

## Vigilancia microbiológica de enteropatógenos bacterianos emergentes y reemergentes en Cuba

Microbiological surveillance of emerging and reemerging bacterial enteropathogens in Cuba

Adalberto Águila Sánchez<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0259-4394>

Anabel Fernández Abreu<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5395-5041>

Laura Bravo Fariñas<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2183-3119>

Yanaika Cruz Infante<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9825-2737>

María de los Ángeles León Venero<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2962-4090>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Dirección Nacional de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia. [adalberto@ipk.sld.cu](mailto:adalberto@ipk.sld.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** La vigilancia microbiológica y el control epidemiológico de las enfermedades diarreicas agudas causadas por el agua y alimentos contaminados adquieren mayor relevancia en países en vías de desarrollo. Por lo general la escasez de agua limpia, deficientes sistemas hidrosanitarios, conflictos armados, fenómenos naturales y la migración, provocan situaciones extremas que desencadenan brotes epidémicos.

**Objetivo:** Resumir las estrategias diagnósticas desarrolladas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de

Medicina Tropical Pedro Kourí para la confirmación diagnóstica de agentes enteropatógenos bacterianos emergentes y reemergentes y sus resultados.

**Desarrollo:** Se realizó una recopilación de las estrategias desarrolladas para la confirmación diagnóstica de agentes enterobacterianos emergentes y reemergentes, así como el reporte en tiempo real de importantes eventos de salud provocados por ellos en Cuba. Se describieron los algoritmos de vigilancia microbiológica y de caracterización fenotípica, molecular y genética realizados en cuatro investigaciones relacionadas con la confirmación de enteropatógenos bacterianos como agentes causales de brotes en el país de 1998 a 2015. Los resultados propiciaron los primeros reportes nacionales e internacionales de nuevos serogrupos de *Plesiomonas* sp.: O93, O94, O95 y O96; serotipos de *Plesiomonas* sp.: O17:H11; O11:H2; O23:H1a1c y O57:H3; patotipos de *E. coli* diarrogénicas: STEC O157:H7 y prototipo de la 7ma pandemia: *V. cholerae* O1, serotipo Ogawa, biotipo El Tor.

**Conclusiones:** Se confirmó la efectividad de la estrategia establecida con la implementación de técnicas de diagnóstico microbiológico convencionales, métodos de epidemiología molecular y genómicos. Se logró mayor profundidad, alcance, cobertura e inmediatez en los resultados. Lo anterior presupone el nuevo paradigma de la certificación internacional de los resultados ante estos tipos de eventos con impacto en salud pública.

**Palabras clave:** *Vibrio cholerae*; *Vibrio cholerae* O1; *Escherichia coli*; *Aeromonas*; *Plesiomonas*; monitoreo epidemiológico; Cuba.

## ABSTRACT

**Introduction:** Microbiological surveillance and epidemiological control of acute diarrheal diseases caused by contaminated water and food are particularly important in developing countries. Shortages of clean water, poor sanitation systems, armed conflicts, natural phenomena, and migration generally cause extreme situations, that trigger epidemic outbreaks.

**Objective:** Summarize the diagnostic strategies developed at the National Reference Laboratory for Acute Diarrheal Diseases of the Pedro Kourí Tropical Medicine Institute for the diagnostic confirmation of emerging and re-emerging bacterial enteropathogens and their results.

**Development:** A compilation was made of the strategies developed for the diagnostic confirmation of emerging and re-emerging enterobacterial agents, as well as the real-time reporting of important health events caused by them in Cuba. The algorithms for microbiological surveillance as well as for phenotypic, molecular and genetic characterization were described. These algorithms were used in four studies related to the confirmation of bacterial enteropathogens as causative agents of outbreaks in Cuba from 1998 to 2015. The results led to the first national and international reports of new *Plesiomonas* sp. serogroups: O93, O94, O95, and O96; *Plesiomonas* sp. serotypes: O17:H11; O11:H2; O23:H1a1c, and O57:H3; diarrheagenic *E. coli* pathotypes: STEC O157:H7; and the prototype of the 7th pandemic: *V. cholerae* O1, serotype Ogawa, biotype El Tor.

**Conclusions:** The effectiveness of the employed strategy was confirmed with the implementation of conventional diagnostic techniques, molecular epidemiology and genomic methods. Greater depth, scope, coverage and immediacy in the results were achieved. This presupposes the new paradigm of international certification of results in the face of these types of events with an impact on public health.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*; *Vibrio cholerae* O1; *Escherichia coli*; *Aeromonas*; *Plesiomonas*; epidemiological monitoring; Cuba.

Recibido: 26/06/2023

Aprobado: 08/11/2023

## Introducción

El aumento del flujo migratorio intercontinental y el movimiento de personas por viajes de turismo y de negocios son factores que establecen una intensa dinámica de intercambio mundial. Las enfermedades de transmisión digestiva (ETD) constituyen un serio problema en países en desarrollo, sobre todo en África, Asia y América Latina.<sup>(1)</sup> Además de los factores mencionados, el incremento de las ETD es motivado por el aumento del intercambio internacional de personas y de productos agroindustriales, sobre todo los provenientes de la acuicultura, para la alimentación de humanos y de animales, por lo que constituyen fuentes importantes de ETD en todo el mundo.<sup>(2)</sup>

Los principales enteropatógenos bacterianos emergentes implicados en las ETD son *Vibrio cholerae* O1-pandémico, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhi* y las especies de *Salmonella* no-tifoideas, *Shigella dysenteriae* tipo I, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas* sp.<sup>(3)</sup>

A nivel global las infecciones transmitidas por agua y alimentos contaminados representan alrededor del 70 % de los casos de enfermedades diarreicas agudas (EDA).<sup>(3)</sup> Los estudios recientes realizados en Australia, Reino Unido y Estados Unidos indican una proporción de 32 %, 26 % y 36 % respectivamente.<sup>(3)</sup> En los últimos años se han reportado más de 12 664 brotes de ETD provenientes de 22 países de la región de las Américas: 6 % del área andina, 63 % del Caribe, 4 % de Centro América, 10 % de Norteamérica y 17 % del Cono Sur. Se han afectado en estos brotes más de 460 282 personas y han fallecido alrededor de 634.<sup>(4)</sup>

Hoy día aún se reportan porcentajes elevados de brotes de ETD sin el diagnóstico microbiológico del agente etiológico. De los brotes estudiados con información de laboratorio, el 45 % fue por bacterias y el 21 % por virus. Los tres alimentos que se asociaron con mayor frecuencia a los brotes reportados fueron: el agua, con el 23% de casos, los pescados con el 18 % y las carnes rojas con el 12 %. Entre los principales agentes microbianos contaminantes causantes de brotes estuvieron *Salmonella* sp. y *E. coli* diarrogénicos.<sup>(3)</sup>

Los estudios realizados por el grupo de trabajo del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas (LNR-EDA) del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) han demostrado las potencialidades de los enteropatógenos bacterianos como causa de brotes y de casos aislados de diarreas agudas a partir del consumo de agua y alimentos contaminados. En ese sentido, se hace imprescindible el estudio clínico-epidemiológico y microbiológico de los fenómenos masivos relacionados con ETD, sobre todo los brotes diarreicos de grandes dimensiones.

