

Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* O139

Gemma Año ⁽¹⁾; Hilda García ⁽¹⁾; Arturo Talavera ⁽¹⁾; Tania Valmaseda ⁽¹⁾; Rafael Fando ⁽²⁾; Bárbara Cedré ⁽¹⁾; Odelsa Ancheta ⁽²⁾; Gloria Roura ⁽²⁾; Luis García ⁽¹⁾.

1. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. La Habana, Cuba.
2. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

El surgimiento del serogrupo O139 de *Vibrio cholerae* y su asociación a diferentes brotes, ha provocado su inclusión en los estudios para la lucha contra el cólera. En tal sentido nuestro equipo se propuso realizar un estudio comparativo de las características microbiológicas, incluyendo los factores de virulencia de cuatro cepas epidémicas: *V. cholerae* O139, de la cepa vacunal 251a (O139), y dos cepas de *V. cholerae* O1. Los resultados mostraron similitud entre todas las cepas en cuanto a sus características tintoriales, culturales, bioquímicas y morfológicas, con excepción del grosor de la envoltura celular, que en las cepas O139 resultó ser mayor, posiblemente debido a la presencia de cápsulas. También fueron similares los resultados obtenidos en la determinación de la toxina de cólera (CT) mediante el ensayo Ileal Loop y Southern blot, capacidad hemaglutinante, expresión de la subunidad A de la proteína estructural del pili (TcpA) por Western blot y actividad hemolítica observada a través de la prueba de CAMP. La sensibilidad a diferentes drogas antimicrobianas, empleando el sistema DIRAMIC-10, reportó que las cinco cepas del serogrupo O139 fueron sensibles a la tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, furazolidona, doxiciclina, ácido nalidíxico, kanamicina, penicilina y ciprofloxacina. Resultaron resistentes a estreptomycin, polimixina, sulfametoxazol-trimetoprim y a oxacilina. Sin embargo, las cepas O1 fueron sensibles al sulfametoxazol-trimetoprim y a la estreptomycin. Frente a rifampicina los resultados fueron variables. Estos resultados permiten un mayor grado de conocimiento sobre el serogrupo O139, comprobándose así la similitud existente con el biotipo El Tor de *V. cholerae* O1.

Palabras claves: *Vibrio cholerae* O139, identificación fenotípica, factores de virulencia, antibiograma.

Introducción

Hasta 1992, solamente *Vibrio cholerae* del serogrupo O1 había sido reconocido como agente causal del cólera. *V. cholerae* de los 137 serogrupos restantes, también conocidos como *V. cholerae* no-O1, nunca habían sido reportados como causantes de cólera epidémico.

El predominio del serogrupo O1 de *V. cholerae* como causante de epidemias y pandemias de cólera, fue anulado en octubre de 1992, cuando grandes brotes de esta enfermedad ocurrieron en el sur y este de la India y sur de Bangladesh, con la subsiguiente extensión a otras partes de Asia. El agente causal fue una nueva cepa toxigénica de serogrupo no-O1, que se denominó *V. cholerae* O139, sinónimo Bengal, que se piensa pueda ser el agente causal de la Octava Pandemia de Cólera (1).

A partir de esta nueva situación, el desarrollo de métodos inmuno-específicos de protección contra el cólera, toman en cuenta las cepas de *V. cholerae* O139. En tal sentido, existen pocos reportes sobre la caracterización de estas cepas, aunque se describe que comparten numerosas características con cepas El Tor de *V. cholerae* O1, sin embargo, difieren en cuanto a longitud y composición del polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular y en la presencia de cápsula, que está ausente en el serogrupo O1 (2).

