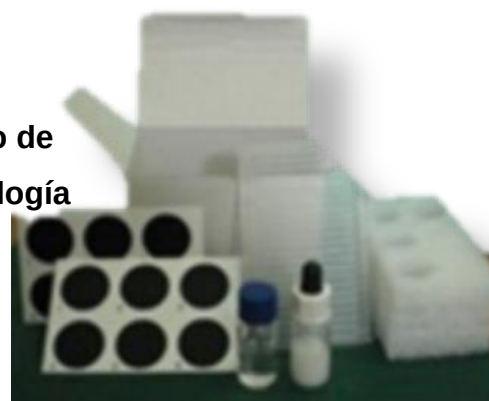


Ministerio de Salud Pública de Cuba
Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

**Evaluación del sistema de aglutinación al látex AL_{ChO1}-IF
para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1
en pacientes con diarrea.**

IPK, 2015.

**Tesis para optar por el Título de
Máster en Bacteriología-Micología**



Autor: Dra. María Antonia Morín Suárez

La Habana, 2016

Ministerio de Salud Pública de Cuba
Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

**Evaluación del sistema de aglutinación al látex AL_{ChO1}-IF
para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1
en pacientes con diarrea.
IPK, 2015.**

**Tesis para optar por el Título de
Máster en Bacteriología-Micología.**

Autor: Dra. María Antonia Morín Suárez.

**Tutores: Dr. Adalberto Águila Sánchez; M. Sc.
 Dra. Mislady Rodríguez Ortega; M. Sc.**

Asesora: Dra. María Teresa Illnait Zaragozí; M. Sc, Dr. C.

La Habana 2016

PARA MARIAN.

Agradecimientos

Mi sincera gratitud a mis tres tutores:

En primer lugar agradezco a la Dra. Mislady Rodríguez Ortega, por su constante empeño en enseñarme todo lo concerniente a la investigación científica y su solidaridad en el trabajo y para la vida.

En segundo lugar a la Dra. María Teresa Inait Zaragozí a quien considero un ejemplo de responsabilidad ante el trabajo y por tratar de aportarme los conocimientos básicos necesarios en metodología de la investigación lo cual es de extrema importancia para cualquier profesional, además por su ayuda en la confección de este documento.

Al Dr. Adalberto Aguila Sánchez por su amistad y solidaridad en momentos complejos.

Resumen

Introducción: Los eventos de cólera ocurridos en Cuba evidenciaron la necesidad de disponer de una prueba que permitiera la vigilancia de la enfermedad de forma sostenible. El Instituto Finlay desarrolló un sistema basado en la aglutinación al látex (AL_{ChO1}-IF) que mostró excelentes resultados durante su estandarización.

Objetivo: Evaluar el sistema AL_{ChO1}-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de cólera en adultos con diarrea aguda.

Metodología: Se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN), las razones de verosimilitud positiva y negativa (RVP y RVN) del sistema AL_{ChO1}-IF. Se compararon los resultados con los de los métodos comerciales disponibles en Cuba de las casas CTK-Biotech y SD-Bioline. Se empleó el diagnóstico convencional como método de referencia. Se aplicó una encuesta para conocer el comportamiento de las principales variables epidemiológicas de los pacientes estudiados.

Resultados: El AL_{ChO1}-IF tuvo una sensibilidad de 84,85% y una especificidad de 82,88%. Sus VPP, VPN, RVP y RVN fueron de 69,14%, 92,37%, 4,96 y 0,18 respectivamente. Su desempeño fue similar al de la prueba de CTK-Biotech. Los resultados del AL_{ChO1}-IF tuvieron una buena concordancia con los resultados obtenidos con el método de referencia con un índice kappa de 0,63. El consumo de agua sin hervir fue la variable que más se asoció al riesgo de enfermar de cólera (RP = 2,12 y $p = 0,016$).

Conclusiones: El diagnosticador AL_{ChO1}-IF pudiera sustituir al sistema de CTK-Biotech. Las acciones de educación sanitaria para evitar el cólera deben hacer mayor énfasis en el uso de agua hervida.

Glosario de términos

AcMs	Anticuerpos monoclonales
AcPs	Anticuerpos policlonales
Ags	Antígenos
AHK	Agar hierro dos azúcares de Kliger
AHL	Agar hierro lisina
ALchO1- IF	Prueba rápida presuntiva de cólera, Instituto Finlay
APA	Agua peptona alcalina
CECMED	Centro para el Control Estatal de los Medicamentos y Dispositivos Médicos
CMI	concentración mínima inhibitoria
CPHEM-LH	Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de La Habana
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EDA	Enfermedad diarreica aguda
LNR-EP-IPK	Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias Patógenas del IPK
IC	Intervalo de confianza
IPK	Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
LPS	Lipopolisacáridos
Minsap	Ministerio de Salud Pública de Cuba
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PDK	De sus siglas en inglés, Pathogen Detection Kit
PDR	Prueba de diagnóstico rápido
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
RP	Razón de prevalencia
RVP	Razón de verosimilitud positiva

RVN	Razón de verosimilitud negativa
SMART	De sus siglas en inglés, Sensitive Membrane Antigen Rapid Test
TC	Toxina colérica
TCBS	Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa
TSA	Agar triptona soya
UFC	Unidades formadoras de colonias
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo

Tabla de contenido

I	Introducción	1 - 5
I.1	Justificación del estudio	4
I.2	Hipótesis del trabajo	4
I.3	Objetivos	5
II	Marco teórico	5 – 20
II.1	Antecedentes	5
II.2	Principales características clínicas del cólera	5 – 6
II.3	Epidemiología	6 - 7
II.4	Agente causal: características generales	7
II.5	Estructura antigénica	7 - 9
II.6	Diagnóstico microbiológico	9 – 12
II.7	Diagnosticador AL _{ChO1} -IF	12 - 13
II.8	Diagnosticador Cholera antigen O1/O139 de SD Bioline	13 – 14
II.9	Diagnosticador On Site Cholera Ag O1/O139 Rapid Test de CTK-Biotech	14
II.10	Otros diagnosticadores	15 – 17
II.11	Evaluación del desempeño de pruebas diagnósticas	17 – 20
II.11.1	Requisitos metodológicos	17 - 18
II.11.2	Requisitos técnicos	18 - 20
III	Materiales y métodos	21 - 30
III.1	Tipo de estudio, población y muestreo	21
III.2	Selección de la muestra y estrategia de muestreo	21 - 22
III.3	Procedimientos generales	22 - 23
III.4	Técnicas y procedimientos específicos	23 – 27
III.5	Procedimientos estadísticos y análisis	

de datos para la validación del diagnosticador	27 – 28
III.6 Aspectos éticos y conflictos de intereses	28 - 30
III.7 Aspectos de bioseguridad	30
IV Resultados	31 - 36
V Discusión	37 - 47
VI Conclusiones	48
VII Recomendaciones	49
VIII Referencias bibliográficas	50 - 56
Anexos.	57

El cólera es una enfermedad infecto-contagiosa intestinal aguda, causada por la ingestión de alimentos o agua contaminada con *Vibrio cholerae*. Basado en su antígeno somático O, se conocen al menos 200 serogrupos de esta bacteria patogénica; no obstante, *V. cholerae* O1 y O139 han sido los más relacionados con eventos epidemiológicos. Los restantes pueden ser causa de diarrea leve pero no dan origen a epidemias (Harris JB et al., 2012).

La enfermedad es endémica en más de 50 países de diferentes áreas de Asia, África, el Mediterráneo y más recientemente, América Central y del Sur. Suele presentarse de forma explosiva en varios focos simultáneamente causando epidemias desastrosas con un patrón estacional (Kumar P et al., 2012; Baik YO et al., 2014).

Existe un subregistro global de los casos de cólera; no obstante, la Organización Mundial de la salud (OMS) reporta que entre 1,4 y 4,3 millones de personas son afectadas anualmente por esta enfermedad, de las cuales mueren entre 28 000 y 142 000 en todo el mundo (OMS, 2014; OMS/OPS, 2015). Esta realidad es más notoria en algunas regiones del mundo, en especial el Sudeste asiático, Medio Oriente y África (Kumar P et al., 2012; Baik YO et al., 2014; OMS, 2015).

Entre 2004 y 2008 fueron notificados a la OMS un total de 838 315 casos, cifra mayor que los 676 651 casos declarados entre 2000 y 2004; esto constituyó un aumento del 24% de la incidencia anual global (OMS, 2014; OMS/OPS, 2015). El 24 de octubre del 2010, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) alertó sobre la confirmación de los primeros casos de cólera en Haití donde en poco más de tres años se registraron 700 541 casos (Almodovar-Battle MC & Dickinson FO, 2014). En República Dominicana se consignaron 31 532 casos sospechosos de cólera desde el inicio de la epidemia en noviembre del 2010 hasta la semana estadística 8 de 2014 (OPS/OMS, 2015). Desde el año 2010 y con motivo de la propagación de la epidemia en el Caribe, Cuba revitalizó y fortaleció la vigilancia para el diagnóstico microbiológico de cólera. Dos años más tarde, en junio del 2012, se detectaron los primeros casos en la provincia Granma (OPS/OMS, 2013; Almodovar-Battle MC & Dickinson FO, 2014).

Los brotes epidémicos se producen principalmente por la ingestión de agua contaminada con las heces infectadas con *V. cholerae*. Hasta el momento, el hombre es el único reservorio conocido y se convierte en fuente de contaminación mediante el depósito de fómites infectados en sitios inadecuados. Se requieren entre 10^6 y 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) para provocar una infección exitosa; no obstante, en personas con hipoclorhidria o anaclorhidria de cualquier origen, puede ser suficientes 10^4 UFC (Harris JB et al., 2012; Weil AA et al., 2012; Tabatabaei SM & Khorashd AS, 2015; Miwanda B et al., 2015). El período de incubación de la enfermedad oscila entre unas pocas horas y cinco días, lo que facilita la aparición de brotes epidémicos (Weil AA et al., 2012).

El método de referencia para el diagnóstico de la infección es el cultivo, aislamiento e identificación de su agente causal (Harris JB et al., 2012; Weil AA et al., 2012; Tabatabaei SM & Khorashd AS, 2015). Sin embargo, este requiere no menos de 48 horas, además de la disponibilidad de recursos materiales y personal capacitado para hacer una distinción correcta entre *V. cholerae* y otros enteropatógenos como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* sp., *Plesiomona shigeloide*, *Cryptosporidium* sp. y *Giardia intestinalis*, los cuales pueden producir cuadros diarreicos similares al cólera (Farmer JJ & Kelly T, 1991; Kelly MT et al., 1991).

Las pruebas de diagnóstico rápido deben aportar resultados presuntivos con un nivel de confiabilidad que permita la adopción oportuna de las medidas de contención del brote y el tratamiento adecuado de cada paciente (Farmer JJ & Kelly T, 1991). Esto último cobra mayor relevancia en los lugares donde la población sufre brotes epidémicos frecuentes y el acceso a los servicios de salud especializados es limitado. Los pacientes infectados con algunos de los patógenos intestinales referidos con anterioridad requieren de tratamiento de rehidratación oral o parenteral; sin embargo, sólo en los casos en los que se detecta *V. cholerae* O1 u O139 se hace indispensable establecer medidas inmediatas de control epidemiológico (OPS/OMS, 2017). Esto permite orientar mejor el diagnóstico de los casos índices en eventos masivos de diarreas agudas y limitar la propagación de la enfermedad (Rahman M et al., 1989; Kabir I et al., 1996; Nato F et al., 2003; OPS/OMS, 2017). En estas condiciones, contar con un método de diagnóstico

sensible y específico que brinde resultados en el menor tiempo posible puede resultar vital.

Acorde a la literatura consultada, desde 1990 hasta la fecha, han sido evaluados cerca de 25 pruebas de diagnóstico rápido (PDR) para cólera (Michal D et al., 2012; Keddy KH et al., 2013). Las primeras en aparecer utilizaban anticuerpos policlonales (AcPs), requerían pre-cultivo en medios de aislamiento primario y presentaban reacciones cruzadas con otras bacterias (Bolaños HM et al., 2004; Michal D et al., 2012). El desarrollo de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales (AcMs) dio lugar al advenimiento de diferentes tipos de PDR basadas en el principio de inmunocromatografía de flujo lateral. A partir del año 2000 se han comercializado 14 pruebas de este tipo para el diagnóstico rápido de esta enfermedad (Carrillo L et al., 1994; Nato F et al., 2003; Bolaños HM et al., 2004; Sinha A et al., 2012). Estos tienen como factor común el uso de AcMs altamente específico para el antígeno A del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de *V. cholerae* O1.

Los métodos más antiguos, como el Pathogen Detection Kit® (PDK) de Intelligent Monitoring Systems, Gainville, FL, usan AcMs acoplados a partículas de látex suspendidos en una solución amortiguadora (Carrillo L et al., 1994; Bolaños HM et al., 2004); otros como el Sensitive Membrane Antigen Rapid Test (SMART) de New Horizons Diagnostic Corporation, Columbia, Md, consisten en un sistema inmunocromatográfico de dos pasos, que combina el uso de un AcM marcado con oro coloidal y un AcP fijado a una membrana de nitrocelulosa que permite visualizar el resultado de la prueba (Carrillo L et al., 1994; Bolaños HM et al., 2004). Además existen sistemas como el COLTA, comercializado por la misma casa, que se basa en el principio de co-aglutinación y tiene un AcM acoplado a células muertas por calor de *Staphylococcus aureus* (Rahman M et al., 1989; Bolaños HM et al., 2004). Posteriormente vieron la luz los métodos inmunocromatográficos de un solo paso, los cuales usan AcMs que reconocen específicamente al antígeno (Ag) A de *V. cholerae* O1. En este grupo el sistema más estudiado y conocido es el Crystal VC, desarrollado inicialmente por investigadores del Instituto Pasteur de París y comercializado gracias a un acuerdo con Span Diagnostics Ltd, Udhna, Surat, India (Wang XY et al., 2006). Esta prueba de diagnóstico, constituye un referente útil pues fue extensamente evaluada en protocolos de laboratorio y en estudios de campo en

áreas endémicas como Bangladesh, Madagascar y Mozambique (Sinha A et al., 202).

El presente trabajo evaluó el desempeño de un sistema de diagnóstico producido en el Instituto Finlay, La Habana, Cuba, basado en el método de aglutinación de partículas de látex (Cuello-Pérez M et al., 2015) (en lo adelante para esta investigación este producto se nombrará AL_{ChO1}-IF) para la detección cualitativa rápida de *V. cholerae* O1. Como método de referencia se empleó el diagnóstico convencional. De forma adicional se comparó con los sistemas comerciales en uso en Cuba: Cholera Ag O1/O139 (SD-Bioline Standard Diagnostics, Inc., Korea) y Cholera Ag Rapid Test CE (CTK-Biotech; San Diego, California), ambos basados en el principio inmunocromatográfico para la detección y diferenciación cualitativa de los antígenos O1 y O139 de *V. cholerae* en muestras de heces humanas.

I.1. Justificación del estudio

Las pruebas inmunocromatográficas disponibles en Cuba para el diagnóstico rápido presuntivo de cólera son sensibles, pero no son de producción nacional lo que encarece el diagnóstico y su suministro resulta inestable. El Instituto Finlay desarrolló un sistema de diagnóstico rápido presuntivo de cólera, el cual precisa de ser evaluado para su posterior certificación según las normativas vigentes (Norma Cubana NC EN 13612:2006; CECMED. Regulación No. 47-2007):

I.2. Hipótesis de trabajo: El diagnosticador AL_{ChO1}-IF permite la detección cualitativa de *V. cholerae* O1 excretado por los pacientes con diarreas agudas y muestra un desempeño igual al de las pruebas inmunocromatográficas disponibles en la actualidad en Cuba para diagnóstico rápido de cólera.

I.3. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el desempeño del sistema AL_{ChO1}-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de cólera por *V. cholerae* O1 en pacientes adultos con diarrea aguda atendidos en el IPK del 1^{ro} de mayo al 30 de septiembre de 2015.

Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad predictiva del sistema AL_{ChO1}-IF en muestras clínicas.
2. Comparar el desempeño del sistema AL_{ChO1}-IF con el de las pruebas rápidas inmunocromatográficas comerciales disponibles en la red nacional de laboratorios de microbiología en Cuba.
3. Caracterizar la población de estudio según variables de interés epidemiológico.

