

**Factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1**  
**Virulence factors in strains of *Vibrio cholerae* no-O1**

**Autores:** Yanet Bueno-Fuentes<sup>1</sup>, Laura Bravo-Fariñas<sup>2</sup>, Anabel Fernández-Abreu<sup>2</sup>, Fidel Ángel-Núñez<sup>2</sup>

**Organismos:** Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM), Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo. Cuba<sup>1</sup>, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana. Cuba<sup>2</sup>.

**Email:** [irliadis@cdm.gtmo.inf.cu](mailto:irliadis@cdm.gtmo.inf.cu)

**Telef.** 322229; 282207; 282209.

**Resumen.**

La virulencia bacteriana refleja la capacidad que poseen algunos agentes biológicos para infectar y producir efectos patológicos en un organismo invadido. En el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), se realizó un estudio, con el objetivo de caracterizar fenotípicamente 63 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1, aisladas de heces de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Se les realizó la confirmación del género mediante pruebas bioquímicas y la determinación de algunos factores de virulencia como: producción de enzimas extracelulares (DNasa, gelatinasa, lecitinasa, elastasa y hemolisina). En todas las cepas objeto de estudio se evidenció al menos la presencia de un factor de virulencia. La caracterización fenotípica y el estudio de los diferentes factores de virulencia en este estudio, contribuye a un mejor conocimiento del potencial patogénico de este microorganismo en Cuba.

**Palabras clave:** vibrio cholerae no-o1; factores de virulencia; enfermedad diarreica aguda.

**Abstract.**

The bacterial virulence represent the capacity that some biological agents posses to infect and to produce pathological effects in an organism invaded. It was carried out a study in the National Laboratory of Reference of Acute Diarrheic Illnesses of the Institute of Tropical Medicine "Pedro Kourí" (IPK), with the objective of characterize phenotypically 63 strains of *Vibrio cholerae* no-O1, isolated of grounds of patient with acute diarrheal illness. It was carried out the confirmation of the gender by means of biochemical tests, as well as it was determined some factors of virulence like: production of extracellular enzymes (Dnase, gelatinase, lecitinase, elastase, and hemolysine). It was evidenced in all the isolates the presence of a factor of virulence at least. This study contributes to a better knowledge of the pathogenic potential of this microorganism in Cuba.

**Keywords:** vibrio cholerae no-o1 virulence factors, acute diarrheic illness.

## Introducción.

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA), son responsables de una elevada morbimortalidad en los niños menores de cinco años de edad y constituyen uno de los problemas más acuciantes que enfrentan los países en vías de desarrollo (Balbachan *et al.*, 2007).

En Cuba, en el año 2006 se realizaron 727 085 consultas médicas por EDA en la población general, de ahí la importancia que reviste la prevención, el diagnóstico y el enfoque terapéutico de esta entidad clínica (Ministerio de la Salud Pública, 2008).

*Vibrio cholerae* de acuerdo al lipopolisacárido capsular se ha clasificado en más de 200 serogrupos, divididos en O1 y no-O1 (Cabrera *et al.*, 2008).

La EDA producida por *Vibrio cholerae* no-O1 generalmente es leve y tiene una evolución autolimitada, que no requiere de terapia antimicrobiana (Bravo *et al.*, 2007).

Los miembros del género *Vibrio* presentan numerosos factores de virulencia capaces de producir daños en el hospedero susceptible, siendo los más estudiados los de la especie *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* O139 (Saha y Chakrabarti, 2006).

La identificación bioquímica de las especies causantes de EDA constituye una herramienta importante para la vigilancia epidemiológica ya que permite determinar la prevalencia de una serovariedad o especie en distintas zonas geográficas (Torres *et al.*, 2001).

Por lo antes expuesto y por la importancia que reviste la vigilancia microbiológica y epidemiológica de *Vibrio cholerae* no-O1 en Cuba, este trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de algunos factores de virulencia de este microorganismo.

## Desarrollo.

### Materiales y Métodos.

El trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK).

Se estudiaron 63 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1, aisladas de heces de pacientes con EDA, procedentes de diferentes Laboratorios de Microbiología Clínica de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología del país, pertenecientes al cepario del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNR / EDA / IPK), referenciadas y confirmadas en el período comprendido desde enero a marzo del 2011.

