), MZA (6), JU (5), CBA (2) SA (13), JU (10), TU (6), BA (5), MZA (6), SFE (3), FOR (1)	VG1: <i>Vch hlyA+ rtxA+ toxR+</i>
Humano N° = 3 Ambiental N° = 7 N° Total = 10	1993 - 1994 1992 - 2000	SA (2), BA (1) CBA (4), SA (2), FOR (1)	VG2: <i>Vch hlyA+ rtxA+ toxR+ stn+</i>
Humano N° = 6 Ambiental N° = 3 N° Total = 9	1995 - 1996 - 2000 1992 - 2000	MZA (3), SA (3), CBA (2), SA (1)	VG3: <i>Vch toxR+ hlyA+ rtxA+ tcpI+</i>
Humano N° = 2 Ambiental N° = 2 N° Total = 4	1993 - 1995 1995 - 1996	TU (1), SA (1), SA (1), JU (1)	VG4: <i>Vch hlyA+ toxR- rtxA-</i>
Humano N° = 1 Ambiental N° = 2 N° Total = 3	2000 1993 - 1998	MZA (1) SA (1), BA (1)	VG5: <i>Vch hlyA+ toxR- rtxA+</i>
Humano N° = 2 N° Total = 2	1996 - 2000	SA (1), BA (1)	VG6: <i>Vch hlyA+ toxR+ rtxA-</i>
Ambiental N° = 1 N° Total = 1	2000	JU (1)	VG7: <i>Vch tcpA- ctxA+hlyA+ toxR+ rtxA+ tcpI+</i>
Total Humano N° = 111			
Total Ambiental N° = 59			
N° Total = 170			

* Provincia: SA Salta; BA Buenos Aires; TU Tucumán; SFE Santa Fe; MZA Mendoza; JU Jujuy; CBA Córdoba; FOR Formosa.

Se continuó con la caracterización de los aislamientos que resultaron *V. cholerae* no-O1 *tcpI* y/o *ctxA*:

Entre los 10 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 ***tcpI* (+)** negativos para *tcpA* alelo El Tor (-) recuperados tanto de casos esporádicos (n=3), como los casos asociados al brote de Salta (n=3), y en aislamientos de origen ambiental (n=4) (VG3 y VG7 indicados en la Tabla N°7); un total de 5 resultaron positivos para el gen *tcpA* alelo Clásico (2 casos asociados al brote de Salta, 2 casos de Mendoza y uno ambiental de Jujuy que además resultó *ctxA* (+) (Fig. N°10).

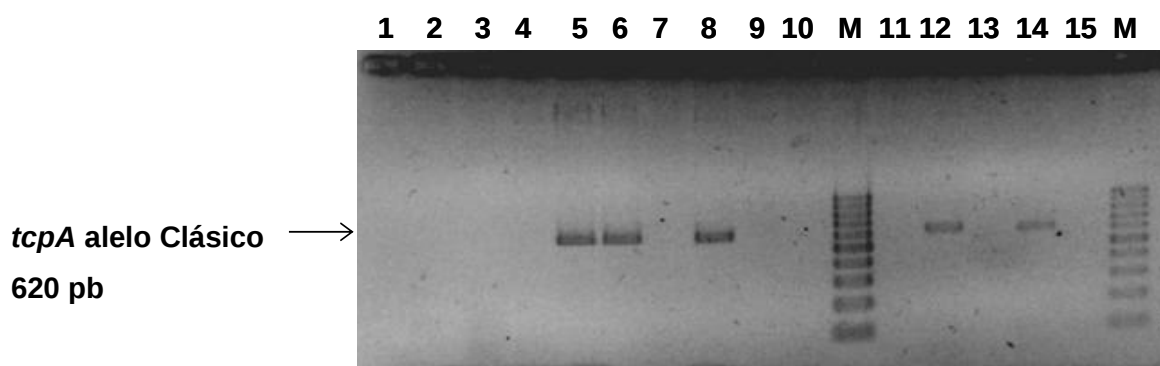


Figura N°10. PCR *tcpA* alelo Clásico

Calle 1: *V. cholerae* O1 Ogawa *ctxAB* 108/13, calle 2: *V. cholerae* no-O1 109/13, calle 3: *V. cholerae* no-O1 92 *tcpI* (+), calle 4: *V. cholerae* no-O1 95 *tcpI* (+), calle 5: *V. cholerae* no-O1 Me11844 *tcpI* (+), calle 6: *V. cholerae* no-O1 Me160 *tcpI* (+), calle 7: *V. cholerae* no-O1 Me3 *tcpI* (+), calle 8: *V. cholerae* no-O1 SO149 *tcpI* (+), calle 9: *V. cholerae* no-O1 SO34 *tcpI* (+), calle 10: *V. cholerae* CDC 105, M: marcador de peso molecular 100 pb, calle 11: control *V. cholerae* O139, calle 12: control *V. cholerae* O1 Clásico 14035, calle 13: *V. cholerae* O139 2761, calle 14: *V. cholerae* no-O1 J31W *tcpI* (+) *ctxAB*, calle 15: control de reactivos, M: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder.

Se implementó y estandarizó el protocolo de PCR - MAMA para caracterización de los genes para la subunidad B de la toxina El Tor/Clásico con controles positivos para *V. cholerae* O1 biotipo El Tor y Clásico; y controles negativos (Fig. N°11.1).

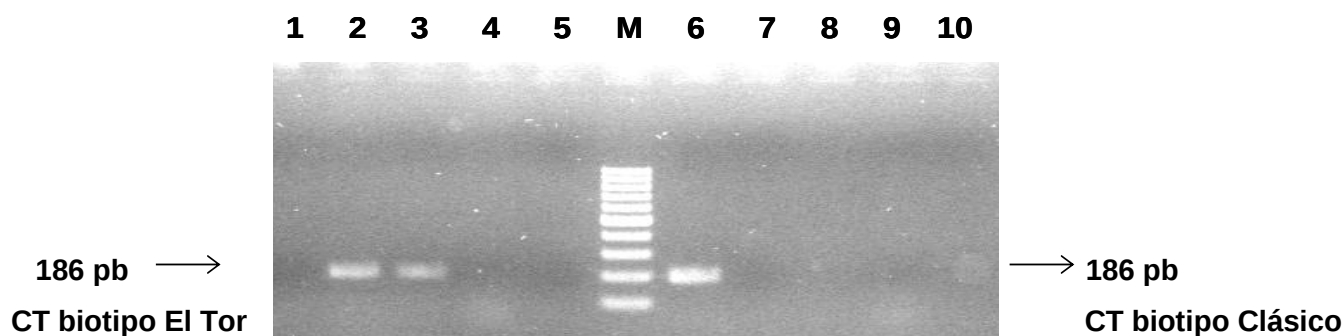


Figura N°11.1. PCR - MAMA subunidad B de *ctx* específica de biotipo El Tor / Clásico de *V. cholerae*

Calle 1: control *V. cholerae* O1 O425 Clásico *ctxA* (+) , calle 2: *V. cholerae* O1 Ogawa ST10568 *ctxA*(+), calle 3: control *V. cholerae* O1 CDC *ctxA* (+), calle 4: control *V. cholerae* O1 *ctxA* (+) Clásico14035, calle 5: control *V. cholerae* no-O1 *ctxA* (-), M: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder, calle 6: control *V. cholerae* O1 O425 *ctxA* (+) Clásico , calle 7: *V. cholerae* O1 Ogawa ST 10568 *ctxA* (+) El Tor , calle 8: control *V. cholerae* O139 *ctxA* (+), calle 9: control *V. cholerae* no-O1 *ctxA* (-), calle 10: control de reactivo.

Posteriormente, se aplicó este protocolo en el único aislamiento que resultó positivo para *ctxA* (+) *tcpA* alelo Clásico (+) cepa N° J31W de origen ambiental que resultó portadora de *ctxB* alelo Clásico, similar a la cepa control *V. cholerae* O1 *ctxA* (+) Clásico 14035 y otros aislamientos de la colección de cultivos *V. cholerae* *ctxA* (+) (Fig. N°11.2).

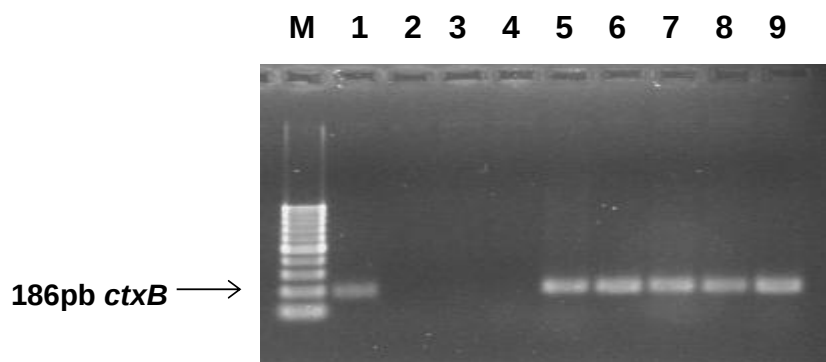


Figura N°11.2. PCR - MAMA subunidad B de la toxina *ctx* biotipo Clásico

M: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder. Calle 1: control *V. cholerae* O1 108/13 *ctxA* (+) (Trinidad y Tobago), calle 2: control *V. cholerae* no-O1 *ctxA* (-), calle 3: control *V. cholerae* O1 El Tor CDC *ctxA*(+), calle 4: control *V. cholerae* O139 *ctxA* (+), calle 5: control *V. cholerae* O1 *ctxA* (+) 14035 Clásico, calle 6: *V. cholerae* O1 Ogawa 521/09 *ctxA* (+) (Paraguay, 2007), calle 7: *V. cholerae* O1 Ogawa *ctxA* (+) (Chaco, 2005), calle 8: *V. cholerae* no-O1 **J31W** *ctxA* (+), calle 9: *V. cholerae* O1 *ctxA* (+) Clásico.

Entre los aislamientos del brote ocurrido en Salta (11 de origen humano y 9 ambientales), se determinó que todos fueron negativos para los genes *ctxA*, *tcpA* alelo El Tor y para los serogrupos O1/O139. Todos los aislamientos fueron portadores de los genes *rtxA*, *toxR* y *hlyA* correspondiente a la hemolisina de *V. cholerae* biotipo El Tor. Con respecto al gen *tcpI*, 4 aislamientos fueron portadoras de dicho gen (tres de origen humano y uno de agua de pozo de una finca), siendo los mismos aislamientos además portadores de los genes *aldA* (+) e *int* (+); y 2/4 resultaron *tcpA* alelo Clásico. Sólo 2 aislamientos de origen ambiental resultaron *stn* (+). Entre los 13 diferentes serogrupos determinados: los aislamientos de *V.cholerae* no-O1 asociados a genes de virulencia *tcpI* o *stn* fueron: O37 (*tcpI*), O49 (*tcpI*), O2 (*tcpI*), O14 (*stn*), O105 (*tcpI*) y O37 (*stn*) (Tabla N°8).

