

Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos cubanos de *Vibrio cholerae* O1 procedentes de muestras clínicas

Antimicrobial susceptibility in Cuban isolates of *Vibrio cholerae* O1 obtained from clinical samples

Anabel Fernández Abreu, Laura Bravo Fariñas, Adalberto Aguila Sánchez, Yanaika Cruz Infante, María T Ilina Zaragoz, Alina Llop Hernández, Jenny L Hernández Martínez, Susel Blanco Abreu, Diana Bebelagua Cruz

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

RESUMEN

Introducción: la re-emergencia de cólera en Haití estableció un nuevo reservorio para el incremento de la séptima pandemia. Esto provocó su diseminación a República Dominicana y a otros países de la región del Caribe, como Cuba y México.

Objetivo: estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Vibrio cholerae* O1, serotipo Ogawa, biotipo El Tor aisladas de pacientes durante el evento epidemiológico de cólera ocurrido en Cuba entre junio de 2012 y agosto de 2013.

Métodos: se realizó el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* en 144 aislamientos de *V. cholerae*, mediante el método de Bauer-Kirby frente a nueve antimicrobianos: ampicilina, sulfonamida, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, azitromicina, ciprofloxacina y gentamicina, según las normas del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos de América.

Resultados: el total de los aislamientos resultaron resistentes al trimetoprim-sulfametoxazol; el 98,7 % lo fue a la sulfonamida y el 90,3 % a la ampicilina. Se obtuvieron valores de sensibilidad intermedia para ciprofloxacina (30,6 %) y cloranfenicol (27,1 %). Se apreciaron niveles de sensibilidad superior al 92 % a los antimicrobianos de primera línea en el tratamiento de la enfermedad (doxiciclina, tetraciclina y azitromicina), así como también a la gentamicina. No se observaron cepas multirresistentes.

Conclusiones: los datos aportados por este trabajo demuestran la efectividad *in vitro* de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento la enfermedad diarreica aguda causada por *V. cholerae* en Cuba.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* O1; susceptibilidad antimicrobiana; resistencia antimicrobiana; vigilancia.

ABSTRACT

Introduction: Re-emergence of cholera in Haiti created a new reservoir for the increase of the seventh pandemic. This resulted in its spread to the Dominican Republic and other Caribbean countries, such as Cuba and Mexico.

Objectives: Study the antimicrobial susceptibility of isolates of *Vibrio cholerae* O1, Ogawa serotype, El Tor biotype, obtained from patients during the cholera epidemiological event occurring in Cuba from June 2012 to August 2013.

Methods: A study was conducted of 144 *V. cholerae* isolates using the Bauer-Kirby method to determine *in vitro* susceptibility to nine antimicrobials: ampicillin, sulfonamide, trimethoprim/sulfamethoxazole, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, azithromycin, ciprofloxacin and gentamicin, in compliance with standards from the U.S. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Results: All isolates were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole; 98.7 % to sulfonamide and 90.3 % to ampicillin. Intermediate sensitivity values were obtained for ciprofloxacin (30.6 %) and chloramphenicol (27.1 %). Sensitivity levels above 92 % were found for first-line antimicrobials (doxycycline, tetracycline and azithromycin), as well as gentamicin. Multi-drug resistant strains were not found.

Conclusions: Results reveal the effectiveness *in vitro* of the antimicrobials used in Cuba to treat acute diarrheal disease caused by *V. cholerae*.

Key words: *Vibrio cholerae* O1; antimicrobial susceptibility; antimicrobial resistance; surveillance.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas agudas son un problema de salud mundial. Estas constituyen la tercera causa de muerte en niños menores de cinco años en países del tercer mundo.^{1,2} Ejemplo de ello fue la séptima pandemia de cólera causada por *Vibrio cholerae* serogrupo O1, biotipo El Tor. Este patógeno ocasiona más de dos millones y medio de casos de diarrea aguda y más de 200 000 muertes por año en el mundo, lo que resulta un reto para las autoridades de Salud Pública de países industrializados y en vías de desarrollo.³ Debido a la severidad del cuadro clínico que produce, durante mucho tiempo el estudio de las especies del género *Vibrio* se focalizó en los serogrupos asociados al cólera, *V. cholerae* O1 y O139.⁴

La reposición de líquidos es de vital importancia en el tratamiento de cólera. Sin embargo, se recomienda la terapia antimicrobiana, pues el uso de antibióticos en los casos severos reduce el volumen y la duración de las diarreas.⁵ El tratamiento de elección en los adultos son las tetraciclinas, en tanto en niños menores de dos años y en las embarazadas, se sugiere la azitromicina. Las fluoroquinolonas, especialmente la ciprofloxacin, se recomiendan como agentes alternativos.^{6,7}

