

Premio Fidel Pagés Miravé en su XIII edición. Detección de cólera en muestras de agua de consumo humano

Rodríguez-Aranda, A¹, Lucas-Fernández, M², Astor-Hoschen, N³, Cerrada-López, V⁴,
Martín-Rodríguez, TM⁴, Garnacho-Sacristán, R⁴, Llorente-Ballesteros, MT⁵

Sanid. mil. 2024; 80 (4): 107-116, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Introducción: El cólera es causado por la ingesta de agua o alimentos contaminados con *Vibrio cholerae*, concretamente por los serogrupos O1 y O139. El aumento de brotes graves en diferentes Zonas de Operaciones y la posible utilización de esta bacteria como arma biológica, refuerza la necesidad de la prevención del cólera para la sanidad militar y para las Fuerzas Armadas. El objetivo fue establecer un método de detección de *Vibrio cholerae* en muestras de agua de consumo en un periodo inferior a veinticuatro horas, con bajos límites de detección y simplificando la toma de muestra. **Material y métodos:** Para llevar a cabo este estudio se simuló muestras problema inoculadas con *Vibrio cholerae* serotipo O1 y serotipo no-O1. La detección de *Vibrio cholerae* en estas muestras se llevó a cabo mediante cultivo microbiológico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Resultados:** El enriquecimiento posterior a la filtración no presentó buenas recuperaciones. Sin embargo, la técnica diseñada en el laboratorio, con enriquecimiento del agua previo a la filtración, presentó recuperaciones satisfactorias, con concentraciones teóricas muy bajas. Esta última técnica de cultivo y la PCR fueron capaces de detectar *Vibrio cholerae* en menos de veinticuatro horas. Asimismo, se consiguió reducir el límite de detección de la técnica prolongando el tiempo de enriquecimiento. **Conclusiones:** Se ha logrado una mejora significativa en la detección de *Vibrio cholerae*, obteniendo resultados en un periodo de tiempo no superior a veinticuatro horas y en concentraciones inferiores a la dosis infectiva.

PALABRAS CLAVE: *Vibrio cholerae*, Agua de consumo humano, Arma biológica, Bioterrorismo, Cultivo, PCR.

Background: Cholera is caused by the ingestion of water or food contaminated with *Vibrio cholerae*, specifically serogroups O1 and O139. The increase of severe outbreaks in different Operational Zones and the possible use of this bacteria as a biological weapon reinforces the need for cholera prevention for military health and for the Armed Forces. The objective was to establish a method to detect *Vibrio cholerae* in water for human consumption samples in a period of less than twenty-four hours, with low detection limits and simplified sampling. **Material and methods:** To carry out this study, test samples inoculated with *Vibrio cholerae* serotype O1 and serotype non-O1 were simulated. The detection of *Vibrio cholerae* in these samples was carried out by microbiological culture and polymerase chain reaction (PCR). **Results:** Post-filtration enrichment did not show good recoveries. However, the technique designed in the laboratory with water enrichment prior to filtration showed satisfactory recoveries with very low theoretical concentrations. The latter culture technique and PCR were able to detect *Vibrio cholerae* in less than twenty-four hours. Likewise, it was possible to reduce the detection limit of the technique by prolonging the enrichment time. **Conclusions:** A significant improvement in the detection of *Vibrio cholerae* has been achieved by obtaining result in a period of less than twenty-four hours and at concentrations below the infectious dose.

KEYWORDS: *Vibrio cholerae*, Water for human consumption, Biological weapon, Bioterrorism, Culture, PCR.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad infecciosa entérica producida por *Vibrio cholerae*⁽¹⁾, un bacilo gram negativo perteneciente a

la familia Vibrionaceae. Es un bacilo curvo, con forma de coma, anaerobio facultativo, oxidasa positivo, muy móvil debido a su flagelo polar. Su tamaño es de 1-3 micras (µm) de largo por 0,5-0,8 µm de ancho.² Habita en ambientes acuosos y prevalece en países en vías de desarrollo.^{3,4}

Existen multitud de cepas y biotipos genética y fenotípicamente diferentes, que se clasifican en más de doscientos serogrupos en función del antígeno O de lipopolisacáridos.⁵ Los serogrupos O1 y O139 son los causantes de la toxina responsable del cólera. El serogrupo O1 tiene dos biotipos, el clásico y el Tor, cada uno de los cuales comprende a su vez tres serotipos: Inaba, Ogawa y Hikojima.^{1,2}

La enfermedad del cólera se caracteriza por un cuadro brusco de diarrea acuosa profusa conocida como *heces en agua de arroz*, vómitos y entumecimiento de las piernas. La gran pér-

¹ Comandante farmacéutico. Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid (España).

² Farmacéutico. Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid (España).

³ Teniente farmacéutico. Servicio Farmacéutico de Cartagena, Cartagena (España).

⁴ Técnico superior en Laboratorio Clínico y Biomédico. Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid (España).

⁵ Coronel farmacéutico. Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid (España).

Dirección para la correspondencia: Almudena Rodríguez Aranda. Instituto de Toxicología de la Defensa. Complejo Hospitalario Gómez Ulla. Glorieta del Ejército s/n, 28047, Madrid (España).

Correo electrónico: arodar3@oc.mde.es

Recibido: 13 de junio de 2024

Aceptado: 20 de junio de 2024

dida de líquidos corporales puede producir una deshidratación severa, colapso circulatorio y *shock*, pudiendo matar a una persona en horas¹.

Un factor para tener en cuenta a la hora de estudiar el desarrollo de brotes de una enfermedad es el periodo de incubación de la misma.⁶ En la enfermedad del cólera este tiempo es corto, oscilando entre pocas horas y cinco días.^{7,8} Las enfermedades con periodos de incubación cortos experimentan picos más pronunciados de infectados en lapsos de tiempo más breves.⁶ Es por ello que la propagación del cólera durante los brotes se agrava en zonas muy pobladas.

El mecanismo de transmisión es fecal-oral y se produce cuando se ingieren altas concentraciones de *Vibrio cholerae* a través de alimentos o agua contaminados con heces.

En España, el cólera es una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) y deben declararse tanto los casos sospechosos como los confirmados.⁹

A nivel global, el impacto de esta enfermedad es desconocido. Existe una subestimación de los casos debido a que solo una pequeña fracción se notifica a la Organización Mundial de la Salud (OMS).^{4, 10}

En octubre de 2017, el Grupo de Trabajo Mundial de la OMS para el Control del Cólera (GTFCC) inició una lucha activa contra esta amenaza: *Global Cholera Epidemiology: opportunities to Reduce the Burden of Cholera by 2030*¹⁰. Este grupo de trabajo tiene como objetivo reducir las muertes por cólera en un 90 % en todo el mundo y eliminarlo en al menos veinte países para 2030. Para ello, proponen una serie de intervenciones multisectoriales específicas.

