

Implementación de la técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de *Vibrio cholerae* en muestras de agua

Implementation of direct immunofluorescence technique for detection of *Vibrio cholerae* in water samples

Hermes Fundora Hernández, Lenina Tamara Menocal Heredia

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Municipio Cerro, La Habana

RESUMEN

A finales del año 2010, se presentó la epidemia de cólera en Haití y de los casos clínicos se aisló *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Ogawa. Por la cercanía al territorio cubano de esta epidemia, se hizo necesaria la introducción de técnicas rápidas para la detección de *Vibrio cholerae* O1/O139 en muestras de agua como parte de la vigilancia ambiental. Las pruebas microbiológicas rápidas actualmente desarrolladas son de detección, identificación o enumeración de microorganismos en tiempos más cortos y con metodologías mucho más sencillas a las utilizadas de forma convencional. En el laboratorio de Inmunoepidemiología del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba, se implementaron las técnicas de inmunofluorescencia directa para la detección de la posible presencia de *Vibrio cholerae* O1/O139 en muestras de agua. La mayor ventaja que ofrece el método implementado es la detección de la posible presencia de *Vibrio cholerae* O1/O139 en estado viable no cultivable.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*; inmunofluorescencia directa; métodos de detección rápidos.

INTRODUCCIÓN

Durante las pandemias del siglo XX, el cólera se diseminaba del delta del Ganges a casi todo el mundo. Existen reportes en disímiles latitudes de aislamiento de *Vibrio cholerae*, se destacan en el año 1930 el aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Inaba a partir de un caso clínico en la ruta hacia la Mecca, el año 1948 el aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 biotipo clásico serotipo Inaba a partir de un caso clínico en la India y en el año 1975 el aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Inaba a partir de un caso clínico en Bangladesh. Excepto en algunos casos donde se adquirió la enfermedad en los laboratorios, *Vibrio cholerae* no se identificó en el continente americano en el período comprendido entre 1911 a 1973. En la década de los 80 aparecieron casos esporádicos en los Estados Unidos de América en el golfo de México y en Australia. En 1991 el cólera azotó a América, tanto América del Norte como del Sur y América Central. La cepa epidémica encontrada fue *Vibrio cholerae* biotipo El Tor serotipo Inaba sin existir reportes en el Caribe.¹

A finales del mes de octubre del año 2010, después del terremoto que azotó a Haití, comenzaron en dicho país los primeros reportes de casos de cólera. Se aisló *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Ogawa a partir de un caso clínico en el departamento de Artibonite.² Esta situación se incrementó, lo cual llevó a la aparición de una epidemia que afectó a todos los departamentos, hasta el 31 de diciembre del 2012 se registraron 635 980 casos de los cuales fallecieron 7912.³ Por la cercanía al territorio cubano de esta epidemia, se hizo necesaria la introducción de técnicas rápidas para la detección de *Vibrio cholerae* O1/O139 en muestras de agua como parte de la vigilancia ambiental.

MÉTODOS

Las pruebas microbiológicas rápidas actualmente desarrolladas ofrecen la detección, identificación o enumeración de microorganismos en tiempos más cortos con metodologías más sencillas, comparadas con las utilizadas tradicionalmente. Con este tipo de tecnología es posible optimizar los recursos disponibles ya que se requiere menos material de laboratorio y escaso personal técnico, lo que trae como resultado una mayor productividad.⁴

En el laboratorio de Inmunoepidemiología del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba se implementó la técnica de inmunofluorescencia directa para la determinación de *Vibrio cholerae* O1/ O139 en aguas. Con estos fines se utilizó el paquete diagnóstico para *Vibrio cholerae* O1 y O139 de la New Horizons Diagnostics Corporation, EUA que utiliza un anticuerpo monoclonal específico del antígeno A del lipopolisacárido O1 de la membrana externa del *Vibrio cholerae* O1 (Cholera DFA) y un anticuerpo monoclonal específico de *Vibrio cholerae* O139 conjugado a FITC (Bengal DFA) los cuales han sido conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FICT) para la detección rápida y simple de *Vibrio cholerae* O1/ O139 en aguas. La técnica implementada es capaz de detectar concentraciones de *Vibrio cholerae* O1/ O139 tan pequeñas como 10 000 organismos/mL.^{5,6}

