

Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea

S. GONZÁLEZ FRAGA^{1,4,*}, A. VILLAGRA de TREJO², M. PICHEL¹, S. FIGUEROA²,
G. MERLETTI², M. I. CAFFER¹, M. CECILIA de CASTILLO³, N. BINSZTEIN¹

¹Departamento Bacteriología, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires; ²Hospital del Niño Jesús, Pasaje Hungría 700 (4000) San Miguel de Tucumán;

³Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Ayacucho 491 (4000) San Miguel de Tucumán;

⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: sgraga@anlis.gov.ar

RESUMEN

La infección por *Vibrio cholerae*, el agente causal del cólera, se transmite al hombre por ingestión de agua y alimentos contaminados. Aunque son los serogrupos O1 y O139 los que habitualmente se asocian al cólera epidémico, los aislamientos de otros serogrupos también son causales de gastroenteritis e infecciones extra-intestinales. Durante el período 2003-2005, se investigó la presencia de *V. cholerae* en la materia fecal de niños con diarrea atendidos en el Hospital del Niño Jesús, Tucumán. Se recuperaron 34 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139. Se determinaron sus perfiles de virulencia por PCR, la sensibilidad a los antimicrobianos y la diversidad genética por electroforesis en campo pulsado. Se obtuvieron ocho perfiles de virulencia, aunque ningún aislamiento fue positivo para la toxina colérica ni para la toxina termoestable. Cuatro aislamientos fueron positivos para el sistema de secreción de tipo tres. El 17,6% de los aislamientos fueron resistentes o de sensibilidad intermedia a ampicilina y el 5,9% fueron resistentes a trimetoprima-sulfametoxazol. Los aislamientos resultaron muy diversos: se hallaron 27 patrones distintos en 29 aislamientos tipificables por electroforesis en campo pulsado. A pesar de su baja incidencia, *V. cholerae* continúa siendo un agente causal de diarrea en niños, los que se ven afectados por una amplia variedad de cepas circulantes.

Palabras clave: *V. cholerae* no-O1, no-O139, factores de virulencia, PFGE

ABSTRACT

Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 isolates associated with diarrhea. *Vibrio cholerae*, etiologic agent of cholera, is transmitted to humans by ingestion of contaminated food or water. Even though serogroups O1 and O139 are the ones usually associated to epidemic cholera, isolates from other serogroups also cause gastroenteritis and extraintestinal infections. During the period 2003-2005, presence of *V. cholerae* in stools was investigated in children with diarrhea that sought assistance at the Niño Jesús Hospital in Tucumán. Thirty four isolates of *V. cholerae* non-O1, non-O139 were recovered. We characterized the isolates studying its virulence factors by PCR, antimicrobial susceptibility patterns and genetic diversity by pulsed-field gel electrophoresis. Eight virulence patterns were obtained although no isolate was positive for the cholera toxin or the thermostable toxin. Four isolates were positive for the type three secretion system. The 17.6% of the isolates were resistant or intermediate to ampicillin and 5.9% were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. By *Sfi*I-PFGE, all isolates were genetically very diverse, as 27 different patterns were identified in 29 typeable isolates by pulsed-field gel electrophoresis. Although it has a low incidence, *V. cholerae* continues to be a causative agent of diarrhea in children, who are affected by a variety of circulating strains of *V. cholerae* non-O1, non-O139.

Key words: *V. cholerae* non-O1 and non-O139 isolates, virulence factors, PFGE

INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae es el agente causal del cólera, una enfermedad infecciosa conocida desde la antigüedad. Es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, los que a su vez actúan como reservorios y vehículos de transmisión de este patógeno (8). La infección por *V. cholerae* es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados. Sus manifestaciones clínicas incluyen una profusa diarrea acuosa, vómitos y deshidratación, con gran pérdi-

da de sales y agua. *V. cholerae* ha sido clasificado en numerosos serogrupos, de los cuales sólo el O1 y, más recientemente, el O139 (20) han causado epidemias de cólera. Sin embargo, cepas pertenecientes a los serogrupos no-O1, no-O139 han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde una diarrea leve hasta la deshidratación grave, semejante a la observada en el cólera (23, 26). Por otro lado, cepas de estos serogrupos se han asociado a sepsis y a cuadros extraintestinales, como también a infecciones de heridas superficiales.

En 1991 el cólera reemergió en Perú (22), luego de aproximadamente 100 años de ausencia de casos en Sudamérica. Esta epidemia fue causada por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor. En Argentina ocurrieron siete brotes de cólera entre 1992 y 1998. En el país se estableció un activo programa de vigilancia que incluyó la creación de la Red de Laboratorios de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria. En el marco de este programa y también a través de estudios de monitoreo en el medio ambiente, desde 1992 hasta 2007 se identificaron y caracterizaron alrededor de 3.500 aislamientos de *V. cholerae* O1 y no-O1 de origen humano y ambiental provenientes de distintas regiones del país (10, 17, 26). *V. cholerae* O1 fue aislado únicamente durante los periodos epidémicos, principalmente en el norte del país y en los meses de verano. En cambio, los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 siguieron un patrón diferente, ya que se recuperaron principalmente en primavera y verano, pero también en los meses de otoño e invierno. En general, los aislamientos clínicos estaban asociados a casos esporádicos de diarrea grave o moderada, aunque también hubo microorganismos recuperados de septicemias. En diciembre de 1999 y enero de 2000, ocurrió en Orán (provincia de Salta) un brote de diarrea que afectó a niños y adultos y que duplicó el número de coprocultivos esperados para la época del año; durante ese brote se recuperó *V. cholerae* no-O1 de diez pacientes y también de fuentes de agua de la zona.