Para llevar a cabo estas propuestas es fundamental la creación de capacidad, investigación, seguimiento y evaluación, promoción y movilización de recursos, así como contar con datos fiables necesarios para la detección rápida y la confirmación de los brotes. De esta forma estos pueden contenerse y pueden realizarse intervenciones bien focalizadas.¹⁰

Desde el punto de vista del diagnóstico en el laboratorio, la búsqueda de *Vibrio cholerae* se puede llevar a cabo en el agua, que es en muchas ocasiones la fuente de contagio. Sin embargo, a veces es difícil aislar *Vibrio cholerae* O1 u O139 en estas muestras.¹¹⁻¹⁴ Algunos estudios se centraron en la búsqueda de indicadores de contaminación fecal, como los coliformes, concluyendo que, al encontrarse estos presentes, el agua potable estaba contaminada fecalmente y, por tanto, también podría haber *Vibrio cholerae* sin identificarse específicamente.¹⁵⁻²² En otro estudio se detectó la presencia de bacteriófagos específicos de cólera; indicando, por tanto, que el agua fue la responsable de tal epidemia.²³

IMPORTANCIA DE LA PREVENCIÓN DEL CÓLERA

En cuanto a la prevención del cólera, la vacunación constituye un papel fundamental. El mecanismo exacto por el que el sistema inmunitario genera protección frente al cólera no es del todo conocido.²⁴ Sin embargo, las observaciones de la infección natural por *Vibrio cholerae* han demostrado una fuerte inmunidad.²⁵ Las vacunas para el cólera son de administración por vía oral, ya que las de administración parenteral ofrecen una

protección limitada y de corta duración, no siendo eficaces contra el cólera.²⁶ Jaime Ferrán desempeñó un papel pionero al desarrollar la primera vacuna viva contra el cólera en España.²⁷ No obstante, fue la concebida por el científico alemán Wilhelm Kolle en 1896 la que, finalmente, se adoptó como modelo de vacuna contra el cólera.²⁸ De las vacunas disponibles frente al cólera, en España se comercializan Dukoral y Vaxchora.²⁹ A pesar de la importancia que las vacunas han supuesto en el control y la prevención del cólera,³⁰ las fichas técnicas de Dukoral y Vaxchora indican que no confieren protección completa. Por ello, la prevención y el control sanitario del agua son de gran importancia.

Asimismo, se dispone de estrategias para tratar el cólera como la rehidratación oral y el uso de antibióticos, así como nuevas intervenciones en desarrollo como el uso de probióticos y la terapia con fagos.³¹

Durante muchos años, las tetraciclinas y las fluoroquinolonas han sido excelentes antimicrobianos frente a las cepas causantes de cólera.³² Sin embargo, estos tratamientos han empezado a fracasar debido a la aparición de cepas resistentes.³³ Los serogrupos O1 y O139 muestran resistencia a múltiples medicamentos. El desarrollo de resistencias durante los últimos años está generando un riesgo para las estrategias de tratamiento.³⁴

El aumento de resistencias puede producir un crecimiento de la morbilidad y mortalidad entre los pacientes. Por tanto, es fundamental realizar una vigilancia continua y una monitorización de la resistencia antibiótica del cólera para dirigir el tratamiento adecuado y mejorar así.³³

La adecuada terapia antimicrobiana puede disminuir la duración de la enfermedad, la transmisión de infecciones y la contaminación del medio ambiente.³⁵

REPERCUSIÓN DE LOS CONFLICTOS ARMADOS EN LA PROPAGACIÓN DEL CÓLERA

Una situación que valorar en el impacto del cólera es la de los conflictos armados. Durante estos, se ocasionan y agravan situaciones debidas a la destrucción de infraestructuras necesarias en el servicio y saneamiento del agua. Esto favorece la aparición de brotes de enfermedades infecciosas y, particularmente, de cólera.³⁶ Ejemplo de ello es el brote masivo de esta enfermedad que se produjo en Yemen resultado de su guerra civil y que afectó a más de un millón de personas entre 2016 y 2018.³⁷

El conflicto actual en Gaza podría tener consecuencias similares ya que, según ha informado la OMS, la situación sanitaria ahí es catastrófica, habiendo colapsado los servicios de agua y saneamiento.³⁸

MISIONES INTERNACIONALES DE LAS FUERZAS ARMADAS

Las Fuerzas Armadas españolas están presentes en diecisiete misiones en el exterior con hasta tres mil militares y guardias civiles desplegados en cuatro continentes.³⁹ En virtud de su interacción con colectivos vulnerables en países endémicos, las tropas se encuentran expuestas a enfermedades para las que no han

desarrollado inmunización natural. Esta circunstancia sitúa a los militares en la categoría de grupo de riesgo.

La conciencia de esta vulnerabilidad refuerza la necesidad de adoptar medidas preventivas y protocolos de salud rigurosos para mitigar los riesgos asociados.

En este contexto, España ha asumido, entre otros, el liderazgo de la misión Coalición contra el DAESH/ISIS - OIR y eNM-I en Irak⁴⁰. Cabe destacar que, en Irak, desde 1966, el cólera se considera una enfermedad endémica que ha afectado a diversas regiones. En el año 2022 se registró un nuevo brote que afectó a varias ciudades del país.⁴¹ Según un informe de la OMS, a fecha de 24 de julio ya había 449 casos confirmados.⁴²

Es esencial reconocer la responsabilidad compartida en la protección de la salud y el bienestar, tanto del Ejército como de las comunidades con las que se interactúa. En este contexto, la implementación de estrategias efectivas de prevención, monitoreo y respuesta adecuada a posibles amenazas epidemiológicas se erige como una prioridad ineludible para salvaguardar la integridad de quienes participan en estas interacciones y para fomentar un entorno de colaboración sostenible y saludable.

ARMAS BIOLÓGICAS

Las armas de destrucción masiva son capaces de causar enfermedades infecciosas, incapacitar o provocar muertes en una elevada cantidad de personas, animales y plantas y ocasionar daños medioambientales y económicos de gran envergadura. Incluyen armas de tipo químico, nuclear y biológico.

Se define como arma biológica aquella que emplea agentes biológicos como herramienta bélica o con fines terroristas, siendo, consecuentemente, la guerra biológica aquella donde se usan agentes biológicos como arma capaz de infligir daño masivo sobre fuerzas militares y/o civiles.⁴³

Las armas de la guerra biológica, además del componente del agente causal, necesitan de un mecanismo de diseminación. El agente causal debe poseer una naturaleza patógena y elevada infectividad, facilidad de transmisión, periodos cortos de incubación, tasas de morbilidad elevadas, inexistencia o baja efectividad de vacunas y tratamientos poco efectivos o escasez de estos.

Los agentes de guerra biológica ganaron notabilidad con las dos guerras mundiales del siglo XX. Su capacidad destructiva condujo a su prohibición mediante tratados internacionales. En 1925 se estableció el Protocolo de Ginebra, que entró en vigor en 1928 y prohíbe el uso de armas biológicas, aunque no su producción y almacenamiento. Como consecuencia, algunos estados continuaron desarrollando programas de armamento biológico.⁴³

En 1972 se firmó la Convención sobre la Prohibición del Desarrollo, la Producción y el Almacenamiento de Armas Bacteriológicas y Tóxicas y sobre su destrucción (CABT). Desde su implementación, el uso de armas biológicas en conflictos ha disminuido significativamente. Sin embargo, no se ha observado la misma reducción en ataques de grupos terroristas. Los analistas de inteligencia tienen en cuenta este posible escenario debido al potencial uso criminal o terrorista de este tipo de agentes^{44,45}.

Ante este nuevo tipo de amenazas para la salud pública, surge la necesidad de actualizar el modo de vigilancia y la capacidad de responder ante ellas. A nivel nacional se han llevado a cabo diferentes estrategias para lograr este objetivo. Ejemplo de esto es la aprobación de un anteproyecto de ley por el que se crea la Agencia Estatal de Salud Pública, cuyo objetivo será la prevención, detección y respuesta rápida frente a amenazas y riesgos para la salud de la población. Asimismo, en España existe la unidad de Alertas y Emergencias en el Instituto de Salud Carlos III y el Centro Nacional de Microbiología perteneciente también a dicho instituto. Existe también la Red de Laboratorios de Alerta Biológica, RE-LAB (creada mediante Orden PRE/ 305/2009, de 10 de febrero). El objetivo de esta infraestructura de naturaleza científico-técnica consiste en proporcionar una respuesta rápida ante situaciones de emergencia debidas a incidentes con agentes biológicos.