II.1. Antecedentes

El cólera es una de las enfermedades infecciosas más devastadoras y antiguas conocidas por el hombre. Aunque no hay consenso respecto del origen del término, existen referencias de Hipócrates (400 AC) y en sánscrito en Sushruta Samhita (400-500 ac) (Koch R, 1884; Colwell RR, 1996). Su agente etiológico fue descrito por primera vez en 1854 por Pacini en Italia y en 1883 por Robert Koch quien aisló el "*bacillus cholera*" del agua durante un brote de diarrea en Egipto (Koch R, 1884). En el siglo XIX, se produjeron verdaderas oleadas de epidemias de esta enfermedad desde el sur de Asia hacia muchas partes del mundo y fue la primera enfermedad para la cual se estableció un sistema de vigilancia y reporte a gran escala (Colwell RR, 1996; Sánchez RM & Pérez IA, 2014).

II.2. Principales características clínicas del cólera

Las manifestaciones clínicas del cólera varían desde la infección asintomática hasta la diarrea severa. Esa última forma, se caracteriza por inicio abrupto, deposiciones acuosas profusas con aspecto de "agua de arroz", vómitos que conllevan a gran pérdida de sales y agua (hasta 20 L por día) y a la deshidratación. Si no se trata de forma adecuada podría desencadenar un choque hipovolémico, acidosis metabólica, falla renal y muerte. Adicionalmente, el 75% de los pacientes presentan calambres musculares, que pueden ser localizados en las extremidades o generalizados (Flores JJ, 1990; Sánchez RM & Pérez IA, 2014).

Al examen físico se puede observar ojos y mejilla hundidos, disminución de la turgencia cutánea, manos con aspecto de "manos de lavandera", voz tenue, mucosas secas y lengua áspera. En estado más avanzado, el paciente manifiesta labios cianóticos, temperatura corporal subnormal, respiración rápida y superficial, taquicardia e hipotensión (el pulso y presión pueden llegar a ser imperceptibles), abdomen escavado generalmente no doloroso y anuria. Los niños pueden presentar fiebre, letargia, tetania o convulsiones generalizadas y edema pulmonar (Flores JJ, 1990; Sánchez RM & Pérez IA, 2014).

Entre las complicaciones y secuelas más significativas cuando no se realiza intervención adecuada y oportuna se encuentran: fallo renal, vómitos y calambres persistentes, arritmia cardíaca, fallo miocárdico-pulmonar, íleon paralítico y alteraciones del sistema nervioso central. En las embarazadas es frecuente la muerte fetal y el aborto en el último trimestre. La tasa de mortalidad de los pacientes no tratados es de 60% (Flores JJ, 1990; Sánchez RM & Pérez IA, 2014)

II.3. Epidemiología

Recientemente se estimó que existe una incidencia anual de 3 a 5 millones de casos de cólera en todo el mundo y 100 000 muertes por esta causa (CDC, 2014).

La transmisión de persona a persona es extremadamente rara, probablemente debido a que el inóculo necesario para causar la enfermedad es alto. En una epidemia la fuente de contaminación habitual son las personas infectadas que contaminan el agua o los alimentos, lo que facilita que la enfermedad se propague con facilidad en lugares donde no existen buenas condiciones sanitarias (Somarriba L et al., 2013; CDC, 2014).

Algunos sistemas acuáticos, como las aguas costeras, riveras de lagos y ríos son reservorios ambientales de *V. cholerae* la cual es considerada una bacteria acuática. Esta es capaz de sobrevivir por largos períodos en estos hábitats asociado principalmente a la quitina de diversos artrópodos marinos, los cuales al ser ingeridos se convierten también en una fuente de infección eventual (Somarriba L et al., 2013; CDC, 2014).

La dosis infectiva es alta, son necesarios entre 10^6 y 10^8 UFC para provocar infección; no obstante, en personas con hipoclorhidria o anaclorhidria, como la que existe en los niños, los ancianos y en adultos con tratamientos antiácidos por entidades como la gastritis crónica, la úlcera péptica y la infección por *Helicobacter pylori* puede ser de hasta 10^4 UFC (Sánchez JHJ, 2005 Somarriba L et al., 2013; Fernández SF & Alonso G, 2009; CDC, 2014).

El período de incubación de la enfermedad oscila entre dos horas y cinco días, lo que facilita la aparición de brotes epidémicos en los lugares carentes de condiciones

higiénicas y sanitarias adecuadas (Fernández SF & Alonso G, 2009; Sánchez JHJ, 2005).

II.4. Agente causal: características generales

V. cholerae, es un bacilo aerobio, gramnegativo, curvo o recto, móvil con un flagelo polar único, halófilo, perteneciente a la familia Vibrionaceae. Se encuentra en aguas costeras y estuarios de ríos, donde puede asociarse a cianobacterias, zooplancton y crustáceos, incluyendo especies comerciales como cangrejos, camarones y langostas (Somarriba L et al., 2013). En lugares donde no hay condiciones higiénicas y sanitarias adecuadas la bacteria puede multiplicarse fácilmente en el agua potable e incluso en los alimentos (Somarriba L et al., 2013; CDC, 2014).

V. cholerae tiene más de 200 serogrupos clasificados según la estructura del antígeno somático O del lipopolisacárido de su membrana externa. Los serogrupos O1 y O139 son los únicos capaces de provocar epidemias o endemias (Fernández SF & Alonso G, 2009; Somarriba L et al., 2013). Basado en variabilidades del Ag O y otras características fenotípicas, se reconocen tres serotipos (Ogawa, Inaba e Hikojima) y dos biotipos (Clásico y El Tor) los cuales pertenecen al serogrupo O1, considerado el más virulento y epidémico por excelencia (Sánchez JHJ, 2005; Fernández SF & Alonso G, 2009; Somarriba L et al., 2013).

A nivel molecular, los principales genes patogénicos de *V. cholerae* se encuentran en regiones del cromosoma en forma de “clusters” o agrupaciones. Estos tienen la capacidad de ser propagados horizontalmente lo que sugiere que los aislados ambientales pueden volverse más virulentos para el hombre a través de la adquisición de dichos genes de patogenicidad (Karaolis DKR et al., 1998, Heidelberg et al., 2000).

II.5. Estructura antigénica

V. cholerae se diferencian por la estructura molecular del polisacárido O tipo específico que forma parte del LPS anclado en la membrana externa de la bacteria. Estas diferencias estructurales del polisacárido O determinan los más de 200

serogrupos de *V. cholerae*. El serogrupo O1 está a su vez subdividido en dos biotipos con características fenotípicas y patógenicas distintas y se denominan: Clásico y El Tor. Los aislados del serogrupo O1 de ambos biotipos se clasifican a su vez en dos serotipos principales: Ogawa e Inaba. El primero presenta un grupo metilo – 2- O en el extremo no reducido del carbohidrato terminal del polisacárido O específico que está ausente en el serotipo Inaba (Johnson RA et al., 2012). El serotipo Hikojima es muy infrecuente y tiene las dos modalidades antigénicas de los serotipos explicados antes. Estos determinantes antigénicos dan lugar a antígenos somáticos termoestables serotipo – específicos que son detectados mediante pruebas serológicas y se denominan A, B y C (Finkelstein RA, 2011; Kitaoka M et al., 2011; Johnson RA et al., 2012). Todos los aislados del serogrupo O1 tienen un antígeno común que es la molécula blanco de las pruebas de diagnóstico rápido presuntivo de cólera, que es el antígeno A, aunque también existen pruebas de diagnóstico rápido que identifican antígenos de la toxina colérica (Nato et al., 2003). Los que pertenecen al serotipo Ogawa tienen además el antígeno específico B, es decir son AB y aquellos pertenecientes al serotipo Inaba muestran además el antígeno C, por lo tanto son AC. Los del serotipo Hikojima son ABC, es decir tienen los dos antígenos que identifican a los dos serotipos más frecuentes además del antígeno A que es el específico del serogrupo O1 (Finkelstein RA, 2011; Kitaoka M et al., 2011).

La determinación del serogrupo se realiza mediante aglutinación en lámina a partir de un cultivo en agar triptona soya (TSA) de 18 horas a 37°C. Antes se debe verificar que el cultivo se encuentre en forma lisa mediante la reacción de aglutinación con solución salina al 2%. La serotipificación es realizada también en lámina portaobjeto con los antisueros correspondientes y siempre partiendo de un aislado con características fenotípicas de *V. cholerae* (Caffer MI et al., 2007; OMS, 2011; Kitaoka M et al., 2011).

En la figura 1 se muestra el diagrama general para la identificación de los principales serogrupos y serotipos de *V. cholerae*.

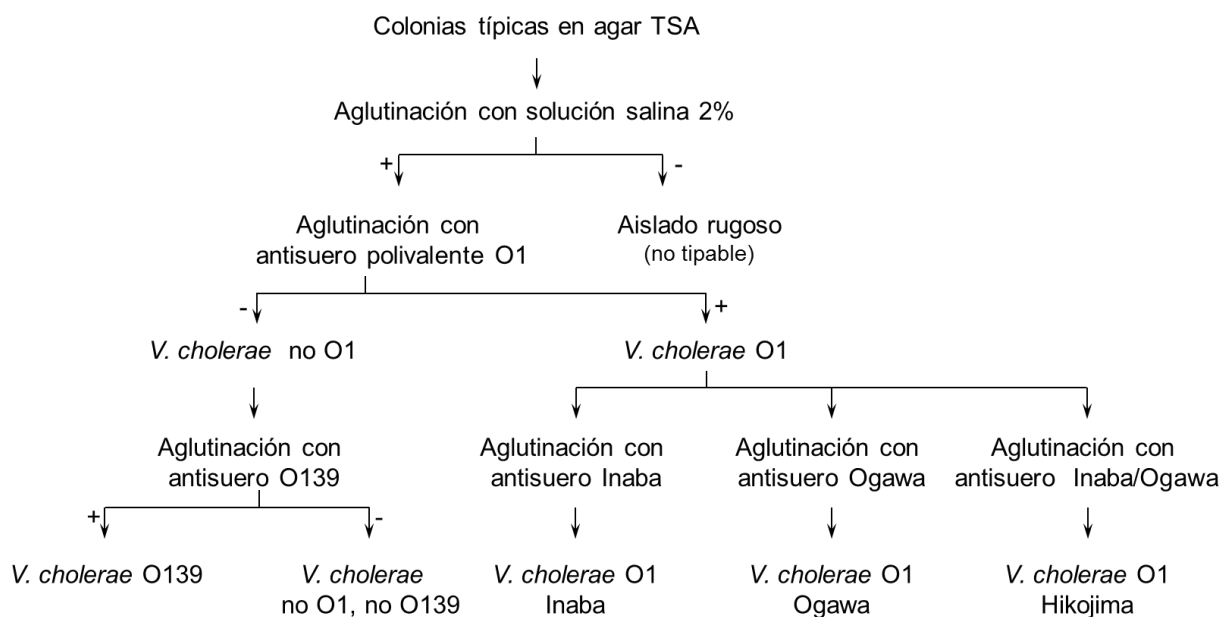


Figura 1. Diagrama para la identificación de los serogrupos y serotipos de *V. cholerae* (Caffer MI et al., 2007).

II.6. Diagnóstico microbiológico

En la sospecha inicial de cólera el reconocimiento de las características clínicas típicas y del entorno epidemiológico son sumamente importantes. No obstante, el método de referencia o regla de oro en el diagnóstico de esta infección es el aislamiento e identificación de su agente causal a partir de productos patológicos, especialmente muestras de heces diarreicas. Su realización requiere de un laboratorio bien equipado y personal calificado. Los protocolos normalizados para el diagnóstico convencional incluyen varias etapas y consumen no menos de 72 horas de trabajo. Entre las principales etapas se encuentran (Caffer MI et al., 2007; Fernández SF & Alonso G, 2009; Somarriba L et al., 2013):

1. Toma y procesamiento de la muestra: Se debe realizar durante la fase aguda de la enfermedad. Las muestras útiles son las heces diarreicas recogidas en esta fase y antes del inicio de cualquier tratamiento antibiótico o antiparasitario. Debe ser obtenida aproximadamente 1 g de heces frescas o 0,5 – 1 mL de heces líquidas. En casos especiales puede realizarse mediante hisopado rectal.

Debe procesarse en un período menor de 2 horas después de ser recogida. Si esto no fuera posible, debe ser colocada en un medio de transporte como el Cary–Blair, donde se puede conservar hasta 5 días a 4-8 °C.

2. Examen directo: Permite realizar un diagnóstico presuntivo rápido, aunque por lo general se considera poco confiable y no aplica como prueba de tamizaje. Incluye varias pruebas como la microscopía de campo oscuro, la prueba de inmovilización con el antisuero O1, la tinción de Gram sustituyendo la safranina por carbol-fucsina como colorante de contraste y la inmunofluorescencia.
3. Cultivo, pruebas fenotípicas y serológicas: Se lleva a cabo la siembra simultánea de 0,5–1 mL o 1 g de heces en 10 -15 mL de medio de enriquecimiento agua de peptona alcalina (APA) pH 8.5, así como en medios generales y selectivos (agar sangre, agar Mc Conkey y agar Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS, de sus siglas en inglés tiosulfato citrato bilis sacarosa). Una vez sembrados los medios sólidos se incuban durante 18 – 24 horas a 37 °C y el medio de enriquecimiento durante 4 a 6 horas, a la misma temperatura. Luego de transcurridos estos tiempos se toma una asada de la superficie del caldo y se realiza la resiembra en TCBS.

Las colonias con las características culturales del género *Vibrio* deben ser sembradas en los medios de agar dos azúcares de Kliger (AHK) y agar hierro lisina (AHL). Ambos medios de diferenciación son incubados a 37 °C durante 18 a 24 horas antes de su lectura, la cual debe mostrar la fermentación de glucosa, la no utilización de lactosa y la descarboxilación de la lisina en presencia de este agente. Una vez establecida la pertenencia al género *Vibrio* se realiza la prueba de la oxidasa, la cual debe dar un resultado positivo y se procede con las pruebas fenotípicas que permiten establecer el diagnóstico de la especie *V. cholerae*: producción de catalasa, prueba de la cuerda, descarboxilación de la lisina y la ornitina, hidrólisis de la arginina, utilización del manitol y del inositol, sensibilidad al compuesto vibriostático O/129 y la prueba de tolerancia al NaCl.

Una vez identificada la especie, se prosigue con el estudio antigénico. Se debe probar primero el antisuero polivalente O1 para la determinación del serogrupo y luego sigue la determinación del serotipo con los sueros monovalentes para el

serotipo Ogawa e Inaba. Si el resultado al enfrentar la colonia en estudio es negativo para el antisuero O1, se procede a utilizar el antisuero O139 (figura 1). Los aislamientos presuntivamente del serogrupo O139, o del serotipo Hikojima deben ser enviados a un laboratorio de referencia para un diagnóstico confirmatorio.

4. Técnicas moleculares: Reacción en cadena de la polimerasa (RCP), una de las más utilizadas es la que amplifica un fragmento específico para *V. cholerae* que pertenece a una de las regiones espaciadoras intergénicas localizadas entre las subunidades de 16s y 23s del ANRr de este enteropatógeno. Existe además una RCP múltiple que amplifica un fragmento del gen *ctxA* y del gen *tcpA* que codifican para la subunidad A de la TC y para el pili co-regulador de la toxina de *V. cholerae* O1 (Pukatzi S & Provenzano D, 2013).
5. Pruebas para la determinación del biotipo: Para este propósito pueden utilizarse el aislamiento en agar sangre, hemaglutinación de eritrocitos de pollo, el fagotipaje, la reacción de Voges-Proskauer, la sensibilidad a polimixina B y la RCP.
6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana in vitro: Los métodos recomendados y más empleados para este propósito son la difusión en agar Muller – Hinton con sangre según Kirby- Bauer y la microdilución en caldo o agar. Los antimicrobianos recomendados por la OMS son: cotrimoxazol, furazolidona, tetraciclina, y ácido nalidíxico. Los resultados para el disco de tetraciclina son usados para predecir la susceptibilidad a la doxiciclina. Si hay resistencia al ácido nalidíxico se debe comprobar el comportamiento del aislado frente a ciprofloxacino ya que probablemente haya en ese caso sensibilidad intermedia a esta quinolona (Kitaoka M et al., 2011). El Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI, de sus siglas en inglés Clinical Laboratory Standart Institute) sólo provee los puntos de corte para la interpretación de los halos de inhibición para ampicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclina, y cotrimoxazol ya que los resultados de sensible, intermedio y resistente para los aislados de *V. cholerae* O1 y O139 frente a estos antimicrobianos están correlacionados con los resultados de concentración mínima inhibitoria (CMI) para estos antibióticos por el método de microdilución en medio líquido. El método de difusión con discos no debe ser

usado para la doxiciclina y la eritromicina pues los resultados de los aislados de *V. cholerae* O1/O139 frente a estos antibióticos por este método son frecuentemente inexactos. Para la interpretación del halo de inhibición frente a ciprofloxacino se debe usar el punto de corte que establece CLSI para enterobacterias, pues no hay punto de corte para *V. cholerae* en este caso (Kitaoka M et al., 2011; CLSI, 2015).