La introducción y aplicación sistemática de tecnologías como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de punto final y de tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés), la electroforesis de campo pulsado (ECP) y la secuenciación genómica aportan un alto poder de discriminación en el análisis de los brotes diarreicos. Estas tecnologías están encaminadas a lograr evidencias científicas del origen, modo de transmisión y confirmación de los aislamientos genéticamente relacionados. Mediante los métodos de subtipificación molecular se logra determinar la variedad genética circulante, así como el conocimiento a gran profundidad y con alta precisión de los factores de colonización, virulencia, estructuras seroinmunológicas y los mecanismos de resistencia antimicrobiana.<sup>(5,6)</sup>

El LNR-EDA se propuso fortalecer el diagnóstico y lograr avances significativos en la caracterización microbiológica de los principales enteropatógenos bacterianos emergentes y reemergentes, con más énfasis en los que provocan mayor impacto en la salud de la población. Ante estos desafíos se inició la capacitación del personal técnico, la actualización científica de los profesionales y la introducción e implementación de nuevos métodos y tecnologías promisorias, con el objetivo de dar respuesta inmediata a los eventos masivos de salud y a su vez alertar de manera oportuna a las autoridades sanitarias.

En este trabajo se resumen las estrategias diagnósticas desarrolladas en el LNR-EDA del IPK para la confirmación de agentes enteropatógenos bacterianos emergentes y reemergentes y sus resultados.

## Estrategia diagnóstica y resultados de la vigilancia microbiológica de enteropatógenos bacterianos emergentes y reemergentes en Cuba

En el período de 1998 a 2015 se realizaron cuatro investigaciones relacionadas con la confirmación diagnóstica de enteropatógenos bacterianos como agentes causales de brotes diarreicos en el país. Se utilizaron técnicas diagnósticas que incluyeron los métodos convencionales, de biología molecular y de subtipificación genética. La estrategia diagnóstica empleada en cada uno de los eventos epidemiológicos que fueron enfrentados con éxito se resume a continuación (fig. 1 y 2).

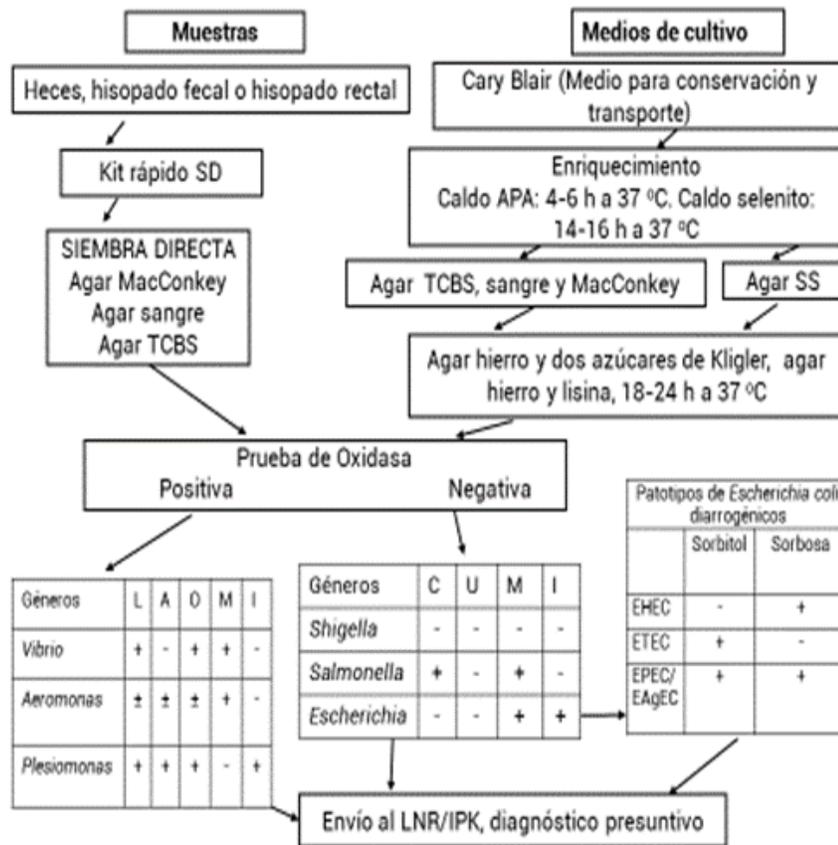
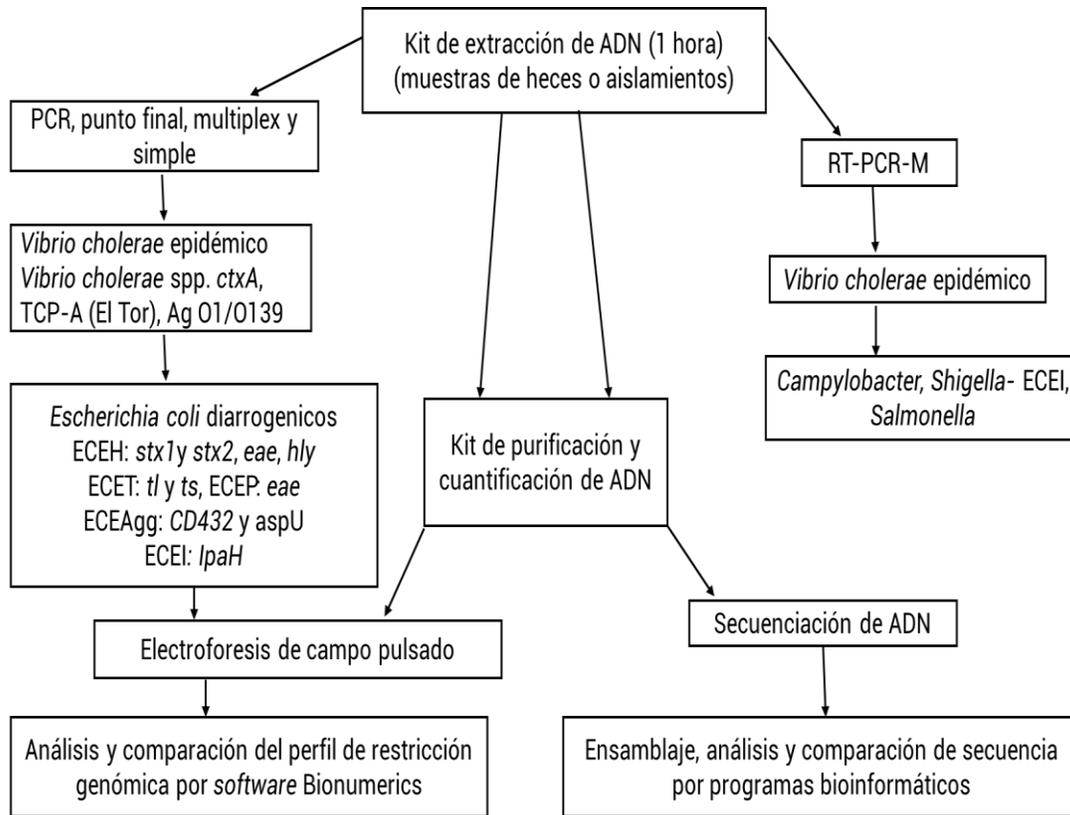