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio comparativo de las características microbiológicas, incluyendo algunos factores de virulencia, de cepas epidémicas de *V.*

cholerae O139, la cepa vacunal 251a, atenuada por ingeniería genética y cepas de *V. cholerae* O1.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas. Se caracterizaron cinco cepas de *V. cholerae* correspondientes al serogrupo O139 (MDO12, MO45, 1837 y SG251), aisladas de pacientes, donadas por PhD R. Finkelstein de la Universidad de Missouri, Estados Unidos y la cepa 251a (*ctx A*, *ctx B*, *zot*, *ace*), mutada por técnicas de ingeniería genética en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), a partir de la cepa SG251 (Comunicación personal. Benítez y col.). Además se utilizaron como control dos cepas de referencia de *V. cholerae* O1, T19479 (biotipo El Tor, serotipo Inaba), donada por el departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Göteborg, Suecia, y la cepa VC12 (biotipo Clásico, serotipo Ogawa), donada por el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto Pasteur, Francia. Se partió de conservaciones almacenadas a -70 °C en Caldo Triptona Soya (TSB), que contenía glicerol al 20%.

Identificación fenotípica. La caracterización fisiológica y bioquímica de las cepas en estudio se realizó siguiendo la metodología recomendada en el Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3).

Serología. El análisis serológico se realizó a través del método de aglutinación en lámina. Los antisueros utilizados fueron obtenidos en el Laboratorio de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay siguiendo el esquema utilizado por Shimada (4).

Toxina de cólera (CT). Se realizó el ensayo de Intestino Ligado ("Ileal Loop") en dos conejos Nueva Zelandia blancos (2-2,5 Kg de peso) para medir fluido acumulado (F.A), inoculándose intrainestinalmente por cada cepa, 0,5 mL de una suspensión bacteriana de 10^7 UFC en dos segmentos ligados de 5-6 cm de largo, próximos al apéndice (5). Para demostrar la presencia de genes que codifican para CT se realizó la técnica de "Southern Blot", digiriendo el DNA genómico con la enzima de restricción Hind III (6). La sonda utilizada se correspondió con una porción de DNA del gen que codifica para la subunidad A de la toxina de cólera (*ctx A*).

Hemaglutinina Sensible a Manosa (MSHA). La actividad hemaglutinante de las cepas en estudio se evaluó utilizando una solución al 1% de eritrocitos de gallos Leghorn, a través de las técnicas de Hemaglutinación (HA) e Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) con el monosacárido D-Manosa al 0,1%. El título se definió como el inverso de la mayor dilución en la cual hubo hemaglutinación (7).

Pili Corregulado con la Toxina (TCP). Para la demostración de la presencia de TCP se realizó la técnica de Western blot (8, 9), utilizando un anticuerpo policlonal anti TcpA obtenido en conejos Nueva Zelandia de 2-3 kg de peso, a una concentración de 5 µg/mL y un patrón de peso molecular de la BIORAD de amplio rango (6 500-200 000 Da).

Hemolisina. El análisis de la hemolisina se realizó mediante la prueba de CAMP, empleando placas de agar sangre que contenían eritrocitos de carnero al 5% (10). Para esta prueba se utilizó la cepa Cowan 1 de *Staphylococcus aureus*.

Cápsula. La presencia de cápsula en las cepas O139 se evaluó a través de microscopía electrónica (ME). Las células se procesaron mediante el método de corte e inclusión. Las mediciones se realizaron sobre las microfotografías (11, 12).

Sensibilidad a antimicrobianos. La sensibilidad de las cepas a diferentes drogas antimicrobianas se determinó empleando

el sistema DIRAMIC 10, programa computadorizado que calcula el índice de inhibición que cada droga es capaz de producir. De acuerdo con el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano, se establecieron criterios cualitativos de sensibilidad: resistente (0-70%), intermedio (70-79%) y sensible (79-100%) (13). Las drogas antimicrobianas estudiadas fueron: tetraciclina (30 µg); ácido nalidíxico (30 µg); ampicilina (10 µg); estreptomina (10 µg); eritromicina (15 µg); sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg); cloranfenicol (30 µg); polimixina B (300U); ciprofloxacina (5µg); kanamicina (30 µg); furazolidona (15 µg); penicilina (10 U); doxiciclina (30 µg); oxacilina (1 µg) y rifampicina (2 µg) (14).