Tabla N°8. Distribución de factores de virulencia y serogrupos de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 del brote de Salta

Aislamiento	Origen	Serogrupo	Detección por PCR de los genes asociados a virulencia							
			Vc (16S-23S)	ctxA	tcpA El Tor	toxR	hlyA Clas/ELTor	rtxA	stn	tcpI
SO1272	Humano	O94	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO34	Humano	O37	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(+)
SO1285	Humano	O48	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO63	Humano	ND	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO97	Humano	O8	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO149*	Humano	O49	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(+)
SO207	Humano	O48	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO219	Humano	O104	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO283*	Humano	O49	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(+)
ST20888	Humano	ND	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO222	Humano	ND	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SGBarco	Humano	O2	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(+)
SO19W	Ambiental	O48	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO28W	Ambiental	O14	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(+)	(-)
SO30W	Ambiental	ND	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO39W	Ambiental	O53	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO41W	Ambiental	O27	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO42W	Ambiental	O105	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(+)
SO47W	Ambiental	O37	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(+)	(-)
SO49W	Ambiental	O27	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)
SO60W	Ambiental	O4	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) El Tor	(+)	(-)	(-)

ND: no determinada; SO283* y SO149*: aislamientos clínicos de un mismo paciente y diferente fecha de aislamiento.

2.- Ensayo “in vivo” en asa ligada de conejo en una selección de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 por perfil genotípico

En la Tabla N°9 se presentan los resultados de los 30 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 seleccionados para este ensayo: se analizaron cepas con diferentes perfiles genotípicos de virulencia, procedentes de distintas provincias, de origen humano y ambiental.

Las cepas de *V. cholerae* no-O1 estudiadas fueron capaces de inducir acumulación de fluido en el ensayo de asa ligada de conejo (RIL assay) con valores desde un rango de $0,06 \pm 0,01$ a $1,79 \pm 0,56$ ml/cm; presentando valores mayores a 0,70 ml/cm; 20 de los 30 aislamientos.

Si bien en este subgrupo de aislamientos se observaron valores en promedio mayores para las cepas portadoras de *tcpI* + o *stn*+, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes perfiles genéticos identificados (análisis ANOVA-Tukey Kramer realizado por FCQ, Córdoba).

El aislamiento N°J31W *ctxA* (+) *tcpI* (+) *tcpA* alelo Clásico (+) mostró un valor intermedio de FA de 0,72 ml/cm, en concordancia con el valor intermedio obtenido por ELISA-GM1 para CT, sugiriendo una baja tasa de producción de CT por parte de esta cepa, en comparación a aislamientos de *V. cholerae* O1 causantes de cólera.

Entre los 30 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, 6 fueron caracterizados como portadores del sistema de secreción tipo III (V_2N_2) (González Fraga, 2010), que mostraron valores variables de acumulación de fluido en asa ligada de conejo, entre 0,38 y 1,42 ml/cm (Tabla N°9).

Como se mencionó antes, todos los aislamientos fueron además productores de hemolisina, que también podría influir en la acumulación de fluidos, en la Tabla N°9 se detallan los grados de hemólisis en agar sangre (con halo y grado débil + a fuerte +++).

Tabla Nº9 . Caracterización del potencial enterotóxico en una selección de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de Argentina (1992-2003)

Cepa	Serogrupo	Fecha de aislamiento	Provincia	Perfil genotípico por PCR (<i>V. cholerae</i> , <i>ctxA</i> , <i>rtxA</i> , <i>toxR</i> , <i>hly</i> , <i>tcp I</i> y V_2N_2)	Ensayos fenotípicos			
					Hemólisis (mm)	Valor	Asa ligada AF (ml/cm)	DS
BA312	no-O1	07-03-94	Buenos Aires	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i> V_2N_2	3,9	+++	1,42	±0,22
BA115018 (Cirillis)	O111	01-04-02	Buenos Aires	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET ₁)	3,7	+++	1,27	±0,27
CF17170	O36	02-04-02	Buenos Aires	<i>V. cholerae toxR hly</i> (ET)	4,9	+++	1,65	±0,06
Me1338	no-O1	05-06-00	Mendoza	<i>V. cholerae rtxA hly</i> (ET) V_2N_2	1,23	+	1,01	±0,09
M545	O2	11-05-93	Mendoza	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	0,43	+	0,40	±0,32
ME3	no-O1	20-01-95	Mendoza	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>tcp I</i> V_2N_2	0,67	+	0,38	±0,18
ME160	no-O1	20-01-95	Mendoza	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET ₁) <i>tcp I</i>	1,4	+	1,29	±0,18
ME11844	no-O1	06-02-96	Mendoza	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET ₁) <i>tcp I</i>	1,23	+	1,42	±0,35
Pilcomayo (3W)	no-O1	17-03-92	Formosa	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i>	1,25	+	0,59	±0,39
R3	O75	12-05-93	Santa Fe	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET ₁)	4,23	+++	0,61	±0,44
T6189	no-O1	10-12-93	Tucumán	<i>V. cholerae hly</i> (ET ₁) V_2N_2	4,1	+++	0,82	±0,58
T347	no-O1	02-01-03	Tucumán	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	3,57	+++	0,10	±0,10
J31/W	no-O1	12-04-00	Jujuy	<i>V. cholerae ctxA toxR rtxA hly</i> (ET) <i>tcp I</i> V_2N_2	1,96	++	0,72	±0,27
ST5162	no-O1	26-11-93	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i>	1,1	+	1,04	±0,53
SSM679	no-O1	18-03-94	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	1,63	++	0,34	±0,22
ST9969	no-O1	14-02-95	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	1,97	++	0,06	±0,01
ST1239	no-O1	05-02-96	Salta	<i>V. cholerae toxR hly</i> (ET ₁)	1,76	++	0,10	±0,38
SSR536	no-O1	29-12-97	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	4,6	+++	0,51	±0,22
SO34	O37	06-01-00	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>tcp I</i> V_2N_2	1,67	++	0,89	±0,21
SO63	no-O1	07-01-00	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	1,73	++	1,07	±0,42
SO149	O49	24-01-00	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>tcp I</i>	1,0	+	1,79	±0,43
SO28/W	O14	11-02-00	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i>	3,9	+++	0,8	±0,19
SO47/W	O37	11-02-00	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i>	3,3	+++	1,37	±0,14
ST7469	no-O1	14-03-94	Salta	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i>	2,0	++	1,78	±0,38
VC4	no-O1	21-02-92	Córdoba	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	ND	+++	1,11	±0,18
VC43	no-O1	05-02-93	Córdoba	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i>	ND	++	0,91	±0,16
VC44	no-O1	05-02-93	Córdoba	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET)	ND	+++	1,16	±0,35
VC52	no-O1	01-03-93	Córdoba	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>stn</i>	ND	++	0,19	±0,23
VC92**	no-O1	23-12-93	Córdoba	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>tcp I</i>	ND	++	1,00	±0,08
VC95**	no-O1	07-01-94	Córdoba	<i>V. cholerae toxR rtxA hly</i> (ET) <i>tcp I</i>	ND	++	1,07	±0,51

Cepas aisladas de hemocultivo: CF17170, BA115018, M545.

hly ET: alelo El Tor

hly ET₁: compatible con otro alelo El Tor

AF: acumulación de fluido

ND: No determinada

Enterotoxicidad de las cepas determinado por el ensayo de asa ligada de conejo: Acumulación de fluído: AF (ml/cm) (expresada como el promedio más la desviación $\pm$ estándar de al menos tres diferentes experimentos). *V. cholerae* O1 biotype El Tor EP1/151 CT (+) fue usado como control positivo (AF: $2,03 \pm 0,48$), mientras *Escherichia coli* DH5a fue usado como control negativo (AF: $0,03 \pm 0,02$).

3.- Análisis de la diversidad genética: aplicación de PFGE

3.1.- La aplicación de la técnica de PFGE (Dalsgaard, 1996).

Esto permitió evidenciar una gran diversidad genética entre los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 procedentes de diferentes regiones de Argentina en un periodo amplio de tiempo (1992-2003). Se identificaron 161 patrones electroforéticos entre los 170 aislamientos estudiados, demostrando la gran diversidad genética entre las cepas de *V. cholerae* no-O1 en estudio. El único aislamiento ambiental *ctxA* (+), J31W, así como el aislamiento de serogrupo O139 ST2761 presentaron patrones únicos.

De los 170 aislamientos de origen humano y ambiental sólo mostraron perfiles electroforéticos idénticos o muy relacionados los siguientes aislamientos agrupados en “clusters”:

- Dos aislamientos de casos clínicos procedentes de Tucumán con el mismo perfil electroforético y perfil genotípico *V. cholerae toxR, rtxA, hly* (Fig.Nº12, calles 3 y 4). Estos casos clínicos podrían haber tenido relación epidemiológica, ya que fueron recuperados en la misma fecha (10-02-97), aunque dicha relación no fue confirmada.

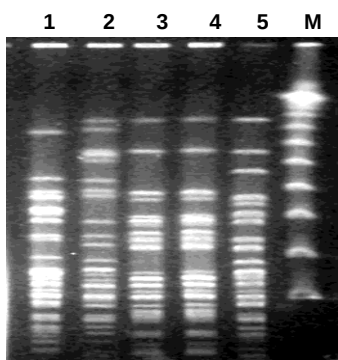


Fig. Nº12: PFGE con la enzima *NotI* (protocolo según Dalsgaard, 1996) de aislamientos de origen humano de *V. cholerae* no-O1 procedentes de Tucumán. Calles 1 a 4: aislamientos de origen humano de *V. cholerae* no-O1 T6189, T347, T860 y T870. Calle 5: aislamiento de control de *V. cholerae* O1 de Argentina ST 10568. M: Marker Lambda Ladder PFGE.

- Dos aislamientos de origen ambiental procedentes del estuario del Río de La Plata (serogrupos O96 y O6), recuperados en una misma estación de muestreo de 1/08/03 y 4/08/03; con el mismo perfil electroforético y perfil genotípico *V. cholerae toxR, rtxA, hly*.
- Dos aislamientos de origen ambiental procedentes de otra estación del estuario del Río de La Plata (serogrupos O52 y O6), aislados el 6/08/03 y 7/08/03, con el mismo perfil electroforético y perfil genotípico *V. cholerae toxR, rtxA, hly*.
- Dos aislamientos de casos clínicos (VC4 y VC44) procedentes de Córdoba del año 1994 con igual perfil electroforético y perfil genotípico *V. cholerae toxR, rtxA, hly*.
- Dos aislamientos de origen ambiental (agua de canales) procedentes de Córdoba del año 1992 (VC92 y VC95) con idéntico perfil electroforético y perfil genotípico *V. cholerae toxR, rtxA, hly, tcpI*.
- Dos aislamientos de origen ambiental (J328W y J325W) (agua de un canal y del Río Grande de Tilcara), Jujuy, aislados el 10-02-97 que resultaron de perfil idéntico y otro aislamiento (J393W) recuperado el 19-02-97 del Río Grande de Tilcara de perfil relacionado (diferencia de dos bandas). Los tres aislamientos mostraron el mismo perfil genotípico *V. cholerae toxR, rtxA, hly*.
- Dos aislamientos de casos clínicos de Mendoza (M160 y M11844) (esporádicos) y uno de Salta (SO149 del brote investigado en Orán) mostraron dos patrones electroforéticos altamente relacionados entre sí, a pesar de las diferencias en sus fechas de aislamiento (1995, 1996 y 2000 respectivamente). Estos aislamientos mostraron también idéntico perfil genotípico *V. cholerae toxR, rtxA, hly, tcpI, tcpA* alelo Clásico.
- Los aislamientos del brote de Salta (Orán, enero / febrero 2000), se analizaron aplicando los criterios de Tenover de acuerdo al número de bandas compartidas entre los perfiles de PFGE. Se identificaron diferentes patrones electroforéticos de relación distante entre ellos (más de 6 bandas de diferencia), salvo dos aislamientos que presentaron idéntico perfil genotípico: *V. cholerae* (SO63) y *V. cholerae* (SO1285, serogrupo O48); y otros dos aislamientos, *V.*

cholerae (SO149 y SO269, ambos serogrupo O49) recuperados estos dos últimos de un mismo paciente en diferentes fechas. Por lo tanto, en concordancia con lo observado a nivel de diversidad de serogrupos, se descartó la presencia de un brote causado por única cepa, y en cambio se determinó que el aumento en el número de casos fue causado por múltiples cepas con diferentes subtipos genéticos, posiblemente vinculadas a una misma fuente de infección, el agua, según se postuló en el estudio epidemiológico. Algunos de los aislamientos que resultaron del mismo serogrupo O37 (n=2), O27 (n=2) y O48 (n=3) mostraron diferentes perfiles genotípicos dentro de un mismo serogrupo.

