



Gastroenteritis aguda causada por *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 que porta una región homóloga a la isla de patogenicidad VpaI-7

María T. Ulloa F., Lorena Porte T., Stephanie Braun J., Jeannette Dabanch P.,
Alberto Fica C., Tania Henríquez A. y Carlos G. Osorio A.

Hospital Militar, Santiago,
Chile (LPT, SBJ, JDP, AFC).
Universidad de Chile,
Santiago, Chile.

Facultad de Medicina,
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Microbiología y
Micología (MTUF, THA, CGOA).

Los autores declaran no tener
conflictos de interés.

Financiamiento: Proyecto Innova-
Corfo 09CN14-5951.

Recibido: 25 de octubre de 2010
Aceptado: 14 de abril de 2011

Correspondencia a:

Carlos G Osorio A.
gonosorio@med.uchile.cl

Acute gastroenteritis caused by a *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain harboring a genetic region homologous to the VpaI-7 pathogenicity island

Pathogenic *Vibrio cholerae* isolates, the etiologic agents of cholera, generally express one of two O antigens (O1 or O139). Most environmental isolates are nonpathogenic and are referred to as “non-O1, non-O139”. However some *V. cholerae* non-O1, non-O139 strains are clearly pathogenic and have caused outbreaks or sporadic cases of gastroenteritis and extraintestinal infections in humans. We report a case of acute gastroenteritis by a *V. cholerae* non-O1, non-O139 harboring a genetic region homologous to a segment of the VpaI-7 *V. parahaemolyticus* pathogenicity island.

Key words: Gastroenteritis, *Vibrio cholerae*, non-O1, non-O139, pathogenicity island.

Palabras clave: Gastroenteritis, *Vibrio cholerae*, no-O1, no-O139, isla de patogenicidad.

Introducción

La bacteria gramnegativa *Vibrio cholerae* es el agente etiológico del cólera, un tipo de diarrea secretora que puede causar deshidratación grave y tener alta letalidad. La mayoría de las cepas patogénicas de *V. cholerae* poseen en su membrana externa un antígeno denominado O, porción más externa del lipopolisacárido (LPS), del tipo O1 u O139. La mayoría de las cepas ambientales de esta bacteria presenta otros tipos de antígeno O y por eso se categorizan como no-O1, no-O139¹⁻⁴. Sin embargo, algunas cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 poseen un claro poder patógeno y han causado brotes o casos esporádicos de gastroenteritis e infecciones extra-intestinales en humanos⁵⁻⁷.

La transmisión de *V. cholerae* no-O1 no-O139 se relaciona con el consumo de alimentos de origen marino, especialmente mariscos bivalvos crudos. Las infecciones en humanos causadas por *V. cholerae* no-O1, no-139 muestran variadas presentaciones clínicas; la más frecuente corresponde a un cuadro de gastroenteritis aguda con diferentes grados de gravedad. Una forma bastante infrecuente de esta infección es la septicemia^{5,6}. Los casos reportados de septicemia se asocian generalmente con inmunosupresión y/o daño hepático crónico. Unos pocos casos de asocian a infección cutánea primaria.

Los factores de virulencia que expresan las cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 prácticamente se desconocen.

Un trabajo realizado por el laboratorio de Mekalanos y cols., en el año 2005, describió por primera vez una cepa clínica de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que porta en su genoma un segmento homólogo de la isla de patogenicidad denominada VPaI-7 de *V. parahaemolyticus*⁷. Este segmento génico codifica para un sistema de secreción tipo III (TTSS) funcional que probablemente pueda estar contribuyendo a la virulencia de este tipo de cepas^{8,9}.

Este trabajo describe por primera vez en Chile un caso de gastroenteritis aguda cuyo agente etiológico corresponde a una cepa de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que porta una estructura genética similar a la descrita previamente por el grupo de Mekalanos.