Resultados y Discusión

Como resultado de este estudio, observamos que las características morfológicas, culturales y bioquímicas de las cinco cepas de *V. cholerae* O139 fueron similares entre sí. Además se puso en evidencia la similitud planteada en la literatura entre el serogrupo O139 y el biotipo El Tor de *V. cholerae* O1 (14).

Sin embargo, el estudio serológico reveló que de las siete cepas de *V. cholerae*, cinco pertenecieron al serogrupo O139 (MDO12, 1837, SG251, 251a y MO45) y dos al serogrupo O1 (VC12, T19479), corroboró que los antígenos lipopolisacáridicos de las cepas O139, difieren de los de *V. cholerae* O1 (15).

La Figura 1 muestra los valores de FA obtenidos en el ensayo Ileal Loop, con diferentes cepas de *V. cholerae* O139. Se observa que las cepas epidémicas MO45, 1837 y MDO12, mostraron valores de FA significativamente superiores a los obtenidos para la cepa atenuada 251a y para la SG251.

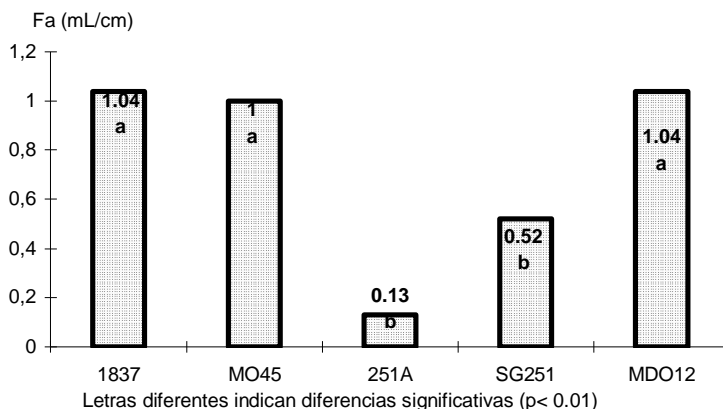


Figura 1. Fluido acumulado en Intestino Ligado de conejos inoculados con diferentes cepas de *V. Cholerae* O139

Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* O139

Gemma Año ⁽¹⁾; Hilda García ⁽¹⁾; Arturo Talavera ⁽¹⁾; Tania Valmaseda ⁽¹⁾; Rafael Fando ⁽²⁾; Bárbara Cedré ⁽¹⁾; Odelsa Ancheta ⁽²⁾; Gloria Roura ⁽²⁾; Luis García ⁽¹⁾.

1. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. La Habana, Cuba.
2. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

El surgimiento del serogrupo O139 de *Vibrio cholerae* y su asociación a diferentes brotes, ha provocado su inclusión en los estudios para la lucha contra el cólera. En tal sentido nuestro equipo se propuso realizar un estudio comparativo de las características microbiológicas, incluyendo los factores de virulencia de cuatro cepas epidémicas: *V. cholerae* O139, de la cepa vacunal 251a (O139), y dos cepas de *V. cholerae* O1. Los resultados mostraron similitud entre todas las cepas en cuanto a sus características tintoriales, culturales, bioquímicas y morfológicas, con excepción del grosor de la envoltura celular, que en las cepas O139 resultó ser mayor, posiblemente debido a la presencia de cápsulas. También fueron similares los resultados obtenidos en la determinación de la toxina de cólera (CT) mediante el ensayo lleal Loop y Southern blot, capacidad hemaglutinante, expresión de la subunidad A de la proteína estructural del pili (TcpA) por Western blot y actividad hemolítica observada a través de la prueba de CAMP. La sensibilidad a diferentes drogas antimicrobianas, empleando el sistema DIRAMIC-10, reportó que las cinco cepas del serogrupo O139 fueron sensibles a la tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, furazolidona, doxiciclina, ácido nalidíxico, kanamicina, penicilina y ciprofloxacina. Resultaron resistentes a estreptomycin, polimixina, sulfametoxazol-trimetoprim y a oxacilina. Sin embargo, las cepas O1 fueron sensibles al sulfametoxazol-trimetoprim y a la estreptomycin. Frente a rifampicina los resultados fueron variables. Estos resultados permiten un mayor grado de conocimiento sobre el serogrupo O139, comprobándose así la similitud existente con el biotipo El Tor de *V. cholerae* O1.