A su vez, existe normativa y recomendaciones a seguir para el control, evaluación y vigilancia de una óptima calidad del agua en los contingentes desplegados en el exterior como la STANAG 2136 en misiones OTAN y la instrucción técnica de la Inspección General de Sanidad, por la que se regula la toma de muestras y requisitos de potabilidad del agua de consumo humano en operaciones.^{46,47}

Por todo ello y en vista de la importancia que supone para las Fuerzas Armadas una rápida identificación de *Vibrio cholerae* en las fuentes de agua potable, se planteó como objetivo principal de este estudio la búsqueda de un método de detección de la bacteria en muestras de agua en un periodo inferior a veinticuatro horas. Como objetivos secundarios se plantearon, por un lado, lograr que esta metodología tuviera límites de detección muy reducidos para poder detectar muestras de agua con escasa concentración de *Vibrio cholerae* y, por otro, que la técnica diseñada permitiera facilitar la realización de la toma de muestra con la menor cantidad de material posible.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se emplearon dos cepas comerciales de *Vibrio cholerae* adquiridos en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia: serotipo O1 CECT 512 (NCTC 7254) y serotipo noO1 CECT 655 (TK 17121).

Como control positivo de PCR se empleó ADN genómico de *Vibrio cholerae* (CECT 512).

Preparación de reactivos y medios de cultivo

La solución Ringer (BR0052 G, OXOID) se prepara según las instrucciones del fabricante disolviendo una pastilla en 500 ml de agua destilada. A continuación, se reparte en tubos de 10 ml y se esterilizan mediante autoclave.

La preparación de placas de Agar Tryptona Soja (TSA) se realiza empleando medio TSA sólido (074-BA1008, Scharlau). Para ello, en condiciones de esterilidad, se funde TSA y se reparte en placas Petri de 100 mm de diámetro.

El agua de peptona alcalina (CM1028B, OXOID) se prepara según instrucciones del fabricante.

Cultivo de cepas biológicas

Activación de las cepas y preparación de stock

Cada líofilo de *Vibrio cholerae* se resuspende en 300 µl de medio líquido estéril (solución Ringer) y la suspensión se siembra en superficie en agar TSA con un asa de Digrafsky estéril. Las placas se incuban veinticuatro horas a 36 ± 2 °C y se confirma la identidad de las colonias obtenidas utilizando un espectrómetro MALDI-TOF (*MALDI Biotyper*® Sirius, Bruker).

Para la criopreservación de las cepas, las colonias obtenidas se reparten en viales tipo *Cryoinstant* (409113/1, Deltalab) y se almacenan a -80 °C.

Cultivo de *Vibrio cholerae*

Para el trabajo de rutina con *Vibrio cholerae* se descongela un criovial de la cepa de interés y se deposita una perla sobre placa de agar TSA, extendiéndola con un asa de siembra estéril por toda la superficie de la placa. La placa se incuba durante 20 h a 36 ± 2 °C.

Preparación de las muestras de agua problema

Se preparan muestras de agua inoculadas con *Vibrio cholerae* para simular muestras problema con distinta concentración bacteriana. De cada dilución se siembran distintos volúmenes (de 100 µl a 500 µl) en placas de agar MacConkey (032227020, Bioagar), TCBS (032218020, Bioagar) y Columbia (43041, Biomerieux) para realizar recuentos iniciales. Estos recuentos se siembran por triplicado para cada volumen y la media constituye el recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en placa.

Con este valor de recuento, se calcula la concentración teórica de UFC de *Vibrio cholerae* que existe por mililitro en la solución Ringer, que es con la que se dopará el agua. De cada una de estas diluciones seriadas, se inocula 1 ml en 1 l de agua o cantidades proporcionales si es necesario mayor volumen de agua para los ensayos.

Las aguas empleadas fueron de consumo humano de la red de distribución. En cada ensayo se procesó un blanco sin inocular para verificar la ausencia de la bacteria.

Con el volumen que se introduce en el agua de la solución Ringer con *Vibrio cholerae*, se calcula la concentración teórica de esta en el agua en UFC en 100 ml.

Detección de *Vibrio cholerae* mediante cultivo microbiológico

Inicialmente, se plantean dos posibles técnicas de cultivo microbiológico.

Recuperación mediante filtración por membrana y enriquecimiento del filtro

Se realiza la filtración de distintos volúmenes de agua empleando filtros de membrana de 0,22 µm (1226157, GVS) y de 0,45 µm (MIHAWG100, Millipore).

Se filtran desde el agua problema distintos volúmenes de agua: 100 ml, 250 ml y 500 ml. Estos filtros se colocan en tubos

con agua de peptona y se incuban tres horas a 36 ± 2 °C. Después se procede a su sonicación para desprender las bacterias del filtro y se realiza una siembra directa de 100 µl, 300 µl y 500 µl en agar selectivo TCBS y agar Columbia. En las diluciones de 10^{-8} hasta 10^{-10} se siembran para los recuentos solo 500 µl. A partir de los recuentos iniciales se calcula la recuperación.

Recuperación mediante enriquecimiento y filtración por membrana

Con el fin de enriquecer el cultivo de *Vibrio cholerae* y promover su multiplicación, distintos volúmenes de agua problema se mezclan con el mismo volumen de agua de peptona y se incuban tres horas a 36 ± 2 °C. Todo el contenido se filtra a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y el filtro se deposita agar TCBS. Las placas se incuban 36 ± 2 °C durante 20 horas. A partir de los recuentos iniciales se calcula la recuperación.

Detección de *Vibrio cholerae* mediante PCR

Extracción de ADN genómico

Previo a la extracción, se realiza un enriquecimiento de 5 ml de muestra con 5 ml de agua de peptona en un tubo de 15 ml y se incuba 3 h a 36 ± 2 °C. Tras esto, los tubos se centrifugan diez minutos a 3800 rpm y el sedimento celular se resuspende en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) 1x (P4417-100TAB, Sigma Aldrich).

La extracción de ADN genómico se realiza empleando el kit comercial *MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit* (06374891001, Roche) en una estación robótica de alto rendimiento (*MagNA Pure 96*, Roche). La cantidad de ADN se cuantifica en un espectrofotómetro *NanoDrop™ One* (ThermoFisher).

Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa

Tras una revisión bibliográfica, se seleccionan dos cebadores que amplifican selectivamente una región de doscientos seis pares de bases del gen *GbpA*⁸⁰ de *Vibrio cholerae*.

Para la realización de la PCR a tiempo real se emplea la sonda marcada con *GbpA* Pr (5-FAM-AACCCAGCAGGTCAAATCATTCCAAA-BBQ). Los cebadores y las sondas son sintetizados por *Tib Molbiol*. La reacción de PCR se realiza empleando los reactivos *DNA Process Control Kit* (07339542001, Roche) en un termociclador *LightCycler 480 II* (Roche).

RESULTADOS

En primer lugar, se realizaron recuentos de las diluciones decimales en solución Ringer. Cuando las muestras se dopan solo con *Vibrio cholerae* se puede utilizar agar Columbia como medio para el recuento, ya que la bacteria crece adecuadamente. Se selecciona este como medio de referencia para recuentos posteriores.

Los recuentos realizados desde las diluciones seriadas en agar Columbia, permiten calcular la cantidad teórica de bacterias con la que se inoculan las muestras.

Los recuentos desde las soluciones Ringer en la dilución de 10^{-7} fueron detectables en tres de los diez ensayos y en la dilución 10^{-8} en uno de los diez ensayos realizados. En los ensayos de 10^{-9} y 10^{-10} no se detectó crecimiento de *Vibrio cholerae*.