Los principales factores de virulencia asociados al cólera epidémico incluyen la enterotoxina conocida como CT (11) y el factor de colonización TCP (*toxin coregulated pilus*) codificado en la isla de patogenicidad VPI (33), ambos habitualmente ausentes en *V. cholerae* no-O1, no-O139 (21). Para estos serogrupos se postula un mecanismo de patogenia diferente, en el que intervienen otros factores de virulencia. La diarrea en general es acuosa, aunque puede presentar sangre y moco (23). Por otra parte, *V. cholerae* no-O1, no-O139 puede producir otros productos extracelulares como la toxina termoestable NAG-ST y las citolisinas VCC/HlyA y RTX (1, 5, 21), los que pueden estar contribuyendo a la virulencia de estas cepas. También se ha descrito una neuraminidasa codificada en otra isla de patogenicidad (VPI-2), que cliva el ácido siálico de los gangliósidos presentes en las células eucariotas (19). Se cree que esta enzima aumenta la sensibilidad de las células hospedadoras a la toxina CT, ya que expone al gangliósido GM₁, receptor de la toxina. La neuraminidasa está habitualmente asociada a cepas toxigénicas; sin embargo, también ha sido descrita en aislamientos de *V. cholerae* no toxigénicos como la variante Amazonia (15). Recientemente se ha descrito la presencia de un sistema de secreción de tipo III en cepas de *V. cholerae* no-O1 que puede participar en la virulencia de estas cepas (13, 32).

Diferentes estudios muestran que *Vibrio cholerae* es una especie de alta diversidad genética, y ello se ha observado utilizando diferentes técnicas de tipificación como multilocus enzimolectroforesis (2), ribotipificación (14), diferentes estrategias basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (25, 31) y MLST (*multilocus sequence typing*) (16). Estas técnicas poseen diferente poder de discriminación y estudian distintas porciones del genoma. También hay estudios en los que se utilizó la electroforesis de campo pulsado (PFGE) con las enzimas de restricción *NotI* o *SfiI*, los que mostraron que esta técnica es muy discriminatoria para estudiar la diversidad genética de aislamientos de *V. cholerae* (4, 25, 31). En general, dichos estudios muestran un agrupamiento de los aislamientos O1 y O139 toxigénicos causales de epidemias –lo que indicaría una dispersión clonal de cepas epidémicas– y, por otra parte, una alta diversidad para los aislamientos no toxigénicos de los serogrupos O1 y no-O1.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los perfiles de virulencia y la diversidad genética de los aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 recuperados de niños con diarrea atendidos en el Hospital del Niño Jesús de San Miguel de Tucumán durante el período 2003-2005.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se estudiaron 14 724 coprocultivos correspondientes a niños con diarrea atendidos en el Hospital del Niño Jesús de San Miguel de Tucumán entre el 1° de enero de 2003 y el 31 de diciembre de 2005.

Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*

Las muestras de materia fecal se obtuvieron principalmente por hisopado anal o rectal y se conservaron en el medio de transporte Cary Blair hasta su traslado al laboratorio del hospital. Se sembraron en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), y en agar sangre preparado con sangre humana al 5% en el medio tripteína de soja (Laboratorios Britania, CABA, Argentina); estas placas se incubaron durante 24 h a 37 °C luego de un enriquecimiento de 6-8 h en agua peptonada alcalina (APA) (Oxoid Ltd.). Las colonias amarillas en TCBS (sacarosa positivas) o hemolíticas en agar sangre y oxidasa positivas fueron caracterizadas utilizando las pruebas bioquímicas para *V. cholerae* descritas por Dodin *et al.* (12). Además, se realizó la prueba de la cuerda en desoxicolato de sodio, positiva para *Vibrio cholerae*. Los aislamientos de *V. cholerae* fueron serotipificados por aglutinación en placa utilizando sueros policlonales (anti-O139, O1, Ogawa e Inaba) producidos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Para confirmar la identificación realizada por pruebas bioquímicas se efectuó PCR múltiple A con cebadores específicos para *Vibrio cholerae* (6). Los resultados de la serotipificación se confirmaron mediante PCR múltiple B con el empleo de cebadores para detectar los serogrupos O1 y O139 (28), utilizando la técnica detallada en el próximo párrafo y en la Tabla 2. Los aislamientos de *V. cholerae* caracterizados en este estudio se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 analizados mediante PCR