Palabras claves: *Vibrio cholerae* O139, identificación fenotípica, factores de virulencia, antibiograma.

Introducción

Hasta 1992, solamente *Vibrio cholerae* del serogrupo O1 había sido reconocido como agente causal del cólera. *V. cholerae* de los 137 serogrupos restantes, también conocidos como *V. cholerae* no-O1, nunca habían sido reportados como causantes de cólera epidémico.

El predominio del serogrupo O1 de *V. cholerae* como causante de epidemias y pandemias de cólera, fue anulado en octubre de 1992, cuando grandes brotes de esta enfermedad ocurrieron en el sur y este de la India y sur de Bangladesh, con la subsiguiente extensión a otras partes de Asia. El agente causal fue una nueva cepa toxigénica de serogrupo no-O1, que se denominó *V. cholerae* O139, sinónimo Bengal, que se piensa pueda ser el agente causal de la Octava Pandemia de Cólera (1).

A partir de esta nueva situación, el desarrollo de métodos inmuno-específicos de protección contra el cólera, toman en cuenta las cepas de *V. cholerae* O139. En tal sentido, existen pocos reportes sobre la caracterización de estas cepas, aunque se describe que comparten numerosas características con cepas El Tor de *V. cholerae* O1, sin embargo, difieren en cuanto a longitud y composición del polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular y en la presencia de cápsula, que está ausente en el serogrupo O1 (2).

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio comparativo de las características microbiológicas, incluyendo algunos factores de virulencia, de cepas epidémicas de *V.*

cholerae O139, la cepa vacunal 251a, atenuada por ingeniería genética y cepas de *V. cholerae* O1.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas. Se caracterizaron cinco cepas de *V. cholerae* correspondientes al serogrupo O139 (MDO12, MO45, 1837 y SG251), aisladas de pacientes, donadas por PhD R. Finkelstein de la Universidad de Missouri, Estados Unidos y la cepa 251a (*ctx A*, *ctx B*, *zot*, *ace*), mutada por técnicas de ingeniería genética en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), a partir de la cepa SG251 (Comunicación personal. Benítez y col.). Además se utilizaron como control dos cepas de referencia de *V. cholerae* O1, T19479 (biotipo El Tor, serotipo Inaba), donada por el departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Göteborg, Suecia, y la cepa VC12 (biotipo Clásico, serotipo Ogawa), donada por el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto Pasteur, Francia. Se partió de conservaciones almacenadas a -70 °C en Caldo Triptona Soya (TSB), que contenía glicerol al 20%.

Identificación fenotípica. La caracterización fisiológica y bioquímica de las cepas en estudio se realizó siguiendo la metodología recomendada en el Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3).

Serología. El análisis serológico se realizó a través del método de aglutinación en lámina. Los antiseros utilizados fueron obtenidos en el Laboratorio de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay siguiendo el esquema utilizado por Shimada (4).

VC12 (biotipo Clásico, serotipo Ogawa) hubo ausencia de hemólisis.

La mayoría de las cepas de *V. cholerae* no-O1 son hemolíticas y no se han encontrado diferencias biológicas, inmunológicas o fisicoquímicas con las hemolisinas del biotipo El Tor. Esta hemolisina es una potente toxina con actividad citotóxica y citolítica que provoca la acumulación de fluido en el intestino delgado (18).

