

Resistencia antimicrobiana y factores de virulencia en aislados de *Vibrio cholerae* O1. Cuba, 2012-2015

Antimicrobial resistance and virulence factors in *Vibrio cholerae* O1 isolates.
Cuba, 2012-2015

Yanaika Cruz Infante^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9825-2737>

Anabel Fernández Abreu¹ <https://orcid.org/0000-0002-5395-5041>

Laura Bravo Fariñas¹ <https://orcid.org/0000-0003-2183-3119>

Fidel A. Nuñez¹ <https://orcid.org/0000-0001-8611-4411>

Adalberto Águila Sánchez¹ <https://orcid.org/0000-0003-0259-4394>

Jenny L. Hernández Martínez¹ <https://orcid.org/0000-0003-1018-6757>

Aurora Longa² <https://orcid.org/0000-0001-7537-6158>

Zurisnay Ramírez Mejías¹ <https://orcid.org/0000-0001-8031-5480>

Brenda Conesa Sánchez¹ <https://orcid.org/0000-0002-5127-7929>

Ana María Cordero Azcuy¹ <https://orcid.org/0000-0001-5241-8386>

Eduardo A Valdés Ramos¹ <https://orcid.org/0000-0001-7550-5669>

¹Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

²Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

*Autor para la correspondencia: yanaika@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El cólera es una infección intestinal aguda causada por cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*. La rápida diseminación y emergencia de la multiresistencia que caracteriza a este patógeno, podría interferir en el éxito de la terapia antimicrobiana, por lo que constituye una prioridad monitorear los cambios en los patrones de susceptibilidad, como parte trascendental de la política de control de la resistencia antimicrobiana.

Objetivo: Determinar el comportamiento de la resistencia antimicrobiana frente a los antimicrobianos de interés empleados en el tratamiento, la presencia de factores de virulencia enzimáticos y si existe relación entre ambos.

Métodos: Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal durante julio de 2012 a diciembre de 2015. Se estudiaron 500 aislamientos pertenecientes al cepario del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, procedentes de brotes de enfermedades diarreicas agudas de la red nacional de laboratorios de Microbiología de Cuba. Se aplicaron métodos convencionales fenotípicos para determinar el comportamiento de la resistencia antimicrobiana, la presencia de factores enzimáticos y la relación de estos con la resistencia antimicrobiana.

Resultados: Los mayores porcentajes de sensibilidad se obtuvieron frente a azitromicina (98 %), doxiciclina (96 %) y ciprofloxacina (93%) y de resistencia frente a ampicilina (100 %) y trimetoprim-sulfametoxazol (99,4 %). Se encontraron 44 aislados (8,8 %) multirresistente. Todos los aislamientos poseían al menos dos enzimas extracelulares como factores de virulencia, las más frecuentes: gelatinasa (96 %) y lecitinasa (95 %).

Conclusiones: Se evidencia una relación directa y proporcional entre la presencia de los factores de virulencia y resistencia antimicrobiana, sinergismo que surge mayor patogenicidad de los aislados estudiados procedentes de brotes epidémicos.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*; virulencia; resistencia; multirresistencia.

ABSTRACT

Introduction: Cholera is an acute intestinal infection caused by toxigenic strains of *Vibrio cholerae*. The rapid dissemination and emergence of the multiresistance that characterizes this pathogen could interfere with the success of antimicrobial therapy, so it is a priority to monitor changes in susceptibility patterns, as a transcendental part of the resistance control policy antimicrobial.

Objective: To determine the behavior of antimicrobial resistance against the antimicrobials of interest used in the treatment, the presence of enzymatic virulence factors and whether there is a relationship between them.

Methods: A descriptive cross-sectional study was conducted during July 2012 to December 2015. Where 500 isolates belonging to the cepary of the National Reference Laboratory for Acute Diarrheal Diseases of the Institute of Tropical Medicine "Pedro Kourí", from outbreaks of EDA of the national network of Microbiology laboratories in Cuba. Conventional phenotypic methods were applied to determine the behavior of antimicrobial resistance, the presence of enzymatic factors and their relationship with antimicrobial resistance.

Results: The highest percentages of sensitivity were obtained against azithromycin (98%), doxycycline (96%) and ciprofloxacin (93%) and resistance to ampicillin (100%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (99.4%). 44 isolated (8.8%) multi-resistant were found. All isolates had at least two extracellular enzymes as virulence factors, the most frequent: gelatinase (96%) and lecithinase (95%).