Aislamiento	Toma de muestra	Barrio	Sexo	Edad	<i>V. cholerae</i> O1-O139	ctxA	tcpA ET ⁽¹⁾	tcpI	stx/sto	Resultados PCR					
										hiyA	rtxA	nanH	vcsV ₂	vcsN ₂	PV ⁽²⁾
T153	Ene-03	Alderetes	F	1 año 6 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T347	Ene-03	Banda del Río Salí	M	6 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T557	Ene-03	San Miguel de T.	F	10 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T997	Ene-03	Banda del Río Salí	F	1 año 8 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T1035	Ene-03	Alderetes	M	11 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T4747	Abr-03	Banda del Río Salí	F	14 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T16586	Nov-03	Banda del Río Salí	F	1 año 1 mes	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	B
T17454	Nov-03	Banda del Río Salí	M	8 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	B
T18118	Dic-03	Villa Alem	F	2 años	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	G
T18641	Dic-03	Banda del Río Salí	F	2 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T597	Ene-04	Banda del Río Salí	M	9 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T1378	Ene-04	Famailía	M	2 años 8 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T1848	Feb-04	Banda del Río Salí	F	1 año	+	-	-	+	+	ET	+	-	-	-	E
T2734	Feb-04	Los Vázquez	F	11 meses	+	-	-	+	+	ET	+	-	-	-	E
T2799	Feb-04	Ciudadela	M	11 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T4463	Mar-04	Yerba Buena	M	2 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	+	F
T4956	Abr-04	Banda del Río Salí	M	1 año	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	H
T6228	May-04	San Miguel de T.	F	1 año 10 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	+	C
T8792	Jul-04	Banda del Río Salí	F	8 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	+	C
T14438	Oct-04	San Miguel de T.	F	2 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	B
T14707	Nov-04	Villa 9 de Julio	M	1 año 2 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T15704	Nov-04	San Miguel de T.	M	3 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T15881	Nov-04	Banda del Río Salí	M	1 año	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	D
T17612	Dic-04	San Miguel de T.	M	1 año 3 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	B
T17659	Dic-04	Banda del Río Salí	F	2 años	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T987	Ene-05	Banda del Río Salí	M	4 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	B
T1917	Feb-05	Santiago del Estero	F	6 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T2508	Feb-05	Lules	M	1 año 2 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	B
T4174	Mar-05	San Miguel de T.	M	5 años	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	D
T4582	Mar-05	Banda del Río Salí	M	3 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	B
T4630	Mar-05	Reducción	F	4 años	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	D
T7189	May-05	Ranchillos	F	7 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T7959	Jun-05	Famailía	F	1 año 2 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T9242	Jul-05	Costanera Norte	F	3 años 4 meses	+	-	-	-	+	ET	+	-	-	+	C

⁽¹⁾ET: El Tor; ⁽²⁾PV: perfil de virulencia

Tabla 2. Condiciones de las reacciones de PCR

Blanco de amplificación	Cebadores	Tamaño amplicón (pb)	Concentración cebador (μM)	Apareamiento ($^{\circ}\text{C}$)	Extensión (min)	Referencia
PCR Múltiple A (<i>V. cholerae-ctxA-tcpA</i>)						
<i>V. cholerae</i>	pVC-F2 pVCm-R1	300	0,8			Chun <i>et al.</i> , 1999
<i>ctxA</i>	CT 94F CT 614R	564	0,4	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
<i>tcpA</i> El Tor	TCP 72F TCP 477R	461	0,4			Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR Múltiple B (O1-O139)						
O1	VCO1-F2 VCO1-R2	647	0,4			Rivera <i>et al.</i> , 2003
O139	VCO139-F2 VCO139-R2	741	0,4	55	1,5	
PCR Múltiple C (<i>stn/sto-rtxA</i>)						
<i>stn/sto</i>	67F 194F	172	1			Rivera <i>et al.</i> , 2001
<i>rtxA</i>	rtxA-F rtxA-R	417	0,8	55	1	Chow <i>et al.</i> , 2001
PCR Múltiple D (<i>hlyA</i> Clásico y El Tor)						
<i>hlyA</i>	489-F 744-F 1184-R	737 ⁽¹⁾ 480 ⁽²⁾	0,8	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR <i>toxR</i>						
<i>toxR</i>	101F 837R	779	0,8	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR <i>tcpl</i>						
<i>tcpl</i>	132F 951R	862	0,8	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR <i>nanH</i>						
<i>nanH</i>	nanH-1 nanH-2	1900	0,6	55	1	Jermyn <i>et al.</i> , 2002
PCR <i>vcsN₂</i>						
<i>vcsN₂</i>	N2-F N2-R	500	0,3	52	1	Este trabajo
PCR <i>vcsV₂</i>						
<i>vcsV₂</i>	V2-F V2-r	720	0,3	55	1	Este trabajo

⁽¹⁾Positivo para los biotipos Clásico y El Tor, ⁽²⁾específico para El Tor

Sensibilidad a los antimicrobianos

Se evaluó la sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión con discos utilizando discos comerciales (Laboratorios Britania) de ampicilina (AMP, 10 μg), trimetoprima – sulfametoxazol (SXT, 1,25 / 23,75 μg), furazolidona (FUR, 100 μg), fosfomicina (FOS, 50 μg), tetraciclina (TET, 30 μg) y norfloxacina (NOR, 10 μg). Frente a la AMP, la SXT y la TET, los resultados obtenidos se interpretaron según las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, USA) para *V. cholerae*; en el caso de los demás antimicrobianos la interpretación se basó en las recomendaciones para *Enterobacteriaceae* (7).