El estudio de la superficie de células de diferentes cepas de *V. cholerae* por Microscopía Electrónica, permitió observar diferencias entre las mediciones realizadas a cepas O1 y O139. En la cepa del serogrupo O1, el grosor de la zona externa al límite citoplasmático fue alrededor de 20 nm y en las cepas O139 entre 35 y 40 nm (Figura 4). Generalmente la membrana citoplasmática de las células bacterianas mide de 7-10 nm.

Con el método empleado, se observaron diferencias de medidas entre el serogrupo O1 y el O139, lo que pudiera estar dado por la suma de la pared más la microcápsula (14, 15).

Al igual que en otras bacterias capsuladas, la presencia de esta estructura pudiera conferir mayor virulencia a los vibrios O139 (14).

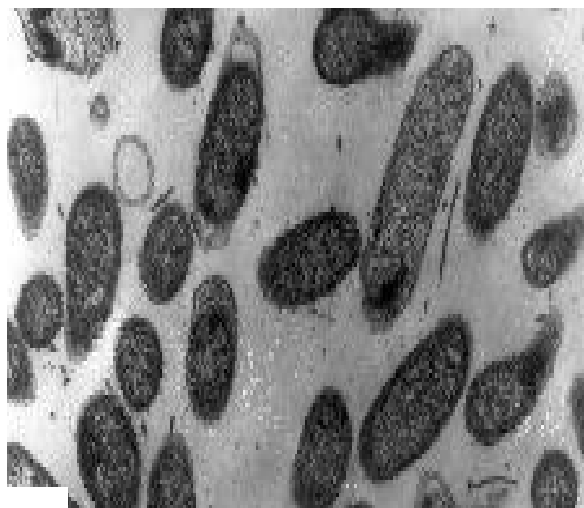
En el estudio de sensibilidad a las diferentes drogas antimicrobianas utilizadas se observó que las cinco cepas O139, fueron sensibles a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, furazolidona, doxiciclina, ácido nalidíxico, kanamicina, penicilina y ciprofloxacina, para un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano. A excepción de la cepa MDO12, que resultó ser sensible, las restantes O139 tuvieron niveles de inhibición intermedios (70-79%) con rifampicina. Todas las cepas O139 fueron resistentes a estreptomycin y polimixina. Cabe destacar la resistencia al sulfametoxazol-trimetoprim y a oxacilina, para los cuales se obtuvieron niveles de inhibición entre 0-8%. A diferencia de las cepas O139, las O1 resultaron sensibles al sulfametoxazol-trimetoprim y a la estreptomycin.

Los índices de inhibición del crecimiento bacteriano obtenidos en este estudio por el sistema **DIRAMIC 10**, mostraron concordancia con los resultados reportados por métodos tradicionales, orientados por la OMS, para estudios de sensibilidad antimicrobiana en cepas de ambos serogrupos (1).

La resistencia a antimicrobianos de cepas O1, así como el surgimiento de nuevos brotes de *V. cholerae* O139, es un problema en ascenso en algunas partes del mundo (1), por lo que se debe mantener una vigilancia periódica de la sensibilidad antimicrobiana en ambos serogrupos.

Los resultados obtenidos en este estudio, permiten un mejor conocimiento del serogrupo O139 de *V. cholerae*, comprobándose así algunas analogías y diferencias existentes con el biotipo El Tor de *V. cholerae* O1.

A



B



Figura 4. Microfotografía electrónica de cepas de *Vibrio cholerae* que demuestra la presencia de microcápsula en cepas del serogrupo O139. A) *Vibrio cholerae* O1. B) *Vibrio cholerae* O139. (x 19500).