Caso clínico

Mujer de 63 años con antecedentes de hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, dislipidemia en tratamiento y un episodio de diverticulitis aguda no complicada en el año 2004. A comienzos de enero de 2009, la paciente inició un cuadro caracterizado por deposiciones líquidas abundantes y explosivas con mucus, sin sangre ni pus, asociadas a dolor abdominal tipo cólico y fiebre de hasta 39 °C con calofríos. Por persistencia de los síntomas, consultó al segundo día de evolución en un centro privado de salud donde se le realizó una tomografía axial computarizada de abdomen, que demostró signos



compatibles con inflamación de fleon terminal, colon ascendente y transverso. Sólo se le indicó tratamiento sintomático. Por persistencia de diarrea grave de alta frecuencia y dolor abdominal asociado a vómitos, al tercer día de evolución, consultó al Servicio de Urgencia del Hospital Militar de Santiago, donde se decidió su internación con el diagnóstico de colitis infecciosa y deshidratación leve. Al examen físico de ingreso se constató una temperatura axilar de 37,4 °C, taquicardia con frecuencia de 113 x', presión arterial normal, signos de deshidratación leve y abdomen distendido, sensible en forma difusa y con ruidos hidroaéreos aumentados. Se solicitaron exámenes de laboratorio incluidos hemograma, hemocultivos, electrolitos plasmáticos, proteína C reactiva (PCR), glicemia y estudio de deposiciones (leucocitos fecales, coprocultivo, detección de rotavirus y adenovirus entérico). En los resultados sólo destacó una PCR elevada de 44,25 mg/dL (VN:0-1), hipokalemia de 3,11 mEq/L (VN: 3,5-5,3), glicemia discretamente elevada de 156 mg/dL (VN:70-99) y leucocitos fecales > 20 por campo. A las 24 horas de ingresar, se inició tratamiento con ceftriaxona y metronidazol, hidratación parenteral y corrección de la hipokalemia. El cuadro febril cedió, pero pese al tratamiento, la paciente persistió con diarrea intensa, entre 8-10 deposiciones/día, dolor abdominal y vómitos. Se obtuvo, además, el antecedente de tres personas relacionadas a la paciente que habrían presentado síntomas gastrointestinales similares, sin lograr más información. En el coprocultivo tomado al ingreso hubo desarrollo de un bacilo gramnegativo a las 72 horas de incubación, identificado como *Vibrio* spp. Los cultivos en agar TCBS y Chromoagar, la prueba de la oxidasa y la identificación por Microscan fueron concordantes con el diagnóstico presuntivo de *V. cholerae*. El aislado fue derivado al Programa de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile para su caracterización molecular. Se modificó el tratamiento antimicrobiano, continuando con ciprofloxacina 500 mg cada 12 horas por vía oral. Los hemocultivos fueron negativos al séptimo día. A los 10 días de evolución, la paciente presentó franca mejoría, cesando los vómitos y disminuyendo la frecuencia de las deposiciones. Completó ocho días de tratamiento antimicrobiano y fue dada de alta en buenas condiciones a los 11 días de evolución.

Caracterización molecular

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de esta nueva cepa clínica de *V. cholerae* no-O1, no-O139, ésta fue derivada al Laboratorio de Microbiología Molecular de Vibrios del Programa de Microbiología y Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Estudios de serotipificación con antisueros anti-O1 y anti-O139 demostraron que este aislado pertenece al tipo no-O1 y no-O139. Todos los partidores utilizados

en este estudio para ensayos de reacción de polimerasa en cadena (RPC) se detallan en la Tabla 1. Con el fin de corroborar los resultados serológicos se amplificó y secuenció una región del gen del ARN 16S utilizando el par de partidores: fD1 y rP2¹⁰. La secuencia obtenida (Laboratorio Dr. Andrew Camilli, Tufts University Medical School, Boston, MA, USA) fue analizada por BLAST confirmando con certeza que la secuencia pertenece a la especie *V. cholerae* (el mayor grado de identidad, esto es 99%, ocurrió con la cepa de *V. cholerae* AM-19226 que pertenece al tipo no-O1, no-O139). Entre los probables genes de virulencia de esta cepa se estudiaron por RPC estándar la toxina del cólera (CTX), el pilus TCP y la presencia de un segmento homólogo de la isla de patogenicidad denominada VPai-7 de *V. parahaemolyticus*⁴⁻⁷. El gen *ctxA* y *tcpA* codificantes para la subunidad catalítica de la CTX y la subunidad pilina del pilus TCP, respectivamente, resultaron ambos negativos. Se realizaron además ensayos de RPC estándar para amplificar diferentes segmentos, incluyendo ambos extremos y la zona central, de la región génica descrita previamente por el grupo de Mekalanos⁷. El objetivo de este ensayo fue establecer con cierto grado de confianza si nuestra cepa diarreogénica portaba esta estructura genética de manera completa o parcial. Para ello, los siguientes pares de partidores fueron utilizados: el par P5 fue diseñado para amplificar el segmento proximal de la isla de patogenicidad, el par Pm para la región central y el par P3 para su región terminal (Tabla 1, Figura 1). Los pares P5 y Pm amplificaron un fragmento del tamaño esperado. El par P3 amplificó un