3.2.- El protocolo estandarizado de PFGE de la Red PulseNet con la primera enzima *Sfil*.

Se aplicó a una selección de 30 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 que presentaban distintos perfiles genotípicos asociados a virulencia (2 resultaron no tipables por esta técnica). En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente con el primer protocolo de PFGE según Dalsgaard, 1996 se observó diversidad genética entre los 28 aislamientos tipificables. Sin embargo, algunos aislamientos fueron agrupados en “clusters” (Fig. N°13): dos aislamientos *V.cholerae toxR, rtxA, hly* de origen clínico (VC4 y VC44); dos *V.cholerae toxR, rtxA, hly, tcpI* de origen ambiental de Córdoba (VC92 y VC95); y tres aislamientos *V.cholerae toxR, rtxA, hly, tcpI, tcpA* alelo Clásico de origen clínico de Mendoza (M160 y M11844) y Salta (SO149). El único aislamiento N°J31W portador del gen *ctxA*⁺ mostró un patrón diferente a los otros subtipos identificados. Los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 que resultaron positivos para el gen *stn* presentaron diferentes patrones electroforéticos entre sí, en oposición a la relación genética observada entre los aislamientos *tcpI* (+).

Los perfiles electroforéticos obtenidos de los aislamientos caracterizados fenogenotípicamente y ensayados en su potencial enterotóxico, fueron analizados con el software BioNumerics e ingresados a la Base de Datos Nacional para *V. cholerae*.

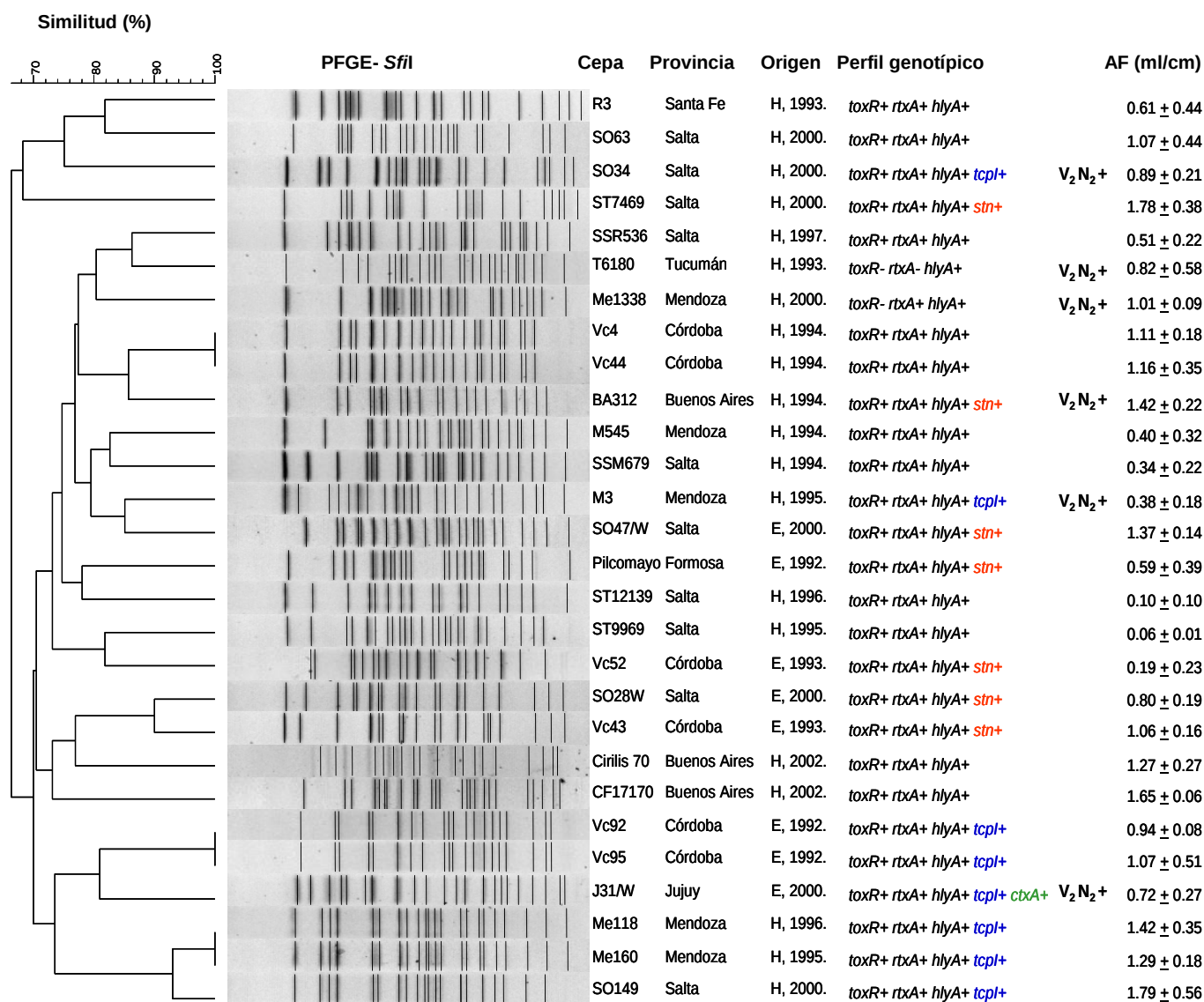
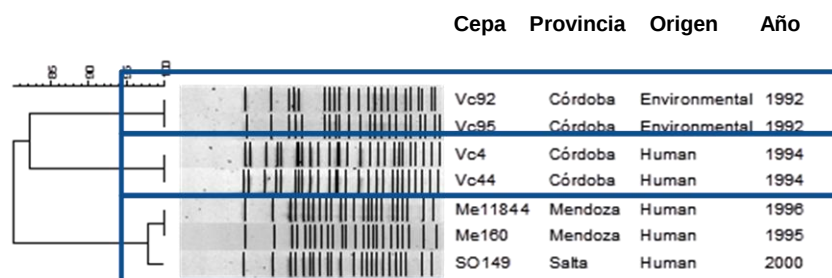


Figura N°13. Diversidad genética y potencial enterotóxico de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de Argentina. Patrones de restricción por PFGE-*SfiI* de 28 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 seleccionados por perfil genotípico. Analizados con BioNumerics Applied Maths versión 4.6. Coeficiente de Dice % Similitud. Origen H: humano, E: ambiental. AF: acumulación de fluido.

La similitud genética observada por *SfiI*-PFGE e identificada anteriormente, fue confirmada además con la segunda enzima *NotI* para un subgrupo de aislamientos (Fig. N°14).



 Subtipos genéticos relacionados genéticamente entre sí, confirmados con la segunda enzima *NotI*.

Figura N°14. Dendrograma de la relación genética de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 con la enzima *NotI*

3.3.- Comparación en la BDN con los subtipos genéticos ingresados de *V. cholerae*

La aplicación del protocolo estandarizado de PFGE permitió comparar los subtipos genéticos de los aislamientos estudiados con los correspondientes a otros aislamientos de *V. cholerae* ingresados en la BDN, incluyendo cepas de *V. cholerae* O1. Se observó que los subtipos de los aislamientos de la selección de *V. cholerae* no-O1 (n=28, de 1992 a 2003), fueron diferentes (similitud $\leq$ a 75) a los subtipos genéticos de los aislamientos de *V. cholerae* O1 de la epidemia de cólera (1992-1998). También mostraron baja similitud con respecto a la variante de Tucumán de *V. cholerae* O1 no toxigénico (1994-1995, Pichel et al., 2003) y a otras cepas recientemente recuperadas en el marco de la vigilancia tales como: *V. cholerae* O1 *ctxA* (-) *tcpI* (+), *V. cholerae* O139 (2014) (Moroni y col., 2014) y *V. cholerae* no-O1 asociadas a brotes (Tucumán, 2007; Salta, 2008) y esporádicos desde 2003 al 2014. De este análisis comparativo en la BDN el aislamiento ambiental J31W de *V. cholerae* portador de los genes *ctx* y *tcp* alelo Clásico, al igual que la cepa N°ST 2761 *V. cholerae* O139 no toxigénico, mostraron patrones únicos diferentes a los patrones observados en las cepas epidémicas de los 90'. Los aislamientos esporádicos de *V. cholerae* *toxR*, *hlyA*, *rtxA* de hemocultivos (N° 575/13, M545, CF17770, BA115018, 491/14, 308/11) mostraron perfiles electroforéticos por PFGE diferentes entre sí y a los ingresados en la base de subtipos genéticos (Fig. N°15). En la figura 15 se muestra una selección de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 y O1 ingresados en la BDN (2003 al 2014) incluyendo los aislamientos del presente estudio (1992 al 2003).