Fig. 1 - Algoritmo para el diagnóstico y la caracterización fenotípica

Agar MacConkey: Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de enterobacterias. Agar SS: Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de especies de *Shigella* y *Salmonella*. Agar TCBS: Medio diferencial para el aislamiento de *Vibrio cholerae*. APA: Agua de peptona alcalina. Kit rápido SD: Kit para la identificación de serogrupos epidémicos de *V. cholerae* O1/O139 (SD-Bioline-Corea del Sur). LNR/IPK: Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí.



**Fig. 2** - Algoritmo para el diagnóstico y la caracterización genotípica

ADN: Ácido desoxirribonucleico. RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. RT-PCR-M: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real multiplex.

Un resumen de los cuatro eventos epidémicos de enfermedad diarreica aguda ocurridos en Cuba en el período mencionado y abordados con éxito por el LNR-EDA se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1-** Eventos epidémicos abordados por el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas (LNR-EDA) del IPK, 1998-2015

Fecha del evento	Organismo	Brote (casos)	Confirm. Diag. fenotípica	Confirm. Diag. genotípica	Caract. fenotípica	Caract. genotípica	Aporte del LNR-EDA
1998-2006	<i>Aeromonas</i>	Holguín (4) La Habana (9)	Convencional	-	Determ. RAM	ECP	Brote definido
1998-2006	<i>Plesiomonas</i>	Santiago de Cuba (99)	Convencional	-	Determ. RAM	-	Reporte de 4 nuevos serogrupos
2009	STEC O157.H7	La Habana (6)	Convencional	PCR-M, punto final	Determ. RAM	ECP	Primer reporte 6 STEC O157
2012-2015	<i>V. cholerae</i> O1, epidémico	Cuba (brotes en el país)	Convencional	PCR-M, punto final	Determ. RAM	ECP y la secuencia parcial de ADN	Enfrentamiento exitoso de la epidemia

ADN: Ácido desoxirribonucleico. Caract.: Caracterización. ECP: Electroforesis de campo pulsado. IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. PCR-M: Reacción en cadena de la polimerasa multiplex. RAM: Resistencia antimicrobiana. STEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.

### ***Aeromonas* spp. enteropatógeno emergente, causante de brotes de diarreas agudas y procesos extraintestinales (1998-2006)**

Los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas* han sido reconocidos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos como patógenos emergentes. Ellos habitan en aguas subterráneas, aguas potables y de tratamiento, sistemas de distribución de aguas, plantas de reservas de aguas, así como lagos y ríos contaminados, carne, pescado, vegetales, leche natural y aves comestibles.<sup>(7)</sup>

Este agente desempeña un papel importante como patógeno primario a nivel del tracto gastrointestinal, pero también es capaz de producir bacteriemia, septicemia, meningitis, neumonía, peritonitis, miocarditis, infecciones urinarias, hepatobiliares,

respiratorias, oculares y vaginales, fascitis necrotizante, infecciones de heridas e infecciones nosocomiales, que traen como consecuencia el síndrome urémico hemolítico (SUH).<sup>(8)</sup> Por tal motivo, el LNR-EDA y los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) se propusieron realizar la vigilancia microbiológica del género *Aeromonas* en el país.

Se realizaron diferentes estudios con aislamientos de *Aeromonas* spp. recuperados de procesos infecciosos humanos, del medio ambiente acuático, de alimentos y de animales. Los aislamientos recibidos en el LNR-EDA se obtuvieron a partir de heces de niños menores de cinco años con un cuadro clínico de enfermedad diarreica, y de diferentes muestras intestinales y extraintestinales, como hemocultivos, líquido cefalorraquídeo, urocultivos, pus de heridas, exudados óticos, exudados conjuntivales, de catéter, de lesión de piel, exudados faríngeos, bilicultivo, secreción articular, restos placentarios, esputo, úlcera de pie, heridas quirúrgicas, secreción vaginal y endocervical, agua y alimentos,<sup>(9,10)</sup> y animales (anfibios).<sup>(9)</sup> Otros 15 aislamientos fueron obtenidos de dos brotes de infección nosocomial ocurridos en el Cardiocentro del Hospital Pediátrico William Soler de La Habana y en el Hospital Clínico Quirúrgico Luis Íñiguez de Holguín. A todos se les realizó la caracterización fenotípica: identificación de género y especies, susceptibilidad antimicrobiana y determinación de factores de virulencia. A los aislamientos correspondientes al brote se les realizó también el análisis de macrorrestricción del ADN, mediante la técnica de ECP. Todos los aislamientos pertenecieron al género *Aeromonas*, siendo *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv *sobria* las especies identificadas en mayor proporción.<sup>(11,12)</sup> Los aislamientos de pacientes con EDA demostraron altos porcentajes de resistencia para cefalotina, sulfonamida y ácido nalidíxico, y se obtuvieron nueve patrones de multirresistencia. Se demostró la presencia de al menos un factor de virulencia asociado a la enteropatogenicidad en los aislamientos intestinales, y en más del 50 % de los de origen extraintestinal.<sup>(13,14)</sup>