Identificación de factores de virulencia por PCR

Sobre la base de protocolos ya publicados, se realizaron diferentes reacciones de PCR para detectar genes que codifican factores de virulencia, entre ellos: *ctxA* (que codifica la subunidad

A de CT); *tcpA* El Tor (que codifica la unidad estructural del factor de colonización TCP, alelo El Tor, TcpA); *tcpl* (que codifica una proteína asociada a la membrana interna y reguladora de la síntesis de TcpA); *toxR* (que codifica la proteína ToxR, reguladora de la expresión y la secreción de CT y TCP); *stn/sto* (que codifica la toxina termoestable NAG-ST); *hlyA* (que codifica la citolisina HlyA/VCC); *rtxA* (que codifica la toxina formadora de poros RTX); y *nanH* (que codifica una neuraminidasa) (5, 19, 27). Los protocolos fueron ligeramente modificados, ya que se implementó PCR múltiple A para *V. cholerae*, *ctxA* y *tcpA* El Tor y PCR múltiple C para *stn/sto* y *rtxA*, como se muestra en la Tabla 2. También se desarrollaron dos reacciones de PCR para los genes *vcsN₂* y *vcsV₂* que codifican la ATPasa y la proteína estructural del sistema de secreción de tipo III, recientemente encontrado en *V. cholerae* (13). La secuencia de los cebadores utilizados es la siguiente: N2-F: GCAGTTGAGCCAATTCCATTACAG; N2-R: CGACCAAACGAGATAATGCT; V2-F:

CTATTTGGCTCACTTGATGGGGC; V2-R: GCCACATCATTGCTTGCTACC. Las condiciones de ciclado y la concentración de los cebadores (Operon Biotechnologies, Cologne, Alemania) se muestran en la Tabla 2. Para todas las reacciones de amplificación, la concentración final de $MgCl_2$ fue de 1,5 mM. Los templados de ADN fueron preparados por el método de hervido y se utilizaron 2 μ l para la amplificación por PCR (volumen final 25 μ l). Como controles se utilizaron las siguientes cepas: RC138 (*V. cholerae* O139, *ctxA* +, *tcpA* El Tor +, *hlyA* El Tor, *toxR* +, *stn/sto* -, *rtxA* +) y RC2 (*V. cholerae* O1, *ctxA* +, *tcpA* El Tor -, *hlyA* Clásica, *toxR* +, *stn/sto* -, *rtxA* +), provistas por la Dra. Rita Colwell, Center of Marine Biotechnology, University of Maryland, EE.UU.; y la cepa 83-7771 (*V. cholerae* no-O1, no-O139, *ctxA* -, *tcpA* El Tor -, *hlyA* El Tor+, *toxR* +, *stn/sto* +, *rtxA* +), provista por el Dr. Clifford Clark, National Microbiology Laboratory, Canadá. También se utilizó una cepa autóctona BA312 como control positivo para *vcsV₂* y *vcsN₂*. Como control de reactivos se agregaron 2 μ l de agua en lugar del templado a la mezcla de reacción. El programa de ciclado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min seguida de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de apareamiento a temperatura variable, tiempo variable de extensión a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Tabla 2).

Diversidad genética por electroforesis de campo pulsado

Se utilizó el protocolo de PFGE estandarizado de la Red PulseNet Internacional para *Vibrio cholerae* (9). Brevemente, el ADN genómico se preparó mezclando en partes iguales una suspensión bacteriana de densidad óptica 0,9 a 610 nm en buffer Tris-EDTA 100 mM con agarosa SeaKem Gold 1%. Luego de una lisis de 1 h a 54 °C (solución para la lisis: Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8, lauril sarcosina 1%, proteinasa K 0,1 mg/ml), se realizaron dos lavados con agua y cuatro lavados con TE 1X en baño con agitación a 50 °C. La restricción se realizó con 40 U de la enzima *SfiI* o con 30 U de *NotI* incubando toda la noche a 50 °C o 37° respectivamente. La cepa *Salmonella* Braenderup H9812 digerida con *XbaI* se utilizó como estándar. La electroforesis se realizó con agarosa SeaKem Gold 1% utilizando un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) en buffer TBE 0,5X con el siguiente programa: 2 a 10 seg, 13 h; 20 a 25 seg, 6 h. Para los aislamientos que presentaron una degradación completa del ADN se repitió el ensayo con el agregado de tiourea 50 μ M en el buffer de corrida TBE (29). Aquellos aislamientos en los que no se resolvió la degradación fueron considerados no tipificables por PFGE. Los patrones de PFGE se analizaron por inspección visual y utilizando también el programa BioNumerics versión 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Los dendrogramas se construyeron utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA.