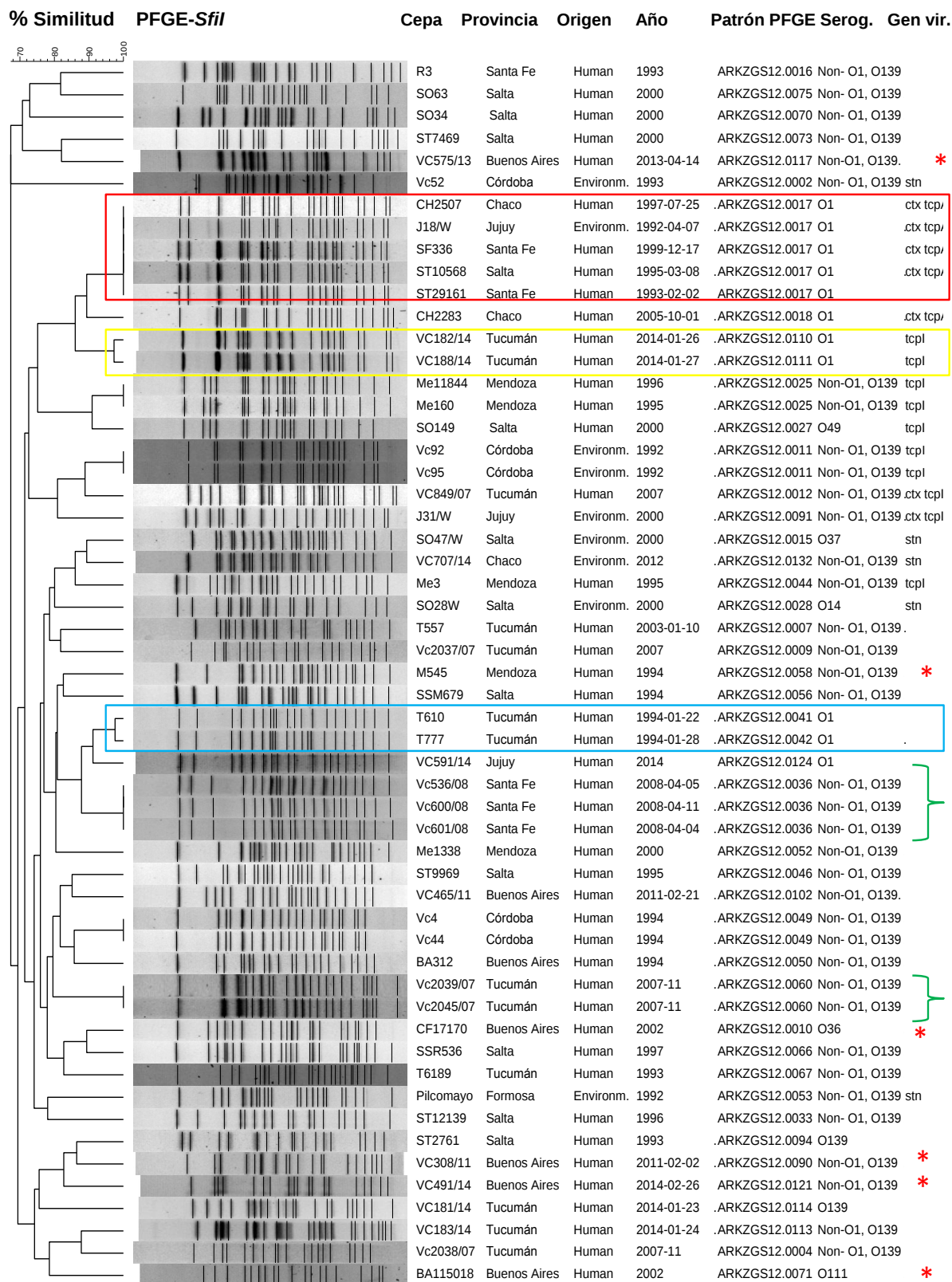


Figura N°15. Dendrograma de relación genética de una selección de aislamientos de *V. cholerae* de la BDN (237 aislamientos; enzima *SfiI*: 218 patrones), coef. Dice.

- Aislamientos *V. cholerae* O1 CT (-) referidos como variante Tucumán, 1994.
- Aislamientos *V. cholerae* O1 CT, TCP (+) de brotes epidémicos, 1992 al 1999.
- Aislamientos *V. cholerae* O1 CT (-), TCP (+) de Tucumán, 2014.

* Aislamientos *V. cholerae* no-O1 de hemocultivo (bacteriemia, HIV, cirrosis y suboclusión intestinal), de 1994, 2002, 2011, 2013 y 2014.

Llave verde: aislamientos de *V. cholerae* no-O1 incluídos en un brote detectado en Santa Fe de una institución de salud en el año 2008, y en otro brote, comunitario, en Tucumán, 2007.

Serog.: serogrupo. Gen vir.: gen de virulencia por PCR.

V.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Si bien *V. cholerae* no-O1 ha sido reconocido como un agente etiológico de gastroenteritis e infecciones extraintestinales (Janda *et al.*, 1988, Morris *et al.*, 1994; Daniels *et al.*, 2000), su capacidad y/o potencial patogénico no han sido completamente estudiados ni definidos en cuanto a sus mecanismos de virulencia como en los serogrupos de *V. cholerae* productores de toxina de cólera (Colwell *et al.*, 1996). En 1992, la emergencia de *V. cholerae* O139 en Bangladesh, India (Reeves, 1998), destacó la necesidad de la vigilancia de otros serogrupos de *V. cholerae* además del O1.

En nuestro país, la recuperación de *V. cholerae* no-O1 como parte de la vigilancia intensiva en el contexto de los brotes epidémicos de cólera (1992-1998) planteó la necesidad de investigar el rol patogénico de estos serogrupos. En este trabajo se implementaron técnicas de caracterización fenogenotípica que incluyeron además de la detección de los genes asociados a cólera epidémico *ctxA* y/o *tcpA*, otros genes de virulencia como *hly*, *toxR*, *rtxA*, *stn*, *tcpI* que habían sido descritos en estudios internacionales (Rivera *et al.*, 2001, 2003; Chatterjee *et al.*, 2009) y a nivel nacional (González Fraga *et al.*, 2009). Por otra parte, la evidencia de transferencia de elementos genéticos móviles entre cepas de *V. cholerae* (Karaolis *et al.* 1998), junto al conocimiento del ambiente acuático como medio natural del microorganismo, llevó a incluir en la investigación a la par de aislamientos de casos clínicos, aislamientos ambientales como posibles reservorios de genes asociados a virulencia con potencial patogénico (González Fraga *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2001).

Diversos estudios de diversidad genética han sido focalizados principalmente en cepas epidémicas de *V. cholerae* O1/O139 (Sharma *et al.*, 1998; Faruque *et al.*, 1994; 2003, Pichel *et al.*, 2003). En este trabajo el análisis de la subtipificación molecular de aislamientos de

V. cholerae no-O1 de casos de gastroenteritis, sepsis e inclusive asociados a brote permitió determinar la relación genética entre estas cepas circulantes en Argentina, contribuyendo a la vigilancia epidemiológica de este microorganismo. Además, la aplicación de un protocolo estandarizado en el marco de la Red PulseNet (Cooper *et al.*, 2006) permitió el ingreso de subtipos circulantes de *V. cholerae* no-O1 desde 1992 a la Base de Datos Nacional para subtipos de *V. cholerae* (Moroni y col., 2014) y la comparación con los subtipos de *V. cholerae* O1 asociados a brotes epidémicos (1992-1998) y de otros aislamientos de *V. cholerae* no-O1 recuperados recientemente en el marco de la vigilancia.

La caracterización de los perfiles genéticos de virulencia asociados a los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 recuperados en un amplio periodo de tiempo en nuestro país facilitó el diseño de un flujograma de aplicación diagnóstica en el marco de la Red Nacional de Diarreas (Anexo Fig. I y II).

- Entre las herramientas moleculares implementadas para el diagnóstico de *V. cholerae*, se destaca:

La aplicación de la reacción de PCR-Múltiple para identificar la presencia de los genes: *ctxA*, *tcpA* alelo El Tor y región intergénica específica 16S-23S rRNA de *V. cholerae* permitió confirmar la identidad de los aislamientos estudiados y estudiar la presencia de los **factores de virulencia asociados a cólera epidémico**: toxina CT y factor de colonización TCP El Tor en forma rápida y específica. Esta técnica molecular fue transferida a los laboratorios de la Red Nacional de cólera y diarreas bacterianas para la identificación y caracterización de aislamientos de *V. cholerae* en el marco de la vigilancia de este enteropatógeno.

Se determinó una buena correlación entre las dos técnicas empleadas para identificar los serogrupos O1 y O139 (aglutinación en placa y PCR), salvo en algunas cepas rugosas con características autoaglutinantes en las cuales la reacción de PCR fue la que permitió definir el serogrupo. Por lo tanto, esta reacción de PCR Múltiple también constituye un importante aporte, para la **identificación rápida de los serogrupos O1 y O139**. Estudios realizados en Tailandia durante los brotes epidémicos aplicaron técnicas basadas en PCR a los fines de un diagnóstico diferencial rápido de serogrupos O1/O139 de los no-O1 no-O139 (Bhumiratana A *et al.*, 2014).

El perfil genotípico prevalente determinado por PCR en el estudio de *V. cholerae* no-O1, *ctxA* (-), *tcpA* alelo *El Tor* (-), *toxR* (+), *hlyA* *El Tor* (+), *rtxA* (+), diferente al que presentan las cepas epidémicas de *V. cholerae* O1, portadoras de *ctxA* y *tcpA*, concuerda con lo observado en cepas de *V. cholerae* no-O1 de otras regiones y sugiere el posible **rol de factores como la hemolisina y la citotoxina RTX en la patogénesis de *V. cholerae* no-O1.**

La actividad enterotóxica de la hemolisina alelo *El Tor* ha sido demostrada en varios modelos de animales (Mahendra et al., 2003), como también la actividad de apoptosis a nivel celular (Saka et al., 2008). La **variabilidad** observada en cuanto a la detección del fragmento de 738 kb correspondiente al **gen *hlyA* de la hemolisina *El Tor*** sugiere que existen diferencias en la secuencia de este gen entre distintos aislamientos de *V. cholerae* no-O1. Esta información podría ser útil para la identificación de “subtipos” portadores de distintas secuencias (futuro desarrollo de técnicas de PCR-RFLP o PCR-secuenciación), como caracterización complementaria en estudios de epidemiología molecular. Hubo correlación entre la presencia del gen *hlyA* y la detección de actividad hemolítica, aún en las cepas portadoras de distintos alelos, sugiriendo que existe expresión fenotípica de este gen, más allá de la diferencia entre los alelos.

Por otra parte, la actividad citotóxica de la **toxina RTX**, codificada por el gen *rtxA*, ha sido demostrada sobre células en cultivo (Lin et al., 1999), y dicha toxina pertenece a la familia de toxinas (RTX) implicada también en la patogénesis de otros organismos Gram (-) como *E. coli* enteropatógena (Fullner et al., 2000).

En general, no se observaron diferencias en la distribución de genes asociados a virulencia en aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de origen humano ó ambiental, sugiriendo que **el ambiente acuático constituye un verdadero reservorio de cepas con capacidad patogénica** (Costagliola y col., 2000; Rivera et al. 2001, G. Fraga et al., 2007); las cuales dadas las condiciones adecuadas, son capaces de diseminarse y causar enfermedad en el hombre.

El **gen *stn/o***, que codifica una toxina termoestable postulada como un importante factor de virulencia de *V. cholerae* no-O1 (Sarkar et al., 2002), fue encontrado sólo en 5,9% de los aislamientos estudiados, con mayor frecuencia en cepas de origen ambiental.

La aplicación de PCR para detección del **gen *tcpI***, regulador de la síntesis del factor de colonización TCP, fue un importante aporte, ya que se han descrito nuevas variantes del gen estructural del operón *tcpA* (Nandi *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2002), que no son posibles de detectar con los “primers” para *tcpA* alelo El Tor/Clásico. Por esta razón, se incluyó en el estudio el gen *tcpI* y otros dos genes como marcadores de la isla de patogenicidad VPI: *aldA* e *int*. Dado que el factor de colonización TCP codificado en dicha isla, funciona como receptor para el fago CTX ϕ (portador del gen para la toxina de cólera CT), es de gran relevancia la identificación de estas **cepas potencialmente epidémicas, que podrían adquirir dicho fago**.

Dos hallazgos demostraron **la transferencia horizontal de genes** implicados en la virulencia de *V. cholerae* O1 epidémico a los aislamientos de *V. cholerae* no-O1: la identificación de un aislamiento de *V. cholerae* no-O1 *ctxA* (+) de origen ambiental y la detección de diez aislamientos (5,9%) (seis humanos y cuatro ambientales) portadores de los genes correspondientes a la isla VPI: *tcpI*, *aldA* e *int*. Cabe destacar que estos últimos genes se encontraron en algunos casos esporádicos, pero también asociados a aislamientos recuperados durante un brote de gastroenteritis detectado en Orán, Salta (tres de casos clínicos y una ambiental). Esto sugiere que la adquisición de estos factores de virulencia podría haber aumentado la capacidad patogénica y/o de persistencia/transmisión de estos aislamientos. La identificación de aislamientos de origen ambiental *V. cholerae* no-O1 toxigénicos (*ctxA*+) con factor de colonización de la isla de patogenicidad VPI-1 como la cepa J31W también ha sido descrita en otras regiones, destacando el potencial patógeno de ciertas cepas *V. cholerae* no-O1 que deben estar bajo vigilancia (Ceccarelli *et al.*, 2015; Chatterjee *et al.*, 2009).