Todo lo expuesto respecto al diagnóstico de certeza del cólera y a la caracterización fenotípica de la especie *V. cholerae* como agente etiológico de la enfermedad, explica por qué es necesario contar con métodos alternativos de diagnóstico rápido que permitan una orientación presuntiva. Estos métodos deben ser confiables, sencillos de aplicar, fáciles de interpretar por cualquier personal y útiles en condiciones de campo.

En Cuba el aumento en el número de atenciones médicas por enfermedad diarreica aguda (EDA) ocurridas en años recientes (Coutin MG et al., 2006; Almodovar-Battle MC & Dickinson FO, 2014) conllevó al uso de pruebas de diagnóstico rápido presuntivo de cólera en todos los niveles de atención médica del país. Esta situación puso de manifiesto la necesidad de contar con una PDR cubana que permitiera abaratar los costos del diagnóstico y mantener la estabilidad en la disponibilidad de este recurso.

Con estos antecedentes, el Instituto Finlay de La Habana, Cuba, con amplia experiencia en la obtención de AcMs contra diferentes microorganismos, emprendió el desarrollo de un diagnosticador rápido presuntivo de cólera basado en el método de aglutinación a partículas de látex (Falero G et al., 2003; Cuello-Pérez M et al., 2015).

II.7. Diagnosticador AL_{ChO1}-IF

El diagnosticador AL_{ChO1}-IF consiste en una solución de un AcM a una concentración de 0,25 mg/mL acoplado a partículas látex en una suspensión al 10%. Dicho AcM fue obtenido a partir de un hibridoma productor de IgG que reconoce el LPS de *V. cholerae* O1 perteneciente a la colección del Instituto Finlay, La Habana, Cuba (Falero G et al., 2003).

El principio de la prueba consiste en la reacción de complementariedad inmunológica entre el AcM y el LPS de *V. cholerae* O1. La positividad de la reacción se visualiza gracias a la aglutinación de las partículas látex acopladas al AcM una vez que se produzca la unión de este AcM con el Ag A del LPS de *V. cholerae* O1.

Durante los estudios preliminares conducidos por el Instituto Finlay se comprobó una alta sensibilidad (límite de detección de 10^2 UFC/mL) y especificidad analítica de este diagnosticador frente a diferentes cepas de *V. cholerae* O1 constatándose que no hubo reacción cruzada con otros enteropatógenos como: *V. cholerae* no O1, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella sonnei*, *Shigella flexneri* y ECEP. La evaluación inicial de su desempeño frente a 84 muestras frescas de heces diarreicas humanas mostró una sensibilidad del 97,87% y especificidad del 97,29% (Cuello-Pérez M et al., 2015).

No obstante, antes de proponer la introducción del AL_{ChO1}-IF al sistema nacional de salud cubano, era necesario realizar un estudio para la evaluación de su desempeño frente a un número mayor de muestras de heces diarreicas humanas y comparar su funcionamiento con los diagnosticadores comerciales usados en el país: el Cholera antigen O1/O139 de SD-Bioline y el *On Site* Cholera Ag O1/O139 Rapid Test de CTK-Biotech.

II.8. Diagnosticador Cholera antigen O1/O139 de SD-Bioline (www.standardia.com/en/homeproduct/rapid_Diagnostic_Test/Cholera_Ag.-O1-O139.html)

Esta es una prueba rápida presuntiva para la detección cualitativa de *V. cholera* O1/O139 en heces humanas frescas. Constituye un método de uso fácil, no tiene reacción cruzada con otras especies de vibrios y sus resultados están disponibles en 20 minutos. Tiene un límite de detección de 10^7 UFC/mL acorde a lo reportado por el fabricante y es aplicable a estudios de pesquiasaje masivo en condiciones de campo. A diferencia del diagnosticador de CTK-Biotech sólo permite procesar muestras de heces y requiere una mayor manipulación pues tiene varios componentes.

El sistema contiene una membrana pre-cubierta con un AcM anti-*V. cholerae* O1 en la zona 1 de la tira y con un AcM anti-*V. cholerae* O 139 en la zona 2. Ninguna de las dos zonas o líneas de diagnóstico son visibles antes de la aplicación de la muestra.

Su visibilidad ocurre cuando cualquiera de los dos antígenos (O1 u O139) reaccionan con un AcP acoplado a oro coloidal que está libre y forma un conjugado que migra por capilaridad a lo largo de la membrana y es captado por los respectivos AcMs fijos a la membrana. Esto genera una línea color púrpura en la zona 1 si en la muestra está presente el Ag O1 o en la zona 2 si está presente el Ag O139.

En caso de no estar presente ninguno de los dos Ags no se forma el conjugado y en consecuencia tampoco es generada la línea color púrpura en ningunas de las dos zonas de diagnóstico. La línea control debe aparecer siempre ya que su presencia garantiza la correcta realización y funcionamiento de la prueba.

II.9. Diagnosticador *On Site* Cholera Ag O1/O139 Rapid Test de CTK-Biotech (Ctk.biotech.com/ctk.product/ctk-productcholera-ag-rapid-test)

Al igual que el diagnosticador de SD-Bioline, el sistema de CTK-Biotech es un método inmunocromatográfico de flujo lateral que a diferencia del test coreano utiliza dos pares de AcMs, ambos acoplados a partículas de oro coloidal. Dos AcMs libres que reconocen cada uno específicamente a los Ags O1 u O139 si están presentes en la muestra y dos AcM anti O1/O139 fijos a las zonas diagnósticas 1 y 2 respectivamente que atrapan a los conjugados O1anti O1 u O139 antiO139 si éstos se forman dando origen a una línea color púrpura que representa o indica la positividad de la prueba cuando los Ags O1 u O139 se encuentran en la muestra. El sistema de CTK-Biotech es una prueba ampliamente conocida y utilizada en Cuba, se adapta bien a las condiciones de campo y tiene algunas diferencias con el diagnosticador SD-Bioline ya que permite procesar vómito además de heces, requiere menos manipulación pues contiene menos componentes, es un poco más rápida debido a que su tiempo máximo de lectura es 10 minutos y además su límite de detección es de 10^5 UFC/mL según su fabricante, por lo que es también más sensible.

II.10. Otros diagnosticadores

Las PDR presuntivo de cólera son esenciales en la vigilancia de los brotes epidémicos de la enfermedad y en el control de los mismos. Estas han evolucionado desde la microscopía, los métodos de aglutinación, los inmunocromatográficos hasta la RCP. En enero de 2010, habían sido reconocidas 24 pruebas comerciales para el diagnóstico rápido presuntivo del cólera y han sido publicados al menos 18 estudios del desempeño en muestras clínicas en condiciones de campo y de laboratorio (Michal D et al., 2012).

Los primeros métodos para la detección precoz del cólera se basaron en la utilización de AcP que identificaban determinantes antigénicos de la toxina colérica o del LPS de *V. cholerae* O1/O139 y a menudo presentaban reacción cruzada con otras especies de bacterias enteropatógenas (Carrillo L et al., 1994; Hasan JAK et al., 1994; Nato F et al., 2003; Bolaños HM et al., 2004). Además, estas primeras pruebas no ofrecían una detección inmediata ya que requerían de la recuperación del germen a partir de la muestra, por lo que sólo acortaban en un día el tiempo demandado por el diagnóstico convencional (Rahman M et al., 1989).

La estandarización de la metodología para la obtención de AcMs impactó en el desarrollo de las PDR para el cólera. Entre los primeros sistemas con esta tecnología están los que utilizan AcMs conjugados con partículas de látex suspendidas en una solución amortiguadora como el PDK de Intelligent Monitoring Systems, Gainville, FL (Bolaños HM et al., 2004) y los métodos de co-aglutinación que utilizan AcM adsorbidos a *S. aureus* muertos por calor que coaglutinan con *V. cholerae* O1 como el Cholera Screen de New Horizons Diagnostics Corp, Columbia, Md (Carrillo L et al., 1994; Bolaños HM et al., 2004). En la primera década del actual siglo, aún eran utilizadas pruebas de diagnóstico rápido como el cólera SMART que combinaban el uso de AcPs y AcMs en un formato sándwich, que requiere varios pasos y que tienen buenos resultados (Nato F et al., 2003).

Desde hace varios años los sistemas inmunocromatográficos de flujo lateral de uno o dos pasos son los más utilizados como PDR presuntivo de cólera. Uno de los métodos inmunocromatográficos más conocidos y evaluados es el *V. cholerae*

Crystal de Span Diagnostics Ltd, India (Wang XY et al., 2006; Sinha A et al., 2012; Chakraborty S et al., 2013), el cual es un dispositivo inmunocromatográfico de un solo paso que utiliza un AcM unido a partículas de oro coloidal que fue originalmente desarrollado en el Instituto Pasteur en el año 2003 y ha sido evaluado en Bangladesh, Madagascar y Mozambique (Sinha A et al., 2012; Wang XY et al., 2013). Los estudios del desempeño de este diagnosticador en los dos primeros países arrojaron una sensibilidad entre 94 y 100%, con especificidad entre 84 y 100% utilizando el cultivo como método de referencia (Sinha A et al., 2012). El estudio de campo de este diagnosticador realizado en una zona endémica de Mozambique en el que se establecieron varios grupos experimentales según el cuadro clínico de los pacientes, la sensibilidad y la especificidad totales de esta prueba rápida fue de 95% y 89% respectivamente, siendo mayor la sensibilidad en aquellos pacientes que requirieron terapia de rehidratación endovenosa (Wang XY et al., 2013). En otro estudio de evaluación del desempeño del VC Crystal en condiciones de laboratorio, se obtuvo una sensibilidad de un 100% y una especificidad del 66% con respecto al cultivo (Vijaya S, Dhanalakshmi TA, 2015).

El sistema Cholera SMART[®] de New Horizons Corp., Columbia, Md. antes mencionado, tiene como principio la precipitación de un AcM marcado con partículas de oro coloidal que detecta específicamente *V. cholerae* O1. Esta precipitación da lugar a un complejo que es capturado por un AcP fijado a una membrana de nitrocelulosa lo cual hace posible la visualización del resultado. Este sistema mostró una sensibilidad analítica de 6×10^7 UFC/mL en muestras de heces diarreicas de pacientes con sospecha cólera y una sensibilidad y especificidad de un 100% con estas mismas muestras (Bolaños HM et al., 2004). Este resultado fue similar al obtenido en otro estudio de campo realizado con este diagnosticador donde se obtuvo una sensibilidad de un 95,6% (Hasan JAK et al., 1994).

Por otra parte las pruebas de coaglutinación para el diagnóstico rápido de *V. cholerae* O1 fueron las primeras en ser utilizadas para este propósito y datan de los años 1970's y 1980's del siglo pasado (Rahman M et al., 1989). Uno de estos sistemas utiliza células de *S. aureus* (ATCC 12598) muertas por calor, estabilizadas con formaldehído y luego tratadas con antisueros específicos anti-*V. cholerae* O1. Los Acs presentes en este antisuero se adhieren por sus fragmentos Fc a la proteína

A de la membrana externa de la célula estafilocócica y reaccionan por su región variable con su antígeno homólogo en las muestras, lo que provoca la coaglutinación y la positividad de la prueba. La evaluación del sistema demostró que detecta *V. cholerae* O1 a partir de colonias sospechosas en agar TCBS con una sensibilidad y especificidad similares al cultivo (Rahman M et al., 1989). El mismo se comercializa como Cholera Screen de New Horizons Corporation (Bolaños HM et al., 2004).

II.11. Evaluación del desempeño de pruebas diagnósticas

II.11.1 Requisito metodológicos

Uno de los requisitos establecidos en Cuba para la inscripción de este tipo de producto en el Registro Nacional de Diagnosticadores es demostrar mediante un estudio de evaluación del desempeño que el sistema responde al propósito para el cual fue diseñado. Esto requiere que el estudio se realice en un laboratorio no comprometido con el fabricante (CECMED; Regulación No. 47-2007).

En Cuba la Regulación 47 del 2007 emitida por el Centro para el Control Estatal de los Medicamentos y Dispositivos Médicos (CECMED) ofrece una serie de orientaciones para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores y complementa lo establecido para este tipo de estudio en la regulación vigente sobre los Requisitos Generales para el Registro Sanitario de los Diagnosticadores en el país (Fernández SP & Díaz SP, 2013). De forma adicional, la Norma Cubana EN 13612:2006 establece el procedimiento general para la evaluación del funcionamiento de los diagnosticadores que deberá ser cumplido con independencia del tipo de diagnosticador de que se trate (Norma Cubana NC EN 13612:2006; CECMED; Regulación No. 47-2007).

Entre los requisitos generales a tener en cuenta en la evaluación del desempeño de los diagnosticadores establecidos en la Regulación 47 están los siguientes:

- El diagnosticador a evaluar será comparado con otro que tenga una aplicación similar o con el método o estándar de referencia establecido, los cuales se utilizarán además para caracterizar las muestras que se utilicen en la evaluación.

También se podrá utilizar en casos que se requiera y sea de mayor utilidad un criterio diagnóstico específico.

- Los diagnosticadores que se utilicen en la evaluación deberán estar registrados por las autoridades reguladoras competentes o contarán con un reconocimiento internacional.
- El diagnosticador se evaluará bajo las mismas condiciones en que será utilizado. Se tendrán en cuenta diversos factores como: muestras biológicas, analistas, equipos, condiciones ambientales, instalaciones (consultorios, laboratorios del nivel primario, secundario o terciario), entrenamiento específico, entre otros.
- Las características del desempeño que se evaluarán durante el estudio, serán aquellas que se consideren de utilidad para avalar el uso del diagnosticador, para lo cual se deberá tener en cuenta el tipo de ensayo (cualitativo o cuantitativo) y la aplicación del producto (diagnóstico, pesquiasaje, pronóstico, seguimiento, confirmación o complementario).

II.11.2. Requisitos técnicos

Se refieren a las características del desempeño que deberán ser evaluadas para los diagnosticadores y que se subdividen en desempeño analítico y desempeño diagnóstico o clínico (Norma Cubana NC EN 13612:2006; CECMED. Regulación No. 47-2007).

Desempeño diagnóstico o clínico: Es la evaluación de las características del desempeño que implica un número de muestras biológicas estadísticamente significativas. Este estudio es necesario para demostrar la relación entre el resultado y la condición clínica del paciente. Estas incluyen:

- Exactitud diagnóstica: Se obtiene al comparar los resultados del diagnosticador que se está evaluando con el resultado del estándar de referencia establecido. Una forma de hacer esta comparación es mediante las pruebas de concordancia, que se conocen como estudios de comparación, comparación de métodos, o pruebas de eficiencia, entre otros. En cualquier caso se refiere a estudios comparativos en los cuales una serie de muestras de pacientes o individuos son

analizadas con el diagnosticador en estudio y el método de referencia con el que se comparan los resultados de la prueba en estudio. Se recomienda utilizar un número de muestras estadísticamente significativa, que deben oscilar entre 50 y 100 en dependencia del tipo y la aplicación del producto y que además debe ser empleado un método de referencia reconocido. Las pruebas de concordancia es una vía de obtener la imprecisión del comportamiento del diagnosticador en la práctica.