Las 63 cepas preservadas en el medio de conservación para enterobacterias "Pasteur", se inocularon en caldo cerebro-corazón y se incubaron durante 18-24 horas a 37<sup>0</sup> C en condiciones de aerobiosis. Posteriormente, se sembraron por agotamiento en placas de agar Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa (TCBS), agar Mac Conkey y agar sangre con 5% de sangre de carnero, con el propósito de obtener colonias bien aisladas. La incubación se realizó en iguales condiciones a las descritas anteriormente. A las 24 horas, se seleccionaron al menos tres colonias convexas, de bordes regulares y fermentadoras de la sacarosa en el agar TCBS, translúcidas, convexas y de bordes regulares en el agar Mac Conkey; y del agar sangre se tomaron tres colonias hemolíticas o no, convexas y de bordes regulares.

La inoculación se realizó por punción y estría en los medios de diferenciación primaria: agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK) y, agar hierro lisina (AHL). La incubación se efectuó en aerobiosis durante 24 horas a 37<sup>0</sup> C, y transcurrido ese período de tiempo se seleccionaron los cultivos que presentaron las siguientes características (Koneman *et al.*, 1998; Martin-Carnahan y Joseph, 2005):

En AHK: no oxidación, ni fermentación de la lactosa, oxidación y fermentación de la glucosa, ausencia de gas y ausencia de producción de sulfuro de hidrógeno; y en AHL: decarboxilación de la lisina.

A todas las cepas que mostraron las características descritas se les investigó la presencia de la enzima citocromo oxidasa, según el método de Kovacs y la coloración de Gram. Aquellas cepas que resultaron bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y con reacción positiva a la oxidasa se les realizó un estudio fisiológico complementario para ubicarla en género y especie. La confirmación en especie, la serotipificación y el estudio de la sensibilidad al compuesto vibriostático O/129 se realizó según lo descrito en la literatura especializada.

A las 63 cepas en estudio se les determinó la producción de enzimas extracelulares (DNasa, elastasa, gelatinasa, lecitinasa y  $\beta$  hemolisina).

La actividad de DNasa fue investigada según Mc Faddin (2002). Un halo rosado alrededor de las colonias en Agar DNasa con 0.01% de azul de toluidina indicó actividad de nucleasa.

El estudio de la enzima gelatinasa se realizó por la técnica descrita por Mc Faddin (2002). Se inoculó por punteo en la superficie del medio agar gelatina, y se incubó 24 horas a 37<sup>0</sup> C. Una opacidad alrededor de la colonia indicó producción de la enzima gelatinasa.

La presencia de la enzima lecitinasa se determinó por el protocolo recomendado por M Sc. Faddin (2002). Se inoculó por punteo en la superficie del medio agar lecitina, y se incubó 48 horas a 37<sup>0</sup> C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de la enzima.

La enzima elastasa se determinó por la metodología establecida por Scharmann (1972). Se inoculó por punteo en la superficie de medio agar elastina, incubándose, hasta 7 días a 37<sup>0</sup> C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de la enzima elastasa.

Para determinar la actividad  $\beta$  hemolítica, se siguió la técnica descrita por Robinsón (1986). A partir de un cultivo puro en el medio de AHK con 18 - 24 horas de incubación, se tomó una asada, se inoculó en estría por agotamiento, y se flameó el asa entre cada cuadrante para obtener colonias aisladas en agar triptona – soya suplementada con sangre de carnero al 5%. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

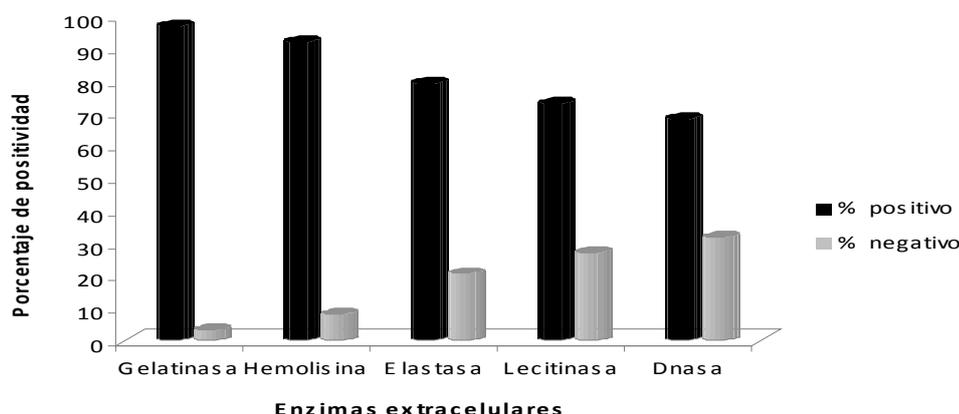
Se utilizaron las siguientes cepas controles, según las recomendaciones del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos de América: Cepa control positivo *Vibrio cholerae* 569 B y control negativo *Escherichia coli* O101: K99 pertenecientes al LNR/EDA/IPK.