Además, la presencia del gen *tcpA* alelo Clásico en algunos aislamientos *tcpI* (+) (5/10), entre los que se evidenció además relación genética (en 3/5); estaría indicando la presencia en nuestro país de nuevos subtipos de *V. cholerae* portadores de alelos de *tcp* diferentes del factor de colonización TCP alelo El Tor que había sido identificado durante la epidemia de cólera de los años 90'. Estos subtipos podrían dar origen a nuevas cepas de *V. cholerae* no-O1 con potencial patógeno/epidémico, a través de la adquisición de genes adicionales de virulencia.

Por otra parte, ante la emergencia de nuevas variantes de *V. cholerae* en la Región de América, como la observada en Haití en 2010 (OMS, 2010; Ali *et al.*, 2011, Hasan *et al.*, 2012) la incorporación de nuevas técnicas moleculares, cuya secuencia blanco permite la diferenciación

de la subunidad B de *ctx* biotipo El Tor/Clásico (Morita *et al.*, 2008) y *tcpA* alelo El Tor/Clásico permitió una caracterización completa y detección de nuevos perfiles genotípicos en algunos aislamientos de *V. cholerae* no-O1 *ctxA* y/o *tcp* (+) circulando en el período de estudio en Argentina. Este protocolo ha sido incorporado a las técnicas utilizadas en el LNR y puede ser transferido, al igual que los demás ensayos de PCR, a la RND y PTA, como también a otros laboratorios que lo requieran.

Por otra parte, el grupo de aislamientos seleccionados por perfil genotípico fueron capaces de inducir **acumulación de fluido en el ensayo de asa ligada de conejo** (CIBIFI, FCQ, Córdoba) en un amplio rango de valores inclusive con un mismo perfil genotípico, indicando que otros factores o combinación de factores de virulencia distintos que CT, como también variables asociadas a la expresión fenotípica de los genes estudiados, pueden ser responsables de las propiedades de virulencia de *V. cholerae* no-O1, llevando a síntomas de diarrea severa “cholera-like” en humanos. Si bien se observaron los valores más altos para los aislamientos portadores principalmente de los genes *tcpI* o *stn*, no hubo diferencias significativas con respecto a un perfil genotípico determinado.

En relación al estudio de diversidad genética, el **análisis por PFGE** aplicado a 170 aislamientos de *V. cholerae* no-O1 tanto de origen humano como ambiental, permitió establecer la **gran diversidad genética** de los aislamientos circulantes en el país. El alto poder discriminatorio del PFGE hace que sea una técnica ideal para estudios de epidemiología local, incluyendo la investigación de brotes. Además, los perfiles determinados en ese período de estudio con el protocolo estandarizado en el marco de PulseNet permitieron el ingreso de los subtipos circulantes identificados a la Base Nacional de Subtipos Genéticos de *V. cholerae*, haciendo posible la comparación con los subtipos detectados recientemente de aislamientos esporádicos de gastroenteritis, infecciones extra-intestinales y cepas recuperadas en el contexto de brotes. Actualmente la aplicación de esta herramienta molecular que establece relaciones genéticas se realiza como parte de la vigilancia epidemiológica de este microorganismo, para todos los aislamientos de *V. cholerae* recibidos en el LNR. En el estudio del **brote de gastroenteritis ocurrido en Orán, Salta**, al aplicar PFGE se demostró gran diversidad entre los aislamientos, pertenecientes a trece diversos serogrupos. Así, el estudio de subtipificación molecular **demostró el origen policlonal del brote**. Asimismo, se han observado casos

similares en otros países, como Perú (Dalsgaard A, Albert MJ *et al.*, 1995) donde se registró un brote de diarrea a causa de *V.cholerae* no-O1 CT (-), NAG-ST (-), causado por siete serogrupos diferentes y en Tailandia (Dalsgaard A, Serichantalergs O *et al.*, 1995), donde también se hallaron diferentes serogrupos entre las cepas de *V. cholerae* no-O1 como agente causal de diarrea esporádica y brotes.

Entre los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 que fueron seroagrupados por Shimada, **no se determinó correlación entre serogrupo y perfil electroforético por PFGE** o perfil genotípico, lo cual sugiere la posible transferencia y/o re-arreglos de los genes implicados en la síntesis del antígeno somático O entre distintos aislamientos. Esta teoría ya ha sido demostrada para algunos serogrupos de *Vibrio cholerae*, incluyendo la emergencia de *V. cholerae* O139 epidémico a partir de *V. cholerae* O1 El Tor (Singh *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).

Al comparar en la BDN, si bien los aislamientos de *V. cholerae* no-O1 resultaron diferentes a los subtipos genéticos correspondientes a la cepa epidémica de los 90', sería de interés profundizar la caracterización de los subtipos más cercanos a los de *V. cholerae* O1 epidémico, como también de los aislamientos portadores de los genes *ctx* y *tcpI*, mediante la aplicación de técnicas que empleen secuencias conservadas como blanco, como el "Multilocus Sequence Typing" (MLST) (González Fraga, Tesis doctoral, 2010) o el análisis de secuenciación genómica, a fin de investigar la posible relación filogenética y evolución de clones circulantes en el país entre sí y con respecto a otras regiones (Mutreja *et al.*, 2011).

En resumen, todos los hallazgos obtenidos durante el estudio señalan la importancia de implementar una continua y sistemática vigilancia de *Vibrio cholerae* no-O1 en Argentina, que contemple la identificación y caracterización de aislamientos clínicos, como también el monitoreo de las cepas en el ambiente, a fin de detectar aislamientos con potencial patogénico y epidémico.

- Entre los aportes de la investigación de *V. cholerae* no-O1 se destacan:

Este estudio de caracterización genotípica de *Vibrio cholerae*, sumado a la experiencia del laboratorio en la aplicación de técnicas moleculares estandarizadas permitió el **diseño de un flujograma diagnóstico** para la vigilancia de *V. cholerae* en el marco de la RND y PTA, con la

aplicación de PCR como método transferible y rápido, complementario de la caracterización fenotípica, a los fines de un diagnóstico oportuno (Anexo).

Los protocolos de PCR descritos en este estudio para *V. cholerae*, *ctxA*, *tcpA* El Tor, *stn*, *tcpI* y serogrupos O1/O139 fueron transferidos en el Taller de “Fortalecimiento de la vigilancia laboratorial de *Vibrio cholerae*” realizado en Buenos Aires, en marzo de 2011, teniendo en cuenta la emergencia por *V. cholerae* O1 en la Región (brote de Haití, 2010) y se continuó el fortalecimiento en capacitación para la vigilancia en los Talleres integrados de Redes de Laboratorios realizados en mayo 2013, Buenos Aires.

Se identificaron los perfiles genéticos de virulencia de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de origen humano y ambiental circulantes en Argentina

Se determinó la diversidad genética de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 de origen clínico y del ambiente acuático y se incluyeron los subtipos identificados en la Base de Datos Nacional de subtipos genéticos de *V. cholerae* para referencia en la vigilancia y futuros estudios de brotes.

Este trabajo constituye un amplio estudio de caracterización de *Vibrio cholerae* no-O1 en Argentina. Los resultados obtenidos han permitido significativos avances en el conocimiento de este patógeno, agente causal de diarrea en niños y adultos y asociado a infecciones extra-intestinales en inmunocomprometidos y pacientes con enfermedad de base en nuestro país. Además estos resultados han aportado herramientas esenciales que se aplican actualmente en el diagnóstico y la vigilancia de este microorganismo.

VI.- Resumen

V. cholerae no-O1 ha sido asociado con casos esporádicos de diarrea y con infecciones invasivas (Morris *et al.*, 1990, 1994), y ha sido reconocido en reservorios ambientales (Colwell *et al.*, 2006). Sin embargo, la capacidad y el rol patogénico de *V. cholerae* no-O1 no está tan estudiada e investigada como la asociación de *V. cholerae* a cólera epidémico y a los serogrupos O1/O139. La emergencia de una nueva cepa *V. cholerae* no-O1 con características epidémicas en India, serogrupo O139 en 1992; destacó la necesidad de la vigilancia de otros serogrupos de *V. cholerae*. En este estudio el objetivo fue caracterizar feno-genotípicamente y establecer la diversidad genética de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 de origen humano y ambiental circulantes en Argentina en un periodo amplio de tiempo (1992 – 2003) a los fines de identificar perfiles genéticos de este microorganismo con potencial patogénico.

De un total de 1302 aislamientos remitidos al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) desde la implementación de la vigilancia activa del cólera en 1992 hasta el año 2003, se seleccionaron 170 aislamientos de *V. cholerae* no-O1. Entre ellos, se estudiaron para determinar la distribución de genes asociados a factores de virulencia 111 de casos clínicos y 59 de origen ambiental procedentes de diferentes regiones de Argentina, incluyendo 20 aislamientos correspondientes a un brote ocurrido en Salta en el año 2000. La caracterización genotípica fue realizada a través de la implementación de protocolos de PCR descriptos para la identificación de los genes *ctxA* (toxina de cólera), *tcpA* (factor de colonización TCP alelo ElTor/Clásico), *toxR* (gen regulador), *rtxA* (citotoxina), *hly* (hemolisina), *tcpI*, y *stn* (toxina termoestable). En una selección de 30 aislamientos que presentaron diferentes perfiles genotípicos se estudió la enterotoxigenicidad mediante un ensayo de acumulación de fluido en asa ligada de conejo (colaboración con CIBICI, FCQ, Universidad Nacional de Córdoba). Finalmente, se realizó un estudio de diversidad genética de los 170 aislamientos por electroforesis en campo pulsado (PFGE) según Dalsgaard *et al.*, 1996 y en la misma selección de aislamientos ensayada para enterotoxigenicidad se aplicó el protocolo estandarizado de PFGE de la Red PulseNet Internacional. Casi la totalidad de los aislamientos estudiados fueron *V. cholerae* no-O1, excepto un aislamiento de *V. cholerae* O139; y resultaron negativos para los factores de virulencia asociados a cólera epidémico CT y/o TCP, excepto un aislamiento de origen ambiental portador de los genes *ctxA* y *tcpI*. Entre los perfiles genéticos determinados por PCR, *V. cholerae* no-O1 portador de los genes *hlyA*, *toxR* y *rtxA* resultó el más prevalente con una frecuencia del 82,9%. Otros perfiles genotípicos identificados

en menor frecuencia, presentaron la combinación de la hemolisina (*hlyA*) con otros factores de virulencia, tales como *ctxA*, *tcpI* y/o *stn* entre un rango de 0,60% al 5,9% y distribuído en aislamientos de origen humano y del ambiente. Resultó de interés el hallazgo de un aislamiento *V. cholerae* no-O1 ambiental *ctxA tcpA* alelo Clásico, *tcpI*; un aislamiento *V. cholerae* O139 de un caso clínico *toxR*, *rtxA*, *hly*; y cinco aislamientos portadores de *tcpA* alelo Clásico entre diez cepas *V. cholerae tcpI* positivas. En general no hubo grandes diferencias en los perfiles genéticos determinados en aislamientos de origen humano como ambiental, señalando el ambiente como reservorio de cepas con potencial patogénico.