La re-emergencia de cólera en Haití estableció un nuevo reservorio para el incremento de la séptima pandemia de esta enfermedad que provocó su diseminación a República Dominicana y a otros países de la región del Caribe, como Cuba y México.²

La resistencia entre los patógenos entéricos puede ser transmitida rápidamente entre ellos. El constante monitoreo de los patrones de susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos es válido como guía para el tratamiento empírico, como método de tipificación e indicador de la diseminación de la resistencia.⁸

Por la importancia que reviste a nivel nacional e internacional la vigilancia microbiológica y epidemiológica de los microorganismos pertenecientes al género *Vibrio*, así como la emergencia y diseminación de aislamientos resistentes a los agentes antimicrobianos se realizó el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de *V. cholerae* O1 aisladas de muestras clínicas en Cuba.

MÉTODOS

Se estudiaron 144 aislamientos de *V. cholerae* O1 recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos Bacterianos, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (LNR-EB-IPK), provenientes de los brotes ocurridos en Granma y La Habana entre junio de 2012 y enero de 2013. Todos los aislamientos fueron recuperados de heces de pacientes con cólera y se encontraban conservados en el medio "Pasteur" para enterobacterias en la colección del LNR-EB-IPK.⁹

Para la confirmación de género se realizaron las pruebas bioquímicas y todos los aislamientos se sometieron a las pruebas de tolerancia al cloruro de sodio y la utilización de la sacarosa para su identificación en especies. Se realizaron además, las pruebas serológicas mediante el método de aglutinación en láminas con los antisueros: polivalente *V. cholerae* O1, monovalentes Ogawa e Inaba y *V. cholerae* O139.¹⁰

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad de los aislamientos se determinó frente a los agentes antimicrobianos de elección (ampicilina (AMP) (10 µg), sulfonamida (SSS) (300 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) (1,25/23,75 µg), cloranfenicol (CHL) (30 µg), tetraciclina (TE) (30 µg), doxiciclina (DXT) (30 µg), según el documento M45_A2 del año 2010¹¹ y para los antimicrobianos alternativos (ciprofloxacina (CIP) (5µg), azitromicina (AZM) (15 µg) y gentamicina (CN) (10 µg)) se utilizó el documento M100S24E,¹² excepto para azitromicina para la cual los criterios de susceptibilidad fueron adaptados de los criterios recomendados para el estudio de aislamientos de *Staphylococcus* spp. según el documento M45_A2. Se utilizó el método de difusión en agar (*Kirby-Bauer*) como recomienda el CLSI de 2014.¹³

Como cepas controles se utilizaron: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Escherichia coli* ATCC 35218; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.¹²

Procesamiento estadístico

Los datos se almacenaron en Microsoft Office Excel y se procesaron en el paquete de programas EPIDAT 3.1, versión 6,04.¹⁴

RESULTADOS

Los 144 aislamientos de pacientes con cólera pertenecientes al cepario del LNR-EB-IPK fueron confirmados como *V. cholerae* O1, serotipo Ogawa.

Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana

En la [tabla](#) se observa la distribución en las categorías de: sensibles, susceptibilidad intermedia y resistente de los aislamientos de *V. cholerae* frente a los antimicrobianos investigados.

Los aislamientos mostraron valores de resistencia por encima del 90 % frente al trimetoprim-sulfametoxazol, la sulfonamida y la ampicilina. En el 30,6 % y el 27,1 % se encontró sensibilidad intermedia a la ciprofloxacina y el cloranfenicol. Se apreciaron niveles de sensibilidad superior al 92 % a la azitromicina, doxiciclina, gentamicina y tetraciclina. No se observaron cepas multirresistentes.

Tabla. Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos cubanos de *V. cholerae* O1 a los antimicrobianos mediante el método Bauer-Kirby

| Antimicrobianos | Aislamientos | | | | | |
|----------------------------|--------------|------|------------|------|------------|------|
| | Sensible | | Intermedio | | Resistente | |
| | No. | % | No. | % | No. | % |
| Ampicilina | 1 | 0,7 | 13 | 9,0 | 130 | 90,3 |
| Sulfonamida | 0 | 0 | 2 | 1,3 | 142 | 98,7 |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | 0 | 0 | 0 | 0 | 144 | 100 |
| Cloranfenicol | 106 | 73,6 | 39 | 27,1 | 2 | 1,3 |
| Tetraciclina | 133 | 92,4 | 1 | 0,7 | 10 | 6,9 |
| Doxiciclina | 141 | 98 | 2 | 1,3 | 1 | 0,7 |
| Azitromicina | 143 | 99,3 | 0 | 0 | 1 | 0,7 |
| Ciprofloxacina | 100 | 69,4 | 44 | 30,6 | 0 | 0 |
| Gentamicina | 139 | 96,5 | 0 | 0 | 8 | 5,5 |

