

**Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba.
Antimicrobial susceptibility in strains of *Vibrio cholerae* no-O1 isolated in Cuba.**

Autores: Yanet Bueno Fuentes¹, Laura Bravo Fariñas², Anabel Fernández Abreu², Fidel Ángel Núñez².

Organismo: ¹Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM), El Salvador, Guantánamo. Cuba

²Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana. Cuba

Email: irliadis@cdm.qtmo.inf.cu

Telef.: 32 2229; 28 2207; 28 2209.

Resumen.

Las infecciones intestinales causadas por *Vibrio cholerae* no-O1 tienen un incremento en el ámbito mundial. Se realizó un estudio en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), con el objetivo de caracterizar microbiológicamente 63 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1, aisladas de heces de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Se les realizó la confirmación del género mediante pruebas bioquímicas y la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana frente a 10 antimicrobianos por el método del E-test. El 65,1 % y el 23,8 % de las cepas mostraron resistencia a la Ampicilina y al Trimetoprim-sulfametoxazol respectivamente. Se apreciaron niveles de sensibilidad superiores al 93% para el Cloranfenicol, la Tetraciclina, la Doxiciclina, la Ciprofloxacina, la Cefotaxima, la Ofloxacina y la Amikacina. No se observaron cepas multirresistentes. El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana señala la importancia de implementar una continua y sistemática vigilancia de *Vibrio cholerae* no-O1 en Cuba.

Palabras clave: *vibrio cholerae* no-o1, susceptibilidad antimicrobiana, enfermedad diarreica aguda, cepas multirresistentes

Abstract.

The intestinal infections caused by *Vibrio cholerae* no-O1 they have an increment in the world. It was carried out a study in the National Laboratory of Reference of Acute Diarrheic Illnesses of the Institute of Tropical Medicine "Pedro Kourí" (IPK), with the objective of characterizing microbiologically 63 strains of *Vibrio cholerae* no-O1, isolated of grounds of patient with acute diarrheal illness. It was carried out the confirmation of the gender by means of biochemical tests, as well as the determination of the susceptibility antimicrobial in front of 10 antimicrobial for the method of the E-test. The 65, 1% and 23, 8% of the strains showed resistance to the ampicilline and the trimethoprim - sulfamethoxazole respectively. Superior sensibility levels to 93% were appreciated for the cloranphenicole, the tetracycline, the Doxiciclina, the Ciprofloxacina, the Cefotaxima, the Ofloxacina and the Amikacina. It was not observed multi-resistant strains. The study of the susceptibility antimicrobial is important for the implementing of a continuous and systematic surveillance of *Vibrio cholerae* no-O1 in Cuba.

Key words: *vibrio cholerae* no-o1, antimicrobial susceptibility, acute diarrheic illness, multi-resistant strains

Introducción.

Una de las afectaciones que más prevalecen en estos tiempos son las enfermedades diarreicas agudas (EDA), las cuales constituyen un problema de salud para numerosas regiones del mundo, especialmente en los países subdesarrollados, sobre todo en las áreas con mayor grado de exclusión social, deterioro ambiental y pobreza (Balbachan *et al.*, 2007).

En Cuba, las EDA muestran variedad estacional con un incremento del número de casos durante el período lluvioso, aunque dada las condiciones climáticas que se pronostican para el futuro, algunos autores prevén su ascenso (Bulto *et al.*, 2006).

En los últimos 20 años las infecciones intestinales causadas por los microorganismos del género bacteriano *Vibrio* se incrementaron a escala mundial (Lesmana *et al.*, 2002).

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

Por la importancia clínica que reviste el cólera, las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y no-O1 se encuentran sujetas a diferentes estudios, entre los que sobresalen los relacionados con la susceptibilidad a antimicrobianos, debido al incremento de cepas microbianas que muestran resistencia a los tratamientos con antibióticos.

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, permite la elección de una correcta terapia antimicrobiana y contribuye al uso adecuado de los antibióticos.