Las cepas analizadas en el ensayo de enterotoxigenicidad fueron capaces de inducir acumulación de fluídos en un amplio rango de valores inclusive con un mismo perfil genotípico, indicando que una combinación de factores de virulencia u otras variables relacionadas con la expresión fenotípica intervienen en las propiedades de virulencia de *V. cholerae* no-O1. El estudio de subtipificación molecular demostró la gran diversidad genética de los aislamientos de origen clínico y ambiental, salvo algunas excepciones que presentaron un mismo perfil genotípico. Entre ellos se identificaron 7 grupos o “clusters” incluyendo 2 a 3 aislamientos cada uno, de casos clínicos y reservorios ambientales (ríos, estuarios, canales) de varias provincias: 6/7 procedentes del mismo lugar y relacionados temporalmente dentro de cada grupo. En 1/7 se identificó un subtipo genético que incluyó aislamientos de diferentes provincias y año asociado al perfil genético de *V. cholerae* no-O1 *toxR*, *rtxA*, *hly*, *tcpI*. Además, la aplicación de PFGE demostró el origen policlonal del brote de Salta asociado a 13 diferentes serogrupos de *V. cholerae*, que presentaron 18 perfiles de PFGE distintos. Los subtipos circulantes obtenidos por el protocolo estandarizado de la Red PulseNet fueron ingresados a la Base Nacional de subtipos de *V. cholerae*, resultando diferentes a las cepas epidémicas de *V. cholerae* O1 de la década del 90`.

La identificación de los perfiles genéticos de virulencia circulantes en el país permitió el diseño de un flujograma diagnóstico que fue transferido en el marco de la Red Nacional de Diarreas. Este trabajo permitió la aplicación de herramientas moleculares para el diagnóstico, caracterización y vigilancia de *V. cholerae* no-O1 en el país.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abbott SL, Janda JM, Farmer JJ III. *Vibrio* and Related Organisms. En: Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Ed. Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock D. American Society for Microbiology Press Washington DC. 2011. Cap 39, págs. 666-676.
2. Alam M, Hasan N, Sultana M, Nair B, Sadique A, Faruque A, Endtz H, Sack R, Huq A, Colwell R. Diagnostic limitations to accurate diagnosis of cholera. J Clin Microbiol. 2010; 48 (11): 3918-3922.
3. Alam M, Islam MT, Rashed SM, Johura FT, Bhuiyan NA, Delgado G, Morales R, Mendez JL, Navarro A, Watanabe H, Hasan NA, Colwell RR, Cravioto A. *Vibrio cholerae* classical biotype strains reveal distinct signatures in Mexico. J Clin Microbiol. 2012; 50: 2212-6.
4. Alam M, Sultana M, Balakrish Nair G, Bradley Sack R, Sack D. Toxigenic *Vibrio cholerae* in the Aquatic Environment of Mathbaria, Bangladesh. Applied and Environmental Microbiology. 2006, 72, 2849 – 2855.
5. Ali A, Chen Y, Johnson JA, Redden E, Mayette Y, Rashid MH, Stine DC, Morris JG Jr. Recent clonal origin of cholera in Haiti. Emerg Infect Dis. 2011; 17:699-701.
6. Arita M, Takeda T, Honda T, Miwatani T. Purification and characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable enterotoxin. Infect Immun. 1986; 52: 45-9.
7. Aulet O, Silva C, Gonzalez Fraga S, Pichel M, Cangemi R, Gaudioso C, Porcel N, Jure MA, de Castillo MC, Binsztein N. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40: 385-90.
8. Bagchi K, Echeverria P, Arthur JD, Sethabutr O, Serichantalergs O, Hoge CW. Epidemic of diarrhea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 that produced heat-stable toxin among Khmers in a camp in Thailand. J Clin Microbiol. 1993; 31: 1315-7.
9. Beltrán P, Delgado G, Navarro A, Trujillo F, Selander RK, Cravioto A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. J Clin Microbiol. 1999; 37: 581-90.
10. Bhattacharya MK, Bhattacharya SK, Garg S, Saha PK, Dutta D, Nair GB, Deb BC, Das KP. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. Lancet 1993; 341: 1346-7.
11. Bidinost C, Saka HA, Aliendro O, Sola C, Panzetta-Duttari G, Carranza P, Echenique J, Patrino E, Bocco JL. Virulence factors of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Córdoba, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2004; 36: 158-63.
12. Binsztein N, Costagliola MC, Pichel M, Jurquiza V, Ramirez FC, Akselman R, Vacchino M, Huq A, Colwell RR. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 7481-6.
13. Bhumiratana A, Siripap A, Khamswan N, Borthong J, Chonsin K, and Sutheinkul O. O Serogroup-Specific Touchdown-Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection and Identification of *Vibrio cholerae* O1, O139, and Non-O1/Non-O139. Biochemistry Research International. 2014, Article ID 295421.
14. Blanche P, Sicard D, Sevali Garcia J, Paul , Fournier JM. Septicemia due to non-O:1 *Vibrio cholerae* in a patient with AIDS. Clinical Infectious Diseases. 1994; 19 (4), 813- 937.
15. Boardman BK, Satchell KJ. *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. J Bacteriol. 2004; 186: 8137-43.
16. Bravo FL, Fernández A, Ramírez MM, Llop A, Martínez G, Hernández RI, Cabrera LE, Morier L, Fraga J, Nuñez FS, Aguila A. Microbiological characterization of non-O1 *Vibrio cholerae* isolated in Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2007; 59: 227-33.

17. Bravo L, Ramirez M, Cabrera R, García B, Fernández A y Ariosa C. Aislamiento de *Vibrio cholerae* no-O1 en niños con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Enf Inf Microbiol*. 1998; 18:1-4.
18. Calduch Broseta JV, Segarra Soria MM, Colomina Avilés J, Llorca Ferrandiz C, Pascual Pérez R. Septicemia caused by *Vibrio cholerae* non-O1 in immunocompromised patient. *An Med Interna*. 2003; 20: 630-2.
19. Cameron DN, Khambaty FM, Wachsmuth IK, Tauxe RV, Barrett TJ. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 1685-90.
20. Capriglioni C. Estadística, 2005. Tomo I.
21. Ceccarelli D, Chen A, Hasan NA, Rashed SM, Huq A, Colwell R. Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* Carrying Multiple Virulence Factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. *Appl Environ Microbiol*. 2015, 81: 1909-1918.
22. Coelho A, Andrade J, Vicente A, Di Rita V. Cytotoxic Cell Vacuolating Activity from *Vibrio cholerae* Hemolysin. *Infect Immun* 2000; 71: 3213-20.
23. Coelho A, Andrade JR, Vicente AC, Salles CA. New variant of *Vibrio cholerae* O1 from clinical isolates in Amazonia. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 114-8.
24. Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*. 1996; 274: 2025-31.
25. Colwell RR, Huq A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. En *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Ed. Wachsmuth K., Blake P, Olsvik Ø. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1994. Cap 9, págs. 117-133.
26. Colwell RR. A global and historical perspective of the genus *Vibrio*. En *The biology of vibrios*. Ed. Thompson FL, Austin B, Swings J. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 2006. Cap. 1, págs. 3-11.
27. Cooper KL, Luey CK, Bird M., Terajima J., Nair GB, Kam KM, Arakawa E, Safa A., Cheung DT, Law CP, Watanabe H., Kubota K, Swaminathan B, Ribot EM. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog Dis.*, 2006; 3(1): 51-8.
28. Costagliola M, López A, Malaspina A, Guerrero R, Medina D, Odizzio M, Abelenda A, Friss de Kereki C. Study of the presence of *Vibrio cholerae* on the Argentine-Uruguayan common fisheries zone. Period 1992-1996. *Frente Marítimo*. 2000; 18: 53-8.
29. Crump JA, Bopp CA, Greene KD, Kubota KA, Middendorf RL, Wells JG, Mintz ED. Toxigenic *Vibrio cholerae* serogroup O141-associated cholera-like diarrhea and bloodstream infection in the United States. *J Infect Dis*. 2003; 187: 866-8.
30. Chatterjee S, Ghosh K, Raychoudhuri A, Chowdhury G, Bhattacharya MK, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Klose KE, Nandy RK. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1087-95.
31. Childers BM, Klose KE. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: the ToxR regulon. *Future Microbiol*. 2007; 2: 335-44
32. Chinen L, Toma C, Honma Y, Hiha N, Iwanaga M. Hemolysin production by *Vibrio cholerae* as examined by hemolytic and antigenic activities. *Jpn J Trop Med Hyg*. 1996; 24: 151-155.
33. Chow IK, Yuen K, Yam W. Detection of RTX Toxin Gene in *Vibrio cholerae* by PCR. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 2594-7.

34. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65: 2202-8.
35. Dalsgaard A, Albert MJ, Taylor DN, Shimada T, Meza R, Serichantalergs O, Echeverria P. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2715-22.
36. Dalsgaard A, Forslund A, Sandvang D, Arntzen L, Keddy K. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the aadA2 gene located on class 1 integrons. J Antimicrob Chemother. 2001; 48: 827-38.
37. Dalsgaard A, Huss H, H-Kittikun A, Larsen, JL Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. International Journal of Food Microbiology. 1995; 28: 101-113.
38. Dalsgaard A, Serichantalergs O, Shimada T, Sethabutr O and Echeverría P. Prevalence of *Vibrio cholerae* with heat-stable enterotoxin (NAG-ST) and cholera toxin genes, restriction fragment length polymorphisms of NAG-ST genes among O serogroups from a major shrimp production area in Thailandia. J. Med. Microbiol. 1995; 43: 216-220.
39. Dalsgaard A, Skov MN, Serichantalergs O, Echeverria P. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping for subtyping of *Vibrio cholerae* O139 isolated in Thailand. Epidemiol Infect. 1996; 117: 51-8.
40. Daniels NA, Shafaie A. A Review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians Infect Med. 2000; 17: 665-685.
41. Danin-Poleg Y, Cohen LA, Gancz H, Broza YY, Goldshmidt H, Malul E, Valinsky L, Lerner L, Broza M, Kashi Y. *Vibrio cholerae* strain typing and phylogeny study based on simple sequence repeats. J Clin Microbiol. 2007; 45: 736-46.
42. De SN, Chatterjee DN. An experimental study of the mechanism of action of *V. cholerae* on the intestinal mucous membrane. J Pathol Bacteriol. 1953; 66: 559-62.
43. De SN. Enterotoxicity of bacteria free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. Nature 1959; 183: 1533-4.
44. Dodin A, Fournier JM. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibron cholérique et des autres vibrions. Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur. Paris, Institut Pasteur. 1992, págs. 91-148.
45. Dziejman M, Balon E, Boyd D, Fraser CM, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 1556-61.
46. Dziejman M, Serruto D, Tam VC, Sturtevant D, Diraphat P, Faruque SM, Rahman MH, Heidelberg JF, Decker J, Li L, Montgomery KT, Grills G, Kucherlapati R, Mekalanos JJ. Genomic characterization of non-O1, non-O139. *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102: 3465-70.
47. El-Hiday AH, Khan FY, Al Maslamani M, El Shafie S. Bacteremia and spontaneous bacterial peritonitis due to *Vibrio cholerae* (non-O1 non-O139) in liver cirrhosis. Indian J Gastroenterol. 2006; 25: 107.
48. Farmer III JJ, Janda JM, Birkhead K. *Vibrio*. En Manual of Clinical Microbiology 8th Edition. Ed. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen JH, Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. American Society for Microbiology Press Washington DC. 2003. Cap 46, págs 706-18.
49. Faruque SM, Abdul Alim AR, Roy SK, Khan F, Nair GB, Sack RB, Albert MJ. Molecular analysis of rRNA and cholera toxin genes carried by the new epidemic strain of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. J Clin Microbiol. 1994; 32: 1050-3.

50. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62:1301-14.
51. Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Dziejman M, Rahman MH, Sack DA, Nair GB, Mekalanos JJ. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101: 2123-8.
52. Faruque SM, Mekalanos JJ. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. Virulence. 2012; 3: 556-65.
53. Faruque SM, Saha MN, Asadulghani, Sack DA, Sack RB, Takeda Y, Nair GB. The O139 serogroup of *Vibrio cholerae* comprises diverse clones of epidemic and nonepidemic strains derived from multiple *V. cholerae* O1 or non-O1 progenitors. J Infect Dis. 2000; 182: 1161-8.
54. Faruque SM, Sack DA, Sack RB, Colwell RR, Takeda Y, Nair GB. Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 1304-9.
55. Fasano A, Baudry B, Pumplin DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM and Kaper JB. *V. cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 5242-46
56. Figueiredo SC, Neves-Borges AC, Coelho A. The neuraminidase gene is present in the non-toxigenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 563-9.
57. Figueroa-Arredondo P, Heuser JE, Akopyants NS, Morisaki JH, Giono-Cerezo S, Enriquez-Rincon F, Berg DE. Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. Infect Immun 2001; 69: 1613-24.
58. Fullner K., Mekalanos J. In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. EMBO J. 2000; 19: 5315-5323.
59. Galán JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature. 2006; 444: 567-73.
60. Garza DR , Thompson CC , Brito Loureiro EC , Dutilh BE , Inada DT , Sousa Junior EC , et al. Genome-Wide Study of the Defective Sucrose Fermenter Strain of *Vibrio cholerae* from the Latin American Cholera Epidemic. Plos One. 2012, 7: 1-11.
61. González Fraga S, Pichel M, Costagliola M, Cecilia M, Jurquiza V, Peressutti S, Caffer MI , Aulet O, Hozbor C , Tracanna B.C , Gamundi A.V, Hernández D, Rami´ S FC, Akselman R and Binsztein N. Environment and virulence factors of *Vibrio cholerae* strains isolated in Argentina. Journal of Applied Microbiology. 2007; 103: 2448-2456.
62. González Fraga S, Pichel M, Binsztein N, Johnson J, Morris Jr J, Colin Stine O. Lateral gene transfer de O1 serogroup encoding genes of *Vibrio cholerae*. FEMS Microbiol Lett. 2008, 286: 32 – 38.
63. González Fraga S, Villagra de Trejo A, Pichel M, Figueroa S , Merletti G, Caffer MI, Castillo C, Binsztein N. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1,no-O139 asociados a cuadros de diarrea Revista Argentina de Microbiología. 2009, 41: 11-19.
64. González Fraga S. Búsqueda de reservorios ambientales de *Vibrio cholerae* O1 en diferentes regiones del país y caracterización de *V. cholerae* O1. Tesis de Doctorado. Enterobacterias. INEI-ANLIS.Instituto“Dr C.G.Malbrán”. Buenos Aires, 2010.
65. Guandalini S, Rao MC, Smith PL, et al. cGMP modulation of ileal ion transport: in vitro effects of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin. Am J Physiol. 1982; 243: G36-41.
66. Guía para el Equipo de Salud. Plan de Abordaje Integral de la Enfermedad Diarreica Aguda y Plan de Contingencia de Cólera. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud de la Nación.Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-abordaje-colera.pdf>

67. Hasan NA, Choi SY, Eppinger M, Clark PW, Chen A, Alam M, Haley BJ, Taviani E, Hine E, Su Q, Tallon LJ, Prosper JB, Furth K, Hoq MM, Li H, Fraser-Liggett CM, Cravioto A, Huq A, Ravel J, Cebula TA, Colwell RR. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 2010-7.
68. Häse CC, Mekalanos JJ. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 730-34.
69. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000; 406: 477-83.
70. Hoque KM, Saha S, Gupta DD, Chakrabarti MK. Role of nitric oxide in NAG-ST induced store-operated calcium entry in rat intestinal epithelial cells. *Toxicology*. 2004; 201: 95-103.
71. Hunter P. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol*. 1990; 28: 1903-1905.
72. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 1045-50.
73. Iida T, Kurokawa K. Comparative genomics: genome configuration and the driving forces in the evolution of vibrios. En *The biology of vibrios*. Ed. Thompson FL, Austin B, Swings J. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 2006. Cap. 5, págs. 67-75.
74. Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp., 1988; 1: 245-67.
75. Jermyn WS, Boyd EF. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002; 148: 3681-93.
76. Jiang SC, Matte M, Matte G, Huq A, Colwell RR. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66: 148-53.
77. Kam K, Luey C, Tsang Y, Law Ch, Chu M, Cheung T, Chiu A. Molecular Subtyping of *Vibrio cholerae* O1 and O139 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Hong Kong: Correlation with Epidemiological Events from 1994 to 2002. *J. Clin. Microbiol*. 2003; 41: 4502-4511.
78. Kaper J, Fassano A, Trucksis M. Toxins of *Vibrio Cholerae*. En *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Ed. Wachsmuth K., Blake P, Olsvik Ø. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1994. Cap 11, págs. 145-176.
79. Khan FY, El-hiday AH, El Shafie S, Abbas MT. Non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia and peritonitis associated with chronic liver disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2007; 1: 296-298.
80. Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 3134-9.
81. Kotetishvili M, Stine OC, Chen Y, Kreger A, Sulakvelidze A, Sozhamannan S, Morris JG Jr. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 2191-6.

82. Kothary M., Lowman H., McCardell B. and Tall B. Purification and Characterization of Enterotoxigenic El Tor-Like Hemolysin Produced by *Vibrio fluvialis*. Infect. Immun. 2003; 71: 3213-322.
83. Labbate M, Boucher Y, Joss MJ, Michael CA, Gillings MR, Stokes HW. Use of chromosomal integron arrays as a phylogenetic typing system for *Vibrio cholerae* pandemic strains. Microbiology. 2007; 153: 1488-98.
84. Levine M, Kaper JB, Herrington D, Losonsky G, Morris JG, Clements ML, Black RE, Tall B and Hall R. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. Infect Immun 1988, 56: 161-67.
85. Levine M. South America: the return of cholera. Lancet. 1991; 338: 45-46
86. Li M, Shimada T, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Sozhamannan S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. Infect Immun. 2002; 70: 2441-53.
87. Lin CJ, Chiu CT, Lin DY, Sheen IS, Lien JM. Non-O1 *Vibrio cholerae* bacteremia in patients with cirrhosis: 5-yr experience from a single medical center. Am J Gastroenterol. 1996; 91: 336-40.
88. Lin W, Fullner KJ, Clayton R, Sexton JA, Rogers MB, Calia KE, Calderwood SB, Fraser C, Mekalanos JJ. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 1071-6.
89. Madhusudana R, PK Surendran. Detection of ctx gene positive non-O1/non-O139 *V. cholerae* in shrimp aquaculture environments. J Food Sci Technol. 2013, 50: 496 – 504.
90. Mahaligam S, Cheong YM, Kan S, Yassin R, Vadivelu J and Pang T. Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1994, 32:12, 2975-79
91. Manual de Procedimientos. Detección de patógenos asociados a Enfermedad Diarreica Aguda, incluyendo *Vibrio cholerae*. Cap I. Aislamiento, Identificación, Caracterización de *Vibrio cholerae*. Cap II. Determinación de Sensibilidad de a los Antimicrobianos de *Vibrio cholerae*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - A.N.L.I.S. “Dr Carlos G. Malbrán” - OPS. Buenos Aires, 2011; págs.163-222.
92. Manual de Procedimientos. Aislamiento, Identificación, Caracterización de *Vibrio cholerae*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Protocolos para la Identificación y Caracterización de *V. cholerae* por métodos fenotípicos. Buenos Aires, 2010; Sección III. págs. 10-16.
93. Manual Diagnóstico de *V. cholerae* y *Salmonella* por PCR. III Curso avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO-GFN) América del Sur. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires, 2010. Disponible en: www.paho.org
94. Maslow J., Mulligan M. Epidemiologic Typing System. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 1996, 17: 595-604.
95. Mitra R, Figueroa P, Mukhopadhyay AK, Shimada T, Takeda Y, Berg DE, Nair GB. Cell vacuolation, a manifestation of the El tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. Infect Immun 2000; 68: 1928-33.
96. Mitra RK, Nandy RK, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Shimada T, Takeda Y, Nair GB. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. J Med Microbiol. 2001; 50:268-76.
97. Morita M, Ohnishi M, Arakawa E, Bhuiyan NA, Nusrin S, Munirul Alam, Siddique AK., Qadri F, Izumiya H, Nair GB, Watanabe H. Development and validation of a mismatch amplification

- mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor Microbiol Immunol. 2008; 52: 314–317.
98. Moroni M, Della Gaspera A, Panagópulo M, Caffer MI, Viñas MR y grupo Servicio Enterobacterias. Vigilancia laboratorial de infección por *Vibrio cholerae* desde el Laboratorio de Referencia Nacional. Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba, 2014.
 99. Morris JG. Non-O-group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. Epidemiol Rev, 1990; 12:179-91.
 100. Morris JG. Non-O group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. En *Vibrio cholerae* and Cholera. Ed. Wachsmuth K., Blake P, Olsvik Ø. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1994. Cáp. 8; págs. 103-115.
 101. Moschioni M, Tombola F, de Bernard M, Coelho A, Zitzer A, Zoratti M, Montecucco C. The *Vibrio cholerae* haemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death. Cell Microbiol. 2002; 4:397-409.
 102. Mukhopadhyay A, Chakraborty S, Takeda , Nair G, Berg D. Characterization of VPI Pathogenicity Island and CTX Prophage in Environmental Strains of *Vibrio cholerae*. J.Bacteriol. 2001; 183: 4737-47.
 103. Murphy RA, Boyd EF. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. J Bacteriol. 2008; 190: 636-47.
 104. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, Connor TR, Lee JH, Kariuki S, Croucher NJ, Choi SY, Harris SR, Lebens M, Niyogi SK, Kim EJ, Ramamurthy T, Chun J, Wood JL, Clemens JD, Czerkinsky C, Nair GB, Holmgren J, Parkhill J, Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. Nature. 2011; 477: 462-465.
 105. Nair B and Takeda Y. Detection of toxins of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1. En: *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives Wachsmuth K, Blake PA, Olsvik O, eds. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994: 53-67.
 106. Nair GB, FaruqueSM, Bhuiyan NA, Kamruzzaman M, Siddique AK, Sack DA. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J Clin Microbiol. 2002; 40:3296-9.
 107. Nandi B, Nandy RK, Vicente AC, Ghose AC. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic non-O1/Non-O139 strain of *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 2000; 68: 948-52.
 108. Nandi S, Maiti D, Saha A, Bhadra RK. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTXphi array and its position in the genome. Microbiology. 2003; 149: 89-97.
 109. Okada K, Iida T, Kita-Tsukamoto K, Honda T. Vibrios commonly possess two chromosomes. J Bacteriol. 2005; 187: 752-7.
 110. Olive M. and Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 1661-1669.
 111. Olsvik O, Wahlberg J, Petterson B, Popovic T, Wachsmuth K, Fields P . Use of Automated Sequencing of Polymerase Chain Reaction Generated Amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholera* O1 strains. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 22-25.
 112. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Actualización Epidemiológica. Cólera, 2013. Disponible en: www.paho.org.
 113. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Actualización Epidemiológica Cólera. Situación del cólera en la Región de las Américas. 2015. Disponible en: <http://www.paho.org>
 114. Organización Mundial de la Salud (OMS). Alerta y Respuesta Mundiales (GAR) Cólera en Haití – Actualización. Disponible en: <http://www.who.int/csr/don/2010>.

