

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL " PEDRO KOURÍ"

## *Vibrio cholerae* No-01 toxigénico

Lic. Laura Bravo,<sup>1</sup> Dra. Margarita Ramírez,<sup>2</sup> Dr. Jorge Luis Maestre,<sup>3</sup> Dra. Alina Llop,<sup>4</sup> Lic Roberto Cabrera,<sup>5</sup> Lic. Belkis García,<sup>6</sup> Téc. Anabel Fernández<sup>7</sup> y Téc. Nelsideismy Castañeda<sup>8</sup>

### RESUMEN

Se investigó la susceptibilidad antimicrobiana y la presencia de toxina termoestable en 100 cepas de *Vibrio cholerae* No-01 remitidas de 7 diferentes centros de salud del país al Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Se demostró la presencia de 20 % *Vibrio cholerae* No-01 toxigénico, esta cifra resultó considerablemente más alta que la reportada en otras áreas geográficas, excepto en zonas epidémicas. Este resultado permitirá establecer una *alerta epidemiológica* en Cuba, pues estas cepas pueden ser infectadas por el fago CTX (elemento que transporta los genes que codifican para la toxina colérica); lo que les conferirá un potencial epidémico similar al del agente etiológico del cólera. Las cepas identificadas podrían estudiarse como posibles candidatas a la vacuna del cólera.

**Descriptor DeCS:** VIBRIO CHOLERAЕ/aislamiento y purificación; TOXINA DEL COLERA/aislamiento y purificación.

*Vibrio cholerae* se diferencia de otros *Vibrios* por su antígeno somático 0 (lipopolisacárido termoestable). Las cepas que aglutinan con el antisuero polivalente de *Vibrio cholerae* son identificadas como *Vibrio cholerae* 01, cepa epidémica responsable de la enfermedad del cólera. Las que no aglutinan son clasificadas como *Vibrio cholerae* No-01, y durante algunos años se les cuestionó su potencial patogénico.<sup>1</sup>

Algunas cepas de *Vibrio cholerae* No-01 producen una enterotoxina termoestable de 17 aminoácidos (conocida como NAG-ST), muy parecida a la enterotoxina de *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*.<sup>2</sup>

La forma clínica más común producida por este microorganismo es la gastroenteritis, cuyo espectro clínico es muy parecido al del cólera: diarrea líquida, deshidratación, dolores abdominales y disentería.

A esta especie le son atribuibles infecciones extraintestinales como son: infecciones de heridas, infecciones biliares y renales, otitis, así como septicemia primaria y secundaria.<sup>3</sup>

En 1990 Morris y otros demostraron que cepas de *Vibrio cholerae* No-01 productoras de NAG-ST, al ser inoculadas por vía oral a concentraciones de 10<sup>6</sup> ufc en voluntarios humanos, producían diarreas de hasta 5 L diarios.<sup>4</sup>

Está claro que existen diferencias de persona a persona en cuanto a la gravedad de las enfermedades diarreicas producidas por *Vibrio cholerae* NO-01. Esta hipótesis corresponde a las diferencias de susceptibilidad a la infección o enfermedad con este microorganismo. Sin embargo, el rango de ataque en epidemias de países como Australia excedió a 60 %, lo que sugiere que aun una cepa de simple virulencia, con altas dosis de inoculación

<sup>1</sup> Licenciada en Ciencias Biológicas. Investigadora Auxiliar.

<sup>2</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Agregada.

<sup>3</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

<sup>4</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Profesora Titular.

<sup>5</sup> Licenciado en Microbiología.

<sup>6</sup> Licenciada en Farmacia Industrial.

<sup>7</sup> Técnica en Farmacia Industrial.

<sup>8</sup> Técnico en Procesos Biológicos.

es capaz de causar un elevado nivel o rango de enfermedad en personas sanas.<sup>5</sup>

La circulación en Cuba de cepas de *Vibrio cholerae* No-01 toxigénicas es desconocida por lo que se propuso el presente estudio.