Mediante la técnica de ECP se demostró que cuatro de los aislamientos procedentes del brote de Holguín presentaron los mismos patrones de restricción,

mientras que nueve de los procedentes del brote del Hospital Pediátrico William Soler presentaron los mismos patrones, por lo que fueron identificados como los causantes de los brotes. Todos los hallazgos obtenidos en el estudio demostraron que los microorganismos del género *Aeromonas* son un importante patógeno bacteriano, por lo que en todo protocolo de investigación relacionado con los procesos infecciosos se debe incluir este agente, para garantizar el diagnóstico y control de las EDA.<sup>(15)</sup>

Este trabajo constituye el primer estudio en Cuba de caracterización del género *Aeromonas* en aislamientos obtenidos de casos esporádicos y de brotes.

### ***Plesiomonas* sp. como causa del síndrome neurológico infeccioso y nuevos serotipos, primer reporte nacional y subregional (1998-2006)**

La principal evidencia de que *Plesiomonas shigelloides* es un patógeno entérico consiste en que este microorganismo se ha aislado de personas con diarrea (1-16 %) más frecuentemente que de las heces de personas sin diarreas (0,1 %).<sup>(16)</sup> Entre los factores potenciales de virulencia asociados con su patogenicidad, se encuentran la invasividad y la enterotoxigenicidad (toxina termoestable), entre otros. Estos factores son motivo de estudio en diferentes áreas geográficas, asociados con la diarrea del viajero en áreas tropicales y subtropicales.<sup>(16)</sup> Con una sola especie y múltiples serotipos se conoce que *P. shigelloides* presenta reacción cruzada con algunos serotipos del género *Shigella*, como el O17:H11, que tiene un lipopolisacárido idéntico al de *Shigella sonnei* fase 1, O11:H11 (*S. dysenteriae* 8 serotipos), O22:H3 (*S. dysenteriae* 7 serotipos), O23:H1a1c (*S. boydii* 13 serotipos), O54:H2 (*S. boydii* 2 serotipos), O57:H3 (*S. boydii* 9 serotipos) y O93:H2 (*S. dysenteriae* 6 serotipos).<sup>(17)</sup>

En este estudio se investigó la estructura antigénica y la susceptibilidad antimicrobiana en 99 aislamientos obtenidos de pacientes con enfermedad diarreica aguda, seis procedentes de un brote de enfermedad de transmisión digestiva en Santiago de Cuba y un aislamiento de un paciente fallecido por síndrome neurológico infeccioso (meningitis). Se identificaron cuatro nuevos serogrupos no descritos con anterioridad en la clasificación mundial: O93, O94, O95 y O96 (tabla 2), que fueron incluidos en el Esquema de Serotipaje Internacional, por el Centro de Referencia Internacional de Praga, República Checa.

Se demostró por primera vez en Cuba la circulación de los serotipos O17:H11; O11:H2; O23:H1a1c y O57:H3 (tabla 2) que presentan reacción cruzada con el género *Shigella*. Los aislamientos procedentes del brote de enfermedad de transmisión digestiva correspondieron al serotipo O50:H11 y en ellos se evidenció la presencia de toxina termoestable. Se describió el primer caso reportado en Cuba de síndrome neurológico infeccioso con etiología por *Plesiomonas shigelloides*, que correspondió al serotipo O50:H11. Se demostró el patrón de resistencia antimicrobiana reportado internacionalmente.<sup>(18)</sup>

En la tabla 2 se describen los serotipos encontrados en la investigación según las provincias del país.

**Tabla 2** - Serotipos de *Plesiomonas shigelloide* identificados por provincias en Cuba (1990-1998)\*

Provincias	Serotipos
Pinar del Río	O17:H11, O11:H2 O8:H3, O1:H1a1c O2:H1a1c
Ciudad de la Habana	O58:H2, O3:H2, O4:H49
Matanzas	O23:H1a1c, O7:H40, O1:H1a1b, O22:H3
Villa clara	O51:H1a1c
Ciego de Ávila	O52:H3
Camagüey	O17:H11, O26:H1a1c, O11:H2, O3:H2, O57:H3, O55:H46, O7:H40, O35:H11, O95:H11, O94:H3, O5:H38, O83:H45, O96:H18, O19:H2, O5:H38, O12:NM, O1:H1a1b, O42:H2
Las Tunas	O17:H11, O22:H3, O63:NM
Holguín	O36:H34, O51:H38, O63:NM, O22:H3, O17:H11, O4:H49, O7:H40
Santiago de Cuba	O83:H45, O25:H3, O55:H43, O9:H2, O63:NM, O38:H8, O10:H41, O22:H3, O50:H11
Granma	O38:H8, O10:H41, O7:H40, O50:H11
Guantánamo	O93:H2, O4:H49, O7:H40
Isla de la Juventud (Municipio especial)	O7:H40, O22:H3

\*En color rojo los nuevos serogrupos encontrados, no descritos con anterioridad en la clasificación mundial.

Fuente: Bravo L, et al.<sup>(18)</sup>

## **Aislamiento y confirmación de *Escherichia coli* O157:H7, primer reporte en Cuba y la subregión de Centro América y el Caribe (2005-2007)**

Se realizó la confirmación diagnóstica de los primeros aislamientos de *Escherichia coli* enterohemorrágicos, seropatotipo O157:H7 en el LNR-EDA, lo cual constituyó el primer reporte en la subregión. El seropatotipo O157:H7 de la categoría enterohemorrágico está considerado por la OMS como un microorganismo emergente y zoonótico, de interés clínico y epidemiológico, capaz de provocar complicaciones clínicas y muerte.<sup>(19,20)</sup>

La identificación y diagnóstico microbiológico de este seropatotipo se considera complejo y exclusivo de países desarrollados. Son pocos los países con bajos recursos que pueden lograr este diagnóstico, entre ellos Cuba.<sup>(19,21)</sup> Este seropatotipo O157:H7 puede provocar complicaciones graves en niños menores de cinco años de edad (del 5 al 6 %). Las afecciones van desde afectaciones invalidantes para toda la vida hasta la muerte. La principal complicación en estos pacientes es el SUH, caracterizado por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y fenómenos trombocitopénicos trombóticos.<sup>(22,23)</sup> La gravedad del cuadro clínico y las complicaciones e incapacidad que puede producir esta bacteria constituyeron suficientes razones para que los especialistas del LNR-EDA implementaran un esquema de vigilancia nacional microbiológica que brindara una mayor protección a la población infantil y también a pacientes con vulnerabilidades inmunológicas.