115. O'Shea YA, Boyd EF. Mobilization of the *Vibrio* pathogenicity island between *Vibrio cholerae* isolates mediated by CP-T1 generalized transduction. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 214: 153-7.
116. O'Shea YA, Finnan S, Reen FJ, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology.* 2004; 150: 4053-63.
117. Pang B, Yan M, Cui Z, Ye X, Diao B, Ren Y, Gao S, Zhang L, Kan B. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J Bacteriol.* 2007; 189: 4837-49.
118. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, Galas M. Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1462-8.
119. Petroni A, Melano RG, Saka HA, Garutti A, Mange L, Pasterán F, Rapoport M, Miranda M, Faccone D, Rossi A, Hoffman PS, Galas MF. CARB-9, a carbenicillinase encoded in the VCR region of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 belongs to a family of cassette-encoded beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:4042-6.
120. Pichel M, Rivas M, Chinen I, Martin F, Ibarra C, Binsztein N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 124-34.
121. Quiroga MP; Viñas MR; Pichel M; González Fraga S; Centrón D. Análisis de integrones cromosómicos en aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 de Argentina. XII Congreso Argentino de Microbiología, VI Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Bacteriología. Buenos Aires, 2010.
122. Rahaman MH, Islam T, Colwell RR, Alam M. Molecular tools in understanding the evolution of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1040.
123. Rader AE, Murphy JR. Nucleotide sequences and comparison of the hemolysin determinants of *Vibrio cholerae* El Tor RV79 (Hly+) and RV79 (Hly-) and classical 569B (Hly-). *Infect. Immun.* 1988; 56: 1414-9.
124. Rajanna C, Wang J, Zhang D, Xu Z, Ali A, Hou YM, Karaolis DK. The *vibrio* pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholerae* forms precise extrachromosomal circular excision products. *J Bacteriol.* 2003; 185: 6893-901.
125. Reeves PR, Lan R. Cholera in the 1990s. *Br Med Bull.* 1998; 54: 611-23.
126. Rivas M, Cacace ML, Ayala LT, Baschkier A, Miliwebsky E, Caffer MI. Casos de gastroenteritis asociados a *Vibrio cholerae* no-O1 en Orán, Salta. *Rev Argent Microbiol.* 1996; 28: 163-9.
127. Rivera I, Chun J, Huq A, Sack R, Colwell RR. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 2421-9.
128. Rivera I, Lipp E, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell RR. Method for extraction and application of multiplex PCR to detect toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ Microbiol.* 2003; 5: 599-606.
129. Rivera I, Chowdhury M, Huq A, Jacobs D, Martins M and Colwell. Enterobacterial Repetitive Intergen Consensus Sequences and the PCR to Generate Fingerprints of Genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 Non-O1 Strains. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 2898-2904.
130. Safrin S, Morris JG Jr, Adams M, Pons V, Jacobs R, Conte JE Jr. Non-O:1 *Vibrio cholerae* bacteremia: case report and review. *Rev Infect Dis.* 1988; 10:1012-7.
131. Saka HA, Bidinost C, Sola C, Carranza P, Collino C, Ortiz S, Echenique JR, Bocco JL. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxigenicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb Pathog.* 2008; 44: 118-28.

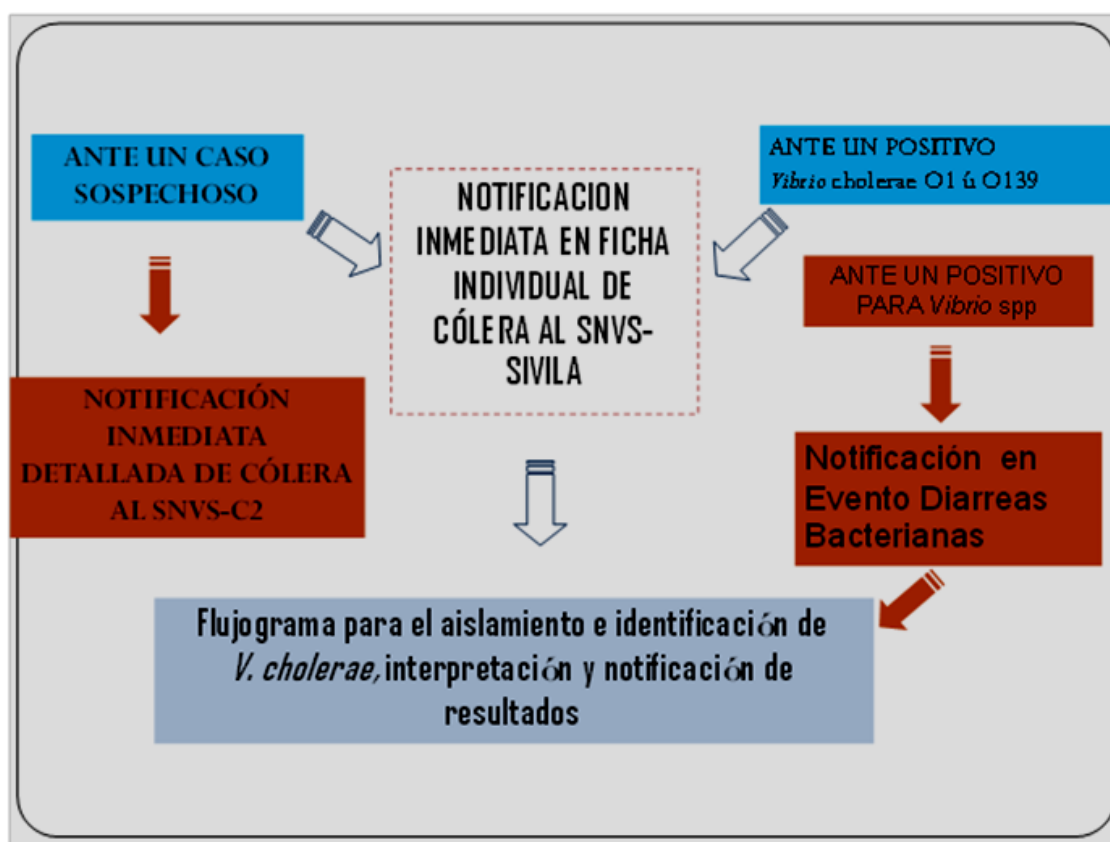
132. Saka HA, Gutiérrez MG, Bocco JL, Colombo MI. The autophagic pathway: a cell survival strategy against the bacterial pore-forming toxin *Vibrio cholerae* cytotoxin. *Autophagy*. 2007; 3: 363-5.
133. Saka HA, Viñas MR, Binsztein N, Carranza P, Sola C, Bocco JL, Pichel M. Virulence factors and genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains isolated in Argentina. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, 2007.
134. Sakasaki R. Bacteriology of *Vibrio* and Related Organism. En *Current Topics in Infectious Disease: Cholera*. Ed. Barua D., Greenough III W. Nueva York 1992; Cap 2, págs. 37-54.
135. Sanyal S. Epidemiology and pathogenicity of non-O1 *Vibrio* species and related organisms. En *Current Topics in Infectious Disease: Cholera*. Ed. Barua D, Greenough III W. Nueva York 1992. Cap 3, págs. 57-67.
136. Sarkar A, Nandy R, Nair B and Ghose A. *Vibrio* Pathogenicity Island and Cholerae Toxin Genetic Element-Associated Virulence Genes and Their Expression in Non-O1 Non-O139 Strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4735-4742.
137. Sarkar B, Bhattacharya T, Ramamurthy T, Shimada T, Takeda T, Balakrish G and Nair. Preferential association of the heat-stable enterotoxin gene (stn) with environmental strains of *Vibrio cholerae* belonging to the O14 serogroup. *Epidemiol Infect.* 2002; 129: 245-251.
138. Shangkuan Y, Show Y, and Wang T. Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. *J. Appl. Bacteriol.* 1995; 79: 264-273.
139. Sharma C, Thungapathra M, Ghosh A, Mukhopadhyay AK, Basu A, Mitra R, Basu I, Bhattacharya SK, Shimada T, Ramamurthy T, Takeda T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 756-63.
140. Sheahan KL, Cordero CL, Satchell KJ. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 9798-803.
141. Singh D, Matte M, Matte G, Jiang S, Sabeena F, Shukla B, Sanyal S, Huq A, Colwell R. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 910-921.
142. Taviani E, Grim CJ, Choi J, Chun J, Haley B, Hasan NA, Huq A, and R Colwell RR. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP II genomic islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2010; 308: 130-137.
143. Tarr Cheryl L, Bopp Cheryl A, Farmer JJ III. *Vibrio* and Related Organisms. En: *Manual of Clinical Microbiology* 11th ed. Eds. Jorgensen JH, Carroll K, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, American Society for Microbiology Press Washington DC. 2015; Cap 41, págs. 762-772-676.
144. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 2833-7.
145. Tenover F, Arbeit R. and Goering R. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233-2239.
146. Thiagarajah JR, Verkman AS. New drug targets for cholera therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26: 172-5.
147. Trucksis M, Galen JE, Michalsky J, Fasano A and Kaper JB. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993, 90: 5267-71.

148. Viñas MR. Aplicación de PCR para el diagnóstico y caracterización de *V. cholerae*. Taller: Fortalecimiento de la vigilancia laboratorial de *Vibrio cholerae*. INEI - ANLIS "Dr C.G.Malbrán". Buenos Aires, 2011.
149. Viñas MR. Métodos rápidos y moleculares para el diagnóstico de patógenos de transmisión alimentaria, incluyendo *V. cholerae*. Talleres integrados Redes infecciones de transmisión sexual, meningitis e infecciones respiratorias bacterianas, resistencia a los antimicrobianos & Diarreas y Enfermedades transmitidas por alimentos. Buenos Aires, 2013.
150. Vital Brazil J, Alves R, Rivera I, Rodrigues D, Karaolis D and Campos L. Prevalence of virulence-associated genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 1999. FEMS Microbiol Lett. 2002; 215: 15 – 21.
151. Waldor MK and Mekalanos. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996, 272: 1910-14.
152. Yamai S, Okitsu T, Shimada T and Katsube Y. Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non -O1 non- O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin and addition of novel serogups. Kansenshogaku Zasshi. 1997; 71; 1037-1045.
153. Zárate MS, Giannico M, Colombrero C, Smayevsky J. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteremia in a chronic hemodialysis patient. Rev Argent Microbiol. 2011; 43:81-3.
154. Zinnaka Y, Carpenter CC Jr. An enterotoxin produced by noncholera vibrios. Johns Hopkins Med J. 1972; 131: 403-11.
155. Zitzer A, Zitzer O, Bhakdi S, Palmer M. Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. J Biol Chem. 1999; 274: 1375-80.

VIII.- ANEXO

Figura I. Flujograma de notificación de casos de *V. cholerae* módulo laboratorial SIVILA del Ministerio Salud de La Nación (MSN).

Según Guía para el Equipo de Salud. Plan de Abordaje Integral de la Enfermedad Diarreica Aguda y Plan de Contingencia de Cólera. Dirección de Epidemiología. MSN. Buenos Aires, 2011. <http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-abordaje-colera>.



Los laboratorios participantes del SIVILA-SNVS, según el flujograma de notificación de caso deben llenar la ficha individual y derivar el aislamiento de *V. cholerae* al LNR para confirmación y caracterización.

Figura II. Flujograma diagnóstico para aislamiento de *V. cholerae* de muestra de materia fecal según LNR.

Taller Fortalecimiento de la Vigilancia Laboratorial de *Vibrio cholerae*. Buenos Aires, 2011

Talleres integrados de Redes de Laboratorios realizados en mayo 2013, Buenos Aires.