Tabla 1. Partidores usados en la caracterización de la región genómica que presenta homología con la isla de patogenicidad Vpai-7 de *Vibrio parahaemolyticus* en cepas clínicas de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139^a

Partidor	Secuencia 5'-3'	Producto (bp)	Referencia
CTX-F	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	564	(9)
CTX-R	CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC		
TCPA-F	AGCCGCCTAGATAGTCTGTG	1.324	(4)
TCPA-R	TCGCCTCCAATAATCCGAC		
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1.500	(8)
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT		
P5f	CTTCATATTCAACACCTTC	2.500	Estudio actual
P5r	CTATGCTGTTAAACCTTTG		Estudio actual
Pmf	TAACTGATACAAGTACTAC	873	Estudio actual
Pmr	TAACTGGTTGACTCGAATC		Estudio actual
P3f	GTTCTCTGCGATATCACTAATG	1.832	Estudio actual
P3r	CATTTTCATTGACCACGAC		Estudio actual

^aTodos los partidores usados en este trabajo se diseñaron en base a la secuencia completa de la isla de patogenicidad DQ124262 (7) y de secuencias obtenidas en nuestro laboratorio.

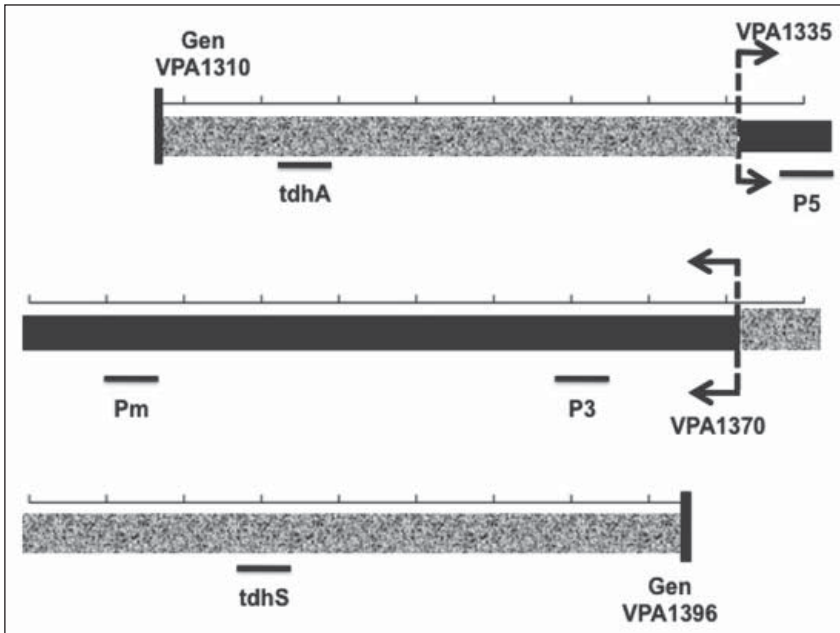


Figura 1. Esquema del segmento homólogo a isla de patogenicidad VpaI-7 de *V. parahaemolyticus* detectado recientemente en cepa de *V. cholerae* no-O1, no-O139 (7). La isla de patogenicidad original de *V. parahaemolyticus*, denominada VpaI-7, se extiende entre los genes VPA1310 y VPA-1396 (indicados en ambos extremos del esquema). La zona detectada en *V. cholerae* no-O1, no-O139 abarca aproximadamente la región entre los genes VPA1335 y VPA1370 (se acota con líneas punteadas y bloque de color negro). Los extremos de la isla VpaI-7, no presentes en *V. cholerae* no-O1, no-O139 se destacan en bloques con textura gris. Los pares de partidores utilizados para detectar esta isla se indican con segmentos de línea horizontal como P5, Pm y P3. Se indican como referencia los genes *tdhA* y *tdhS* de la isla VpaI-7 de *V. parahaemolyticus*.

segmento de un tamaño de aproximadamente 3.000 pb siendo el tamaño esperado 1.832 pb (Figura 2). Dada la diferencia de tamaños, el amplicón P3 fue secuenciado parcialmente para corroborar su identidad.