## MÉTODOS

Durante los años 1990 hasta 1996 se recibieron en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) un total de 385 cepas de *Vibrio cholerae* No-01 aisladas de heces de niños menores de 5 años con EDA y procedentes de 7 diferentes centros provinciales de Higiene y Epidemiología (Guantánamo, Las Tunas, Camagüey, Santiago de Cuba, Ciudad de La Habana, Holguín y Granma) del país, de las cuales se escogieron 100 cepas al azar para la presente investigación.

Todas las cepas fueron serotipadas y biotipadas según el método de *Sakazaki* y otros.<sup>6</sup> Ellos incluyeron reacción positiva para la oxidasa, crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl (0, 3, 6, 7 y 10 %) en caldo triptona, caldo base para la utilización de glucosa, sacarosa, manosa, manitol, inositol, estudio de movilidad, producción de indol, así como la lisina y ornitina descarboxilasa, arginina dehidrolasa y detección de sulfuro de hidrógeno en agar hierro y 2 azúcares de *kligler*.

A todas las cepas se les investigó la actividad hemolítica por medio de eritrocitos de carnero, la susceptibilidad a polimixina B y la aglutinación con el antisuero polivalente de *Vibrio cholerae* 01, así como con los monovalentes *Ogawa* e *Inaba*.<sup>6</sup> La susceptibilidad antimicrobiana frente a 18 drogas fue determinada por la técnica de Bauer-Kirby.<sup>7</sup>

La presencia de toxina termoestable se investigó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), con la utilización de 2 oligonucleótidos o cebadores de 21 y 23 pares de base, los cuales fueron diseñados sobre la secuencia del gen conocido, con amplificación de una región de 238 pares de base.<sup>8</sup> La confirmación de un resultado positivo mediante RCP fue realizada con la aplicación de la técnica de hibridación ADN/ADN, y mediante la utilización como sonda del fragmento de ADN que codifica para la toxina termoestable, insertado en el sitio

SmaI del plásmido p Bluescript-SK+/-, portado por una cepa de *E. coli* K12.<sup>9</sup>

La expresión biológica de la toxina fue investigada mediante la prueba de inoculación intragástrica en ratón lactante.<sup>10</sup> Se utilizaron las cepas de *Vibrio cholerae* No-01 (CO32 productora de NAG-ST como control positivo y la cepa de *E. coli* K99 como control negativo.

## RESULTADOS

Las 100 cepas en estudio resultaron ser bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, oxidasa positivo, con reacción positiva a las pruebas de lisina y ornitina descarboxilasa y negativa para la arginina deshidrolasa. Móviles, con producción de indol y crecimiento hasta 6 % de NaCl, utilización de la sacarosa y manitol, no así del inositol y la arabinosa. Todas resultaron ser hemolíticas.

Ninguna de las cepas en estudio aglutinó con el antisuero polivalente de *Vibrio cholerae* 01 ni con el antisuero de *Vibrio cholerae* 0139, por lo que quedaron definitivamente identificadas como *Vibrio cholerae* No-01.

La susceptibilidad antimicrobiana resultó acorde con lo publicado internacionalmente, en especial para las drogas de elección (tetraciclina, ácido nalidíxico y trimetoprim-sulfametoxazol).

La toxina termoestable fue identificada en 20 cepas (20 %). De ellas 11 (55 %) expresaron valores  $\geq 0,083$  en la prueba de ratón lactante, por lo que se consideraron positivas a la expresión biológica de la toxina.

Las 20 cepas que resultaron poseer codificación genética, hibridaron con la sonda que codifica el gen para la toxina termoestable.