Es por las razones antes expuestas que este trabajo tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba.

Materiales y Métodos.

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

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

Las 63 cepas preservadas en el medio de conservación para enterobacterias "Pasteur", se inocularon en caldo cerebro-corazón y se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis. Posteriormente, se sembraron por agotamiento en placas de agar Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa (TCBS), agar Mac Conkey y agar sangre con 5% de sangre de carnero, con el propósito de obtener colonias bien aisladas. La incubación se

realizó en iguales condiciones a las descritas anteriormente. A las 24 horas, se seleccionaron al menos tres colonias convexas, de bordes regulares y fermentadoras de la sacarosa en el agar TCBS, translúcidas, convexas y de bordes regulares en el agar Mac Conkey; y del agar sangre se tomaron tres colonias hemolíticas o no, convexas y de bordes regulares. La inoculación se realizó por punción y estría en los medios de diferenciación primaria: agar hierro y dos azúcares de Kligler (AHK) y, agar hierro lisina (AHL). La incubación se efectuó en aerobiosis durante 24 horas a 37 °C, y transcurrido ese período de tiempo se seleccionaron los cultivos que presentaron las siguientes características (Koneman *et al.*, 1998; Martin-Carnahan y Joseph, 2005):

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

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

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método del E- test, y se fijó la concentración mínima inhibitoria (CMI), frente a 10 antimicrobianos: Tetraciclina (TET), Cloranfenicol (CHL), Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), Ampicilina (AMP), Sulfonamida (SUL), Ofloxacina (OF), Doxiciclina (DO), Ciprofloxacina (CIP), Cefotaxima (CT) y Amikacina (AK), recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) de los Estados Unidos de América, 2010. Se siguió la metodología descrita para los microorganismos pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* (*Vibrios* spp). Para la lectura e interpretación de los resultados se utilizó la tabla de criterios de susceptibilidad para enterobacterias (CLSI, 2010); y se compararon los valores obtenidos por cada elipse de inhibición de crecimiento con los de la tabla, para clasificar las cepas en estudio en sensibles, intermedias o resistentes.

Se utilizaron las siguientes cepas controles, según las recomendaciones de CSLI: Cepa control positivo: *Vibrio cholerae* 569 B y cepa control negativo *Escherichia coli* O101: K99 pertenecientes al LNR/EDA/IPK.

Se consideró como multirresistente a las cepas que mostraron resistencia a tres o más antimicrobianos de diferentes grupos (World Health Organization, 2005).

Se empleó la prueba de comparación de proporciones para comparar los porcentajes de susceptibilidad. En todos los casos las diferencias y/o asociaciones fueron consideradas estadísticamente significativas para $p < 0,001$.

Los análisis se realizaron bajo el programa para análisis estadísticos EPINFO, versión 6,04 (Dean *et al.*, 1994).

Resultados y discusión.

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

En la tabla 1, se muestra el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas analizadas frente a los antibióticos investigados. Se observaron altos niveles de resistencia a la Ampicilina y al Trimetoprim-sulfametoxazol. Se obtuvieron valores de sensibilidad superiores al 93% en el resto de los antimicrobianos evaluados. Las cepas evaluadas mostraron 100% de sensibilidad frente a los antimicrobianos Tetraciclina, Ofloxacina, Doxiciclina, Ciprofloxacina, Cefotaxima y Amikacina.

Al aplicar el test de comparación de proporciones se estableció de manera muy significativa ($p < 0,001$) que existen diferencias entre los valores obtenidos de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia mostrada por las cepas. En relación a los antimicrobianos se observó que el único antibiótico en el que predominaron cepas resistentes sobre las sensibles e intermedias fue la Ampicilina.