Recuperación mediante filtración por membrana y enriquecimiento del filtro

Se realizaron cinco ensayos para la detección de *Vibrio cholerae* en agua.

Se filtraron alícuotas de 100, 250 y 500 ml (según la dilución empleada) de las aguas problema, con el filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ y $0,45\ \mu\text{m}$.

En la dilución 10^{-3} y empleando el filtro de $0,22\ \mu\text{m}$, con una concentración teórica en el agua superior a 300 UFC/100 ml, no se detectó crecimiento de *Vibrio cholerae* en cuatro de los cinco ensayos. Solo en uno ellos se detectó crecimiento, con 5 UFC en la placa de TCBS. Empleando el filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ se detectó crecimiento en cuatro ensayos, únicamente en los volúmenes de 500 ml (257UFC, 125UFC, 22UFC, 7UFC).

En las aguas dopadas con dilución 10^{-4} , no se detectó crecimiento en ningún ensayo. Las concentraciones teóricas calculadas desde los recuentos fueron superiores a 300 UFC/100 ml en tres ensayos y 210 y 58 UFC en 100 ml en los dos ensayos restantes.

En las diluciones posteriores no se detectó crecimiento.

Recuperación mediante enriquecimiento y filtración por membrana

Se realizaron diez ensayos. Se tomaron cantidades iguales de muestra problema y de agua de peptona por triplicado. Dos alícuotas se incubaron durante tres horas a $36 \pm 2\ ^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo, una de las alícuotas se procesó para enriquecimiento, filtración y posterior cultivo y la segunda se empleó para la detección mediante PCR.

En paralelo se realizó el mismo procedimiento con un periodo de enriquecimiento de veinticuatro horas en lugar de tres horas, logrando de esta forma recuperar *Vibrio cholerae* en las aguas inoculadas con diluciones hasta 10^{-9} .

Según las concentraciones teóricas de la bacteria en el agua problema, calculadas a partir de los recuentos, se obtuvo el dato de la recuperación cualitativa para tres horas de incubación.

En los diez ensayos realizados a partir de la dilución 10^{-4} , con volúmenes de procesamiento de 5 ml del agua problema y 5 ml de agua de peptona se detectó crecimiento en todos los ensayos. En el caso de esta dilución, no pudieron cuantificarse todos los recuentos de UFC por ser muy elevado.

En nueve de los diez ensayos se obtuvo recuperación hasta la muestra inoculada con la dilución 10^{-5} empleando volúmenes de muestra y de agua de peptona de 15 ml más 15 ml. En los ensayos que emplearon esta dilución, la concentración teórica de *Vibrio cholerae* en las aguas problema en 100 ml osciló entre 11 y 298 UFC. La muestra problema que no detectó crecimiento, correspondía con una concentración teórica de 11 UFC en 100 ml.

En las aguas procedentes de las diluciones de 10^{-6} , en tres de los diez ensayos no se recuperó *Vibrio cholerae* tras el procesamiento de las muestras problema. Las concentraciones teóricas del agua problema en estos diez ensayos oscilaron entre 0 y 29 UFC/100 ml, puesto que en uno de los recuentos en placa

no se detectó crecimiento y se atribuyó al agua problema una concentración teórica de 0 UFC/100 ml. Las concentraciones teóricas de agua problema donde tras el procesamiento no se detectó *Vibrio cholerae*, correspondían a valores de 0 UFC/100 ml, 2 UFC/100 ml y 3 UFC/100 ml de *Vibrio cholerae* en el agua problema.

En los restantes siete ensayos en los que se emplearon las diluciones de 10^{-6} , se detectó *Vibrio cholerae* en el procesamiento de las muestras cuando se emplearon volúmenes de 50 ml de agua problema y 50 ml de agua de peptona. Las concentraciones teóricas de las aguas problema fueron de 2 UFC/100 ml, 5 UFC/100 ml, 6 UFC/100 ml, 10 UFC/100 ml, 12 UFC/100 ml, 15 UFC/100 ml y 29 UFC/100 ml. En dos de ellas también se detectó crecimiento de con volúmenes de 15 ml de agua problema y 15 ml de agua de peptona.

En tres ensayos en los que se utilizaron las diluciones de 10^{-7} , los recuentos procedentes de la siembra de 500 μL desde la solución Ringer, fueron de 2 UCF en un caso y de 1 UFC en dos ensayos. Estos datos corresponderían con una concentración teórica en el agua problema de 4 UFC y 2 UFC en un litro respectivamente. Tras el procesamiento de estas aguas, en ninguno de los diez ensayos se detectó *Vibrio cholerae*. De los ensayos realizados a partir de las diluciones de 10^{-8} del agua problema, ninguno de ellos detectó crecimiento de *Vibrio cholerae*. Los volúmenes de agua problema más agua de peptona procesados en esta dilución fueron en ml de 50 + 50, 250 + 250 y 500 + 500. El valor obtenido a partir de los recuentos de 500 μL desde la solución Ringer, fue en uno de los ensayos de 1 UFC.

En los ensayos realizados a partir de las diluciones de 10^{-9} y 10^{-10} no se obtuvieron ni recuentos en placa desde la solución Ringer ni se detectó *Vibrio cholerae* tras el procesamiento de la muestra.

Detección selectiva de *Vibrio cholerae* mediante qPCR

Con el objetivo de mejorar los tiempos de respuesta para un positivo por cólera se exploró la técnica de PCR como herramienta complementaria al cultivo microbiológico.

En primer lugar, se comprobó que los cebadores seleccionados en base a la bibliografía para la detección de la bacteria funcionaban correctamente y eran específicos para los serogrupos O1 y no

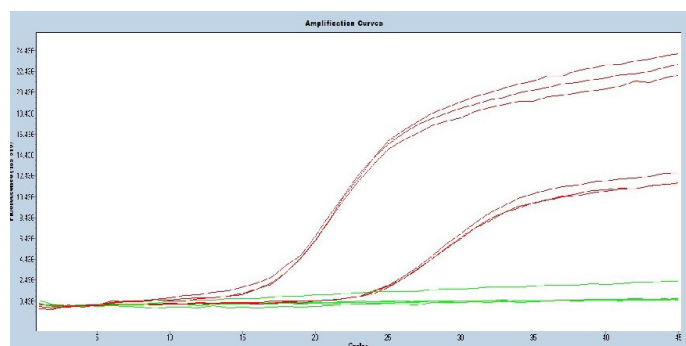


Figura 1. Curvas de amplificación mediante PCR de ADN de *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, vacuna *Vaxchora*. Como control negativo se utilizó agua. En verde se representa tanto el control negativo como el *Vibrio vulnificus*. Las curvas en rojo corresponden a *Vibrio cholerae* y a la vacuna

O1. Para ello, se realizó una PCR empleando ADN genómico de *Vibrio cholerae* como control positivo, ADN de *Vibrio vulnificus* y ADN extraído de la vacuna comercial Vaxchora.

Como se puede observar en la figura 1, mediante PCR a tiempo real se pudo detectar tanto *Vibrio cholerae*, con un Cp de 24, como ADN extraído de la vacuna, con un Cp de 18. No se observó amplificación de *Vibrio vulnificus*.

A continuación, se realizaron análisis mediante PCR de las muestras problema inoculadas *Vibrio cholerae* y enriquecidas con agua de peptona, tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos.

Se detectó *Vibrio cholerae* hasta la dilución 10^{-10} , con un Cp de 36 (figura 2). Los valores de Cp por encima de 40 se consideraron negativos.