### Resultados y Discusión.

Las 63 cepas en estudio se encontraron viables. Todas, utilizaron la glucosa oxidativa y fermentativamente, no así la lactosa, no se observó producción de gas ni de sulfuro de hidrógeno y descarboxilaron la lisina. El 100% de las cepas en estudio presentaron codificación genética para la enzima citocromo oxidasa y además, resultaron sensibles al compuesto vibriostático O/129, produjeron acetilmetilcarbinol (Voges-Proskauer positivo), no hidrolizaron la esculina, produjeron indol, presentaron crecimiento hasta 6% en cloruro de sodio (NaCl). Las cepas no aglutinaron con el antisuero polivalente de *Vibrio cholerae* O1, ni con *Vibrio cholerae* O139; por lo que quedaron identificadas como *Vibrio cholerae* no-O1.

En la **figura 1**, se observa la presencia de al menos un factor de virulencia en las cepas analizadas. Se observó que los mayores porcentajes de positividad correspondieron a la gelatinasa (96,8%) y a la hemolisina (92,1%).

El resto de las enzimas, resultaron positivas en el 79,4%, 73,0% y 68,3% respectivamente.



**Figura 1:** Presencia de factores de virulencia

Estudios de caracterización microbiológica, clínicos-epidemiológicos y de factores de virulencia han sido llevados a cabo en diferentes áreas geográficas (Mc Nichol *et al.*, 2000).

Analizando los resultados de la caracterización fenotípica en este estudio observamos que coincide con los obtenidos por González *et al.* (2009), quienes al procesar 34 muestras de heces de niños con diarrea durante el período 2003-2005, en el Hospital del Niño Jesús, Tucumán, Argentina, obtuvieron un 100% de detección de *Vibrio cholerae* no-O1.

Son escasos los estudios sobre factores de virulencia (producción de enzimas extracelulares) realizados en América Latina y en el Caribe en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con EDA (Bidinost *et al.*, 2004).

La hemolisina producida por *Vibrio cholerae* no-O1 es idéntica a la hemolisina serogrupo El Tor de *Vibrio cholerae* O1 (Sack *et al.*, 1994), y es considerada un factor de virulencia para causar diarreas, especialmente cuando las cepas carecen de toxinas bien definidas, como la toxina colérica (TC) (Yamamoto *et al.*, 1984).

Al observar el comportamiento de este factor de virulencia en esta investigación, se demostró que estos resultados fueron similares a los encontrados por Singh *et al.* (2001) en la India y por Bidinost *et al.* (2004) en Argentina, en estudios relacionados con la presencia y expresión de genes de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de origen clínico, demostrándose la presencia de este factor en el 100% de las cepas.

En un estudio realizado por Coelho *et al.* (2000) con respecto a la hemolisina se observó un menor porcentaje de positividad (60%) en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con EDA, resultado que no coincide con los obtenidos en este estudio. Estos resultados no coinciden, igualmente, con los obtenidos por Rivas *et al.* (1996), quienes en un estudio realizado con 41 casos de gastroenteritis asociados a *Vibrio cholerae* no-O1 no obtuvieron ningún porcentaje de positividad con respecto al factor de virulencia mencionado anteriormente.

Algunos estudios realizados en Argentina demostraron que no hay diferencias en la distribución de genes asociados a virulencia en aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1 de origen humano o ambiental, lo cual sugiere que el ambiente acuático constituye un verdadero reservorio de cepas con capacidad patogénica, las cuales dadas las condiciones adecuadas, son capaces de diseminarse y causar enfermedad en el hombre por lo que señalan la importancia de implementar una continua y sistemática vigilancia de *Vibrio cholerae* no-O1, que contemple, no solamente, la identificación y caracterización de aislamientos clínicos, sino también el monitoreo de las cepas en el ambiente, a fin de detectar aislamientos con un alto potencial patogénico y epidémico (Vián, 2003).

En las cepas de esta investigación se evidenció la producción de la enzima DNasa, gelatinasa, lecitinasa y elastasa, lo que coincide con lo señalado por Boiko (2000) en las

monografías revisadas sobre propiedades y mecanismos de virulencia en las especies del género *Vibrio*.

Las infecciones por *Vibrio* son causadas por el consumo de alimentos o fuentes de agua contaminada, sin embargo, su localización geográfica, las condiciones higiénicas sanitarias de cada región y otros factores relacionados con las características patogénicas propias de cada especie no deben ser jamás ignoradas (Janda, 1991).