RESULTADOS

Aislamiento de *Vibrio cholerae*

La frecuencia de aislamiento de *V. cholerae* obtenido de los coprocultivos fue 0,23%; *Shigella* spp. fue el patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de diarreas durante el período estudiado y estuvo presente en el 10,30% de los 14 724 coprocultivos estudiados. También se aisló *Salmonella* spp. (1,54%) y *Aeromonas* spp. (1,73%). No se detectaron casos de cólera ni se aisló *V. cholerae* de los serogrupos O1 u O139.

Se recuperaron 34 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que se confirmaron con pruebas bioquímicas, serotipificación y PCR. En la Tabla 1 se presentan las fechas de toma de muestra, la ubicación geográfica,

el sexo y la edad de los pacientes, como así también los resultados de las reacciones de PCR de los diez factores de virulencia analizados y de las que confirmaron la identificación como *V. cholerae* no-O1, no-O139. Los pacientes que presentaron diarrea por *V. cholerae* no-O1, no-O139 tenían entre 3 meses y 14 años (mediana = 1,25).

Con respecto a las manifestaciones clínicas, 19 de los 34 pacientes estudiados (56%) presentaron diarrea de tipo acuosa, otros 12 (35%) presentaron diarrea mucosa con sangre y no se contó con información de los tres pacientes restantes. En cinco de estos casos se observó asociación con otros patógenos: en cuatro muestras de diarrea acuosa se identificaron parásitos y en una de diarrea sanguinolenta se aisló *Shigella sonnei*. Por otro lado, 22 de los pacientes (65%) presentaron deshidratación leve, seis deshidratación moderada y uno deshidratación grave.

Sensibilidad a los antimicrobianos

La mayoría de los aislamientos (74%) fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados. Cuatro aislamientos fueron resistentes a la ampicilina y dos fueron de sensibilidad intermedia. También se detectaron dos aislamientos resistentes a la trimetoprima-sulfametoxazol y un aislamiento resistente a la fosfomicina. Ningún aislamiento fue resistente a más de un antimicrobiano.

Factores de virulencia

Todos los aislamientos fueron negativos para *ctxA*, *stn/sto* y *tcpA* El Tor. Dos aislamientos fueron positivos para *tcpI* y, aunque fueron negativos para *tcpA* El Tor, como *tcpI* y *tcpA* pertenecen al mismo operón, es posible que posean otro alelo del factor de colonización TCP. Todos los aislamientos fueron positivos para *toxR*, mientras que 29 (85%) y 31 (91%) aislamientos fueron positivos para *hlyA* (hemolisina El Tor- ET) y *rtxA*, respectiva-

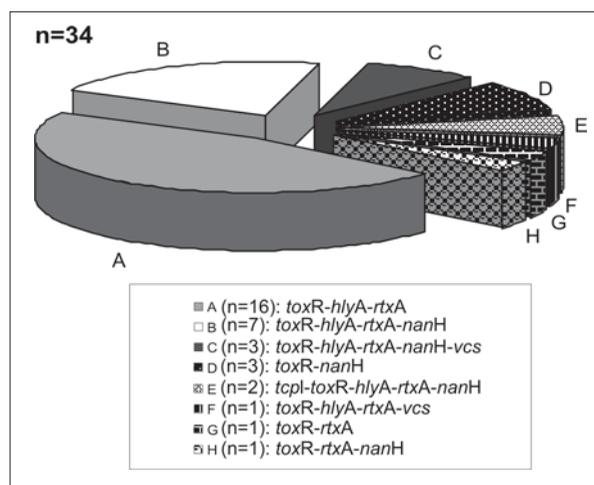


Figura 1. Distribución de los perfiles de virulencia de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139.