- Sensibilidad diagnóstica o clínica: Es una indicación de cuan eficiente es el diagnosticador en identificar a los individuos que tienen una enfermedad o una condición en particular. Es importante tener en cuenta que cuando existe un “estándar perfecto” o un estado clínico bien definido, el valor de sensibilidad y especificidad diagnóstica que se determina es real. Sin embargo, en los casos que exista un “estándar imperfecto” o no esté bien definido el estado clínico, no es apropiado utilizar estos términos, en su lugar se determina la concordancia.
- Especificidad diagnóstica o clínica: Es una indicación de cuán efectivo es el diagnosticador en identificar a los individuos que no tienen una enfermedad o una condición determinada.
- Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad que tiene un individuo de estar infectado o enfermo, cuando el resultado del ensayo es positivo o reactivo. Es la proporción de individuos con resultados positivos o reactivos correctamente diagnosticados por el ensayo. Tiene en cuenta la sensibilidad y especificidad clínica del diagnosticador y además varía en dependencia de la prevalencia de la enfermedad en el área donde se usará en un tiempo determinado.
- Valor predictivo negativo (VPN): Es la probabilidad que tiene un individuo de no estar infectado o enfermo, cuando el resultado del ensayo es negativo o no reactivo. Es la proporción de individuos con resultados negativos o no reactivos correctamente diagnosticados por el ensayo. Tiene en cuenta la sensibilidad y especificidad clínica del diagnosticador y al igual que éstas varía en dependencia de la prevalencia de la enfermedad.

- Razón de verosimilitud positiva (RVP): Expresa el número de veces que es más probable que un resultado positivo provenga de un enfermo respecto de una persona sana.
- Razón de verosimilitud negativa (RVN): Es una medida de la probabilidad de que un resultado negativo sea obtenido de un enfermo respecto a una persona sana.
- Pacientes correctamente diagnosticados: Es un parámetro del desempeño cuyo cálculo está incluido en algunos paquetes estadísticos y ofrece el porcentaje de individuos enfermos entre el total de diagnosticados como positivos o reactivos por la prueba en estudio respecto al método de referencia. Este parámetro proporciona una idea concreta de la utilidad diagnóstica real del diagnosticador en estudio.
- Estos parámetros constituyen el desempeño o validez interna de un diagnosticador que es el conjunto de propiedades de un diagnosticador relativos a su idoneidad para el uso previsto.

III.1. Tipo de estudio, población y muestreo

Tipo de estudio: Se realizó un estudio de corte transversal en el periodo de mayo-septiembre de 2015.

Universo: Adultos residentes en la provincia La Habana (población > 18 años al 31 Dic 2013).

Muestra: Se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula (Morena L, 2013a):

$$n = \frac{z^2 pq}{B^2}$$

Donde: n = Tamaño de la muestra

z = 1,96 para el 95% de confianza

p = prevalencia esperada del factor a estudiar (5%)*

q = 1- p

B = Precisión o error máximo aceptado (3%)

*Prevalencia esperada teniendo en cuenta los casos de cólera ocurridos en Cuba desde 2012.

III.2. Selección de la muestra y estrategia de muestreo

Se utilizó un muestreo no probabilístico accidental, de acuerdo al número de pacientes atendidos en el servicio de recepción de ingresos del IPK por cuadro diarreico agudo con sospecha de cólera (Morena L, 2013a).

Una vez obtenido el consentimiento informado y firmado, se aplicó un cuestionario (anexo 1) y se procedió a la toma de muestra (anexo 2), la cual se recolectó de lunes a viernes durante el horario laboral del IPK (8:00 am a 4:00 pm).

Criterios de selección

Criterios de inclusión para los pacientes

- Pacientes adultos con diarrea aguda que acudieron al servicio hospitalario del IPK.
- Voluntariedad expresada mediante consentimiento informado escrito y firmado.

Criterios de exclusión para los pacientes

- Pacientes tratados con antibióticos siete días o menos antes de la toma de muestra.
- No estar apto mentalmente (para firmar el consentimiento informado y la recogida de información del modelo de la toma de muestra).

Criterio de salida del estudio

- Muestras no identificadas de forma apropiada (sin modelo de solicitud de toma de muestra o con datos incompletos, contenedores no rotulados o mal rotulados).
- Muestras que no cumplan las medidas de bioseguridad (Ej. derramadas, frascos mal tapados)
- Heces de más de 3 horas de emitidas.

III.3. Procedimientos generales

El personal especializado del Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología de La Habana (CPHEM-LH) de conjunto con el del Instituto Finlay proporcionaron entrenamiento a la autora y al resto del equipo técnico y profesional del IPK para el adecuado manejo y funcionamiento del AL_{Ch01}-IF.

Se diseñaron los modelos de solicitud de toma de muestra, recogida de datos del paciente y del consentimiento informado. Las muestras de heces se tomaron en la sala destinada a la atención a pacientes con sospecha de cólera del IPK durante el horario descrito con anterioridad. Se tuvo en cuenta las normas técnicas descritas en el plan de enfrentamiento al cólera del IPK (versión 3 del 2013)* .

* Disponible en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias Patógenas, en la Dirección y en el Puesto de Mando del IPK

Los procedimientos para el diagnóstico rápido presuntivo por medio de los sistemas AL_{ChO1}-IF, de CTK-Biotech y de SD Bioline se realizaron en el sitio de toma de muestra en un local preparado para este propósito. Adicionalmente se inoculó un tubo con agar Cary-Blair y se trasladó al Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias Patógenas del IPK (LNR-EP-IPK). Durante estas operaciones se tuvo en cuenta las medidas de bioseguridad previamente establecidas en el Plan de enfrentamiento al cólera del IPK (versión 3, 2013)*. Una vez en dicho laboratorio, se asentaron los datos de los pacientes en el libro de registro de entrada de este laboratorio y se realizó el procesamiento para el diagnóstico de cólera por métodos convencionales (Caffer MI et al., 2007).

III.4. Técnicas y procedimientos específicos

A las muestras se les realizaron simultáneamente la prueba mediante el sistema AL_{ChO1}-IF y las pruebas inmunocromatográficas de CTK-Biotech y SD-Bioline.

Ensayo con el sistema AL_{ChO1}-IF

Los reactivos se conservaron entre 4-8 °C y se atemperaron antes de su utilización.

– Materiales suministrados por el productor

3 mL de reactivo látex acoplado con el AcM anti-LPS de *V. cholerae* O1.

1 mL de control positivo.

1 mL de control negativo.

Tarjeta de cartulina de fondo negro como soporte para la reacción.

Aplicadores plásticos.

Instructivo para el uso.

– Materiales no suministrados por el productor

Viales o tubos con solución salina (0,5 mL)

Gotero graduado o calibrado (30 µL)

* Disponible en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias Patógenas, en la Dirección y en el Puesto de Mando del IPK

- Metodología para el uso (instructivo elaborado por el Instituto Finlay y modificado por el equipo de investigadores del LNR-EP-IPK).

A. Procesamiento de las heces líquidas:

- 1) Se agitó el frasco con partículas de látex acopladas al AcM anti-LPS de *V. cholerae* O1.
- 2) Se colocó 1 gota del mismo en tres de los pocillos de la tarjeta de reacción
- 3) Se depositó 1 gota del control positivo en uno de los pocillos que contenía el primer reactivo.
- 4) Se depositó 1 gota del control negativo en otro de los pocillos que contenía el primer reactivo.
- 5) Se depositó 1 gota de la muestra en el pocillo restante que contenía el primer reactivo.
- 6) Se mezclaron los reactivos de cada pocillo utilizando un aplicador para cada uno de ellas.
- 7) Se realizaron movimientos giratorios de la tarjeta de reacción hasta 3 minutos.
- 8) Se observó la presencia o no de aglutinación.
- 9) Se anotó el resultado en el modelo de solicitud de análisis y en la libreta de trabajo.

B. Procedimiento de las heces semilíquidas

- 1) Se colocó 500 µL de suero fisiológico en un tubo o vial.
- 2) Se empleó un hisopo embebido en las heces tocando varios puntos de la misma.
- 3) Se introdujo el mismo en el tubo o vial con suero fisiológico.
- 4) Se rotó y presionó sobre las paredes del tubo hasta lograr dilución completa del material fecal.
- 5) Se tomaron 30 µL y se procedió según lo descrito para las heces líquidas.

– Lectura e interpretación de la prueba

Muestras no reactivas o negativas: aquellas que no aglutinaron en un máximo de tres minutos después de mezcladas con el reactivo acoplado al AcM anti-LPS de *V. cholerae* O1 (figura 2).

Muestras reactivas o positivas: aquellas que aglutinaron en el término de hasta tres minutos después de mezcladas con el reactivo látex acoplado al AcM anti-LPS de *V. cholerae* O1 (figura 2).

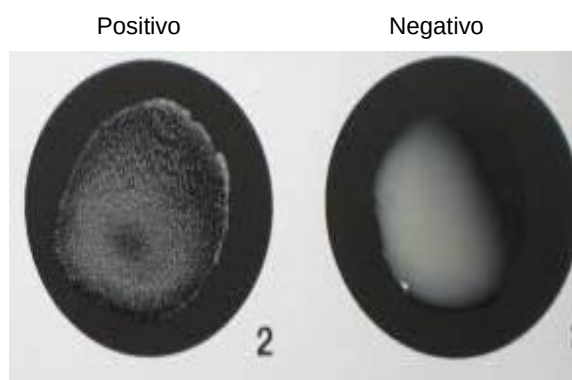


Figura 2. Interpretación de los resultados de la reacción de aglutinación con el sistema AL_{ChO1}-IF. La formación de grumos indica que la reacción es positiva (circulo de la izquierda); el aspecto lechoso de forma homogénea de la suspensión indica que la reacción es negativa (circulo de la derecha).

Prueba rápida de CTK-Biotech y SD-Bioline:

El análisis de las muestras con estos diagnosticadores se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso (anexos 3 y 4 respectivamente). La figura 3 muestra los componentes de las pruebas comercializadas por SD-Bioline y CTK-Biotech.

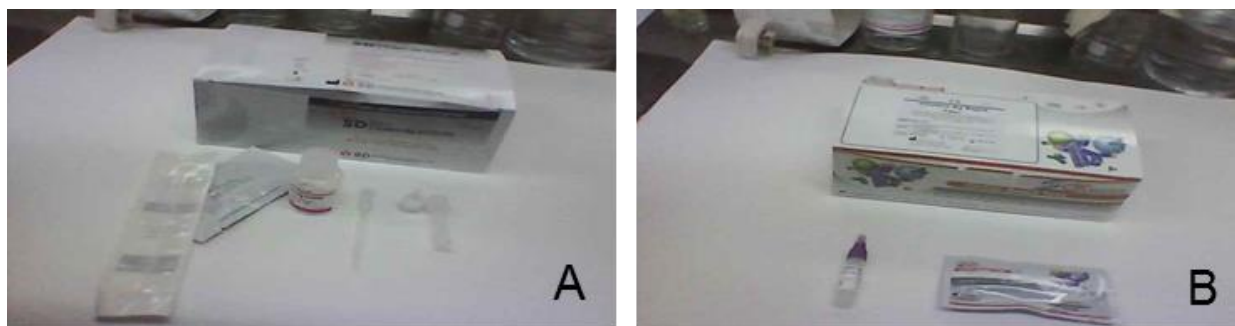


Figura 3. Imagen que muestra los componentes de los sistemas inmunocromatográficos comerciales de SD-Bioline (A) y CTK-Biotech (B).

Diagnóstico convencional

Se procedió según el Procedimiento Normado de Operación A-36-01 del LNR-EP-IPK* para el diagnóstico de *V. cholerae* O1 a partir de muestras de heces que está basado en la bibliografía acotada en el diagrama.

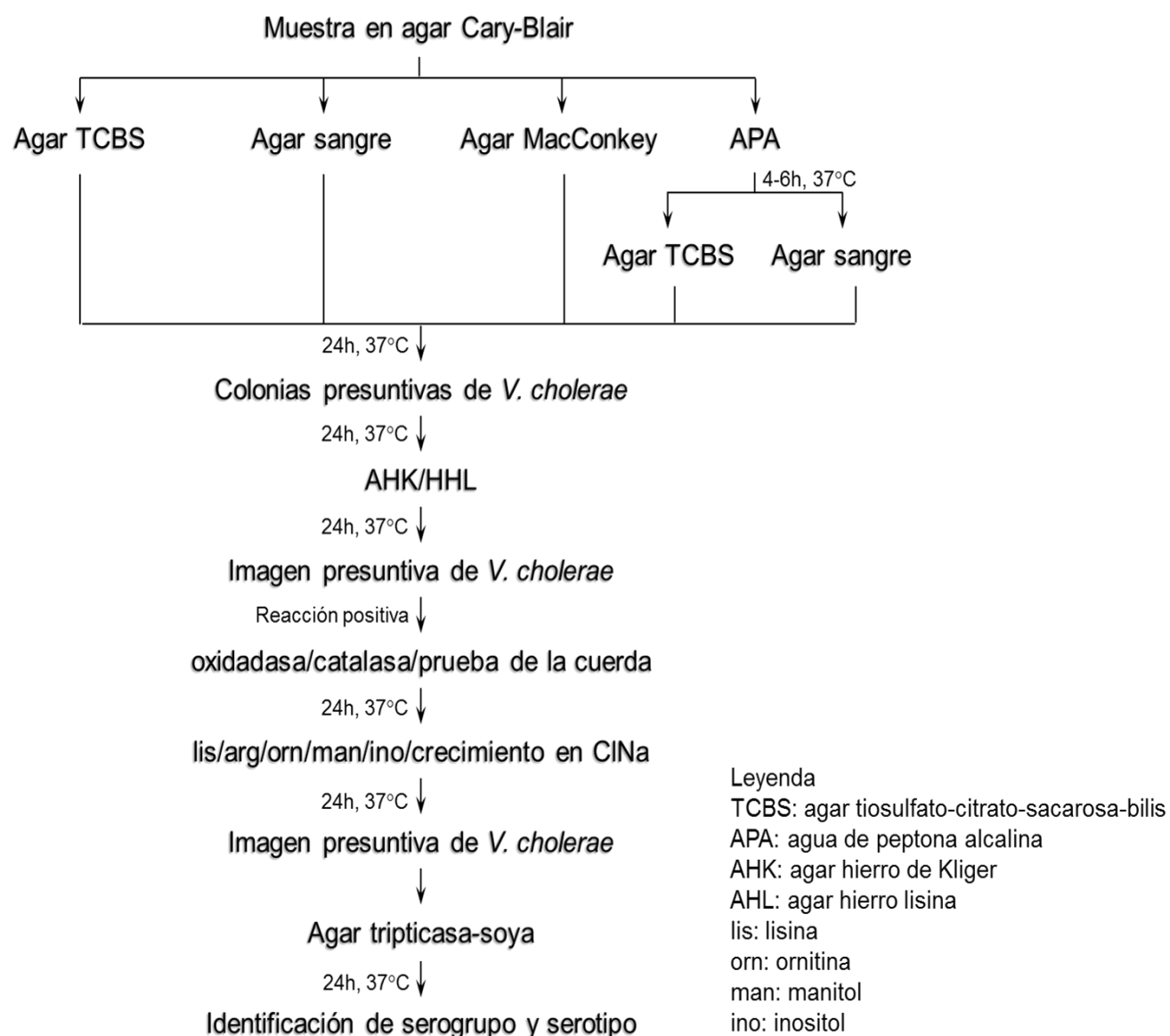


Figura 4. Diagrama que muestra el procedimiento general de identificación convencional de *V. cholerae* (Caffer MI et al., 2007; Somarriba L et al., 2013).

* Disponible en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias Patógenas del IPK.

III.5. Procedimientos estadísticos y análisis de datos para la validación del diagnosticador (Norma Cubana NC EN 13612:2006; CECMED. Regulación No. 47-2007; Morena L, 2013b).

Previo control de calidad, todos los datos fueron almacenados en una base diseñada para este estudio en Epi Info 2006 versión 3.3.2.

Para dar respuesta al primer objetivo específico se determinó la validez interna de la prueba (capacidad predictiva) calculada según:

Validez: Se estimó teniendo en cuenta los cálculos de sensibilidad y especificidad.