Discusión

En este trabajo se ha logrado caracterizar microbiológica y molecularmente una cepa clínica de la especie *V. cholerae*, perteneciente al serotipo no-O1, no-O139. En su gran mayoría, este tipo de cepas carece de los principales factores de virulencia presentes en *V. cholerae* O1/O139, tales como la toxina del cólera (CTX) y el pilus tipo IV denominado TCP^{2,3,11}. Sin embargo, algunos reportes recientes indican que estas cepas podrían compartir regiones de la isla de patogenicidad genómica denominada VpaI-7 de la especie *V. parahaemolyticus*⁷. La isla de patogenicidad VpaI-7 porta los principales genes de virulencia de este vibrión (gen *tdh* que codifica la hemolisina directa termoestable o TDH) y otros probables genes de virulencia (conocidos en inglés como *putative virulence genes*)¹². Fue así como nuestro laboratorio pudo describir una cepa clínica septicémica de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que portaba el gen *tdh*⁵.

En este trabajo se presenta un nuevo aislado de *V. cholerae* no-O1, no-O139, proveniente de un caso de gastroenteritis aguda y que porta una estructura genética homóloga a la descrita previamente por el grupo de Mekalanos⁷. Los amplicones P5 y Pm presentaron un tamaño esperado. El amplicón P3 correspondió a un segmento de aprox 3.000 pb, siendo el tamaño esperado 1.832 pb. Dada la diferencia de tamaños, este amplicón fue parcialmente secuenciado confirmándose su correspondencia con el segmento P3 previamente descrito. La diferencia de tamaños se explica por una inserción, aún no caracterizada, presente en el locus P3 de nuestra cepa diarreogénica. En breve, la confirmación de la presencia de estos tres segmentos genéticos (P5, Pm y P3) en nuestra cepa indica que ésta probablemente porta la estructura completa descrita originalmente⁷.

La información obtenida, junto con los datos de la literatura científica, permiten plantear la posibilidad de que un porcentaje mínimo de las cepas ambientales de *V. cholerae* no-O1, no-O139 haya captado e incorporado en el curso de la evolución trozos de la isla de patogenicidad de *V. parahaemolyticus*, y que este evento de transferencia genética horizontal las haya transformado en cepas patógenas para el ser humano. Sin embargo, dado el escaso número de cepas estudiadas hasta el momento, no es aún posible realizar inferencias precisas respecto a la importancia de este elemento genético. Actualmente estamos recolectando activamente cepas clínicas y ambientales de *V. cholerae* no-O1, no-O139 con el fin de determinar si esta región genética se concentra preferentemente en las cepas