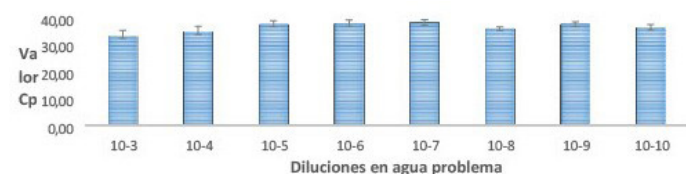


Figura 2. Análisis mediante qPCR de la amplificación de *Vibrio cholerae*. Representación de los valores de Cp obtenidos en muestras problema inoculadas con diluciones decrecientes de *Vibrio cholerae* desde 10^{-3} hasta 10^{-9} . Los valores representan la media de, al menos, cuatro réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar

Paralelamente se realizó una PCR empleando las muestras que habían sido enriquecidas con agua de peptona e incubadas tanto a tres horas como veinticuatro horas. En la figura 3 se pueden observar las curvas de amplificación. Aproximadamente en el ciclo 13 amplifican las muestras más concentradas, que habían sido incubadas durante veinticuatro horas. El control positivo amplifica sobre el ciclo 24 y el resto de las muestras entre 34 y 37 ciclos, en función de la concentración y las horas de incubación.

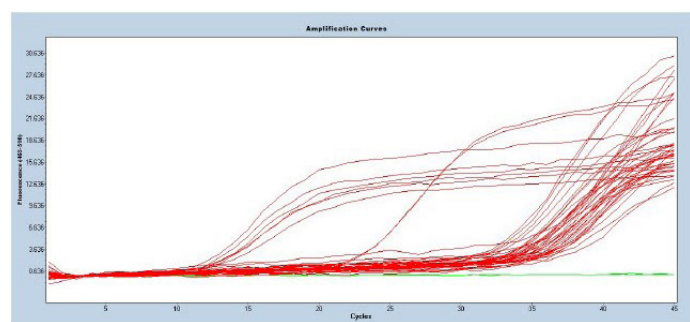


Figura 3. Curvas de amplificación mediante PCR de distintas muestras de agua dopada con concentraciones decrecientes de *Vibrio cholerae*. En verde se representa el control negativo (agua) y en rojo tanto las muestras como el control positivo

Detección de *Vibrio cholerae* en distintas condiciones de almacenamiento

La PCR presenta la ventaja fundamental sobre el cultivo tradicional de permitir la detección de especies en estado VBNC.

En este sentido, se plantearon una serie de experimentos que abarcaban diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento de las muestras. El objetivo primordial fue la evaluación de la capacidad del laboratorio para detectar *Vibrio cholerae* en distintas condiciones de almacenamiento de muestras.

Las muestras de agua se inocularon con concentraciones bacterianas de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y se almacenaron en nevera a 4 °C durante dos, cuatro, siete y ocho semanas. Transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de cada agua y se mezcló con la misma cantidad de agua de peptona y se dejó incubar durante tres horas a 36 ± 2 °C. Los resultados obtenidos mediante análisis de PCR se representan en la figura 4.

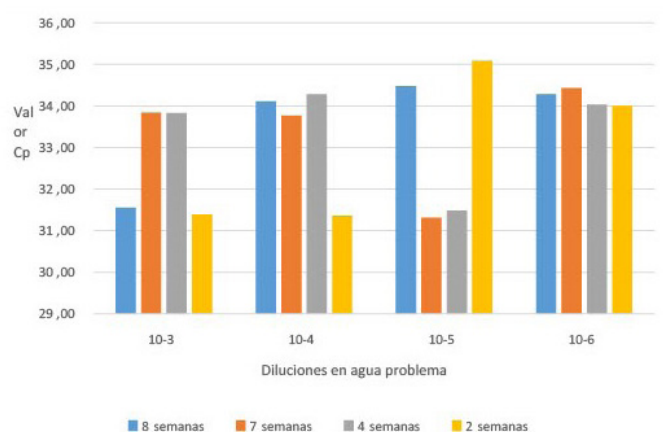


Figura 4. Análisis mediante qPCR de la amplificación de *Vibrio cholerae* en distintas condiciones de almacenamiento. Representación de los valores de Cp obtenidos en muestras problema inoculadas con diluciones decrecientes de *Vibrio cholerae* desde 10^{-3} hasta 10^{-6}

DISCUSIÓN

El cólera sigue siendo endémico en, al menos, 47 países del mundo.⁴⁸ Esta dolencia es una de las que causa mayor mortalidad por enfermedad gastrointestinal, adquirida tras la ingestión de agua y alimentos contaminados en muchas áreas de Asia, África y Sudamérica.^{1,2}

Por otra parte, en 1999 los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) categorizaron los agentes biológicos que podrían ser liberados deliberadamente bajo tres denominaciones: A, B y C.⁴⁹ El potencial letal y/o incapacitante inherente a ciertas enfermedades infecciosas ha sido objeto de explotación en el ámbito militar, donde se han desarrollado estrategias para utilizar patógenos o toxinas como armas biológicas.⁵⁰

El concepto de bioterrorismo se define como la liberación intencionada de virus, bacterias, toxinas u otros agentes biológicos con el propósito de inducir enfermedades o causar la muerte en seres humanos, animales o plantas.⁵¹

La conjunción de estos factores subraya la necesidad imperante de adoptar medidas eficaces para salvaguardar la seguridad sanitaria y nacional y subrayar la importancia de la cooperación internacional en la prevención y mitigación de posibles amenazas derivadas del uso indebido de agentes biológicos.⁵²

Vibrio cholerae pertenece a la categoría B, que incluye agentes moderadamente fáciles de difundir, con una morbilidad moderada y tasas de mortalidad bajas pero que requieren mejorar la capacidad central de diagnóstico y vigilancia de las enfermedades.⁵³

Las Fuerzas Armadas españolas han estado y están involucradas en numerosas misiones internacionales. Durante 2024 se participará en diecisiete misiones en el exterior, con una media de tres mil militares desplegados en cuatro continentes, incluida la continuidad en el mando de UNIFIL Líbano, EUTM Mali, EUNAVFOR Atalanta y NMI en Irak. En el Líbano, bajo mandato de la ONU, militares españoles forman parte de esta misión, en la que lideran el sector este. Además, también se participa en la misión de la ONU en Colombia. En el marco de la OTAN, en el despliegue actual dentro del territorio Euro-Atlántico corresponderá a España el liderazgo del *battlegroup* de la operación Efp-Eslovaquia, suponiendo el incremento de hasta mil setecientos militares. A estos despliegues hay que añadir la contribución a las fuerzas navales permanentes de la OTAN (SNMG y SNMCMG), los dispositivos de policía y vigilancia aérea (EapRumania) y el apoyo a la defensa antiaérea en los países bálticos (BAP) y en A/T-Turquía.³⁹

España está presente en todas las misiones militares que la Unión Europea desarrolla en África, con despliegues en Mali, República Centroafricana, Somalia y Senegal, así como en la operación Atalanta.⁵⁴

Por todo ello, se debe tener en cuenta el posible uso intencionado del cólera como arma biológica para disminuir la capacidad de combate de las fuerzas situadas en zona de operaciones, así como en territorio nacional para colapsar el sistema sanitario y desestabilizar políticamente el país.

El Instituto de Toxicología de la Defensa (ITOXDEF), creado por la Orden Ministerial 28/2011 de 2 de junio de 2011, es el órgano técnico superior en el ámbito toxicológico dentro de las Fuerzas Armadas. Como laboratorio de referencia de agua, asume las competencias y responsabilidades que se indican en la Instrucción Técnica de Aguas de Consumo y asume la determinación de los parámetros incluidos en el RD 03/2023 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua, en los análisis de aguas de las unidades, centros y organismos (UCO) de las Fuerzas Armadas.