- a) Sensibilidad diagnóstica: probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo. Las muestras se clasificaron en verdaderos positivos (VP) y falsos negativos (FN). Se tomó como referencia el diagnóstico convencional.
- b) Especificidad diagnóstica: probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano. Las muestras se clasificaron en verdaderos negativos (VN) y falsos positivos (FP). Se tomó como referencia el diagnóstico convencional.

Seguridad: Se determinó por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo.

- a) VPP: probabilidad de estar infectado por *V. cholerae* O1 cuando se obtiene un resultado positivo con el diagnosticador AL_{ChO1}-IF. Se calculó según la fórmula $VPP = VP / VP + FP$.
- b) VPN: probabilidad de no estar infectado por *V. cholerae* O1 cuando se obtiene un resultado negativo con el diagnosticador AL_{ChO1}-IF. Se calculó según la fórmula $VPN = VN / VN + FN$.

Razón de verosimilitud (cuán probable es un resultado concreto ya sea positivo o negativo): Se estimó según la presencia o ausencia de enfermedad. Se utilizó como índice de comparación entre diferentes pruebas para un mismo diagnóstico.

- a) RVP: indica cuantas veces es más probable estar enfermo cuando la prueba es positiva.
- b) RVN: indica cuantas veces es más probable estar sano cuando la prueba es negativa.

Para dar salida al segundo objetivo se realizó el cálculo de la capacidad predictiva de los diagnosticadores de CTK-Biotech y SD-Bioline mediante los mismos parámetros ya mencionados para el AL_{ChO1}-IF.

Se determinó la exactitud diagnóstica del AL_{ChO1}-IF mediante índice de kappa lineal para lo que se empleó el diagnóstico convencional como método de referencia. Para establecer la concordancia entre los métodos se aplicó la clasificación de Byrt (1996): excelente o muy buena: 1 a 0,8; buena: 0,8 a 0,6; moderada: 0,6 a 0,4; ligera: 0,4 a 0,2; pobre: 0,2 a 0,0 y ausencia de concordancia: 0,0 a -1,0 (Cortés RE; 2010).

Para satisfacer lo planteado en el tercer objetivo se describió la población estudiada según las variables sociodemográficas edad y sexo, así como algunas epidemiológicas de interés (hacinamiento, hervir y clorar el agua). Se calculó los valores absolutos, porcentajes, media, mediana, la razón de prevalencia (RP), considerando el valor de $RP < 1$ como factor protector, RP entre 1 y 1,5 como no existencia de riesgo y $RP > 1,5$ como existencia de riesgo de enfermar (Morena L, 2013b).

En el anexo 5 se resume la operacionalización de las variables consideradas en el presente estudio.

III.6. Aspectos éticos y conflicto de intereses

El protocolo del presente trabajo de tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología, cuenta con la aprobación de la Comisión Científica Especializada de Microbiología y del Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (anexos 6 y 7).

Procedimientos para garantizar aspectos éticos en las investigaciones con sujetos humanos:

Para la selección de los pacientes se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión establecidos para este estudio.

Dando cumplimiento a lo descrito en la Declaración de Helsinki, 2001 y sus posteriores revisiones, la encargada de la toma de muestra brindó a los individuos seleccionados la posibilidad de preguntar cualquier detalle del estudio antes de firmar la planilla de consentimiento informado.

Además se utilizaron los modelos de solicitud de toma de muestras y los registros de laboratorio.

Todo el personal de salud involucrado en la investigación y el operario de la base de datos fueron entrenados previamente.

Se confeccionó una base de datos en Epi Info 2006 versión 3.3.2. En esta base de datos se sustituyó el nombre de cada participante con un número de identificación (desde 1 hasta 200). Solo los responsables del estudio tuvieron acceso a dicha base de datos y manejaron la información con estricta confidencialidad.

Todos los individuos voluntarios que participaron en el estudio fueron beneficiados ya que se les realizó de forma paralela las PDR y un coprocultivo para determinar la infección por enteropatógenos. Aquellos que resultaron positivos mediante las pruebas rápidas empleadas, o negativos con sospecha clínico-epidemiológica fueron ingresados para mejor estudio y la aplicación del tratamiento correspondiente según lo establecido en el Plan de Prevención y Control de cólera del Ministerio de Salud Pública de Cuba (Minsap) de octubre 15, 2012*.

A los pacientes se les explicó que su participación en el estudio era absolutamente voluntaria; además recibieron información sobre los objetivos de la investigación, los beneficios, la no exposición a riesgos potenciales y se les informó a quienes debían contactar para responder alguna pregunta o duda relativa al estudio o su condición de salud.

Conflicto de intereses: Se declara la ausencia de conflictos de intereses con los productores, comercializadores ni otras partes involucrados.

Publicación de resultados en congresos, eventos, para propósitos pedagógicos y otros: Los resultados de este estudio fueron entregados a la dirección del IPK, del CPHEM-LH, del Instituto Finlay y a la Dirección Nacional de

* Disponible en el Centro Hospitalario del IPK y en el Minsap.

Epidemiología del Minsap. Sólo serán publicados, presentados en congresos, eventos y fines pedagógicos en caso de que lo autorice esta última. Los nombres de los voluntarios ni ningún otro identificador se usará en publicación alguna ni en materiales pedagógicos.

Riesgo/beneficio: Los procedimientos normados en el ensayo para la evaluación del desempeño del diagnosticador AL_{Ch01}-IF estuvieron basados en métodos no invasivos, por lo que el mismo no conllevó ningún riesgo para los individuos estudiados. En contraposición, fueron beneficiados ya que recibieron un diagnóstico microbiológico especializado que permitió el manejo específico y oportuno según el caso.

Debido a que el cólera es una enfermedad infectocontagiosa de fácil diseminación, esta acción también repercutió de forma positiva en la población general al contribuir a evitar la aparición de casos nuevos en la comunidad de donde procedía cada paciente.

La comparación del diagnosticador AL_{Ch01}-IF con los sistemas comerciales disponibles y los métodos convencionales, permitió brindar elementos útiles sobre su desempeño a los productores y autoridades competentes para la posterior toma de decisiones.

III.7. Aspectos de bioseguridad: El personal encargado del procesamiento de las muestras de heces fue especialmente capacitado e instruido en las operaciones relacionadas con su trabajo y siguió lo dispuesto en el Manual de Bioseguridad para el Laboratorio (PNO 29-004)* en relación a las buenas prácticas y uso de equipos de protección personal (batas y sobretapas, guantes).

El local seleccionado para el estudio contó con todas las condiciones para el procesamiento correcto y el análisis de la muestra. Además se garantizó la eliminación final del material de desecho contaminado con todos los medios disponibles, incluidas las muestras de heces.

* Disponible en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias Patógenas y la sala de hospitalización del IPK seleccionada para este estudio.

El cálculo de la muestra teniendo en cuenta la cantidad total de adultos mayores de 18 años residentes en La Habana y demás factores de la fórmula que se empleó arrojó un total de 203 individuos.

En la tabla 1 se resumen los resultados de las muestras de todos los pacientes para cada una de las pruebas que se emplearon en el presente estudio.

Tabla 1. Número de pruebas positivas y negativas según el tipo de diagnosticador para el total de pacientes incluidos en el estudio de evaluación del AL_{ChO1}-IF (n = 203). LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre de 2015.

Tipo de diagnosticador	Resultado	
	Positivo	Negativo
Diagnóstico convencional	66	146
AL _{ChO1} -IF	81	131
CTK-Biotech	77	135
SD-Bioline	33	179

Evaluación del desempeño de la prueba presuntiva rápida AL_{ChO1}-IF para el diagnóstico del cólera vs diagnóstico convencional

De las 66 muestras diagnosticadas como positivas según el método convencional, 56 también resultaron positivas por el AL_{ChO1}-IF (56/66), en tanto que las 146 muestras que resultaron negativas por el método de referencia, 121 (121/146) fueron también negativas por el método en evaluación. Estos resultados arrojaron una sensibilidad y especificidad superior al 80%.

La tabla 2 muestra los valores de sensibilidad y especificidad, así como otros parámetros del desempeño de la prueba AL_{ChO1}-IF para el diagnóstico presuntivo

rápido de cólera tomando el diagnóstico convencional como método de referencia y un intervalo de confianza (IC) de 95%.

Tabla 2. Parámetros del desempeño del sistema AL_{Ch01}-IF para el diagnóstico presuntivo rápido de cólera tomando el diagnóstico convencional como método de referencia. LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015.

Parámetros	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	84,85	73,43	92,11
Especificidad (%)	82,88	75,56	88,41
VPP (%)	69,14	57,76	78,67
VPN (%)	92,37	86,05	96,07
RVP	4.96	3,42	7,18
RVN	0,18	0,10	0,33
Pacientes correctamente diagnosticados	83,49	77,65	88,09
Índice de Kappa	0,6376	0,5299	0,7453

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo;
 RVP: razón de verosimilitud positiva; RVN: razón de verosimilitud negativa
 Fuente: Base de datos del estudio. LNREP-IPK, La Habana, 2015.

Comparación del desempeño del sistema inmunocromatográfica de CTK-Biotech vs diagnóstico convencional

En las condiciones de trabajo del presente estudio, de las 66 muestras que resultaron positivas por el método de referencia, 59 fueron diagnosticadas igualmente positivas por el sistema de CTK-Biotech (59/66). De las 146 muestras negativas por el diagnóstico convencional, 128 fueron negativas según este diagnosticador (128/146).

De estos resultados derivaron valores de sensibilidad y especificidad superiores al 85%. El valor predictivo positivo apenas superó el 75%; sin embargo, en cerca del

95% de los casos fue capaz de predecir cuando la diarrea aguda era de etiología no colérica.

La tabla 3 muestra el desempeño de la prueba rápida de CTK-Biotech en relación al diagnóstico convencional como método de referencia.

Tabla 3. Parámetros del desempeño del sistema de CTK-Biotech para el diagnóstico presuntivo rápido de cólera tomando el diagnóstico convencional como método de referencia. LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015.

Parámetros	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	89,39	78,77	95,27
Especificidad (%)	87,67	80,96	92,33
VPP (%)	76,62	65,34	85,20
VPN (%)	94,81	89,21	97,71
RVP	7,25	4,67	11,26
RVN	0,12	0,06	0,24
Pacientes correctamente diagnosticados	88,21	82,90	92,08
Índice de Kappa	0,737	0,6411	0,8329

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo;
 RVP: razón de verosimilitud positiva; RVN: razón de verosimilitud negativa
 Fuente: Base de datos del estudio. LNREP-IPK, La Habana, 2015.

Comparación del desempeño del sistema inmunocromatográfica de SD-Bioline vs diagnóstico convencional

El diagnosticador de SD-Bioline sólo permitió identificar como positivos 30 de los 66 reconocidos por el método de referencia (30/66) y a 143 de los 146 de los diagnosticados como negativos por el diagnóstico convencional (143/146).

Estos resultados mostraron la baja sensibilidad y elevada especificidad del sistema con relación al cultivo; así como la capacidad de predecir la infección por *V. cholerae* en más del 95% de los pacientes con diarrea aguda.

La tabla 4 muestra el resumen de los valores obtenidos para cada parámetro de desempeño que se evaluó con relación al sistema de SD-Bioline en las condiciones del presente estudio.

Tabla 4. Parámetros del desempeño del sistema de SD-Bioline para el diagnóstico presuntivo rápido de cólera tomando el diagnóstico convencional como método de referencia. LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015.

Parámetros	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	45,45	33,32	58,12
Especificidad (%)	97,95	93,65	99,47
VPP (%)	90,91	74,53	97,62
VPN (%)	79,89	73,11	85,35
RVP	22,12	7,00	69,91
RVN	0,56	0,45	0,69
Pacientes correctamente diagnosticados	81,60	75,59	86,45
Índice de Kappa	0,5029	0,3768	0,629

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo;
 RVP: razón de verosimilitud positiva; RVN: razón de verosimilitud negativa
 Fuente: Base de datos del estudio. LNREP-IPK, La Habana, 2015.

Caracterización de la población de estudio

La tabla 5 muestra la RP, la probabilidad (p) asociada a cada valor de este parámetro y su respectivo IC. Los parámetros antes mencionados son los más empleados para estimar el riesgo de enfermar dado los resultados obtenidos con el método de referencia según el comportamiento de las variables epidemiológicas de

interés en el estudio. Como ya mencionamos se seleccionó un valor $\geq 1,5$ para estimar el riesgo de enfermar asociado al comportamiento de estas variables de interés epidemiológicos que fueron: la edad, el sexo, el hacinamiento, el consumo de agua no hervida y el consumo de agua no clorada.

La elevada RP en los individuos entre 25 y 64 años sugiere la asociación entre este rango de edades y el riesgo de adquirir cólera. No se observó diferencias significativas entre este y los restantes grupos etarios.

Con relación al género, los resultados fueron similares ya que la RP resultó superior en los hombres con relación al sexo femenino; a pesar de esto la diferencia no fue significativa.

El valor de RP y p demostraron que el consumo de agua sin hervir constituyó el mayor riesgo de enfermar de cólera.

De acuerdo a la RP estimada en el presente estudio, otras variables epidemiológicas tales como la cloración del agua y el hacinamiento no parecen estar directamente asociados al riesgo de infección por *V. cholerae*.

Tabla 5. Distribución de casos con diarrea aguda comparados con los confirmados de cólera según las variables de interés. LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015.

Variables	Enfermos (n=66) No. (%)	No enfermos (n=146) No. (%)	RP; p
Género			
Masculino (n=94)	35 (37,23)	59 (62,76)	RP=1,66* (0,92-2,99) $p=0,08$
Femenino (n=118)	31 (26,27)	87 (73,72)	
Edad ($\bar{x}$, $\pm$ DS)	46,52($\pm$ 16,803)	45,99($\pm$ 17,69)	RP=1.70* (0.80-3.58) $p=0,16$
Índice de hacinamiento ≥ 3			
Si (n=28)	10 (35,71)	18 (64,28)	RP=1,27 (0,55-2,92) $p=0,57$
No (n=184)	56 (30,43)	128 (69,62)	

Consumo agua hervida

Si (n=79)	17 (21,51)	62 (78,48)	RP=2,12*
No (n=133)	49 (36,84)	84 (63,15)	(1,11-4,04) p=0,01*

Consumo agua clorada

Si (n=63)	18 (28,57)	45 (71,42)	RP=1,18
No (n=149)	48 (32,21)	101 (67,79)	(0,62-2,26)

RP: razón de prevalencia con intervalo de confianza al 95%; p: valor de p significativo <0,05.

* valores significativos

Fuente: Cuestionarios y base de datos de la investigación, IPK-2015

El cólera se considera como una enfermedad infecciosa prevenible ya que se transmite por agua y alimentos contaminados. Desafortunadamente, a pesar de los grandes avances en el entendimiento de la enfermedad y su agente causal, el hombre no ha sido capaz de detener su diseminación. Como resultado, el número de países que reportan esta infección a la OMS continúa en ascenso cada año (Sack DA et al., 2004; Ghose AC, 2011).

El diagnóstico de certeza de esta infección se basa en el aislamiento de *V. cholerae* y la identificación de su serotipo y biotipo. Estas pruebas permiten además, la caracterización del aislado, incluyendo su susceptibilidad in vitro y los estudios de epidemiología molecular. Sin embargo, estos requieren de diversos pasos que enlentecen la obtención del resultado, así como de varios sustratos y reactivos para incrementar la población de bacterias deseadas (en este caso *V. cholerae*), restringir la de otros géneros presentes en la muestra, aislarla en medios no selectivos e identificarla a través de pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas. Este largo proceso es influenciado además por la calidad de la muestra, la cuantía del inóculo en la misma y otros factores externos como la temperatura, humedad y luminosidad entre otros (Guillen A & Lucho J, 2011; Sharifi-Mood B & Maliheh Metanat M, 2014).