## DISCUSIÓN

En los últimos años las cepas de *Vibrio cholerae* No-01 con codificación genética para la toxina termoestable han sido reconocidas como causa importante de enfermedad diarreica aguda, cuyo cuadro clínico incluye desde diarreas autolimitadas hasta severas con deshidratación.<sup>11</sup>

La reciente introducción del diagnóstico de cepas de *Vibrio cholerae* No-01 toxigénico ha

permitido establecer significativos avances en la epidemiología de la enfermedad diarreica aguda causada por estos microorganismos, aunque todavía se precisa profundizar más en este caso.<sup>12</sup>

La presencia de 20 % de cepas toxigénicas observadas en los aislamientos clínicos de este estudio es considerablemente más alta que la reportada en otras áreas geográficas, excepto en zonas de epidemia; como lo demostraron los trabajos realizados por Hoge y otros cuando al estudiar la presencia de toxina termoestable en cepas de *Vibrio cholerae* No-01, 103 de Tailandia, 31 de México y 47 de EE.UU., sólo 7 (4 %) de Tailandia resultaron positivas.<sup>13</sup>

Estudios llevados a cabo en Tailandia durante una epidemia de cólera en marzo de 1990, demostraron que 5 de 15 (33 %) cepas de *Vibrio cholerae* No-01 poseían codificación genética para la toxina termoestable.<sup>14</sup>

Los resultados de este trabajo difieren de los de Caldini y otros quienes en enero de 1995 realizaron estudios similares en Firenze, Italia; ellos investigaron la presencia de toxina termoestable en 46 cepas de *Vibrio cholerae* No-01 aisladas de pacientes con EDA y solamente 4 (8 %) resultaron positivas; y de los de Dalsgard y otros en Lima, Perú quienes no encontraron evidencia de toxina termoestable en 58 cepas de *Vibrio cholerae* No-01 investigadas en un brote de diarreas ocurrido en voluntarios durante el estudio de campo sobre la vacuna colérica.<sup>15,16</sup>

En relación con los estudios de la expresión biológica de la toxina, estos resultados están acordes con los trabajos de Nishibuchi y Seidler sobre la investigación de toxina termoestable, con la utilización de prueba de inoculación gástrica en ratón lactante.<sup>17</sup>

Las cepas en estudio mostraron altos porcentajes de sensibilidad a la tetraciclina, ácido nalidíxico y trimetoprim-sulfametoxazol, lo que coincide con lo reportado en la literatura en relación con los estudios de susceptibilidad antimicrobiana en estos microorganismos.<sup>18</sup>

Las epidemias de cólera hasta 1991 sólo habrían sido atribuibles a *Vibrio cholerae* 01. En diciembre de 1992 se describe una epidemia parecida a la producida durante la enfermedad del cólera causada por *Vibrio cholerae* No-01 identificada internacionalmente como *Vibrio cholerae* 0139,

cepa de alto potencial epidémico reconocida hoy como agente etiológico del cólera.<sup>19</sup>

En investigaciones realizadas por Mekalano y otros demostraron que los genes que codificaban para la toxina colérica son portados por un profago replicado como un plásmido en la especie *Vibrio cholerae*. Estos resultados enfatizan la convulsión genética de estos elementos mediante la transferencia de genes de virulencia hacia especies de bacterias patógenas que ellos pueden infectar.<sup>20</sup> En este caso el hábitat natural del profago y el microorganismo patógeno (*Vibrio cholerae* No-01) es el tracto intestinal, por lo que no sería descartable la posibilidad de que estas bacterias pudieran adquirir el profago mediante la interacción bacteria-fago-hospedero, lo que le confería a estos microorganismos la potencialidad para desarrollar epidemia en Cuba.

Futuros estudios que incluyan investigaciones sobre mutantes isogénicos, de los cuales los genes específicos de la toxina hayan sido deletados, serán necesarios para definir claramente el papel de la toxina termoestable en las cepas de *Vibrio cholerae* No-01.

#### SUMMARY

The antimicrobial susceptibility and the presence of a heat-stable toxin were researched into 100 Non-01 *Vibrio cholerae* strains sent by 7 different health centers to the National Reference Laboratory of Acute Diarrheal Diseases in "Pedro Kouri" Tropical Medicine Institute. The presence of 20% toxigen Non-01 *Vibrio cholerae* was detected, a figure substantially higher than that reported in other geographic areas, except for endemic areas. This result will make it possible to set epidemiological alert in Cuba because these strains can be infected by CTX phages (element transporting gens that encode for choleric toxin) which will give such strains an epidemic potential similar to that of the etiologic agent of cholera. The identified strains could be studied as possible cholera vaccine candidates.