Si se produjera una contaminación intencionada del agua usando *Vibrio cholerae* como agente causal u otro agente biológico, no incluido en los parámetros microbiológicos que deben analizarse actualmente según la legislación vigente, podría no ser detectado por los procedimientos rutinarios que marca la normativa. Para poder detectar *Vibrio cholerae* tanto en agua como en muestras clínicas, es necesario realizar una búsqueda dirigida con las técnicas y medios específicos para este fin.

En algunos de los estudios publicados, la detección de *Vibrio cholerae* en agua se suele realizar mediante cultivo microbiológico y posterior confirmación mediante técnicas especializadas, como la PCR. La obtención de un resultado fiable puede demorarse hasta más de 48 horas, debido al tiempo necesario para el procesamiento de la muestra y su posterior cultivo. En determinados escenarios el tiempo de respuesta del laboratorio de microbiología es crucial para evitar posibles brotes de cólera.^{55,56}

Para el control analítico de las aguas de consumo humano en las Fuerzas Armadas, las UCO's envían a los laboratorios correspondientes muestras desde territorio nacional, así como desde el exterior en zona de operaciones. El transporte de estas muestras desde zonas alejadas conlleva una demora desde unas horas hasta varios días, dependiendo de la distancia y la logística desde el punto de origen, hasta la llegada al laboratorio en territorio nacional.

La demora en el transporte y su llegada al laboratorio para cualquier análisis microbiológico es un problema para la confiabilidad de los resultados microbiológicos. Sin embargo, algunos estudios han descrito que un retraso en condiciones favorables para *Vibrio cholerae* puede aumentar la recuperación de la bacteria.⁵⁶ Ese inevitable lapso de tiempo empleado en el transporte, desde zonas incluso a miles de kilómetros, se ha intentado aprovechar en este estudio para favorecer el crecimiento de *Vibrio cholerae* y su recuperación. De esta forma, el propio tiempo de transporte forma parte del tiempo de análisis, antes de su recepción en el laboratorio. Este hecho ha sido descrito y evidenciado por otros estudios.⁵⁷

Por todo lo descrito, es necesario disponer de un método de detección para identificar el origen de la contaminación, ya sea natural o intencionada. Además, si se diseña la técnica de tal manera que se pueda procesar la muestra y obtener información mediante la realización de PCR y cultivo, se produce una sinergia y una potenciación en las herramientas necesarias para abordar el problema.

Las técnicas llevadas a cabo en el laboratorio de microbiología mediante cultivo fueron dos. Se trató de verificar si alguna de ellas obtenía resultados satisfactorios de recuperación, además de complementarse con la PCR. Son estudios preliminares encaminados a obtener información que ayude a diseñar un método con el que lograr los objetivos propuestos e identificar la posible presencia de *Vibrio cholerae* en agua potable, en un periodo no superior a veinticuatro horas desde que se recibe la muestra y en bajas concentraciones.

En los ensayos de cultivo, como medio selectivo y diferencial para *Vibrio cholerae* se empleó agar TCBS. Su eficacia radica en la capacidad para inhibir el desarrollo de otras bacterias, permitiendo así la proliferación de las especies de *Vibrio* presentes en la muestra.⁵⁵

Una de las técnicas de cultivo empleadas pretende recuperar *Vibrio cholerae* mediante una filtración por membrana de distintos volúmenes y enriquecimiento posterior del filtro. Mediante la filtración se pretende concentrar el mayor número de bacterias posible, y, a través del enriquecimiento en agua de peptona, multiplicarlas para así poder aumentar la posibilidad de recuperación en la posterior siembra en placa de TCBS. Esta técnica no obtuvo recuperaciones satisfactorias, puesto que en concentraciones teóricas de más de 300 UCF/100 ml y filtrando volúmenes de 500 ml donde las concentraciones teóricas de *Vibrio cholerae* serían superiores a 1500 UCF, no se detectó en cuatro de cinco ensayos. El filtro de 0,45 µm recuperó mejor que el de 0,22 µm, pero ninguno de los dos obtuvo recuperaciones satisfactorias según los objetivos planteados.

La segunda técnica de cultivo diseñada introduce una ventaja que puede utilizarse incluso antes de su llegada al laboratorio. La posible mejora en la recuperación de *Vibrio cholerae*

en las muestras de aguas residió en diseñar un paso previo de enriquecimiento que se puede realizar durante el transporte de la muestra de agua o en su recepción en el laboratorio y así obtener el resultado en menos de veinticuatro horas.

Este enriquecimiento precede a la filtración del agua para intentar incrementar los valores de recuperación. Con esta técnica, en las aguas inoculadas con una dilución de 10^{-6} , se consiguió detectar *Vibrio cholerae* en siete de los diez ensayos realizados. En estos siete ensayos donde se recuperó *Vibrio cholerae*, la concentración teórica en el agua problema osciló entre 2 UFC/100 ml y 29 UFC/100 ml.

A su vez, no solo usando volúmenes mayores de la alícuota se mejora el límite de detección. El tiempo de incubación es un factor determinante. En general, se repite un patrón de recuperación de tres diluciones superior, es decir, diluciones en las que no se detectó crecimiento con pretratamientos de tres horas, sí hubo crecimiento pasadas veinticuatro horas de pretratamiento. Con este aumento en las horas de incubación, se incrementa el tiempo de respuesta en la detección de *Vibrio cholerae* por encima de las veinticuatro horas, pero al mejorar los límites de detección, puede ser usada complementariamente en casos en los que se sospeche de bajos niveles de contaminación.

Este breve tiempo de respuesta por parte del laboratorio en el análisis de agua es un factor determinante ante un posible brote de cólera. Además del reducido tiempo de identificación de *Vibrio cholerae* en las muestras de agua, la técnica que implementa el pretratamiento en tres horas posibilita límites de detección muy inferiores a la dosis infectiva necesaria para producir enfermedad en humanos.⁵⁸

La PCR emerge como una alternativa más fiable, ofreciendo resultados precisos de manera inmediata sin la necesidad de esperar los resultados del cultivo. No solo acelera el proceso de detección, sino que también mejora la fiabilidad de los resultados, resaltando así la eficacia y eficiencia de esta metodología avanzada.

Teniendo esto en cuenta, se propuso como método de detección complementario al cultivo microbiológico la PCR. Tras el pretratamiento y enriquecimiento de las muestras desarrollado anteriormente, se extrajo ADN genómico y se realizó la técnica de la PCR, empleando cebadores que amplificaban selectivamente especies de *Vibrio cholerae*. Ante los datos obtenidos, todo parece indicar que la técnica diseñada consta de una gran versatilidad, ya que se puede adaptar con facilidad ante las diferentes circunstancias y objetivos de análisis, pudiendo así emplear diferentes tiempos de pretratamiento y volúmenes de alícuotas. Además, al combinar la técnica de cultivo y PCR se evitan los posibles falsos positivos e interferentes en aguas muy contaminadas por otros microorganismos.

Vibrio cholerae es capaz de sobrevivir en condiciones ambientales que le son desfavorables, entrando en estado viable pero no cultivable (VBNC).⁵⁹ Este estado supone un desafío para los laboratorios de análisis de agua y alimentos, que podrían no ser capaces de detectarla por métodos convencionales de cultivo. No obstante, mediante PCR es posible identificar bacterias en el estado VBNC, lo que supone una ventaja más a la hora de su implementación en el análisis de estas muestras. En vista de los resultados obtenidos se podría concluir que, mediante PCR, se detecta hasta una dilución 10^{-10} desde el inóculo inicial preparado, con un límite de detección muy inferior al logrado mediante la técnica de cultivo.