En un estudio retrospectivo realizado con 200 aislamientos recolectados desde 1999 hasta 2007, procedentes de los CPHEM y recibidos en el LNR-EDA con el diagnóstico presuntivo de *E. coli* enterohemorrágico, se confirmó el diagnóstico por métodos convencionales y moleculares del género y la especie de *E. coli* diarrogénica, del seropatotipo O157:H7.<sup>(19,24)</sup> Por medio de una PCR múltiple de punto final, se confirmó el serogrupo O157, la tenencia de los genes de la

citotoxinas *stx1* y *stx2*,<sup>(25,26)</sup> el gen *eae* de la proteína intimina<sup>(27)</sup> y el plásmido p-O157, relacionado con la producción de enterohemolisina *ehxA*.<sup>(26)</sup>

Los aislamientos de *E. coli* serotipo O157:H7 se recuperaron a partir de heces diarreicas de niños menores de cinco años de edad. A los aislamientos confirmados se les determinó el fenotipo de resistencia antimicrobiana a través del método de Kirby-Bauer,<sup>(28,29)</sup> siguiendo las recomendaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio de los Estados Unidos (CLSI, por sus siglas en inglés). Todos los aislamientos resultaron sensibles a los antimicrobianos probados y pertenecieron al fagotipo PT4.<sup>(30,31)</sup>

Por la combinación de dos métodos moleculares, la PCR múltiple y el análisis del polimorfismo del fragmento de restricción genómico (RFLP por sus siglas en inglés) se determinaron las variantes de la citotoxina Stx 2. A partir del producto amplificado se determinó el genotipo de los aislamientos confirmados.<sup>(25,30)</sup> Se obtuvieron dos genotipos toxigénicos: el primero, *stx2,eae,ehxA*, que correspondía a tres aislamientos con solo la presencia de *stx2*, y el segundo, *stx1-stx2, eae, ehxA*, que incluía las dos aislamientos restantes que poseían ambas citotoxinas. Ambos genotipos pertenecen al grupo del seropatotipo A de *stx2* (patrón *stx2vh-a*), resultado que encierra un potencial patogénico de consideración, por su amplia participación en eventos epidémicos de *STEC* O157:H7 en todo el mundo, acumulando protagonismo internacional.<sup>(24,25)</sup>

En la ECP se utilizó la enzima de restricción *XbaI*, para obtener perfiles de restricción genómica, los que mostraron amplia variedad genética, característica de la especie *E. coli*. Los cinco perfiles de restricción se registraron en la Base de Datos Nacional (BDN) y en la Base de Datos Regional (BDR) de PulseNet América Latina y Caribe (PNALC). Al ser registrados los cinco perfiles correspondientes a los aislamientos cubanos de *STEC* O157:H7, sus administradores notificaron al IPK que se trataba de un aporte significativo, porque eran perfiles de restricción genómica únicos, sin antecedentes en la base de datos regional.<sup>(19,30)</sup>

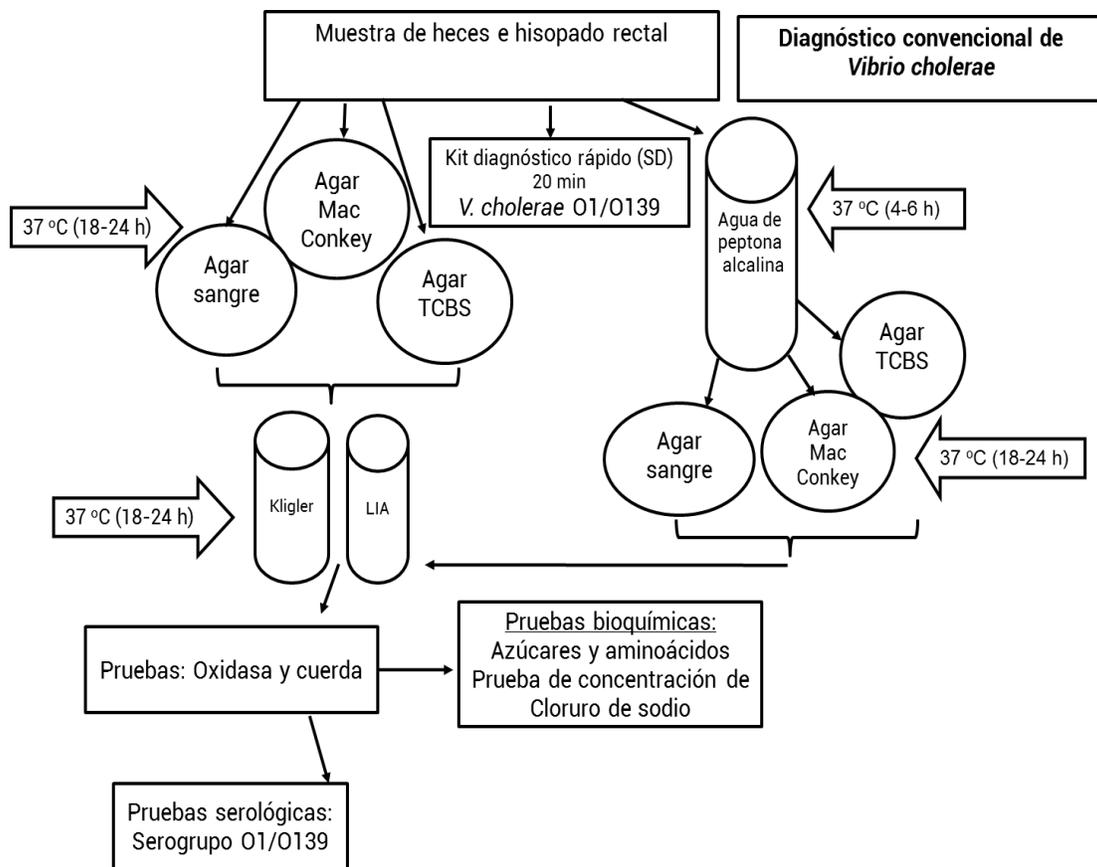
## Enfrentamiento de la epidemia de cólera, vigilancia geno-fenotípica de *Vibrio cholerae* O1, pandémico (2012-2015)