Tabla 1. Comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas frente a los diferentes antibióticos (n= 63)

Agentes antimicrobianos	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	19	30,1	3	4,8	41	65,1
Tetraciclina	63	100	0	0	0	0
Trimetoprim-sulfametoxazol	48	76,2	0	0	15	23,8
Sulfonamida	59	93,6	0	0	4	6,4
Ofloxacina	63	100	0	0	0	0

Cloranfenicol	61	96,8	0	0	2	3,2
Doxiciclina	63	100	0	0	0	0
Ciprofloxacina	63	100	0	0	0	0
Cefotaxima	63	100	0	0	0	0
Amikacina	63	100	0	0	0	0

En América, como en el resto del mundo, la resistencia a los antimicrobianos plantea una amenaza grave y cada vez mayor para la salud pública. Entre los principales factores que contribuyen a la resistencia de los patógenos a los antimicrobianos se encuentra el uso no controlado e inapropiado de estos fármacos; esto incluye la automedicación, el exceso de prescripción médica en situaciones que no lo requieren y la percepción de los pacientes que consideran que el antibiótico es más efectivo que otro tipo de medicación (Balbachan *et al.*, 2007).

Cuando se analizó el comportamiento frente a la Ampicilina de las cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 identificadas en este estudio, se constató que hubo similitud con los resultados descritos por Bravo *et al.* (2004), quienes demostraron altos porcentajes de resistencia para este antimicrobiano en Cuba. Estos resultados tienen semejanza, igualmente, con los alcanzados por Ashok *et al.* (2009), quienes en una investigación realizada en pacientes con EDA, en la India, obtuvieron aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1 resistentes a la ampicilina.

Adabi *et al.* (2009) al realizar pruebas de sensibilidad a varios antibióticos con 60 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con EDA en cuatro provincias de Irán, obtuvieron un 95% de resistencia al Trimetoprim-sulfametoxazol, resultado que no coincide con los obtenidos en esta investigación.

La resistencia de las cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 a la Sulfonamida fue baja en este estudio, lo que está en contraposición a lo descrito por Iwanaga *et al.* (2004), quienes al estudiar 50 cepas aisladas de pacientes con EDA, en Laos, detectaron entre un 33-39% de resistencia a este antimicrobiano.

En el LNR/ EDA/ IPK, Bravo *et al.* (2004) no observaron resistencia al Cloranfenicol al estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con EDA; sin embargo, en este estudio se muestra un ligero incremento de resistencia a este antibiótico, por primera vez en Cuba.

Con relación a la Tetraciclina, Crump *et al.* (2003), en los Estados Unidos de América demostraron altos niveles de sensibilidad a este antibiótico, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo; sin embargo, Li *et al.* (2011) encontraron altos porcentajes de resistencia (60%) al estudiar la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Vibrio cholerae* de origen ambiental y clínico.

En general, los resultados de esta investigación muestran un bajo grado de resistencia a los agentes antimicrobianos analizados, excepto para la Ampicilina y el Trimetoprim-sulfametoxazol, estos resultados pudieran deberse a que las cepas en estudio han interactuado poco con los grupos de drogas antimicrobianos antes señalados.

En las 63 cepas objeto de estudio, se observaron tres patrones de resistencia y no se encontraron cepas multirresistentes.

CL⁻, SXT⁻
AMP⁻, SXT⁻
AMP⁻, SXT⁻, SSS⁻

En el Laboratorio Nacional de Referencia de EDA, Bravo *et al.* (2000, 2004, 2007) realizaron varios estudios sobre el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con diarreas. Bravo *et al.* (2007), encontraron dos patrones de resistencia (AMP⁻, SXT⁻) y (AMP⁻, SXT⁻, SSS⁻), pero no hallaron cepas multirresistentes. Estos resultados fueron corroborados en esta investigación, solamente se añade el hecho de encontrar un nuevo patrón de resistencia (CL⁻, SXT⁻).

A pesar de que en este trabajo no se detectó multirresistencia a los antimicrobianos utilizados, es necesario mantener una estricta vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 en nuestra área.

Conclusiones.

Las cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 mostraron altos niveles de sensibilidad a los antimicrobianos de elección y un incremento de la resistencia al cloranfenicol por primera vez en nuestro país.