Por su parte, las pruebas basadas en la detección de la reacción Ag-Ac, permiten el diagnóstico presuntivo acelerado y se pueden utilizar como una prueba tamiz en una población determinada. Esta ventaja resulta de utilidad para la toma de decisiones durante brotes epidémicos, ya que no solo contribuyen al suministro del tratamiento específico, sino también a iniciar de manera ágil y racional las medidas de control. Aunque otras EDAs también requieren rehidratación del paciente, únicamente cuando su causa es la infección por *V. cholerae* es indispensable establecer medidas inmediatas para limitar la propagación de la enfermedad (Bolaños HM et al., 2004).

La re-emergencia de este agente en el Caribe dio lugar a un nuevo reservorio para el incremento de la séptima pandemia por esta infección (Weil AA et al., 2012). Su introducción en Cuba, después de más de un siglo de erradicada, requirió la actualización de los algoritmos diagnósticos y del manejo de los pacientes con

sospecha de cólera con vistas a garantizar la detección oportuna de la infección y mitigar el impacto negativo de esta enfermedad sobre la salud y la economía (Coutin MG et al., 2006; Almodovar-Battle MC & Dickinson FO, 2014).

Las pruebas de diagnóstico rápido del cólera disponibles actualmente en Cuba no son de producción nacional lo que encarece el diagnóstico y dificulta la estabilidad de su disponibilidad en el país. En este contexto se volcaron todos los esfuerzos en la búsqueda de soluciones de lo cual devino el AL_{ChO1}-IF, objeto de esta evaluación.

Evaluación del sistema de aglutinación al látex AL_{ChO1}-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1 en pacientes con sospecha de cólera

Se conocen más de 200 serogrupos de *V. cholerae* (definidos por el antígeno somático O); no obstante solo los serogrupos O1 y O139 son reconocidos como causa de brotes epidémicos, siendo el primero el de mayor incidencia a nivel mundial (Harris JB et al., 2012). El Instituto Finlay elaboró el sistema de diagnóstico AL_{ChO1}-IF basado en un AcM anti LPS de *V. cholerae* O1 acoplado a partículas de látex. Su evaluación preliminar en condiciones de laboratorio y posterior reto en la detección del antígeno colérico en muestras de pacientes pediátricos, demostraron la sensibilidad, especificidad y eficacia del sistema (97,87; 97,29 y 97,6% respectivamente). Además de buen desempeño en condiciones de campo preliminares, el diagnosticador exhibió otras bondades propias del sistema de aglutinación al látex: resultados en tiempo máximo de 15 minutos, no requerir de instrumental complejo, ni de personal técnico altamente calificado (Cabrera O et al., 2006; Cuello-Pérez M et al., 2015). Aunque no existen antecedentes de estudios sobre la valoración costo/beneficio de este producto, su manufactura nacional presupone inversiones menos costosas que la importación de otros sistemas comerciales como los de las casas CTK-Biotech y SD-Bioline. No obstante, para su escalado e introducción en la red de laboratorios del sistema de salud de Cuba, era preciso el diseño de protocolos aprobados por los organismos regulatorios como el CECMED y de centros evaluadores como el IPK (Norma Cubana NC EN 13612, 2006; Regulación No. 47, CECMED 2007).

Las investigaciones realizadas en el presente estudio demostraron valores de sensibilidad, especificidad y eficacia inferiores a los que se encontraron previamente por los propios productores, tanto al enfrentarlo a cepas controles como durante la prueba de campo preliminar. Esta diferencia pudo deberse entre otras causas, a que las poblaciones de estudio eran diferentes. En la primera fase se emplearon heces de niños ingresados (Cuello-Pérez M et al., 2015), lo que presupone un cuadro clínico comprometedor, mientras que en la segunda fase se evaluó sobre muestras de adultos, la mayor parte de los cuales no requirieron hospitalización. Aunque no se realizó un estudio cuantitativo de la carga bacteriana en las muestras, pudiera deducirse que la severidad del cuadro clínico pudo estar asociada a este factor. Bajo esta perspectiva se pudiera hipotetizar que la gravedad del enfermo es proporcional al número de bacterias presentes en la muestra lo que repercutió de forma negativa en la positividad de la prueba en estudio durante la segunda fase. Esta suposición pudiera homologarse a los resultados de Wang y cols. quienes evaluaron el diagnosticador Crystal VC en un área endémica de cólera en África subsahariana. En este ensayo se demostró que la sensibilidad de esta prueba fue mayor en el grupo de pacientes con enfermedad severa que requirió terapia de rehidratación endovenosa, en tanto que en los casos menos severos fue más baja (Wang XY et al., 2006).

En el presente estudio es posible que influyeran también otros factores relacionados con la edad. Entre ellos 1) la prontitud en acudir a los servicios médicos (usualmente más rápido cuando se trata de niños) lo que favorece que la detección del Ag se realice durante la fase de mayor excreción, 2) la presencia de condiciones anatomofisiológicas adversas para *V. cholerae* (Ej hiperclorhidria en el curso de la úlcera gastroduodenal (Fernández SF & Alonso G, 2009), así como 3) el empleo de sustancias o medicamentos diferentes de los antibióticos que pudieran tener efecto negativo sobre la sobrevivencia o expresión antigénica de este agente; estos últimos de uso más frecuente en los adultos, grupo en que los valores de los parámetros que se evaluaron resultaron inferiores.

Las condicionantes mencionadas con anterioridad no se consideraron durante la elaboración del protocolo de este trabajo y por tanto constituyen limitaciones a tener en cuenta en ensayos futuros.

De igual forma otras circunstancias pudieron influir en los resultados falsos negativos y positivos obtenidos con el AL_{Ch01}-IF. La existencia de otras sustancias u organismos en la muestra, por demás usualmente constituida por una flora microbiana muy variada, también pudieran causar reacción cruzada, autoaglutinación del reactivo o inhibición de la reacción (Caffer MI et al., 2007; Ashihara Y, et al., 2011). Adicionalmente, debido a que el sistema se aplica directamente sobre las heces, la presencia de flóculos o materia fecal propiamente dicha, en ocasiones dificulta la interpretación, lo que puede impactar directamente sobre los resultados. Con vistas a minimizar este último inconveniente, todos los investigadores relacionados con el ensayo recibieron capacitación sobre los procedimientos y se crearon las condiciones necesarias para el desarrollo de los mismos.

El cultivo, considerado como la prueba de referencia internacional, también pudiera tener resultados que dependen de varios factores, entre ellos: la cuantía y representatividad del inóculo, la viabilidad del microorganismo a detectar, su variabilidad fenotípica, de condiciones de laboratorio (Fernández SF & Alonso G, 1991; Kelly MT et al., 1991; Caffer MI et al., 2007). En el caso de *V. cholerae* además, se reporta que los cambios de la osmolaridad y el pH en la parte baja del aparato digestivo pueden inducir la aparición de formas cocoides no cultivables y a la eliminación del fago de los vibrios, factores que pueden afectar la sensibilidad de este diagnóstico (Vijaya S, Dhanalakshmi TA, 2015). Por esta razón, algunos autores refieren que el uso del método convencional como prueba de referencia en los estudios de evaluación pudiera conllevar a una subestimación de la especificidad y del VPP de la prueba evaluada debido a las tasas altas de falsos positivos (Page AL et al., 2012).

Además la especificidad del AL_{Ch01}-IF, aunque por debajo de lo reportado por su fabricante, tuvo un valor cercano a lo reportado para otros diagnosticadores. El Crystal VC por ejemplo, fue evaluado en diferentes países: Madagascar, Bangladesh, Congo y Mozambique, en los cuales este parámetro varió entre el 70,6 y el 100% en dependencia de la gravedad del cuadro clínico y el empleo o no de incubación previa de las heces en APA, en tanto la sensibilidad en estos estudios estuvo alrededor del 77% (Bhuiyan NA et al., 2003; Wang XY et al., 2006, Mukherjee

P et al., 2010; Sinha A et al., 2012; Vijaya S, Dhanalakshmi TA, 2015; Page AL et al., 2012).

El sistema PDK[®] (basado en el uso de un AcM contra el Ag A del LPS del *V. cholerae* O1 acoplado a partículas látex) y el SMART[®] (sistema inmunocromatográfico en dos pasos que utiliza un AcM unido a partículas de oro coloidal y un AcP fijado a una membrana de nitrocelulosa) fueron evaluados y comparados en un estudio multicentrico realizado en Costa Rica. El primero arrojó 100% de sensibilidad, 85,7% de especificidad y VPP de 86,6% cuando fue probado en heces líquidas sin moco. El segundo mostró sensibilidad y especificidad de 100%¹⁹, lo que demuestra la superioridad de ambos sistemas en comparación con el ALChO1-IF. Otro diagnosticador basado en la captura de Ag mediante AcMs acoplados a partículas de látex exhibió 100% de sensibilidad y VPP de 87%, sin embargo la especificidad fue sólo 33% (Carrillo L et al., 1994).

Aunque el ALChO1-IF mostró valores de sensibilidad, especificidad y VPP moderados, su VPN y la RVP traducen que los pacientes diagnosticados como positivos mediante esta prueba tienen casi 5 veces más probabilidad de estar enfermos que de estar sanos. Esta deducción coincide con la RVN de la misma (0,18), de la que se infiere que la probabilidad de que un resultado negativo provenga de un paciente enfermo es muy baja (Morena L, 2013b). Adicionalmente, según la interpretación del índice de kappa por Byrt, los valores entre 0,6 y 0,8 indican buena correlación entre los elementos comparados (Cortés RE, 2010), en este particular el ALChO1-IF y el cultivo como referencia.

De manera general, los parámetros de desempeño tenidos en cuenta durante la evaluación del ALChO1-IF, superan el 80%. Esto permitiría hacer un diagnóstico rápido de forma presuntiva en similar proporción de pacientes con sospecha de cólera, lo que sin dudas pudiera resultar de gran utilidad en el manejo adecuado de los mismos y en el control de brotes epidémicos. No obstante, las limitantes encontradas durante la discusión de este acápite deberán ser estudiadas con más profundidad con vistas a lograr una mejor interpretación de la prueba.

Comparación del desempeño del sistema AL_{ChO1}-IF con el de las pruebas rápidas inmunocromatográficas disponibles en la red nacional de laboratorios de microbiología en Cuba

La inmunocromatografía es una de las técnicas de inmunodiagnóstico más modernas. Cada vez son más sus aplicaciones; el ejemplo más conocido son las pruebas de embarazo y una de las más recientemente incorporadas son aquellas para el diagnóstico de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (Caffer MI et al., 2007, Ashihara Y et al., 2011). Estas se realizan mediante un dispositivo desarrollado para detectar la presencia (o la ausencia) de un compuesto diana en la muestra. Este tipo de pruebas comúnmente presenta en un formato de tira, en el cual la muestra problema fluye a lo largo de un sustrato sólido por medio de una acción capilar. Las basadas en la inmunocromatografía de flujo lateral siempre se presentan en tiras que pueden ser colocadas en los llamados casetes o aplicadores que les brinda un soporte más confiable y atractivo (Michal D et al., 2012; Chakraborty S et al., 2013).

Entre las múltiples ventajas que hoy se le reconocen a las pruebas inmunocromatograficas de flujo lateral se encuentran la rapidez, sensibilidad, especificidad y uso sencillo, cuya lectura e interpretación no requieren de experiencia ni equipos de laboratorio (Ashihara Y et al., 2011).

En general las pruebas de diagnóstico rápido para el cólera han mostrado un desempeño variable según el tipo de estudio, la metodología de la evaluación empleada, el tamaño de muestra y la carga bacteriana en los especímenes analizados³⁸. Algunos autores refieren una sensibilidad que oscila entre 92-100% y especificidad 50-100% (Keddy KH et al., 2013; Vijaya S, Dhanalakshmi TA, 2015). La sensibilidad del AL_{ChO1}-IF fue discretamente inferior a la del diagnosticador de CTK-Biotech y bastante más elevada que la del SD-Bioline. La especificidad, por su parte varió del 82,88 al 97,95% en orden decreciente para el diagnosticador de SD-Bioline, CTK-Biotech y AL_{ChO1}-IF.

Los valores predictivos son parámetros del desempeño que a diferencia de la sensibilidad y la razón de verosimilitud varían con la prevalencia de la enfermedad y la especificidad del método (Norma Cubana NC EN 13612, 2006; Vijaya S,

Dhanalakshmi TA, 2015). El VPP y VPN del AL_{ChO1}-IF fueron comparables a los del diagnosticador de CTK-Biotech; por su parte el de SD-Bioline mostró un comportamiento dispar, con VPP superior y VPN inferior al de los diagnosticadores antes mencionados.

La RV o cociente de probabilidades, indica la probabilidad de que un resultado (positivo o negativo) se corresponda con el diagnóstico correcto. Los valores obtenidos para la RVP fueron hasta tres veces superiores para el diagnosticador SD-Bioline en comparación con el valor de ese parámetro para el CTK-Biotech y el AL_{ChO1}-IF. Por su parte de RVN del CTK – Biotech fue el más bajo respecto a los valores de este parámetro para la prueba en estudio y el diagnosticador SD - Bioline. Estas cifras indican que con respecto a las RV en conjunto (positiva y negativa) el CTK – Biotech es el diagnosticador más seguro seguido por el AL_{ChO1}-IF, ya que aunque la probabilidad de que un resultado positivo provenga de un enfermo es muy alta con el uso del SD – Bioline, también es alta la probabilidad de que uno negativo provenga de un paciente infectado.

El índice kappa traduce la concordancia de los métodos en comparación con la prueba de referencia. De acuerdo a la clasificación de Byrt (1996)(Cortés RE, 2010) el diagnosticador de CTK-Biotech fue el de mejor concordancia con el diagnóstico convencional pues mostró el índice de kappa más elevado. AL_{ChO1}-IF también mostró valores entre 0,6 y 0,8 en tanto la concordancia de la prueba de SD-Bioline fue moderada (valor de kappa entre 0,4 y 0,6).

Adicionalmente, durante el ejercicio se hizo evidente que el diagnóstico con el AL_{ChO1}-IF requiere mayor manipulación de las muestras biológicas, especialmente cuando no son líquidas, y que se generan numerosos desechos potencialmente contaminados (tarjetas de aglutinación, palillos, viales, etc) lo que a su vez origina mayor riesgo biológico para el operador y el entorno.

De forma general, estas evidencias sugieren que el AL_{ChO1}-IF es el menos ventajoso en comparación con los diagnosticadores de CTK-Biotech y de SD-Bioline, entre los cuales no existe una verdadera supremacía dada la gran variabilidad entre sus resultados.

Caracterización de la población de estudio según variables de interés epidemiológico

El presente trabajo abordó además, el comportamiento de algunas variables sociodemográficas y epidemiológicas en la muestra de pacientes que quedaron incluidos en el mismo.

El estudio de toda la población es la manera más exacta de acercarse a lo que se pretende conocer, pero esto casi nunca es posible en la práctica debido a la falta de tiempo, la escasez de recursos y la dificultad para acceder a todos los sujetos, entre otros aspectos. En el presente ensayo el cálculo del número de individuos a incluir tuvo en cuenta la frecuencia esperada de la enfermedad y el tamaño de la población de La Habana, así como un nivel de precisión y confianza que permitieran extrapolar los resultados a la población general (Morena, 2013b). El tipo de muestreo que se empleó garantizó que todos los individuos que cumplieran los criterios de inclusión se sumaran al estudio en la medida que acudieran al hospital del IPK (sitio de ensayo) hasta completar el tamaño de la muestra calculada (Cantor AB, 1996).

El estudio demostró que de los 212 pacientes que conformaron la muestra, más de la mitad eran mujeres (55,6%); sin embargo, el diagnóstico microbiológico de cólera resultó significativamente superior en los hombres ($p = 0,08$). Esto pudiera deberse de una parte a que este último grupo poblacional suele ser más reticente a acudir a los servicios médicos y de otra a que debido a sus actividades por lo general son menos cuidadosos de los hábitos higiénico-sanitarios. Estos argumentos son totalmente especulativos ya que en la encuesta no se exploraron los mismos.