La epidemia de cólera se confirmó en Haití en octubre de 2010. A partir de entonces las autoridades del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) indicaron el fortalecimiento de la vigilancia de *V. cholerae* O1 epidémico. Desde que se emitió la alerta regional por parte de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS),<sup>(32)</sup> el LNR-EDA realizó acciones para fortalecer la vigilancia microbiológica en todo el país, con prioridad en la capacitación del personal que garantizaba la identificación del agente del cólera en toda la Red Nacional de Laboratorios de Microbiología. Entre las principales acciones se introdujo el uso del estuche de diagnóstico rápido (kit rápido de cólera, SD-Bioline, Cholera Rapid Diagnostic Test, Corea del Sur) para *V. cholerae* O1/O139, con el que se realiza la identificación presuntiva de ambos serogrupos epidémicos.<sup>(33)</sup> Por otra parte, se implementó el coprocultivo acortado (48-72 h), con el que se confirmaron los resultados presuntivos positivos del kit rápido de cólera, distribuido en todo el país, con la aplicación de un nuevo algoritmo diagnóstico para *V. cholerae* O1/O139 como parte de la nueva estrategia diagnóstica.<sup>(34)</sup> Un resumen del flujograma para la identificación presuntiva y el diagnóstico convencional de *Vibrio cholerae* O1 se muestra en la fig. 3.

El LNR-EDA normalizó cinco PCR de punto final mediante la aplicación de los protocolos establecidos por autores en estudios internacionales.<sup>(35,36)</sup> Por medio de la ECP se obtuvieron los perfiles de restricción genómica (definición de la variabilidad genética circulante en el país), para lo cual fue utilizado el protocolo Backit y el equipo cubano Guefast-06 (ambos del Centro de Neurociencias de Cuba).<sup>(37,38)</sup>

Se realizó la secuenciación parcial del ADN de las cepas confirmadas como *V. cholerae* O1 epidémico, para lo que se requirió la extracción, purificación y cuantificación del ADN. Para esta secuenciación parcial se utilizó la metodología y equipo Sanger (Reino Unido).<sup>(38,39)</sup>

En junio de 2012 se detectaron los primeros casos de cólera en Manzanillo (provincia Granma). La identificación presuntiva de los casos con el kit rápido de cólera y más tarde la confirmación diagnóstica de *V. cholerae* O1 por medio del coprocultivo acertado constituyeron las evidencias microbiológicas clave para alertar al Programa Nacional y a la dirección del MINSAP. Estos procedimientos se generalizaron en todo el país y se favoreció la activación de acciones de contención ante el surgimiento de nuevos casos sospechosos de cólera, lo cual contribuyó a limitar su transmisibilidad e impacto negativo en la población. El procedimiento normado por el LNR-EDA del IPK (fig. 3) fue seguido en todo el país durante el evento epidémico de cólera.



**Fig. 3 -** Flujograma de identificación presuntiva y diagnóstico convencional de *Vibrio cholerae* O1, epidémico

Agar MacConkey: Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de enterobacterias. Agar TCBS: Medio diferencial para el aislamiento de *Vibrio cholerae*. Kit diagnóstico rápido SD: Kit para la identificación de serogrupos epidémicos de *V. cholerae* O1/O139 (SD-Bioline-Corea del Sur).

Los primeros aislamientos de *V. cholerae* O1 de Manzanillo fueron recibidos en el LNR-EDA en 48 horas (confirmación diagnóstica), lo que permitió realizar los PCR múltiple de punto final previamente normalizados. Por medio del PCR se pudo confirmar la especie *V. cholerae*, el serogrupo O1, la capacidad de producir la toxina del cólera y el factor de colonización *tcp-A*, revelando que pertenecía al biotipo El Tor. Por otro lado, se obtuvieron resultados negativos para la toxina termolábil (TL) y la proteína reguladora (ToxR). La utilización de los antisueros clasificadores reveló el serogrupo O1 y el serotipo Ogawa. Los resultados de las pruebas serológicas, de susceptibilidad antimicrobiana y moleculares, evidenciaron que los aislamientos de *V. cholerae* O1 coincidían con el antibiograma y las características geno-fenotípicas del *V. cholerae* O1 que circuló en Haití.<sup>(40,41)</sup>

La subtipificación molecular por medio de ECP con la enzima de restricción *NotI* confirmó la circulación de una sola variante genética de *V. cholerae* O1. La transmisibilidad espacio-temporal por el territorio nacional quedó demostrada al obtenerse un solo perfil de restricción genómica. Por otra parte, teniendo en cuenta la ruta crítica seguida por el agente del cólera, se pudo inferir que se trataba de una sola introducción en el país y que hasta ese momento mostraba muy buena estabilidad genética.<sup>(39,40)</sup>

Se demostró por métodos genéticos el origen y procedencia del agente de la epidemia cubana de cólera, partiendo de estudios de secuenciación parcial del genoma y la utilización del método bioinformático para la interpretación de los resultados. Se ratificó la especie y estructura genética de la toxina del cólera, importante factor de virulencia del agente.<sup>(42,43)</sup>

La secuenciación del ADN confirmó la relación entre patrones genéticos casi idénticos de los aislamientos de *V. cholerae* O1 de Haití y los cubanos, indicando una estrecha relación genómica. A su vez se evidenció una aproximación genética con las cepas de Nepal.<sup>(44,45)</sup> Al examinar los aislamientos representativos de ambos brotes se observó una similitud genética del 99 %. Por lo tanto, al analizar la fecha del ancestro común más reciente, los aislamientos de *V. cholerae* O1 de Manzanillo coincidieron con el marco temporal del brote de Haití, sumando pruebas

abrumadoras de que los aislamientos de *V. cholerae* O1 cubanos procedían del vecino país.<sup>(45)</sup> El uso del método de secuenciación de ADN no se había aplicado antes en Cuba para *V. cholerae* O1 epidémico.