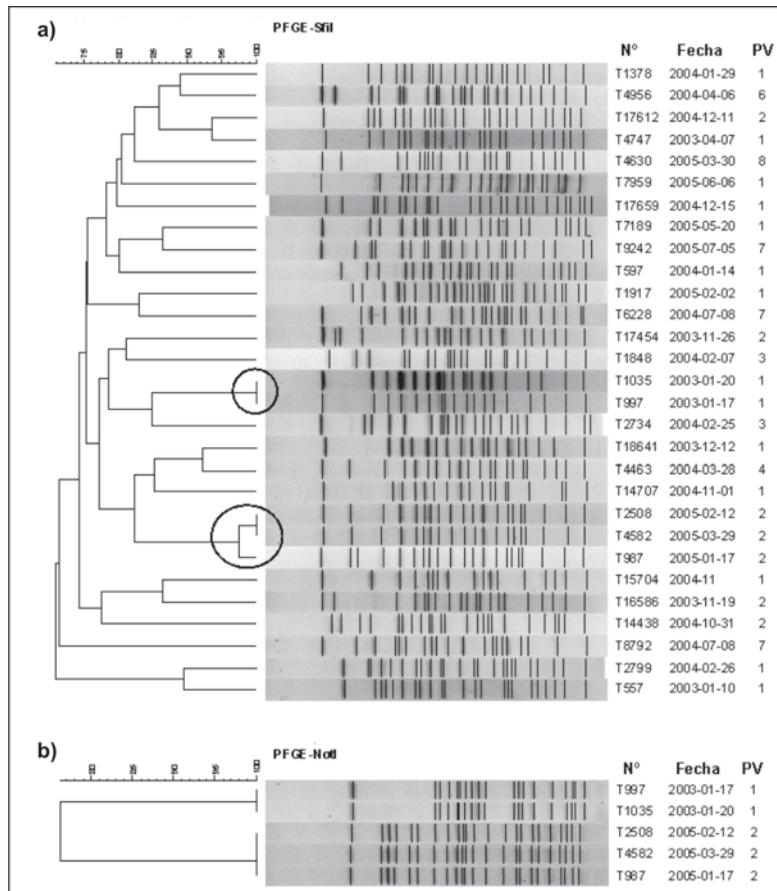


Figura 2. a) Dendrograma de *SfiI*-PFGE para los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139. b) Dendrograma de *NotI*-PFGE para los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que presentaron patrones compartidos con la enzima *SfiI*. En las columnas de la derecha se presenta el número que identifica al aislamiento, la fecha de aislamiento y el perfil de virulencia por PCR (PV). Los círculos señalan los grupos identificados con un coeficiente de similitud mayor del 95%.

mente. El gen *nanH* estuvo presente en 16 aislamientos (47%) y los genes *vcsN₂* y *vcsV₂* amplificaron en 4 de los 34 aislamientos (12%). Al estudiar la presencia de factores de virulencia se detectaron ocho perfiles diferentes (Figura 1 y Tabla 1), con una mayor prevalencia (47%) para aquel que poseía los genes *toxR*, *hlyA* y *rtxA* (perfil A), seguido del que, además de estos tres genes, también incluía *nanH* (perfil B), con el 20%. El resto de los perfiles de virulencia estaba representado por uno a tres aislamientos.

Diversidad genética

De los 34 aislamientos estudiados, cinco (T347, T153, T18118, T15881 y T4174) fueron no tipificables por PFGE, incluso luego de agregar tiourea en el buffer de corrida. La técnica demostró tener alto poder de discriminación, ya que se encontraron 27 patrones electroforéticos diferentes entre los 29 aislamientos comparados (Figura 2a).

Solamente se identificaron dos grupos integrados por dos y tres aislamientos, cada uno con una similitud mayor al 95% al calcular el coeficiente de Dice (señalados en la Figura 2a). El primer grupo comprendió los aislamientos T1035 y T997, recuperados en enero de 2003; éstos fueron indistinguibles con las dos enzimas de restricción utilizadas (Figuras 2a y 2b) y tuvieron el mismo perfil de virulencia (perfil A). El segundo grupo estuvo integrado por los aislamientos T2508, T4582 y T987, recuperados entre enero y marzo del 2005; sus patrones de *SfiI*-PFGE difirieron en una sola banda y fueron indistinguibles por *NotI*-PFGE (Figura 2b). Estos tres aislamientos también compartían el mismo perfil de virulencia (perfil B). Los aislamientos de los dos grupos fueron recuperados en verano de pacientes que habitaban en barrios cercanos al Río Salí.

Al analizar los aislamientos con una similitud mayor al 90% se observaron dos nuevos grupos. Estos compren-

dían a los aislamientos T17612 y T4747 por un lado, y a T18641 y T4463 por otro. Los aislamientos diferían en más de siete bandas al ser analizados por *Sfi*I-PFGE y presentaban distintos perfiles de virulencia. También se identificaron grupos con mayor cantidad de aislamientos que tenían una similitud del 75% al 88%, pero que presentaban al menos diez bandas de diferencia y un máximo de cinco perfiles de virulencia diferentes.

DISCUSIÓN

A lo largo de los años 2003 al 2005 se realizó una intensiva vigilancia de diarreas por *V. cholerae* en el Hospital del Niño Jesús de San Miguel de Tucumán. Al confirmarse solamente 34 aislamientos de 14.724 coprocultivos, se puede afirmar que las diarreas por *V. cholerae* tienen baja incidencia en los pacientes pediátricos de San Miguel de Tucumán y afectan principalmente a niños de corta edad, los que en su mayoría exhiben diarrea de tipo acuosa, aunque fue llamativo el alto porcentaje de los casos (35%) que presentaron diarrea con sangre. El grado de deshidratación observado fue variable; como el tipo de diarrea predominante fue la acuosa, pensamos que la consulta temprana de las madres frente al cuadro de diarrea de sus hijos y la pronta instauración de la hidratación adecuada (oral, endovenosa, o ambas) evitó un grado de deshidratación mayor. De los 34 pacientes de los que se aisló *V. cholerae*, 21 (62%) vivían en zonas geográficas cercanas a ríos como el Salí, el Lules y el Canal Norte (Cuenca del Río Salí); esto se asume como un importante factor de riesgo para contraer diarreas causadas por *Vibrio* spp. y también por *Aeromonas* spp.