Se evidenció por vez primera en Cuba la presencia de un nuevo patrón de resistencia antimicrobiano (Cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol) en las 63 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 investigadas.

Bibliografía.

- Adabi, M., Bakhshi, B., Goudarzi, H., Zahraei, S. M. & Pourshafie, M. R. (2009). Distribution of class 1 integron and sulfamethoxazole trimethoprim constin in *Vibrio cholerae* isolated from patients in Iran, 15(3), 179-184.
- Ashok, K. P., Patterson, J. & Karpagam, P. ((2009)). Multiple antibiotic Resistance Profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139, India, Jpn. J. Infect. Dis., 62(3), 230-232.
- Balbachan, S., Merino, L., Merino, D., Balbachan, M. y Miranda, O. (2007). Resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de diarreas en niños de Corrientes, Argentina. Rev. Cubana. Med. Trop., 59 (3), 55-60.

- Bravo, L., Cabrera, L., Ramírez, M., Llop, A., Fernández, A., García, B. y Morier, L. (2000). *Plesiomonas shigelloides* una vibrionacea en quien pensar, Cuba. *Rev. Cub. Med. Trop.*, 52 (1), 10-14.
- Bravo, L., Cabrera, L., Ramírez, M., Castañeda, N., Fernández, E. y Garrigó, E. (2004). Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes en Cuba. *Esp. Quimioterap.*, 17, 200-201.
- Bravo, L., Fernández, A., Ramírez, M., Llop, A., Martínez, G., Hernández, R., Morier, L., Fraga, J., Núñez, F. y Águila, A. (2007). Caracterización microbiológica de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba. *Cub. Med. Trop.*, 9 (3), 21-25.
- Bravo, Cabrera L., E. L., Ramírez, M., Llop, A., Fernández, A., Morier, L. y Borrego, G. (2008). Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda, Cuba. *Biome*, 19 (3), 238- 244.
- Bulto, P. L., Rivero, A., Pérez, A. y Morgado, F. C. (2006). La influencia de la variabilidad climática en la ocurrencia de las enfermedades digestivas en Cuba. *Cubana de Meteorología*, 13 (1), 73.
- Crump, J. A., Bopp, C. A., Greene, K. D., Kubota, K. A., Middendorf, R. L. & Wells, J. G. (2003). Toxigenic *Vibrio cholera* serogroup O141-associated cholera-like diarrhea and bloodstream infection in the United States. *J. Infect. Dis.*, 187, 866-8.
- Dean, A. G., Dean, J. A., Coulombier, D., Brendel, K. A., Smith, D. C. & Burton, A. H. (1994). *Epi Info Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control.
- Iwanaga, M., Toma, C., Miyazato, T., Insisiengmay, S., Nakasorte, N. & Ehara, M. (2004). Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (7), 2364-2369.
- Koneman, E.W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. N., Sommers, H. M. & Winn, W. C. (1998). *Diagnóstico microbiológico* (3^{era} ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Lesmana, M., Subekti, D. S., Tjaniadi, P., Simanjuntak, C. H., Punjabi, N. H. & Campbell, J. R. (2002). Spectrum of *Vibrio* species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 43, 91-97.
- Li, B. S., Tan, H. L., Wang, D. C., Deng, X. L., Chen, J. D., Zhong, H. J., Ke, B. X., Ke, C. W. & Kan, B. (2011). Phenotypic and genotypic characterization *Vibrio cholera* O139 of clinical and aquatic isolates in China. *Curr Microbiol*, 62 (3), 950-955.
- Martin-Carnahan, A. & Joseph, S. W. (2005). Aeromonadaceae. En Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staly, J. T. & Garrity, G. M. (Ed.), *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2^{da} ed.) Volumen 2 (pp. 557-578). New York: Springer-Verlag.
- World Health Organization. (2005). *The treatment of diarrhea: a manual for physicians and other senior health workers*. 4th revision. Geneva: WHO.

Fecha de recibido: 2 abr. 2012
Fecha de aprobado: 23 jun. 2012