Por último, otra de las vías de estudio iniciadas en el laboratorio de microbiología, trató de identificar la presencia de *Vibrio cholerae* en muestras almacenadas durante distintos periodos de almacenamiento desde su inoculación. Los resultados indican que, sometiendo a las muestras a distintos periodos de almacenamiento, se detecta la presencia de *Vibrio cholerae* mediante PCR incluso tras dos meses en refrigeración. Los Cp obtenidos se encontraron entre 31 y 35. Cabe señalar que la técnica de PCR puede detectar bacterias viables y no viables y que se necesitan más ensayos para evaluar esta línea de estudio.

En el ITOXDEF se ha diseñado una técnica de cultivo que tiene en cuenta las dificultades a las que están sometidas las tropas y UCO,s de las Fuerzas Armadas y aprovecha la dificultad que supone el tiempo de transporte para multiplicar y mejorar su recuperación, posibilitando así la detección de *Vibrio cholerae* en aguas de consumo humano con bajas concentraciones de este posible agente de guerra biológico. En futuros estudios se pretende verificar con mayor número de ensayos la validez de la técnica que emplea el enriquecimiento y posterior filtración, que es la que reflejó recuperaciones satisfactorias, así como utilizar aguas con mayor contaminación para evaluar los posibles interferentes en el cultivo y PCR.

CONCLUSIÓN

La amenaza de uso de armas biológicas por parte de los Estados en conflictos bélicos, grupos terroristas o grupos aislados es real y preocupa a las autoridades de los diferentes países. *Vibrio cholerae* toxigénico está catalogado como agente de bioterrorismo de categoría B y podría emplearse con fines terroristas mediante la contaminación del agua de consumo, con la finalidad de causar bajas militares y civiles tanto en territorio nacional como en misiones internacionales.

En el laboratorio, se ha diseñado una metodología con el objetivo de detectar e identificar *Vibrio cholerae* en aguas de consumo en un periodo de tiempo no superior a veinticuatro horas y en concentraciones incluso inferiores a la dosis infectiva. Todo ello facilitaría la detección temprana y el establecimiento precoz de medidas adecuadas en territorio nacional o zona de operaciones ante un posible brote de cólera.

Lo anteriormente descrito representa una mejora estratégica en relación con las metodologías de detección de *Vibrio cholerae* publicadas. Por un lado, se ha optimizado la detección de este microorganismo y, por otro, ha supuesto una mejora significativa en los tiempos de obtención de resultados en el análisis, con la muy probable mitigación de la morbimortalidad asociada al cólera.

Desde el ITOXDEF muestran su compromiso para continuar perfeccionando y creando nuevas metodologías para garantizar un servicio eficaz y satisfactorio a nuestras Fuerzas Armadas en el desarrollo de sus cometidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Informe epidemiológico sobre la situación del Cólera en España. Año 2022. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.
2. Pathogen Safety Data Sheets and Risk Assessment. *Vibrio cholerae*. Año 2010. Public Health Agency of Canada.