La edad en que más se afectaron los individuos fue de 25 a 64 años. Este rango se corresponde con la edad laboralmente activa, durante la cual las personas pasan la mayor parte del día fuera del hogar. En consonancia con lo anterior, el 86% de los individuos refirieron vivir en condiciones de no hacinamiento; sin embargo, precisamente en este grupo fue donde se demostró el porcentaje más elevado de infección por *V. cholerae*. Vistos de conjunto, estos datos sugieren que los pacientes pudieron adquirir la infección en un entorno extradomiciliario. En estas condiciones las personas no siempre tienen acceso a bebidas y alimentos sanos o a servicios sanitarios donde puedan realizar el aseo correcto de las manos, circunstancias que

podieran propiciar la infección con este patógeno (Thielman NM et al., 2014; Sánchez RM & Pérez IA, 2014).

En Cuba existe un servicio amplio de acueducto y alcantarillado, así como programas masivos de educación sanitaria sobre medidas higiénicas. El objetivo principal de estos últimos es propiciar hábitos de higiene tales como el lavado de manos, la cocción y conservación de alimentos, la lactancia materna, la eliminación de desechos y el tratamiento del agua para el consumo humano. A pesar de esto, el estudio demostró que más del 60% de la población estudiada no cloraba ni hervía el agua y que existe una asociación significativa entre la presencia de la infección por *V. cholerae* y el consumo de agua sin hervir. Está bien demostrado que la dosis infectiva de este patógeno es de 10^8 a 10^9 vibrios, que la fuente de contaminación más importante son las heces de las personas infectadas, que se adquiere por vía oral a través de agua contaminada o al ingerir alimentos que contengan la bacteria y que es más frecuente donde no existen condiciones sanitarias adecuadas para la población, ni un tratamiento adecuado de las aguas (Sánchez RM & Pérez IA, 2010; Salinas de Reigosa B et al., 2011). Por lo general los brotes están asociados con problemas de abasto de agua, pobre higiene doméstica y personal, analfabetismo, pobreza y prácticas culturales que facilitan la transmisión (Valenzuela MT, 2010).

Los datos que aportan esta investigación traducen la necesidad de continuar e intensificar los esfuerzos que realiza Cuba en el control del cólera. Además del mejoramiento de la infraestructura sanitaria y el fortalecimiento de los programas de educación de la población, son necesarias otras medidas que potencien las primeras. Entre estas pudieran mencionarse el perfeccionamiento del diagnóstico y la vigilancia clínica, epidemiológica y microbiológica, así como la implementación de estrategias de vacunación a la población susceptible. La posibilidad de disponer de forma sostenida de métodos de diagnóstico rápido sensibles y específicos resulta una herramienta vital para este propósito.

Discusión general

El cólera aún resulta una amenaza para la salud pública mundial. La clave para mitigar los brotes epidémicos, controlar la enfermedad cuando esta se vuelve endémica y reducir la mortalidad, continúa siendo el abordaje multidisciplinario de la prevención, preparación y respuesta, sumado a un robusto sistema de vigilancia para la detección oportuna de casos.

A partir de junio de 2012, después de más de 100 años libre de cólera, Cuba se vio sometida a brotes epidémicos de esta enfermedad devastadora. Gracias a la visión y esfuerzo del gobierno de este país se implementaron medidas y acciones que contuvieron su expansión y severidad. La importancia de este trabajo radica en aportar las evidencias necesarias para la toma de decisiones relativas al empleo del AL_{ChO1}-IF como método rápido de diagnóstico presuntivo en la red de laboratorios de microbiología.

El método antes mencionado es de producción nacional, lo que garantiza un suministro estable y durante su evaluación demostró valores de sensibilidad, especificidad y VPN aceptables. Su principal debilidad parece estar dada por su VPP. Esto último pudiera solventarse aplicando de forma correcta el método de diagnóstico clínico-epidemiológico y la confirmación del mismo mediante microbiología convencional. Estos resultados soportan la hipótesis de que el diagnosticador AL_{ChO1}-IF permite la detección cualitativa de *V. cholerae* O1 excretado por los pacientes con diarreas agudas.

De forma general, la comparación con los métodos disponibles en la red de laboratorios sugieren la superioridad del sistema de la casa CTK-Biotech seguido por AL_{ChO1}-IF y SD-Bioline de forma decreciente. De esto se desprende que la segunda parte de la hipótesis del presente trabajo, AL_{ChO1}-IF muestra un desempeño igual al de las pruebas inmunocromatográficas disponibles en la actualidad en Cuba, no resulta totalmente cierta.

De forma adicional, el formato del diagnosticador objeto de estudio pudiera facilitar la contaminación del operador y el entorno de no extremarse las medidas de control durante su manipulación.

Entre las principales limitaciones de esta investigación estuvieron: el estudio de un número limitado de los individuos que cumplían los criterios de inclusión debido a la falta de recursos materiales y humanos, la encuesta pudo haber reflejado otros datos que facilitarían el análisis e interpretación de los resultados y finalmente el estudio carece de análisis costo/beneficio.

- La capacidad predictiva del diagnosticador AL_{ChO1}-IF fue aceptable por lo que atendiendo a su desempeño pudiera ser empleada para el diagnóstico rápido presuntivo de cólera.
- La evaluación del desempeño de la prueba AL_{ChO1}-IF mostró resultados similares al del diagnosticador de CTK-Biotech y distantes a los del sistema de SD-Bioline. El empleo futuro del AL_{ChO1}-IF en el sistema de vigilancia activa del cólera debe permitir un diagnóstico rápido presuntivo con una eficiencia similar a la del CTK – Biotech.
- La evaluación de las variables epidemiológicas seleccionadas sugieren que en las acciones para prevenir el cólera se debe enfatizar en el tratamiento correcto y oportuno del agua de consumo, especialmente en la población masculina en edad laboral.

- Presentar los resultados de este estudio de evaluación del desempeño del diagnosticador AL_{ChO1}-IF al Instituto Finlay, con vistas a su perfeccionamiento y sugerir el cambio de formato a un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral el cual pudiera ser más seguro y preciso que la prueba de aglutinación al látex.
- Incluir en los diseños de futuros estudios las variables clínico-epidemiológicas que constituyeron limitaciones en el presente trabajo, tales como, antecedentes patológicos personales y el consumo de sustancias diferentes de los antimicrobianos.
- Realizar un estudio de costo beneficio respecto al uso de las pruebas rápidas presuntivas comercializadas por CTK-Biotech y SD-Bioline para el enfrentamiento al cólera en nuestro país.

- Almodovar-Battle MC, Dickinson FO. Notas para una historia del cólera en Cuba durante los siglos XIX, XX y XXI. Rev Anales Academia de Ciencias de Cuba 2014; 4(1): 1-11.
- Ashihara Y, Kasahara Y, Nakamura RM. Chap 44. Immunoassays and immunochemistry. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011.
- Baik YO, Kim JW, Yang JS, Kim IY, Kim ChW, Homg JH. Safety and immunogenicity assessment of an oral cholera vaccine through Phase I Clinical trial in Korea. J Korean Med Sci 2014; 29: 491-501.
- Bhuiyan NA, Firdausu Q, Faruque AS, Malek MA, Salam MA, Nato F, Fournier JM, Chanteau S, Sack D, Nair GB. Use of Dipstick for rapid diagnosis of cholera caused by *V. cholerae* O1 y O139 from rectal swabs. J Clin Microbiol 2003; 41 (8): 3939-41.
- Bolaños HM, Acuña MT, Serrano AM, Obando X, Mairena H, Chávez L, Sandí, Rodríguez G. Desempeño de los sistemas cholerae- SMART y Pathogen-Detection- Kit en el diagnóstico rápido de cólera. Rev Panam Salud Pública Washington 2004; 16(4): 233-41.
- Cabrera O, Martínez ME, C Maribel, Soto CR, Valmaseda T, Cedré B, Sierra G. Preparation and evaluation of *Vibrio cholerae* O1 EL Tor Ogawa lipopolysaccharide–tetanus toxoid conjugates. Vaccine 24S2 (2006) S2/74–S2/75.
- Caffer MI, Terragno R, Fraga Glez S, Viñas MR, Pichel M, Binstein N. Manual de procedimientos. Aislamiento, identificación y caracteriación de *V. cholerae*. WHO Global Salm Surv. 2007.
- Cantor AB. Sample size calculating for Cohen's K. Psychol Methods. 1996; 1: 150-153.

- Carrillo L, Gilman RH, Mantle RE, Núñez N, Watanabe J, Moron J, Quispe A. Rapid detection of *V. cholerae* O1 in stools of Peruvian cholera patients by using monoclonal immunodiagnostic kits. J Clin Microbiol 1994; 32(3): 856-57.
- CDC. Laboratory methods for diagnosis of epidemic dysentery and cholera, available online at: http://www.Cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_lab_manual.hm.
- CECMED. Regulación No. 47-2007. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. Ambito Regulador [Internet]. 2007 Jun. Disponible en: http://www.cecmed.sld.cu/Docs/Pubs/AmbReg/2007/AmbReg_SEJun_07.pdf.Spanish
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cholera - *Vibrio cholerae* infection. November 16, 2014. Disponible en: <https://www.cdc.gov/cholera/index.html>.
- Chakraborty S, Munirul A, Scobie H.M, Sack D. Adaptation of a simple dipstick test for detection of *V. cholerae* O1/O139 in environmental water. Front Microbiol 2013 29; 4: 320.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2015
- Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. Science 1996; 274(5295): 2025-31.
- Cortés RE. Kappa concordancia y reproducibilidad. Disponible en <http://>. Rev. Vo.61. N° 3 Jul – Sept 2010.
- Coutin MG, Rodríguez D, Aguiar PH. Morbilidad oculta por EDA en Cuba. Reporte técnico de vigilancia ISSN 1028 – 4338. 2006; 11(1). Disponible en: <http://www.sld.cu/galerías/pdf/sitios/vigilancia/coutin.pdf>.
- Cuello-Pérez M, Otero-Alfaro O, Reyes-López F, Camacho-Casanova Frank, Duranti G, Morales-Leslie MM. Obtención de un diagnosticador rápido de cólera,

basado en partículas de látex acopladas a un anticuerpo monoclonal contra lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* O1. Vaccimonitor 2015; 24(1): 10-20.

- Falero G, Rodríguez BL, Rodríguez I, Campos J, Ledon T, Valle E. Production and characterization of monoclonal antibodies to E1 Tor toxin co-regulated *pilus* of *Vibrio cholerae* hybrid. Hybridomics 2003; 22(5): 315-20.
- Farmer JJ, Kelly T. Enterobacteriaceae. In: Balows A, Hausler NJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology. Washington, D.C.: ASM Press; 1991: 360-83.
- Fernández SF, Alonso G. Cólera y *Vibrio cholerae*. Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel 2009; 40 (2): 50-69.
- Fernández SP, Díaz SP. Pruebas diagnósticas. Sensibilidad y especificidad. Cad Aten Primaria 2013; 10: 120-4.
- Finkelstein RA. Medical Microbiology 4th edition Chapter 24 Cholera, *V. cholerae* O1 and O139, and other pathogenic vibrios. Available on www.ncbi.nlm.nih.gov/static/header_footer_ajax/submenu/#resources
- Flores JJ. Cólera: aspectos microbiológicos, epidemiológicos y clínicos. Rev Biomed 1990; 1(4): 211-25.
- Ghose AC. Lessons from cholera & *Vibrio cholerae*. Indian J Med Res 2011; 133: 164-70.
- Guillen A, Lucho J. Retos y problemas en el diagnóstico microbiológico en diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2011; 28(1):116-20.
- Harris JB, La Rocque RC, Qadri F, Rijan ET, Calderwood SB. Cholera. Lancet 2012; 379: 2466-76.
- Hasan JAK, Huq A, Tamplin ML, SiebelingRJ, Colwell RR. A novel kit for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1. J Clin Microbiol 1994; 32: 249-52.
- Heidelberg FG, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft Daniel H, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, ReadTD, 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 OH, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholera*. Nature 2000; 46: 477-848.
- Johnson RA, Uddin T, Aktar A, Mohasin M, Mohammad MA, Chowdhury F, Harris JB, La Roque RC. Comparison of immune responses to the O – specific polysaccharide and lipopolysaccharide of *V. cholerae* O1 in Bangladeshi adult patients with cholera. Clin Vac Immunol 2012; 19(11): 1712- 21.
 - Kabir I, Khan WA, Haider R, Mitra AK, Alam AN. Erythromycin and trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of cholera in children. J Diarrhoeal Dis Res 1996; 14: 243-7.
 - Karaolis DKR,. 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 U S A 1998;95(6): 3134-9.
 - Keddy KH, Sooka A, Parsons MB, Njanpop-Lafourcade BM, Fitchet K, Smith M. Diagnosis of *V. cholerae* O1 infection in Africa. J Infec Dis 2013; 208(S1). S23.
 - Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ III. *Vibrio*. In: Balows A, Hausler NJ, Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology. Washington, D.C.: ASM Press; 1991: 384-95.
 - Kitaoka M, Sarah T, Underweger D, Pukatzi S. Antibiotic resistance mechanism of *V. cholerae*. J Med Microbiol 2011; 60: 397-407.
 - Koch R. An address on cholera and its bacillus. Br Med J 1884; 2: 403-7.
 - Kumar P, Deshmukh DG, Jain M, Zade AM, Ingoel KV, Goel AK. *Vibrio cholera* O1 strains with the Ogawa El Tor ctx b7 allele driving cholera outbreaks in south - westrn India in 2012. Infect Genet Evol 2014; 25: 93-6.
 - Michal D, Martine G, Mousy F, Chaignat Claire-L.D. Review of two decades of cholera diagnostics. How far we real come? PLoS Negl Trop Dis. 2012 Oct; 6(10): e1845.

- Miwanda B, Moore S, Muyembe JJ, Nguefack-Tsague, Kabangwa IK, Ndjakani DY. Antimicrobial drug resistance of *V. cholerae*, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis* 2015; 21(5): 140-5.
- Morena L. Cap 12. Diagnóstico y evaluación de pruebas diagnósticas. En *Epidemiología clínica*, 3e. Ed McGraw-HILL Interamericana S.A. de C.V 2013. Disponible en: <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1442§ionid=101159337> (a).
- Morena L. Cap 19. Muestreo y cálculo de tamaño de muestra. En *Epidemiología clínica*, 3e. Ed McGraw-HILL Interamericana S.A. de C.V 2013. Disponible en: <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1442§ionid=101159337> (b).
- Mukherjee P, Rammurty T, Bhattacharya MK, Takeda Y, Nair GB, Mukhopadhyay AK. Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick kit for diagnosis of cholera emphasizes its outbreak utility. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63 (4): 234-8.
- Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guénolé A. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(3): 476-8.
- Norma Cubana NC EN 13612:2006 (Publicada por el CEN,2002). Evaluación del funcionamiento de los diagnosticadores. (EN 13612:2002,IDT) Cuban National Bureau of Standardrs. ICS:11.040.55. Disponible en: www.nc.cubaindustria.cu.
- OMS Prevención y control de los brotes de cólera: política y recomendaciones de la OMS 2011. Disponible en: <http://www.who.int/topicscholera/control/es/index.html>.
- OMS weekly epidemiology record. 2014; 31(89): 345-56.
- *Onsite Cholera Ag. Rapid Test – Cassette (Fecal Specimen)*. Disponible en Ctk.biotech.com/ctk.product/ctk-productcholera-ag-rapid-test/.
- OPS/OMS Alerta epidemiológica de cólera. 26 de septiembre de 2013. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=docview&gid=2369+&Itemid=999999&lang=es)

- OPS/OMS. Alertas y actualizaciones epidemiológicas. Anuario 2014. Primera edición: Junio 2015:33-37. Disponible en: www.paho.org/hg/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=31136&Itemid=270&lang=es.
- OPS/OMS. Washington, D.C. Epidemiológica: Cólera. 24 de febrero, 2017. Disponible en: <http://www.who.int/topicscholera/control/es/index.html>
- Page AL, Alberti KP, Mondonge V, Rauzier J, Quilici L, Guerin PJ. Evaluation of a rapid test for diagnosis of cholera in the absence of a gold standard. PLoS one 2012; 7 (5): e 37360.
- Pukatzi S, Provenzano D. *Vibrio cholerae* as a predator: lessons from evolutionary principles. Front Microbiol 2013; 10(4): 384-5.
- Rahman M, Sack DA, Wadood A, Yasmin M, Latif A. Rapid identification of *V. cholerae* serotype O1 from primary isolation plates by a coagglutination test. J Med Microbiol 1989(28): 39-41.
- Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. Lancet 2004; 17(363): 223-33.
- Salinas de Reigosa B, Yegüez ME, Rojas Farazo T. Cólera ¿una vieja pandemia de nuevo en casa? Salus 2011; 15(1): 1-10.
- Sánchez JHJ. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. Curr Opin Immunol 2005; 17: 388-98.
- Sánchez RM, Pérez IA. Cólera: historia de un flagelo de la humanidad. Humanidades Médicas 2014; 14(2):547-569.
- SD Bioline Cholerae Ag. O1/O139. One Step *V. cholerae* O1/O139 Ag. Test. Disponible en: www.standardia.com/en/homeproduct/rapid_Diagnostic_Test/Cholera_Ag.-O1-O139.html.
- Sharifi-Mood B, Maliheh Metanat M. Diagnosis, clinical management, prevention, and control of cholera: a review study. Int J Infect 2014; 1(1): e18303.
- Sinha A, Sen Gupta S, Ghosh S, Basu S, Sur D, Kanungo S, Mukhopadhyay. Evaluation of a rapid dipstick test for identifying cholera cases during the outbreak. India J Med Res 2012; 135: 523-28.