La mayor ventaja que ofrece el método implementado además de lo rápido del resultado y de la optimización de recursos materiales y humanos, resulta en la posibilidad de detectar la presencia de *Vibrio cholerae* en estado viable no cultivable (VBNC, en inglés, -viable but non-culturable-). Este estado representa una forma que permite la supervivencia de bacterias no formadoras de esporas en un ambiente adverso. En respuesta a situaciones de estrés ambiental en reservorios acuáticos, tales como la salinidad, poca disponibilidad de nutrientes y bajas temperaturas, *Vibrio cholerae* O1/ O139 adoptan este estado que le permite realizar funciones metabólicas y formar colonias, sin que se le pueda cultivar. Si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, puede revertir al estado cultivable. *Vibrio cholerae* O1 en estado VBNC ha producido síntomas clínicos de cólera en voluntarios, hecho que confirma que mantiene su patogenicidad en el ambiente acuático, aunque las células no sean cultivables.⁷

Algunas bacterias patógenas mantienen su virulencia en el estado VBNC, entre ellas *Vibrio cholerae*. Los métodos convencionales de cultivo resultan inefectivos cuando las bacterias se encuentran en dicho estado. La detección de *Vibrio cholerae* en estado VBNC cobra vital importancia en los períodos interepidémicos por lo cual la implementación de esta técnica resulta de gran importancia para el desarrollo de la vigilancia ambiental de *Vibrio cholerae*.⁷

CONSIDERACIONES FINALES

Se implementó una técnica para la detección rápida de *Vibrio cholerae* O1 y O139 en aguas. Esta resulta de vital importancia en la vigilancia de *Vibrio cholerae*, es útil en la detección de este microorganismo en estado VBNC, estado en el cual las técnicas convencionales de cultivo no resultan eficientes. En el control ambiental del cólera se requiere a menudo un gran número de muestras y los métodos convencionales son demorados, por lo que el perfeccionamiento de este método por microscopía de fluorescencia es de importancia sobre todo en situaciones de emergencia, tales como brotes epidémicos y en períodos interepidémicos para la posible toma de medidas rápidas y evitar la transmisión del microorganismo. Se hace necesario el desarrollo de técnicas similares para otras bacterias de transmisión hídrica como *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Legionella pneumophila*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization Media Centre. "Cholera" Anon [Internet]. New York: [Citado en noviembre de 2008]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>
2. Hendriksen RS, et al. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: nearly identical clones in Haitian outbreak. M Bio. 2011; 2(4):1-6.
3. Organización Panamericana de la Salud. Actualización epidemiológica. Cólera. [Citado el 7 de enero de 2013] Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19658&Itemid=&lang=es

4. Wang D, Xu X, Deng X, Chen Ch, Li B, et al. Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Environmental Water Samples by an Immunofluorescent-Aggregation Assay. Appl Environ Microbiol. 2010;76(16):5520-5.
5. Hasan JA, Bernstein D, Huq A, Loomis L, Tamplin ML, Colwell R. Cholerae DFA: an improved direct fluorescent monoclonal antibody staining kit for rapid detection and enumeration of *Vibrio cholerae* O1. FEMS Microbiol 1994;120 (1-2):143-8.
6. Hasan JA, Huq A, Nair GB, Garg S, Mukhopadhyay, Loomis L, et al. Development and testing of monoclonal antibody-based rapid immunodiagnostic test kits for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. J Clin Microbiol. 1995;33(11):2935-9.
7. Colwell RR. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. J Infect Chemo of Infection and Chemother. 2000;6(2):121-5.

Recibido: 20 de julio de 2013

Aprobado: 12 de noviembre de 2013

Lenina Tamara Menocal Heredia: Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). La Habana, Cuba. Correo electrónico: lenina@inhem.sld.cu