DISCUSIÓN

La caracterización microbiológica mediante los métodos fenotípicos permite identificar los aislamientos de casos esporádicos y los causantes de brotes, tal como lo muestran reportes internacionales. Estos evidencian que *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, causa la mayoría de los brotes, mientras que el O139, que se identificó por vez primera en Bangladesh en 1992 y está confinado al Asia Suroriental.^{15,16}

En las Américas, como en el resto del mundo, la resistencia a los antimicrobianos plantea una amenaza grave y cada vez mayor para la salud pública.¹⁷ Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* del género *Vibrio* están focalizados principalmente en *V. cholerae* O1/no-O1 *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. De forma general, estos microorganismos son sensibles a los aminoglucósidos, el cloranfenicol, el ácido nalidíxico y las fluoroquinolonas, pero se comportan como

resistentes a la ampicilina. La sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol y a la tetraciclina es variable.¹⁸

Las normas para el tratamiento de esta enfermedad contempla el empleo de la doxiciclina y tetraciclina como drogas de elección y como alternativos, la furazolidona, el trimetoprim/sulfametoxazol, la ciprofloxacina y la azitromicina. El monitoreo de los patrones de resistencia *in vitro* a los antimicrobianos son válidos como guía para el tratamiento empírico, como método de tipaje, y como indicador de la diseminación de plásmidos que portan esta característica.¹⁸ El último brote de cólera reportado en Cuba data de 1867,^{19,20} desde entonces esta enfermedad dejó de constituir un problema de salud para el país. No obstante, las autoridades sanitarias mantuvieron estricta vigilancia sobre la introducción del agente causal en la isla. Esto permitió realizar un diagnóstico oportuno de los brotes epidémicos ocurridos a partir de junio de 2012, y realizar los estudios de caracterización microbiológica que incluye la susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos.

Los porcentajes de susceptibilidad y resistencia obtenidos en este trabajo son similares a los publicados en Haití entre el 2010 y 2011, y en Nigeria en el año 2010 al estudiar cepas de *V. cholerae* O1 causantes de brotes y casos esporádicos.^{7,21}

En el presente trabajo se obtuvieron valores de resistencia superiores al 90 % para ampicilina, sulfonamidas y trimetoprim-sulfametoxazol.

Estudios realizados en la India en aislamientos de *V. cholerae* aislados de pacientes con diarreas obtienen 55,5 % de aislamientos resistentes a ampicilina.²² Sin embargo, investigaciones efectuadas en Haití, obtienen 100 % de sensibilidad para este antimicrobiano.²³

En Cuba, en relación a la resistencia frente a las sulfamidas, en 2006, se publican valores de 23,4 % de resistencia a sulfonamida y 16,3 % a trimetoprim-sulfametoxazol,²⁴ y en 2008 se obtienen en cepas de *V. cholerae* no-O1, aisladas de pacientes con EDA, 11,1 y 44,9 % de resistencia respectivamente.²⁵

Como se demostró en el presente estudio las tetraciclinas presentaron un mayor porcentaje de sensibilidad. Resultado similar publican Bravo y otros., en Cuba en un período de 10 años (1996 -2005) donde 98 % de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-139 son sensibles.⁸ Por otra parte investigaciones llevadas a cabo en Irán en 2014 obtienen 100 % de sensibilidad a este medicamento.²⁶

Estudios realizados en el LNR-EB-IPK durante 10 años de la vigilancia antimicrobiana en el género *Vibrio*, ha permitido conocer en el país la circulación de aislamientos de *V. cholerae* no-O1 con dos patrones de resistencia diferentes (AMP⁻, SXT⁻, SSS⁻) y (TE⁻, SXT⁻, SSS⁻), no observándose la circulación de cepas multirresistentes.⁸ El resultado de la susceptibilidad antimicrobiana de *V. cholerae* O1 de la presente investigación, ha demostrado que no circulan hasta el momento cepas de *V. cholerae* O1 multirresistentes, lo que está acorde con los estudios antes mencionados.

Los datos aportados por este trabajo demuestran la efectividad *in vitro* de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento la enfermedad diarreica aguda causada por *V. cholerae* en Cuba.