3. Montero DA, Vidal RM, Velasco J, George S, Lucero Y, Gómez LA, Carreño LJ, García-Betancourt R, O'Ryan M. *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. *Front Med (Lausanne)*. 2023 May 5;10:1155751.
4. Fanous M, King KC. *Cholera*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
5. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsushima A, Asai Y, et al. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology*. 1994 Mar;28(3):175–8.
6. Kahn R, Peak CM, Fernández-Gracia J, Hill A, Jambai A, Ganda L, et al. Incubation periods impact the spatial predictability of cholera and Ebola outbreaks in Sierra Leone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Feb 13;117(9):5067–73.
7. Cólera – Situación mundial [Internet]. [www.who.int. Available from: https://www.who.int/es/emergencias/disease-outbreak-news/item/2023-DON437](https://www.who.int/es/emergencias/disease-outbreak-news/item/2023-DON437)
8. Azman AS, Rudolph KE, Cummings DAT, Lessler J. The incubation period of cholera: a systematic review. *The Journal of infection*. 2013;66(5):432–8
9. RED DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA COMUNIDAD DE MADRID Enfermedades de Declaración Obligatoria PROTOCOLO DE VIGILANCIA DE CÓLERA [Internet]. 2023 [cited 2024 Jan 19]. Available from: https://www.comunidad.madrid/sites/default/files/doc/sanidad/epid/protocolo_de_vigilancia_de_cólera_cm_2023.pdf
10. Legros D. Global Cholera Epidemiology: Opportunities to Reduce the Burden of Cholera by 2030. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018 Sep 1;218(suppl_3):S137–40.
11. Goswami S, Jha A, Sivan S, Dambhare D, Gupta S. Outbreak investigation of cholera outbreak in a slum area of urban Wardha, India: An interventional epidemiological study. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2019;8(3):1112.
12. Gopalkrishna V, Joshi M, Viswanathan R, Malu G, Ganorkar N, Chavan N, et al. Cholera outbreak in Aurangabad, Maharashtra, western India. *Indian J Med Res*. 2019;150(6):640–3.
13. Pal BB, Khuntia HK, Nayak SR, Mohanty A, Biswal B. *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Strains Carrying the ctxB7 Allele Caused a Large Cholera Outbreak during 2014 in the Tribal Areas of Odisha, India. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2017;70(5):549–53.
14. Dey S, Parande MV, Parande AM, Lakkannavar SL, Rathore PK, Mantur BG, et al. Twin outbreak of cholera in rural North Karnataka, India. *Indian J Med Res*. 2014;140(3):420–6.
15. Dutta, B.P.; Kumar, N.; Meshram, K.; Yadav, R.; Sodha, S.V.; Gupta, S. Cholera outbreak associated with contaminated water sources in paddy fields, Mandla District, Madhya Pradesh, India. *Indian J. Public Health* 2021, 65, 46–50
16. Singh, A.; Gupta, R.; Dikid, T.; Saroha, E.; Sharma, N.C.; Sagar, S.; Gupta, S.; Bindra, S.; Khasnobis, P.; Jain, S.K.; et al. Cholera outbreak investigation, Bhadola, Delhi, India, April–May 2018. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2020, 114, 762–769.
17. Goswami, S.; Jha, A.; Sivan, S.P.; Dambhare, D.; Gupta, S.S. Outbreak investigation of cholera outbreak in a slum area of urban Wardha, India: An interventional epidemiological study. *J. Fam. Med. Prim. Care* 2019, 8, 1112–1116
18. Bhattacharya, D.; Dey, S.; Roy, S.; Parande, M.V.; Telsang, M.; Seema, M.H.; Parande, A.V.; Mantur, B.G. Multidrug-Resistant *Vibrio cholerae* O1 was Responsible for a Cholera Outbreak in 2013 in Bagalkot, North Karnataka. *Jpn. J. Infect. Dis* 2015, 68, 347–350.
19. Allam, R.R.; Uthappa, C.K.; Nalini, C.; Udaragudi, P.R.; Tadi, G.P.; Murhekar, M.V. An Outbreak of Cholera due to Contaminated Water, Medak District, Andhra Pradesh, India, 2013. *Indian J. Community Med*. 2015, 40, 283–285.
20. Biswas, D.K.; Bhunia, R.; Maji, D.; Das, P. Contaminated pond water favors cholera outbreak at haibatpur village, purba medinipur district, west bengal, India. *J. Trop. Med*. 2014, 2014, 764530.
21. Dey, S.; Parande, M.V.; Parande, A.M.; Lakkannavar, S.L.; Rathore, P.K.; Mantur, B.G.; Kholkute, S.D.; Roy, S. Twin outbreak of cholera in rural North Karnataka, India. *Indian J. Med. Res*. 2014, 140, 420–426.
22. Kumar, P.; Mishra, D.K.; Deshmukh, D.G.; Jain, M.; Zade, A.M.; Ingole, K.V.; Goel, A.K.; Yadava, P.K. *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor strains with the ctxB7 allele driving cholera outbreaks in southwestern India in 2012. *Infect. Genet. Evol*. 2014, 25, 93–96.
23. Sur D, Sarkar BL, Manna B, Deen J, Datta S, Niyogi SK, et al. Epidemiological, microbiological & electron microscopic study of a cholera outbreak in a Kolkata slum community. *Indian J Med Res*. 2006;123(1):31–6.
24. Sit B, Bolutife Fakoya, Waldor MK. Emerging Concepts in Cholera Vaccine Design. *Annual Review of Microbiology*. 2022 Sep 8;76(1):681–702.
25. Montero DA, Vidal RM, Velasco J, George S, Lucero Y, Gómez LA, et al. *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. *Frontiers in Medicine*. 2023 Jan 1;10:1155751–1.
26. Shaikh H, Lynch J, Kim J, Excler JL. Current and future cholera vaccines. *Vaccine*. 2020 Feb 29;38:A118–26.
27. Henry James Parish. *A History of Immunization*. Edinburgh : E. & S. Livingstone; 1965.
28. Hajj Hussein I, Chams N, Chams S, El Sayegh S, Badran R, Raad M, et al. Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health. *Frontiers in Public Health*. 2015 Nov 26;3.
29. Asociación Española de Pediatría. Comité Asesor de Vacunas. Manual de inmunizaciones en línea de la AEP. [Internet] [cited 2024 Jan 19]. Available from 20. Cólera | Comité Asesor de Vacunas de la AEP (vacunasaep.org)
30. Sinclair D, Abba K, Zaman K, Qadri F, Graves PM. Oral vaccines for preventing cholera. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011 Mar 16.
31. Hsueh BY, Waters CM. Combating cholera. *F1000Res*. 2019;8:589.
32. Yuan X, Li Y, Vaziri AZ, Kaviar VH, Jin Y, Jin Y, et al. Global status of antimicrobial resistance among environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1/O139: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2022 Apr 25;11(1).
33. Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020;38(Suppl 1):A83–92.
34. Verma J, Bag S, Saha B, Kumar P, Ghosh TS, Dayal M, et al. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(13):6226–31.
35. Yousefi A, Vaez H, Sahebkar A, Khademi F. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of antibiotic resistance of *Vibrio cholerae* in Iran. *Ann Ig*. 2019 May-Jun;31(3):279–290.
36. UNICEF. Cólera: un llamamiento mundial a la acción. [Internet] [cited 2024 Jan 19]. Available from [Cholera: A global call to action.pdf \(unicef.org\)](https://www.unicef.org/press-releases/2013/06/2013-06-20-01)
37. Ottolini M, Cirks B, Madden KB, Rajnik M. Pediatric Infectious Diseases Encountered During Wartime Part 1: Experiences and Lessons Learned From Armed Conflict in the Modern Era. *Curr Infect Dis Rep*. 2021;23(12):27
38. OMS. Conflicto en Israel y el territorio palestino ocupado. [Internet] [cited 2024 Jan 19]. Available from [Conflicto en Israel y el territorio palestino ocupado \(who.int\)](https://www.who.int/es/emergencias/situaciones/conflicto-en-israel-y-el-territorio-palestino-ocupado)
39. Ministerio de Defensa. Misiones en el exterior. [Internet] [cited 2024 Jan 18]. Available from [Misiones en el exterior - Ministerio de Defensa de España](https://www.mdefensa.es/)
40. La Moncloa. Referencia del Consejo de Ministros. (27.12.2023) [Internet] Available from [La Moncloa. 27/12/2023. Referencia del Consejo de Ministros \[Consejo de Ministros/Referencias\]](https://www.lamoncloa.gob.es/)
41. Sabir DK, Hama ZT, Salih KJ, Khidhir KG. A Molecular and Epidemiological Study of Cholera Outbreak in Sulaymaniyah Province, Iraq, in 2022. *Pol J Microbiol*. 2023 Mar 24;72(1):39–46.
42. WHO. Situation report Iraq [Internet] United Nations Iraq; 2022. [Internet] [cited 2024 Jan 17]. Available from <https://iraq.un.org/en/192647-who-situation-report-iraq>.
43. López-Muñoz F, Salas-Moreno P, Montero-Sánchez M, De-la-Puente-Mora-Figueroa I, Suárez-Muñoz A, García-Crespin J, et al. Amenazas biológicas intencionadas: implicaciones para la Seguridad Nacional. *Sanidad Militar*. 2021 Apr;77(2):98–105.
44. Cique Moya, A. Superbacterias y seguridad internacional. *bie3: Boletín IEEE*, 2016; (4), 371–388.
45. Ariñez Fernández, M. D. C. Inteligencia y medidas de preparación y respuesta ante el empleo intencionado de agentes biológicos. *Cuadernos de estrategia*, 2022, (217), 163–185.
46. Real Decreto 3/2023. 2023. Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. *Boletín Oficial del Estado*.
47. Minimum standards of water potability during field operations - AME-DP-18. (No enabled versions). Washington DC, United States: United States Department of Defense. (2022). Retrieved from: [Standards Central https://publishers.standardstech.com/content/military-dod-stanag-2136](https://publishers.standardstech.com/content/military-dod-stanag-2136). Accessed: 2024-02-07

48. Baličević SA, Elimian KO, King C, Diaconu K, Akande OW, Ihekweazu V, Trolle H, Gaudenzi G, Forsberg B, Alfvén T. Influences of community engagement and health system strengthening for cholera control in cholera reporting countries. *BMJ Glob Health*. 2023 Dec 6;8(12):e013788.
49. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 2000; 49(RR-4), 1–14.
50. Biselli R, Nisini R, Lista F, Autore A, Lastilla M, De Lorenzo G, et al. A historical review of military medical strategies for fighting infectious diseases: From battlefields to global health. *Biomedicines*. 2022;10(8):2050.
51. Jansen HJ, Breeveld FJ, Stijns C, Grobusch MP. Biological warfare, bioterrorism, and biocrime. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(6):488–96.
52. Evans J. Pandemics and National Security. *Global Security Studies*, Spring 2010, Volume 1, Issue 1.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Emergency Preparedness and Response. Bioterrorism Agents/Diseases. [cited 2024 Jan 22]. Available from <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlistcategory.asp>
54. Ministerio de Defensa. Operaciones en el exterior. [Internet] [cited 2024 Jan 18]. Available from Operaciones en el exterior - EMAD (defensa.gob.es)
55. Islam MT, Nasreen T, Kirchberger PC, Liang KYH, Orata FD, Johura F-T, et al. Population Analysis of *Vibrio cholerae* in Aquatic Reservoirs Reveals a Novel Sister Species (*Vibrio paracholerae* sp. nov.) with a History of Association with Humans. *Appl Environ Microbiol*. 2021;87(17).
56. Baron S, Chevalier S, Lesne J. *Vibrio cholerae* in the environment: a simple method for reliable identification of the species. *J Health Popul Nutr*. 2007 Sep;25(3):312–8.
57. Alam M, Sadique A, Nur-A-Hasan, Bhuiyan NA, Nair GB, Siddique AK, et al. Effect of transport at ambient temperature on detection and isolation of *Vibrio cholerae* from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):2185–90.
58. Ferri, E. F. R., Navarro, A. B., Sáez, A. C., Rodríguez, L. J. D., & Carballeira, A. O. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección fronterizos, a productos pesqueros importados. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, (2010). 12, 9-35.
59. Debnath A, Mizuno T, Miyoshi S. Comparative proteomic analysis to characterize temperature-induced viable but non-culturable and resuscitation states in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 2019 Jul 1;165(7):737–4