Aunque el tratamiento antimicrobiano de los cuadros diarreicos por *Vibrio cholerae* no tiene demasiada importancia en la evolución clínica, es útil para cortar la cadena epidemiológica y evitar así la diseminación del patógeno. Los antimicrobianos ensayados, sobre todo la furazolidona, la trimetoprima-sulfametoxazol y, en menor medida, la ampicilina, presentaron buena cobertura frente a estos aislamientos provenientes de una población pediátrica. Todos los aislamientos fueron sensibles a tetraciclina y norfloxacin, y aunque estos antimicrobianos no están autorizados para uso pediátrico, es importante ensayarlos para emplearlos, en caso de ser necesarios, en adultos. No se detectaron cepas multirresistentes.

Los aislamientos encontrados tuvieron diversos perfiles de virulencia; sin embargo, no se encontró correlación entre los síntomas y signos expuestos por los pacientes y los perfiles de virulencia de los aislamientos (datos no mostrados). Los aislamientos en ningún caso presentaron los genes que codifican la toxina CT (*ctxA*) o la toxina termoestable NAG-ST (*stn/sto*). En cambio, el gen que codifica el regulador ToxR (*toxR*) y los genes que codifican las citosinas HlyA/VCC y RTX (*hlyA* y *rtxA*) estuvieron ampliamente distribuidos entre los aislamientos:

éstos conformaron el perfil de virulencia más frecuente (perfil A, 47%). Tanto HlyA/VCC, que altera el balance osmótico de las células eucariotas (18), como RTX, que despolimeriza los filamentos de actina en células eucariotas (30), podrían explicar la patogenia de las cepas de *V. cholerae* CT negativas y quizás, los casos de diarrea muco-sanguinolenta. Los resultados de la caracterización de aislamientos de origen humano fueron concordantes con los encontrados para aislamientos ambientales recuperados del río Lules y de dos sitios del río Salí (17), ya que los perfiles de virulencia son muy semejantes. Esta similitud, sumada a la falta de correlación entre los perfiles de virulencia de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 y la presentación clínica de la diarrea sugiere que, además de estos factores de virulencia del patógeno, la cantidad de microorganismos ingerida y el estado inmune del huésped tienen un papel muy importante en la evolución de la enfermedad. Por esta razón es importante la vigilancia de este patógeno, especialmente en las poblaciones más vulnerables, como los niños, los ancianos y los inmunocomprometidos.

Es interesante resaltar que se encontraron 16 aislamientos positivos para el gen que codifica la neuraminidasa (*nanH*), que pertenece a la isla de patogenicidad VPI-2, habitualmente asociada a cepas epidémicas portadoras de la toxina CT (19). Sin embargo, la presencia de dicho gen no implica la presencia de la isla VPI-2 completa (24). Es necesario investigar este aspecto, como también el papel de la neuraminidasa en la patogénesis de aislamientos CT negativos.

También es importante destacar la presencia del sistema de secreción de tipo III (T3SS) —hasta ahora, el único descrito para *V. cholerae*— en cuatro de los aislamientos estudiados, ya que este sistema puede aportar mecanismos de patogenia alternativos para las cepas de *V. cholerae* no toxigénicas. A su vez, se ha descrito que los genes *vcs* que codifican el T3SS de *V. cholerae* también se encuentran en la isla VPI-2 (24). En el grupo de aislamientos analizados, solamente tres aislamientos portaban el gen *nanH* y los genes *vcs*. A su vez, hubo tres aislamientos con el gen *nanH* y sin los genes *vcs*, y un aislamiento que poseía los genes *vcs* y no el gen *nanH*. Esto estaría indicando una estructura distinta de la isla VPI-2 o una localización diferente de estos genes.

Al igual que en otros estudios (4, 31), se encontró alta diversidad genética en los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 analizados por PFGE, ya que solamente se identificaron dos pequeños grupos genéticamente muy relacionados, de dos y tres aislamientos cada uno. Si bien se observaron en el dendrograma otros grupos, con una similitud de entre 75% y 95%, los aislamientos dentro de esos grupos presentaban más de siete bandas de diferencia y distintos perfiles de virulencia. Esto sugiere que estos agrupamientos incluyeron aislamientos que pertenecían probablemente a diferentes linajes.

Nuestros resultados muestran que no existe un número limitado de clones que persiste en esta región, sino que existe gran diversidad entre las cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 capaces de causar enfermedad en el hombre, aun dentro de una región acotada, como es el caso de la cuenca del río Salí. Estos resultados coinciden con los encontrados por Bidinost *et al.* (3) en el estudio llevado a cabo en la provincia de Córdoba con aislamientos ambientales y humanos. Más aún, esta diversidad ha sido también demostrada por nuestro grupo en un estudio reciente aplicando MLST sobre aislamientos de *V. cholerae* de Argentina (16).