**Subject headings:** VIBRIO CHOLERAEE/isolation and purification; CHOLERA TOXIN/ isolation and purification.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arita M, Takeda T, Honda T, Miwatani T Purification and characterization of *Vibrio cholerae* Non-01 heat-stable enterotoxin. *Infect Immunol* 1986;52:45-9.
2. Honda T, Arita M, Takeda T, Yoh M, Miwatani T. Non-01 *Vibrio cholerae* produces two newly identified toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin and *E. coli* heat-stable enterotoxin. *Lancet* 1985;2:163-4.
3. Safrin SH, Morris JG, Adams M. Non-01 *Vibrio cholerae* bacteriemia: a case report and review. *Rev Infect Dis* 1988;10:1012-7.
4. Morris JG, Takeda T, Tall DB. Experimental non-O groups I *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. *J Clin Invest* 1990;85:697-705.

5. Dakin W, Howell DJ, Sutton RG. Gastroenteritis due to non-agglutinable (non-cholera) Vibrios. *Med J Aust* 1974;2:407-90.
  6. Sakazaki R. Bacteriology of *Vibrio* and related organisms. In Barua D, Greenough WB, eds. *Cholera* New York: Plenum 1992:35-7.
  7. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility disc method *Am J Clin Pathol* 1996;45:493-6.
  8. Guglielmetti P, Bravo L, Sanchi A. Detection of the *Vibrio cholerae* heat-stable enterotoxin gene by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1994;8:101-6.
  9. Maniatis TE, Fritsch F, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982:86-465.
  10. Takeda Y, Takeda T, Yano T. Purification and partial characterization of stable enterotoxin of enterotoxigenic *E. coli*. *Infect Immunol* 1979;25:978-85.
  11. Wachsmuth IK, Blake PA, Olsnik O. *Vibrio cholerae* and cholera, molecular to global perspectives. Washington ASM Press, DC:1994.
  12. Pal A, Ramamurthy T, Bhadra R. Reassessment of the prevalence of heat-stable enterotoxin (NAG-St) among environmental *Vibrio cholerae* Non-01 strains isolated from Calcutta, India, by using a NAG-St DNA probe. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2485-9.
  13. Hoge CW, Sethabutr O, Bohidatta L. Use of a synthetic oligonucleotide probe to detect strains of non serovar 01 *Vibrio cholerae* carrying the gene of heat-stable enterotoxin (NAG-St). *J Clin Microbiol* 1990;28:1473-6.
  14. Bagchi K, Echaverria P, Arthur J. Epidemic of diarrhea caused by *Vibrio cholerae* Non-01 that produced heat-stable toxin among khmers in a camp in Thailand. *J Clin Microbiol* 1993;31:1315-7.
  15. Caldini G, Lanciotti E, Neri A. Enterotossine di *Vibrio cholerae* Non-01 isolati nel bacino del fiume arno dati preliminari. *Quaderni IILA* 1995;7:57-9.
  16. Dalsgaard A, Albert MJ, Taylor DN. Characterization of *Vibrio cholerae* Non-01 serogroup obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Perú. *J Clin Microbiol* 1995;33:2717-22.
  17. Nishibuchi M, Seidler RJ. Medium dependent production of extracellular enterotoxins by Non-01 *Vibrio mimicus* and *Vibrio fluvialis*. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:228-31.
  18. Dalsgaard A, Serichantalergs O, Pitarangsi C, Echeverria P. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* Non-01. *Epidemiol Infect* 1995;114:51-63.
  19. Albert MJ, Islam MS, Mahalanabis D. Large epidemics of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* 0139 synonym Bengal. *Lancet* 1993;342:387-90.
  20. Waldor MK, Mekalanos J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 1996;272:1910-4.
- Recibido: 20 de diciembre de 1999. Aprobado: 10 de marzo del 2000  
 Lic: Laura Bravo. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"  
 Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ipk @ ciipk.sld.cu