Es necesario mantener una vigilancia estricta de la susceptibilidad antimicrobiana en este microorganismo, para detectar cambios en los patrones de resistencia en las cepas circulantes en las diferentes provincias y regiones del país y para sugerir a las autoridades sanitarias los posibles cambios en la política de uso de los antimicrobianos.²⁷

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boletín Epidemiológico IPK. Vol 23(39):305 [Citado el 22 de octubre de 2013]. Disponible en: <http://www.ipk.sld.cu/bolepid2/bol52-05.htm>
2. Organización Panamericana de la Salud. Situación de salud en las Américas. 2013. [Citado el 22 de octubre de 2013]. Disponible en: <http://www.paho.org/spanish/dd/ais/IB-folleto-2005.pdf>
3. John LR. Enfermedades infecciosas. En: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editores. Inmunología básica y clínica. México, DF.: El Manual Moderno; 1999. p. 827-37.
4. Egli T, Koster W, Meile L. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. FEMS Microbiology Reviews. 2002;26:111-2.
5. Khan WA, Saha D, Ahmed S, Salam MA, Bennish ML. Efficacy of Ci profloxacin for Treatment of Cholera Associated with Diminished Susceptibility to Ciprofloxacin to *Vibrio cholerae* O1. PLoS One. 2015;10(8):e0134921. Disponible en: [10.1371/journal.pone.0134921](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0134921)
6. Antié A, Canovié P. Cholera once and nowadays. Med Projl. 2010;63(7-8):579-82.
7. Sjölund-Karlsson M, Reimer A, Folster JP, Walker M, Dahourou GA, Batra DG, et al. Drug-Resistance Mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 Outbreak Strain, Haiti, 2010. Emerg Infect Dis. 2011;17(11):2151-54.
8. Bravo L, Fernández A, Ramírez M, Fernández C, Ledo Y, Correa Y, et al. Caracterización microbiológica de *Vibrio cholerae* no O1 aisladas de Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(3):184-6.
9. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H y Winn W. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana; 1998.
10. Garrity GM, Bell JA, Lilburm TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. En: Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Release 4.00; Oct 2003. [Citado el 10 de febrero de 2004]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>
11. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline-Second Edition; M45-A2 [ISBN 1-56238-732-4]. 2010;30(18):36-37.
12. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24 [ISBN 1-56238-898-3]. 2014;34(1):68-75.
13. Bauer A., Kirby W, Sherman T y Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Path. 1996;45(4):485-94.

14. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Amith DC, Burton AH, et al. Epi Info Versión 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta, GA: Centers for Disease Control; 1994.
15. Shakya G, Kim DW, Clemens JD, Malla S, Upadhyaya BD, Dumra SP, et al. Phenotypic and genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 clinical isolates collected through national antimicrobial resistance surveillance network in Nepal. World J Microbiol Biotechnol. 2012; 28(8): 2671-8.
16. Khuntia HK, Samal SK, Kar SK, Pal BB. An Ogawa cholera outbreak 6 months after the Inaba cholera outbreaks in India, 2006. J Microbiol Immunol Infect. 2010; 43(2): 133-7.
17. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis. 2001; 32: 331-50.
18. World Health Organization Global Task Force on Cholera Control. First steps for managing an outbreak of acute diarrhoea. Geneva: The Organization; 2004. [citado 23 de mayo de 2011]. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_CDS_CSR_NCS_2003.7_Rev.2_eng.pdf
20. Martínez-Fortún JA. Epidemiología (síntesis cronológica). Cuad Hist San. 1952;5.
21. Delgado G. El cólera morbo asiático en Cuba. Apuntes históricos y bibliográficos. Cuad Hist Sal Pub. 1993; 78.
22. Marin MA, Thompson CC, Freitas FC, Fonseca EL, Aboderin AO, Zailani SB, et al. Cholera Outbreaks in Nigeria Are Associated with Multidrug Resistant Atypical El Tor and Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(2): e2049.
23. Dutta D, Chowdhury G, Pazhaniv G, Guin S, Dutta S, Ghosh S, et al. *V. cholerae* Non-O1, Non-O139 Serogroups and Cholera-like Diarrhea, Kolkata, India. Emerg Infect Dis. 2013 [citado 12 de enero de 2014]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1903.121156>
24. Talkington D, Bopp Ch, Tarr Ch, Parsons MB, Dahourou G, Freeman M, et al. Characterization of Toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010-2011. Emerg Infect Dis. 2011; 17(11): 2122-9.
25. Cabrera LE, Bravo L, Ramírez MM, Llop A, Fernández A, Morier L, et al. Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Rev Biomed. 2008; 19(3): 138-44.
26. Majano A, Bravo L, A. Fernández, M. Ramírez. Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, oxidasa positivas aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Rev Biomed. 2009; 20: 25-32.
27. Bakhshi B, Eftekhari N, Pourshafie MR. Genetic Elements Associated With Antimicrobial Resistance Among Intestinal Bacteria Jundishapur. J Microbiol. 2014; 7(5): e9924.

28. Dong C, Zhang X, Bao C, Zhu Y, Zhuang L, Tan Z, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Vibrio cholera* strains isolated from an outbreak of cholera epidemic in Jiangsu province. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2015 Feb;49(2):128-31.

Recibido: 9 de septiembre de 2015.

Aprobado: 27 de enero de 2016.

Anabel Fernández Abreu. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Autopista Novia del Mediodía km 6 1-2, La Lisa, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: anabel@ipk.sld.cu