### Conclusiones.

En todas las cepas objeto de estudio se evidenció al menos la presencia de un factor de virulencia.

### Bibliografía.

- Balbachan, S., Merino, L., Merino, D., Balbachan, M. & Miranda, O. (2007). Resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de diarreas en niños de Corrientes. *Cubana Med. Trop*, 59(3), 55-60.
- Bidinost, C., Saka, H. A., Aliendro, O., Sola, C., Pancetta-Duttari, G. & Carranza, P. (2004). Virulence factors of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Córdoba, *Argent. Microbiol*, 36(2), 158-163.
- Boiko, A. V. (2000). Pathogenicity factors of various *Vibrios* and *Aeromonas*. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol*, 79(6), 104-108.
- Bravo, L., Fernández, A., Ramírez, M., Llop, A., Martínez, G., Hernández, R., Morier, L., Cabrera L., Bravo, E. L., Ramírez, M., Llop, A., Fernández, A., Morier, L. y Borrego, G. (2008). Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda, *Biomed.*, 19 (3), 238- 244.
- Castillo, M. C. & Binsztein, N. (2009). Characterization of *Vibrio cholera* non-O1 and non O139 isolates associated with diarrhea. *Argent. Microbiol*, 41(1), 11-9.
- Coelho, A., Andrade, J., Vicente, A. & Di Rita, V. (2000). Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect. Immun*, 68, 1700-1705.
- Fraga, J., Núñez, F. y Águila, A. (2007). Caracterización microbiológica de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba. *Cub. Med. Trop*, 59 (3), 21-25.
- González, F. S., Villagra de Trejo, A., Pichel, M., Figueroa, S., Merletti, G., Cafer, M.I.
- Janda, J. M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomic, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol.*, 4, 397-410.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. N., Sommers, H. M. & Winn, W. C. (1998). *Diagnóstico microbiológico* (3 ed.). Buenos Aires.
- Martin-Carnahan, A. J., S. W., D. J., Krieg, N. R., Staly, J. T. & Garrity, G. M. . (2005). *Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed. Vol. 2). New York: Brenner.
- Mc Faddin, J. F. (2002). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Baltimore.

- Mc Nicholl, M. V., Udhayakumar, V., Alper, C. A. & Swedlow, D. (2000). Host-patogen in emerging and re-emerging infectious diseases. *Public Health*, 21, 15-46.
- Rivas, M., Cacace, M. L., Ayala, L. T., Baschkier, A., Miliwebsky, E. & Caffer, M. I. (1996). Cases of gastroenteritis associated to *Vibrio cholerae* no-O1 in Oran. *Argent. Microbiol*, 28, 163-169.
- Robinson, J., Beaman, J., Wagener, L. & Burke, V. (1986). Comparison of direct plating with the use of enrichment culture of isolating of *Aeromonas* spp from faeces. *J. Med. Microbiol*, 22, 315-317
- Sack, D. M. A., Hoque, A., Huq, T. & Entheridge, A. (1994). Is protection against shigellosis induced by natural infection with *Plesiomonas shigelloides* *Lancet*, 343, 1413-1415.
- Saha, P. C., T. (2006). *Aeromonas sharmana* sp. Nova, insolated from a warm spring *Int. J. Syst. Evol. Mycobiol*, 56.
- Scharmman, W. (1972). Elastase in *Pseudomonas* and *Aeromonas*. *Zentralbl Bakteriol*, 220(1), 435-442.
- Singh, D. V., Matte, M. H., Matte, G. R., Jiang, S., Sabena, F. & Shukla, B. N. (2001). Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: Clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol*, 67(2), 910-921.
- Torres, M. E., Pérez, M. C., Schelotto, F., Varela, G. & Parodi, V. (2001). Etiology of children diarrhea in Montevideo, Uruguay. Associated patogénesis and inusual isolates. *J. Clin. Microbiol*, 39, 2134-2139.
- Viám, M. R. *Vibrio cholerae no-O1 asociado a diarreas: factores de virulencia y diversidad genética de un patógeno emergente en América Latina. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS “Carlos G. Malbrán” Departamento Bacteriología. Servicio Enterobacterias.*
- Yamamoto, K., Al-Omani, M., Honda, T., Yakeda, Y. & Miwatani, T. (1984). Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization, and immunological relatednees to El Tor hemolysin. *Infect. Immun.*, 45, 192-196.

**Fecha de recibido: 27 jun. 2012**  
**Fecha de aprobado: 21 sept. 2012**