En la actualidad se imponen nuevos criterios que condicionan la nueva estrategia genómica que define a las cepas de *V. cholerae* O1 como pandémicas o no, a lo que se le ha llamado el nuevo paradigma en las investigaciones epidemiológicas relacionadas con las ETD.<sup>(43,46)</sup>

## Conclusiones

Se confirmó la efectividad de la estrategia establecida en el LNR-EDA del IPK para el diagnóstico de enteropatógenos bacterianos emergentes y reemergentes, con la implementación de técnicas de diagnóstico microbiológico convencionales, métodos de epidemiología molecular y genómicos. Con ello se logró mayor profundidad, alcance, cobertura e inmediatez en los resultados. Esto presupone el nuevo paradigma de la certificación internacional de los resultados ante este tipo de eventos con impacto en la salud pública.

## Referencias bibliográficas

1. Davies HG, Bowman C, Luby SP. Cholera—management and prevention. *J Infect.* 2017;74:S66-S73. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(17\)30194-9](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(17)30194-9)
2. Botta R, Asche F, Borsum JS, Camp EV. A review of global oyster aquaculture production and consumption. *Mar Policy.* 2020;117:103952. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41208-023-00558-1>
3. D'Mello-Guyett L, Gallandat K, Van den Bergh R, Taylor D, Bulit G, Legros D, et al. Prevention and control of cholera with household and community water, sanitation and hygiene (WASH) interventions: a scoping review of current international guidelines. *PLOS One.* 2020;15:e0226549. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226549>

4. Kanungo S, Azman AS, Ramamurthy T, Deen J, Dutta S. Cholera. *Lancet*. 2022;399:1429-40. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00330-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00330-0)
5. Ramamurthy T, Pragasam AK, Taylor-Brown A, Vasudeman K, Das B, Srivastava SK, et al. *Vibrio cholerae* O139 genomes provide a clue to why it may have failed to usher in the eighth cholera pandemic. *Nat Commun*. 2022;13:3864. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31391-4>
6. Balasubramanian D, Murcia S, Ogbunugafor CB, Gavilan R, Almagro-Moreno S. Cholera dynamics: lessons from an epidemic. *J Med Microbiol*. 2021;20:106. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001298>
7. Gonzalez-Avila LU, Loyola-Cruz MA, Hernández-Cortez C, Bello-López JM, Castro-Escarpulli G. Colistin. Resistance in *Aeromonas* spp. *Int J Mol Sci*. 2021;22:5974. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22115974>
8. Pokhrel BM, Thapa N. Prevalence of *Aeromonas* in different clinical and water samples with special references to gastroenteritis. *Nepal Med Coll J*. 2004;6:139-43. DOI: <https://doi.org/10.1159/000098248>
9. Bravo L, Monté R, Zorrilla C, Padilla M. Aplicación del método del Hisopo de Moore para el aislamiento de *Aeromonas*. *Rev Cubana Med Trop*. 1989 [acceso 26/05/2023];41(3):413-8. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-85555>
10. Bravo L, Monté R, Martínez R, García B. Determinación de especies de *Aeromonas* en aguas y alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr*. 1992;6(2):108-11.
11. Bravo Fariñas L, San Germán Suárez S, Fernández Abreu A, Ramírez Alvarez M, Morier Díaz L, et al. Factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 2008 [acceso 26/05/2023];60(2):130-35. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602008000200005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000200005)
12. Fernández Abreu A, Bravo Fariñas L, Ramírez Alvarez M, Fernández Andreu C, Ledo Ginarte Y, Correa Martínez Y, et al. Aislamiento e identificación de *Aeromonas* y *Plesiomonas* en el embalse "Niña Bonita", Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev*

Cubana Med Trop. 2008 [acceso 13/02/2023];60(2):184-6. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602008000200013](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000200013)

13. Bravo L, Monté R, Alfonso V, Cabrera N, Gómez M, Hernández R, et al. Nuevas especies de *Aeromonas* aisladas en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 1995 [acceso 13/02/2023];47(3):215-6. Disponible en:  
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/estargetblank/cum-8221>

14. Vázquez Piloto A, González Ramírez AN, Cruz Robaina JC, Monte Boada RJ, Bravo Fariñas L, Alvaraz Medina AL. Neumonía por *Aeromonas hydrophila* asociada a un accidente de tránsito. Rev Cubana Med Trop. 1996 [acceso 13/02/2023];48(1):50-2. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601996000100009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601996000100009)

15. Bravo L, Cabrera L. Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas*. Rev Cubana Med Trop. 2005;57(2):54-7.

16. Owusu M, Nkrumah B, Mensah EK, Lamptey J, Acheampong G, Sambian D, et al. Surveillance and laboratory collaboration in response to an outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*, *Plesiomonas shigelloides*, and *Aeromonas hydrophila* in Sekondi-Takoradi, Ghana: a case series. J Med Case Reports. 2022;16(53). DOI:  
<https://doi.org/10.1186/s13256-021-03243-0>

17. González-Rey C, Siitonen A, Pavlova A, Ciznar I, Svenson SB, Krovacek K. Molecular evidence of *Plesiomonas shigelloides* as a possible zoonotic agent. Folia Microbiol. 2011;56:178-84. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0032-2>

18. Bravo L, Cabrera R, Ramírez M, Llop A, Fernández A, García B, et al. *Plesiomonas shigelloides* una Vibrionaceae en quien pensar. Rev Cubana Med Trop. 2000 [acceso 12/02/2023];52(1):10-4. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602000000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602000000100002)

19. Águila Sánchez A, Bernedo Navarro R, Falcón Márquez R, Fonseca Quintana M, Sarmiento Pérez L, Domínguez Guilarte O, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

- O157:H7 Isolates From Children in Cuba. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(12):1122-3. DOI: <https://doi.org/10.1097/inf.0b013e31818a8981>
20. Alarcón MA, Escobar GS, Palma ME, Chang AF, Guaminga JR, Tutillo DO. *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida comercializada en los mercados de Guayaquil. *J Am Health*. 2020;3(2):159-68. DOI: <https://doi.org/10.37958/jah.v3i2.45>
21. Vásquez-Guerrero J. Enteroparásitos y factores de riesgo relacionados en frutas y hortalizas de los expendios públicos y privados de la ciudad de Cartagena. [Tesis de grado] [Cartagena De Indias]: Universidad de San Buenaventura; 2015 [acceso 31/05/2023]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10819/2865>
22. Blackburn CW, McClure PJ. Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. 2nd. Ed. Cambridge: CRC Press, Woodhead Publishing Ltd.; 2002. p. 3-12.
23. Rivero MA, Padola NL, Etcheverría AI, Parma AE. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina*. 2004 [acceso 12/02/2023];64(4):352-6. Disponible en: [https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802004000400014](https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802004000400014)
24. Byrne L, Adams N, Jenkins C. Association between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 *stx* gene subtype and disease severity, England, 2009-2019. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(10). DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2610.200319>
25. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 1991;29(7):1339-43. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.29.7.1339-1343.1991>
26. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR assay for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *HlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. *J Clin Microbiol*. 1998;36:598-602. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.36.2.598-602.1998>

27. Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27(12):2751. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.27.12.2751-2757.1989>
28. Águila Sánchez A, Rodríguez A, Fernández Abreu A, Cruz Infante Y, Bravo Fariñas L, Hernández Martínez JL, et al. *Escherichia coli* diarrogénicos, identificación de patotipos y fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislados cubanos. *Rev Cubana Med Trop.* 2020 [acceso 24/04/2023];72(1). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602020000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000100008)
29. Rosado-Porto D, Bonivento-Calvo J, Salcedo-Mendoza S, Molina-Castillo A, Maestre-Serrano R, García ADC. Determinación de *E. coli* biotipo 1 y *E. coli* O157:H7 en canal de carne bovina en plantas de beneficio del departamento del Atlántico (Colombia). *Rev Inv Vet Perú.* 2021;32(3). DOI: <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i3.18476>
30. Roldán ML, Chinen I, Otero JL, Miliwebsky ES, Alfaro N, Burns P, et al. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Rev Argentina Microbiol.* 2007 [acceso 26/05/2023];39(2):113-9. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016791012.pdf>
31. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, et al. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Argentina Microbiol.* 2005 [acceso 13/02/2023];37:1-10. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016778001.pdf>
32. World Health Organization (WHO). Cholera 2018. *Weekly Epidemiol Rec.* 2019 [acceso 25/04/2023];94(48):561-80. Disponible en: <https://reliefweb.int/report/world/weekly-epidemiological-record-wer-29-november-2019-vol-94-no-48-561-580-enfr>
33. Chowdhury G, Senapati T, Das B, Kamath A, Pal D, Bose P, et al. Laboratory evaluation of the rapid diagnostic tests for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using

- diarrheal samples. PLOS Negl Trop Dis. 2021;15(6):e0009521. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009521>
34. Chatterjee S, Haldar S. Vibrio Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. J Marine Sci: Res Dev. 2012;S1:002. DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-9910.S1-002>
35. Rivera ING, Lipp EK, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell RR. Method of DNA extraction and application of Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environ Microbiol. 2003;5(7):599-606. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00443.x>
36. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. App Environ Microbiol. 1999;65(5):2202-8. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2202-2208.1999>
37. Lopez-Canovas L, Riveron Rojas AM, Higginson-Clarke D, Sanchez-Alonso A, Orozco E, Arencibia O, et al. Process for rapid microorganism typing and associated kit reagent. Patente europea: Europa EP1350852, 2003.
38. Arakawa E, Murase T, Matsushita S, Shimada T, Yamai S, Ito T, et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Based Molecular Comparison of *Vibrio cholerae* O1 Isolates from Domestic and Imported Cases of Cholera in Japan. J Clin Microbiol. 2000;38(1):424-6. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.424-426.2000>
39. Domman D, Quilici ML, Dorman MJ, Njamkepo E, Mutreja A, Mather AE, et al. Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. Science. 2017;358(6364):789-93. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aao2136>
40. Kumar P, Yadav P, Ingole KV, Jaiswal RK, Khalid NS, Deshmukh DG, et al. Emergence of Haitian variant genotype and altered drug susceptibility in *Vibrio cholerae* O1 El Tor-associated cholera outbreaks in Solapur, India. Int J Antimicrob Agents. 2020;55(3):105853. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.11.010>
41. Santoriello FJ, Michel L, Unterweger D, Pukatzki S. Pandemic *Vibrio cholerae* shuts down site-specific recombination to retain an interbacterial defence

- mechanism. Nat Commun. 2020;11:6246. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20012-7>
42. Piarroux R, Barraïis R, Faucher B, Haus R, Piarroux M, Gaudart J, et al. Understanding the cholera epidemic, Haiti. Emerg Infect Dis. 2011;17(7):1161-8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1707.110059>
43. Ivers LC, Farmer P, Almazor CP, Léandre F. Five complementary interventions to slow cholera: Haiti. Lancet. 2010;376(9758):2048-51. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)62243-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)62243-x)
44. Lam C, Octavia S, Reeves P, Wang L, Lan R. Evolution of Seventh Cholera Pandemic and Origin of 1991 Epidemic, Latin America. Emerg Infect Dis. 2010;16(7):1130-2. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1607.100131>
45. Chin CS, Sorenson J, Harris JB, Robins WP, Charles RC, Jean-Charles RR, et al. The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain. N Engl J Med. 2011;364(1):33-42. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1012928>
46. Jubyda FT, Nahar KS, Barman I, Johura FT, Islam MT, Sultana M, et al. *Vibrio cholerae* O1 associated with recent endemic cholera shows temporal changes in serotype, genotype, and drug-resistance patterns in Bangladesh. Gut Pathogens. 2023;15:17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00537-0>

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Conceptualización:* Adalberto Águila Sánchez, Laura Bravo Fariñas.

*Curación de datos:* Adalberto Águila Sánchez, Anabel Fernández Abreu.

*Análisis formal:* Adalberto Águila Sánchez, Anabel Fernández Abreu.

*Investigación:* Adalberto Águila Sánchez, Anabel Fernández Abreu, Laura Bravo Fariñas, Yanaika Cruz Infante, María de los Ángeles León Venero.

*Metodología:* Adalberto Águila Sánchez, Anabel Fernández Abreu, Laura Bravo Fariñas.

*Supervisión:* Adalberto Águila Sánchez, María de los Ángeles León Venero.

*Validación:* Adalberto Águila Sánchez, María de los Ángeles León Venero.

*Visualización:* Adalberto Águila Sánchez, Anabel Fernández Abreu, Laura Bravo Fariñas, Yanaika Cruz Infante, María de los Ángeles León Venero.

*Redacción – borrador original:* Adalberto Águila Sánchez, Anabel Fernández Abreu, Yanaika Cruz Infante.

*Redacción – revisión y edición:* Adalberto Águila Sánchez, Anabel Fernández Abreu, Laura Bravo Fariñas, María de los Ángeles León Venero.