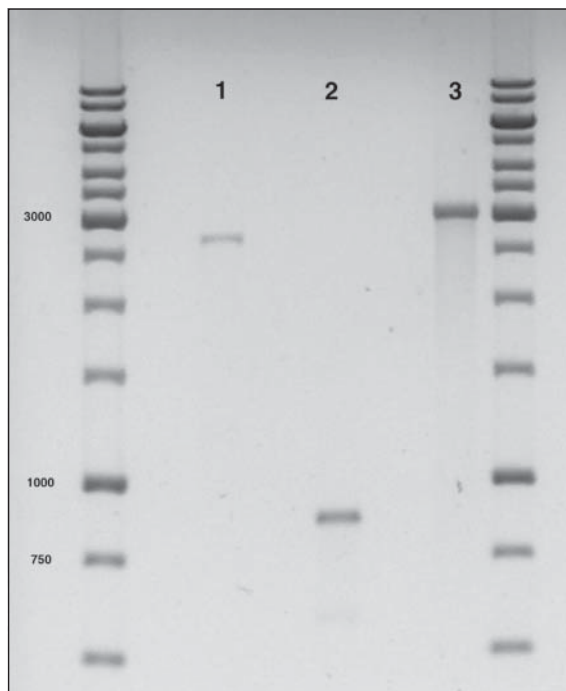


Figura 2. RPC estándar de segmento homólogo a isla de patogenicidad VpaI-7 de *V. parahaemolyticus* presente en cepa diarreogénica de *V. cholerae* no-O1, no-O139. Los siguientes pares de partidores fueron utilizados: P5 (tamaño esperado: aprox. 2.500 pb; carril 1); Pm (tamaño esperado: 873 pb; carril 2); P3 (tamaño esperado: 1.832 pb; carril 3). En ambos extremos se muestran marcadores de peso molecular de 1 kpb GeneRuler (ver detalles en el texto principal).



de tipo clínico respecto de las ambientales. Paralelamente, el estudio de mutantes nulas para esta región genética en modelos *in vivo* permitirá establecer con certeza el papel que esta estructura genética desempeña en virulencia. Es importante destacar que este tipo de cepas de *V. cholerae* se ha visto cada vez más activamente involucrado en diversos casos clínicos reportados en nuestro país: un caso de septicemia fatal en Valparaíso en 2006⁵, 15 aislados clínicos reportados en todo el país en 2009 por el Instituto de Salud Pública (ISP)¹³, una cepa clínica reportada en Santiago en 2009 (presente estudio) y seis aislados clínicos confirmados en un brote en Antofagasta 2010 por ISP¹³. Estos antecedentes demuestran la importancia clínica de este tipo de cepas de *V. cholerae* en nuestro país. Conjugando estos datos epidemiológicos con una probable sub-notificación de estos microorganismos en nuestro país, pone en evidencia la urgente necesidad de estudiar detalladamente la epidemiología y el potencial patogénico de *V. cholerae* no-O1, no-O139.

Agradecimientos. Al académico del Programa de Microbiología del ICBM, Germán Hermosilla, por su valioso aporte en la revisión y discusión de este trabajo.

Resumen

Cepas patogénicas de *Vibrio cholerae*, el agente causal del cólera, expresan generalmente uno de dos antígenos O (denominados O1 u O139). La mayoría de las cepas ambientales son no patogénicas y corresponden al tipo denominado “no-O1, no-O139”. Sin embargo, algunas cepas de este tipo son claramente patogénicas y han causado brotes de gastroenteritis e infecciones extra-intestinales en humanos. Se reporta un caso clínico de gastroenteritis aguda causado por una cepa de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que contiene en su genoma una región homóloga a un segmento de la isla de patogenicidad VpaI-7 descrita previamente en *V. parahaemolyticus*.

Referencias

- 1.- Bidinost C, Saka H, 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.
- 2.- Faruque S M, Albert M J, Mekalanos J J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1301-14.
- 3.- Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 403-31.
- 4.- Boyd E F, Waldor M K. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 serogroup isolates. *Microbiology* 2002; 148: 1655-66.
- 5.- Briceño I, Puebla C, Guerra F, Jensen D, Núñez H, Ulloa M T, et al. Primer caso septicemia fatal causada por *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 hemolítico en Chile. *Rev Med Chile* 2009; 137: 1193-6.
- 6.- Halabi M, Haditsch M, Renner F, Brinninger G, Mitter-Mayer H. *Vibrio cholerae* non-O1 septicaemia in a patient with liver cirrhosis and Billroth-II-gastrectomy. *J Infect* 1997; 34: 83-4.
- 7.- 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.
- 8.- Tam V C, Serruto D, Dziejman M, Briehner W, Mekalanos J J. 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.
- 9.- Alam A, Tam V, Hamilton E, Dziejman M. vttRA and vttRB encode ToxR family proteins that mediate bile-induced expression of type three secretion system genes in a non-O1/ non-O139 *Vibrio cholerae* strain. *Infect Immun* 2010; 78: 2554-70.
- 10.- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; 173: 697-703.
- 11.- Fields P, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2118-121.
- 12.- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 2003; 361:743-9.
- 13.- Comunicados epidemiológicos Instituto de Salud Pública de Chile. 2010. 6 y 7 de abril de 2010.