Finalmente, informamos que se ha detectado un aislamiento portador de los genes *ctxA* y *tcpI*, recuperado en San Miguel de Tucumán en febrero de 2007 de un paciente varón de 2 años y 6 meses, que consultó por la guardia de emergencia por diarrea con reacción inflamatoria, vómitos y mal estado general. Dicho aislamiento, caracterizado como *V. cholerae* no-O1, no-O139 (resultados no publicados), evidencia la transferencia horizontal de genes, ya que *ctxA* y *tcpI* están usualmente asociados a *V. cholerae* O1.

Es necesario destacar la importancia de reactivar la vigilancia de *V. cholerae*, tanto en casos clínicos como en los reservorios acuáticos, para detectar oportunamente la aparición de cepas con potencial patogénico, ya sea del serogrupo O1 o de otros serogrupos.

Agradecimientos: al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca otorgada a S. González Fraga, y a M. Panagopulo por su asistencia técnica. Este estudio fue realizado con fondos del proyecto PICTR 2000-00010 otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Arita M, Takeda T, Honda T, Miwatani T. Purification and characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* 1986; 52: 45-9.
- Beltrán P, Delgado G, Navarro A, Trujillo F, Selander RK, Cravioto A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 581-90.
- Bidinost C, Saka HA, Aliendro O, Sola C, Panzetta-Duttari G, Carranza P, *et al.* Virulence factors of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Córdoba, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36:158-63.
- Choudhury SR, Bhadra RK, Das J. Genome size and restriction fragment length polymorphism analysis of *Vibrio cholerae* strains belonging to different serovars and biotypes. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 115: 329-34.
- Chow IK, Yuen K, Yam W. Detection of RTX Toxin Gene in *Vibrio cholerae* by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2594-7.
- Chun J, Huq A, Colwell R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2202-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th Informational Supplement, 2008; M100-S18. Wayne, PA, USA.
- Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 1996; 274: 2025-31.
- Cooper KL, Luey CK, Bird M, Terajima J, Nair GB, Kam KM, *et al.* Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 51-8.
- Costagliola M, López A, Malaspina A, Guerrero R, Medina D, Odizzio M, *et al.* Estudio de la presencia de *V. cholerae* en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya: período 1992-1996. *Frente Marítimo* 2000; 18: 53-8.
- De SN. Enterotoxogenicity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature* 1959; 183: 1533-4.
- Dodin A, Fournier JM. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibrión cholérique et des autres vibrións. Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur. Paris, Institut Pasteur 1992, p. 91-148.
- Dziejman M, Serruto D, Tam VC, Sturtevant D, Diraphat P, Faruque SM, *et al.* Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3465-70.
- Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Dziejman M, Rahman MH, Sack DA, *et al.* Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2123-8.
- Figueiredo SC, Neves-Borges AC, Coelho A. The neuraminidase gene is present in the non-toxicogenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 563-9.
- González Fraga S, Pichel M, Binsztein N, Johnson JA, Morris JG Jr, Stine OC. Lateral gene transfer of O1 serogroup encoding genes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 286: 32-8.
- González Fraga S, Pichel M, Costagliola M, Cecilia M, Jurquiza V, Peressutti S, *et al.* Environment and virulence factors of *Vibrio cholerae* strains isolated in Argentina. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 2448-56.
- Gutiérrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FC, Yoshimori T, Bocco JL, *et al.* Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1829-34.
- Jermyn WS, Boyd EF. Characterization of a novel vibrio pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology* 2002; 148: 3681-93.
- Kaper JB, Morris JG Jr, Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 48-86.
- Kurazono H, Pal A, Bag PK, Nair GB, Karasawa T, Mihara T, *et al.* Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occludens toxin, accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin in *Vibrio cholerae* of diverse origins. *Microb Pathog* 1995; 18: 231-5.
- Levine M. South America: the return of cholerae. *Lancet* 1991; 338: 45-6.
- Morris JG. Non-O group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. En: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik Ø, editors. *Vibrio cholerae* and Cholera. Washington D.C., ASM Press, 1994, p. 103-15.
- Murphy RA, Boyd EF. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J Bacteriol* 2008; 190: 636-47.
- Pichel M, Rivas M, Chinen I, Martín F, Ibarra C, Binsztein N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 124-34.
- Rivas M, Cacace ML, Ayala LT, Baschkier A, Miliwebsky E, Caffer MI. Casos de gastroenteritis asociados a *Vibrio cholerae* no-O1 en Orán, Salta. *Rev Argent Microbiol* 1996; 28: 163-9.

27. Rivera I, Chun J, Huq A, Sack R, Colwell RR. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2421-9.
28. Rivera I, Lipp E, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell RR. Method for extraction and application of multiplex PCR to detect toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ Microbiol* 2003; 5: 599-606.
29. Römmling U, Tümmler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 464-5.
30. Sheahan KL, Cordero CL, Satchell KJ. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9798-803.
31. Singh DV, Matte MH, Matte GR, Jiang S, Sabeena F, Shukla BN, *et al.* Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 910-21.
32. Tam VC, Serruto D, Dziejman M, Briehner W, Mekalanos JJ. A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host Microbe* 2007; 1: 95-107.
33. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2833-7.