Referencias

1. CDC/ NCID. OPS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Programa especial de publicaciones. Washington, EE.UU: CDC; 1994.
2. Calia EK, Murtagh M, Ferraro MJ, Calderwood SB. Comparison of *Vibrio cholerae* O139 with *Vibrio cholerae* O1 Classical and El tor Biotypes. *Infect Immun* 1994; 62:1504-06.
3. OPS/ OMS/ CDC/ NCID. Curso de Métodos de Laboratorio en el Diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Procedimientos de Laboratorio. Caracas, Venezuela: Octubre 22-25, 199: 4-7,17,29.
4. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsuchima A, Asai Y, Yamai S, et al. Extended Serotyping Scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology* 1994; 28:175-8.
5. De SN, Chatterje DN. An experimental study of the mechanisms of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J Pathol Bacteriol* 1953; 46:559-62.
6. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology*. Third Edition. United States: John Wiley & Sons Inc; 1995.
7. Jonson G, Svennerholm AM, Holgrem J. Identification of a Mannose-binding pilus on *Vibrio cholerae* El Tor. *Microbial Pathogenesis*. 1991; 11:433-7.
8. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227:680-5.
9. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76:4350-4.
10. Lesmana M, Rockhill RC. A CAMP phenomom between *Vibrio cholerae* biotype El Tor and Staphylococcal β - hemolysin. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 1985; 16:261-4.
11. Spurr AR. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1969; 26:31.
12. Reynolds ES. The use of lead citrate at right pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17:208.
13. Serufo JC, Pires AB, Dos Santos SG, et al. Diagnóstico Rápido da Infecção do Trato Urinario. Estudo comparativo com o Método Convencional. *BMJ* 1995; 69:155-64.
14. Albert JM. Minireview. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32:2345-9.
15. Johnson JA, Salles CA, Panigrahi P, Albert JM, Wright AC, Johnson RJ, Morris JG., Jr. *Vibrio cholerae* O139 Sinonym Bengal is Closely Related to *Vibrio cholerae* El tor but has Important Differences. *Infect.Immun* 1994; 62:2108-10.
16. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding Cholera Toxin. *Science*. 1996; 272:1910-14.
17. Kaper JB, Fasano A, Trucksis M. Toxins of *Vibrio cholerae*. In Wachsmuth IK, Blake PA, and Olsvik O, eds, *Vibrio cholerae and Cholera, Molecular to Global Perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1994: 145-68.
18. Jonson G, Svennerholm AM, Holgrem J. Expression of virulence factors by Classical and El Tor *Vibrio cholerae* *in vivo* and *in vitro*. *FEMS. Microbiol. Ecol*. 1990; 74: 221-8.

Microbiological characterization of *Vibrio cholerae* O 139 strains

Abstract

The outcoming and spreading of *Vibrio cholerae* O 139 serogroup and its association to different outbreaks have raised interest to conduct studies for the control of the disease. For those purposes a comparative study of different strains was carried out based upon their microbiological characteristics, including the virulence factors of four epidemic O 139 strains, the vaccinal 251 a (O 139) and two belonging to serogroup O 1. Staining, cultural, biochemical and morphological characteristics resulted similar among all the strains. Only the bacterial envelope was different, being thicker in O 139 strains, possibly due to the existence of the capsule. Another results such as the determination of cholera toxin (CT) by the ileal loop assay and the Southern Blot, the haemagglutinating activity, the expression of TcpA by Western Blot and the haemolytic activity by the CAMP test were also similar among the strains. The sensitivity to different antimicrobial drugs was determined using the Cuban automated system DIRAMIC-10; it showed that five O 139 serogroup strains were sensitive to tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, furazolidone, doxycycline, nalidixic acid, kanamicin, penicillin and ciprofloxacin, but resistant to streptomycin, polymyxin, trimetoprim-sulfamethoxazole and oxacillin. Contrarily, O 1 strains were sensitive to trimetoprim-sulfamethoxazole and streptomycin. Variable results were obtained to rifampicin. Those results allowed a better knowledge about O 139 serogroup and showed its similarity to El Tor biotype of *V. cholerae* O 1.

Keywords: *Vibrio cholerae* O 139; phenotypic identification; virulence factors; antibiogram.

Recibido: 3-11/1997

Aceptado: 12-2/1998