- Somarriba L, Llanes RA, Sánchez MJ. Cólera en Haití. Lecciones aprendidas por la brigada médica cubana. La Habana, Editorial de Ciencias médicas, 2013; 264 pág.
- Tabatabaei SM, Khorasht AS. Antimicrobial resistance patterns of *Vibrio cholerae* strains isolated from Afghan and Irain patients in Iran. Int J Infect 2015; 2(1): e 22822.
- Thielman NM, Guerrant MD. Acute Infectious Diarrhea. N Engl J Med 2004; 350: 38-47, Stroni GP, Dhimolea MM, Pipero PS, Kraja DV, Sallavaci SY, Bino SF. A study on the epidemiology and etiology of acute gastroenteritis in adult patients presenting at the Infectious Diseases Hospital in Tirana, Albania. Balkan Med J 2014; 31(3):196-201.
- Valenzuela MT, Salinas H, Cárcamo M, Cerda J, Valdivia G. Estrategias para el enfrentamiento del cólera. La experiencia chilena desde una perspectiva de salud pública. Rev Chil Infectol 2010; 27(5): 290-4.
- Vijaya S, Dhanalakshmi TA. Rapid detection of *V. cholerae* O1 /O139 in stool samples by one – step immunochromatographic Dip- stick test. Int J Biol Med Res 2015; 6(2): 4990-2.
- Wang XY, Ansaruzzaman M, Vas R, Mondale C, Lucas ESM, von Seidlein L, Deen JL. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high – risk population. BMC Infect Dis 2006; 6: 17.
- Weil AA, Ivers LC, Harris JB. Cholera: lessons from Haití and beyond. Curr Infect Dis Reports 2012; 14(1): 1-8.

Anexo 1. Modelo de consentimiento informado. Evaluación del sistema de aglutinación al látex AL_{Ch01}-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1. LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015.

Estimado paciente,

En los últimos meses se reporta un incremento en el número de pacientes atendidos en consulta por diarrea. El Sistema Nacional de Salud de Cuba está interesado en conocer cuáles son los principales microorganismos (virus, bacterias y parásitos) causantes de este problema en el país. Con este objetivo se diseñó un estudio que se está realizando en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Nos gustaría contar con su consentimiento para que a las muestras de heces que Ud. está entregando, se les realicen todas las determinaciones pertinentes en este sentido, así como con su colaboración en la recogida de información necesaria que nos permitan arribar a conclusiones certeras.

Todos los datos brindados por Ud. u obtenidos en el presente estudio serán estrictamente confidenciales y privados. Su participación o no, no afectará en lo absoluto el servicio ni la atención que usted debe recibir.

Si decide participar, por favor firme esta página. Su nombre no será usado en ningún informe, pero su colaboración nos ayudará a obtener la información necesaria para tratar de resolver un problema de salud que en estos momentos le afecta a usted. Si no desea participar, gracias por su tiempo.

He leído la información de esta hoja de consentimiento y todas mis preguntas sobre el estudio y participación han sido atendidas, además se me ha informado de que puedo no participar o retirarme del mismo en cualquier momento, sin que por ello vaya a ser motivo de perjuicio.

Hago constar por este medio, mi disposición y consentimiento, para que se tome mi muestra de heces para ser incorporado al estudio.

Si acepto: ____ Fecha (día/mes/año): ____/____/____

Nombre completo de la persona entrevistada: _____

Firma: _____

Fecha (día/mes/año): ____/____/____

A quien contactar

Si usted desea hacer alguna pregunta puede hacerla ahora o después. Si usted

quisiera hacerla más tarde puede contactar a: _____,

Teléfono: _____

Anexo 2. Planilla diseñada para la recolección de datos y resultados durante la evaluación del sistema de aglutinación al látex AL_{ChO1}-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1. LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015.

Modelo de indicación de toma de muestra para coprocultivo, envío al LNR EP-IPK y resultados				
1-Nombre (es): _____ Apellidos: _____				3-Número de identificación _____
2-Edad: _____				
4-Dirección particular:	5-Área de Salud	6-Municipio	7-Provincia	8-Sexo Masc. ____ Fem. ____
9-Síntomas y signos. _____ _____ _____ Características de las heces: semilíquidas ____ pastosas ____ semipastosas ____ sanguinolentas ____ mucopiosanguinolentas ____ otra: ____		10-APP: _____ _____ _____ _____ _____		11- Fecha de colecta de la muestra de heces (D/M/A) ____/____/____ 12-Nombre del facultativo y firma, cuño: _____ _____
Resultados				
13-Fecha de la llegada al Laboratorio: ____/____/____ Resultados del SD Bioline ____ Resultados CTK Biotech ____ Resultados del AL _{ChO1} -IF ____ Fecha del resultado: ____/____/____ Resultado del coprocultivo: Microbiota normal (MBN): ____ Bacteria Identificada:____ Fecha del resultado: ____/____/____ Observaciones: _____ _____ _____ _____				
14- Realizado por: Nombre: _____ Firma _____ Fecha: ____/____/____				

Anexo 3. Procedimiento para realizar la prueba rápida CTK-Biotech (traducido en el LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015).

Preparación de la suspensión de la muestra para la realización de la prueba

1. Coloque los materiales del Kit a temperatura ambiente antes de realizar la prueba
2. Tome una porción de la muestra problema (alrededor de 50 mg) con el hisopo.
3. Cuando la muestra comience a difundir, usted observará un color purpura a través de la ventana del resultado
4. Interprete los resultados al cabo de 10 minutos. No interpretarlos después de los 10 minutos

Interpretación de la prueba

1. Una banda de color aparecerá a la izquierda de la ventana del resultado, lo cual indica que el procedimiento de trabajo es correcto. Esta banda es la línea de control (C).
2. Aparecerán bandas de color en el centro y a la derecha de la ventana del resultado.

Resultado negativo: La presencia solamente de la banda de control (C) indica un resultado negativo.

Resultado positivo: La presencia de la banda de control (C) y la banda O1 indica un resultado positivo para *Vibrio cholerae* O1.

La presencia de la banda de control (C) y la banda O139 indica un resultado positivo para *Vibrio cholerae* O139.

La presencia de la banda de control (C), la banda O1 y la banda O139 indica un resultado positivo para *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* O139.

Resultado no válido: Se considera resultado no válido cuando no aparece la banda de control (C). Algunas de las causas de resultado no válido pudieran ser no cumplimiento del procedimiento para la realización del diagnosticador o que esté vencido.

Anexo 4. Procedimiento para realizar la prueba rápida de SD-Bioline (traducido en el LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015).

Preparación de la suspensión de la muestra para la realización de la prueba.

1. Coloque los materiales del diagnosticador a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.
2. Tome el diluyente hasta la marca como se muestra en la figura. Luego, transféralo al tubo de recolección de la muestra.
3. Repita el paso 2.
4. Tome una porción de la muestra problema (alrededor de 50 mg) con el hisopo de recolección.
5. Inserte el hisopo dentro del tubo de recolección de la muestra que contiene el diluyente.
6. Gire el hisopo al menos 10 veces hasta que la muestra se haya disuelto en el diluyente. Antes de descartar el hisopo, presione sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.
7. Tape el tubo de recolección de la muestra con el gotero.

Procedimiento de la prueba

1. Saque de la bolsa el diagnosticador y colóquelo en una superficie seca
2. Agregue 2-3 gotas (80-100 mL) en la ventana de la muestra (S) del diagnosticador.
3. Cuando la muestra comience a difundir, usted observará un color púrpura a través de la ventana del resultado.
4. Interprete los resultados al cabo de 10 – 20 minutos. No interpretarlos después de los 20 minutos.

Interpretación de la prueba

1. Una banda de color aparecerá a la izquierda de la ventana del resultado, lo cual indica que el procedimiento de trabajo es correcto. Esta banda es la línea de control (C).
2. Aparecerán bandas de color en el centro y a la derecha de la ventana del resultado (2,1).

Resultado negativo: La presencia solamente de la banda de control (C) indica un resultado negativo.

Resultado positivo:

1. La presencia de la banda de control (C) y la banda 1(1) indica un resultado positivo para *Vibrio cholerae* O1.
2. La presencia de la banda de control (C) y la banda 2 (2) indica un resultado positivo para *Vibrio cholerae* O139.
3. La presencia de la banda de control (C), la banda 1(1) y la banda 2 (2) indica un resultado positivo para *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* O139.

Resultado no válido: Se considera resultado ni válido cuando no aparece la banda de control (C). Algunas de las causas de resultado no válido pudieran ser no cumplimiento del procedimiento para la realización del diagnosticador o que el diagnosticador este vencido.

Anexo 5. Operacionalización de las variables consideradas en el estudio para la evaluación del sistema de aglutinación al látex AL_{ChO1}-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1. LNR-EP-IPK; La Habana, mayo-septiembre 2015.

Variable (Clasificación)	Definición y escala
Socio-demográficas	
Edad (variable cuantitativa discreta).	Los grupos de edad se clasificaron en seis categorías: 18-24 años, 25-34 años, 35-44 años, 45-54 años, 55-64 años, 65 y + años.
Género (variable cualitativa nominal dicotómica)	Según sexo biológico: a) Masculino b) Femenino
Lugar de residencia (variable cualitativa politómica)	Se tuvo en cuenta los que residían en los 15 municipios de La Habana.
Escolaridad (variable cualitativa ordinal).	Se clasificó según nivel terminado siguiendo las categorías: iletrado, primario, secundario, medio y superior.
Ocupación (variable cualitativa nominal politómica).	De acuerdo a sus diferentes modalidades en el país y posteriormente se redujo a seis categorías: Amas de casa, jubilados, trabajadores de la salud, cuenta propia, manipulador de alimentos y otros.
Epidemiológicas	
Hacinamiento (variable cualitativa dicotómica).	Sí o No (según cantidad de convivientes/número de cuartos utilizados para dormir ≥ 3).
Procedencia del agua de consumo (variable cualitativa nominal politómica)	- Acueducto: Conducto artificial para conducir agua, para el abastecimiento de una población determinada. - Cisterna: Receptáculo para contener generalmente agua. Su capacidad va desde unos pocos litros a miles de metros cúbicos. - Pozo: Receptáculo para contener agua. - Pipa: Transporta y vende agua por medio de un camión cisterna. - Otras fuentes: Procedente de cualquier otra fuente, incluyendo embotellada
Calidad del agua de consumo. (variable cualitativa nominal dicotómica).	Hervida: agua calentada hasta bullir por tres o más minutos utilizando electricidad, gas, keroseno, carbón o algún otro combustible. Se operacionalizó como: Sí y No. - Clorada: aquella que independientemente de la fuente se le adicionó hipoclorito de sodio al 1%. Se operacionalizó como: Sí o No.

Disposición final de residuales líquidos: (variable cualitativa nominal politómica).	Se tuvo en cuenta diferentes categorías: - Inodoro conectado al alcantarillado: Sistema de cañerías de desagüe, también llamado alcantarillado, que está diseñado para recolectar las excretas humanas (heces y orina) y las aguas residuales y eliminarlas del entorno domiciliario. Los sistemas de alcantarillado consisten de instalaciones de recolección, bombeo, tratamiento y eliminación de excretas humanas y aguas residuales. - Inodoro conectado al tanque séptico. Dispositivo de recolección de excretas que consiste de un tanque asentador hermético, que normalmente se encuentra bajo tierra, lejos de la vivienda o del inodoro. También se le denomina “fosa”. - Letrina (pozo negro/hoyo). Sistema que vacía las excretas a un hoyo en el suelo y cuenta con agua para la limpieza. - Sin instalación sanitaria: Incluye fecalismo al aire libre - Otro (especifique): Opción considerada para dar la posibilidad de declarar otro(s) sistemas diferentes a los anteriores.
Clínicas	
Antecedentes de contacto con personas con diarreas (variable cualitativa nominal dicotómica)	Sí o No.
Número de diarreas (variable cuantitativa discreta)	Dependiendo del número de diarreas en las últimas 24 horas: <10 o ≥10
Vómitos en las últimas 24 horas (variable cualitativa nominal dicotómica)	Sí o No
Fiebre (variable cualitativa nominal dicotómica)	Sí o No
De laboratorio	
Resultado del diagnóstico convencional (variable cualitativa nominal dicotómica)	Positiva o negativa
Resultado de la prueba de aglutinación al látex AL _{Vch01} -IF (variable	Positiva o negativa

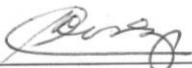
cualitativa nominal dicotómica)	
Resultado de la prueba inmunocromatográfica de CTK-Biotech (variable cualitativa nominal dicotómica)	Positiva o negativa
Resultado de la prueba inmunocromatográfica de SD-Bioline (variable cualitativa nominal dicotómica)	Positiva o negativa

Anexo 6. Aval de la comisión Científica Especializada de Microbiología emitido a favor del estudio “Evaluación del sistema de aglutinación al látex ALChO1-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1 en pacientes con diarrea. IPK, 2015”.

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)

**AVAL DE LA COMISIÓN CIENTÍFICA
ESPECIALIZADA DE MICROBIOLOGÍA**

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CCEM), como órgano asesor científico-técnico de la Vice dirección de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), ha aprobado el Protocolo de Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología titulado: “**Evaluación de un sistema de aglutinación al látex del Instituto Finlay para el diagnóstico presuntivo rápido de cólera**”, de la Dra. *María Antonia Morín Suarez*. El presente protocolo de tesis permitirá dar respuesta a la necesidad de evaluar un sistema de diagnóstico rápido presuntivo de cólera desarrollado por el Instituto Finlay para su posterior certificación. La propuesta de trabajo corresponde a las tareas 1 y 2 del proyecto del mismo nombre el cual cuenta con la aprobación de la CCE- de Microbiología y el CEI- del IPK (dictamen número CEI-IPK 19-14).


Dr. Mayling Álvarez Vera
Secretario CCEM, IPK

La Habana, 8 de julio del 2016



Anexo 7. Aval del Comité de Ética Institucional del IPK emitido a favor del estudio “Evaluación del sistema de aglutinación al látex ALCh01-IF para el diagnóstico rápido presuntivo de *V. cholerae* O1 en pacientes con diarrea. IPK, 2015”.

Ministerio de Salud Pública

Centro Auspiciado por la UNESCO
Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios
Para el estudio de las Enfermedades Virales
En Tuberculosis y Micobacterias

INSTITUTO
Pedro Kourí

COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 45-16

“Evaluación del sistema de aglutinación al látex como prueba rápida presuntiva para el diagnóstico de cólera”

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dra. María Antonia Morín Suárez

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.
3. Se aprueba el protocolo presentado

Dado, en el IPK, La Habana, a los 6 días del mes de octubre de 2016.

DrCs. Eric Martínez Torres
Presidente

DrC. Daniel González Rubio
Vicepresidente

DrC. Pedro Mas Bermejo
Vicepresidente

DrC. María Caridad Montalvo Villalva
Miembro

DrC. Iliana Valdés Hernández
Secretaría

Introducción

Marco teórico

Materiales y métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Recomendaciones

Referencias bibliográficas

Anexos