Conclusions: There is a direct and proportional relationship between the presence of virulence factors and antimicrobial resistance, synergism that arises greater pathogenicity of the isolates studied from epidemic outbreaks.

Key words: *Vibrio cholerae*; virulence; resistance; multiresistance.

Recibido: 02/12/2019

Aceptado: 01/10/2020

Introducción

El cólera es una enfermedad infecciosa aguda de etiología bacteriana, identificada por Robert Koch en 1833, siendo la primera entidad para la cual se estableció un sistema de vigilancia e informe de brotes a gran escala.⁽¹⁾

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cólera como una infección intestinal aguda causada por la ingestión de agua o alimentos contaminados por la bacteria del género *Vibrio* la cual produce una enterotoxina que causa diarrea abundante, indolora y acuosa, que conlleva con rapidez a una deshidratación grave y la muerte, si no es tratada oportunamente, principalmente países en vías de desarrollo del continente africano, asiático y el Caribe.⁽²⁾

El agente causal *Vibrio cholerae* pertenece al género *Vibrio*, familia Vibrionaceae, siendo el patógeno más reconocido de esta familia por la diarrea que puede producir en los pacientes. Los principales factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad incluye la enterotoxina colérica y el factor de colonización lo que confiere la habilidad de colonizar en el intestino delgado. Además, existen otros factores de virulencia que han sido identificado en este género como son la producción de enzimas extracelulares gelatinasa, elastasa, lecitinasa, citolicinas, citotoxinas, hemolisinas y la producción de polisacárido capsular y hemaglutininas.^(3,4,5)

La enfermedad del cólera requiere de rehidratación tanto por vía oral como endovenosa acompañada de una terapia antimicrobiana; se utiliza como tratamiento de elección tetraciclina (doxiciclina) y azitromicina, y como antimicrobiano alternativo la ciprofloxacina.⁽⁶⁾ No obstante en estudios internacionales se describen aislados de *V. cholerae* resistentes a múltiples antimicrobianos de uso frecuente, con un incremento de la resistencia a todos los antibióticos de uso frecuente, incluye ampicilina, quinolonas, ciprofloxacina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual pudiera estar debido a mecanismos de resistencia como la producción de betalactamasas de espectro extendido, las mutaciones cromosómicas, la presencia de bombas de eflujo y la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal.^(5,6)

La vigilancia de la enfermedad diarreica aguda (EDA) provocada por *V. cholerae* O1 representa un reto importante para el sistema nacional de salud en Cuba. Aunque desde la década de los 80 se han realizado estudios de caracterización fenotípica en esta especie, no se ha estudiado la asociación de la virulencia con la resistencia antimicrobiana en aislados de *V. cholerae* O1. Por tanto, el objetivo es determinar el comportamiento de la resistencia antimicrobiana frente a los antimicrobianos de interés empleados en el tratamiento, la presencia de factores de virulencia enzimáticos y si existe relación entre ambos.

Métodos

Se realizó un estudio descriptivo observacional de corte transversal durante el periodo de julio de 2012 a diciembre de 2015.

Se estudiaron 500 aislados de *V. cholerae* O1 identificadas, identificados con antelación, pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNR/EDA/IPK). Los aislados procedían de muestras de heces obtenidas de pacientes incluidos en los eventos de cólera notificados en Cuba, remitidos por la Red Nacional de Laboratorios de Microbiología, en el periodo descrito anteriormente.

Los aislados preservados en medio de conservación para enterobacterias (medio Pasteur), elaborado según las instrucciones del Manual de Medios y Reactivos del Instituto “Pasteur” (1978), se inocularon en agua peptonada alcalina (APA) y se incubaron en condiciones de aerobiosis a 37 °C de 6-8 h. De cuatro a cinco asadas del cultivo en agua peptonada se sembraron por agotamiento en placas con agar MacConkey (BioCen/Cuba) y se incubaron

en aerobiosis a 37 °C de 18-24 h. Transcurrido este período, se seleccionaron tres colonias translúcidas, convexas y de bordes regulares y se inocularon por punción y estría en los medios de diferenciación primaria: agar hierro y dos azúcares de Kligler y agar hierro lisina (BioCen/Cuba), se incubó bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad. La presencia de la enzima citocromo oxidasa se determinó mediante la prueba oxidasa.⁽⁴⁾

Se determinó la susceptibilidad de aislados de *V. cholerae* O1 frente a los agentes antimicrobianos de elección. Se utilizó el método de difusión en agar (Kirby – Bauer). Para la lectura e interpretación de los halos de inhibición se utilizaron los protocolos recomendados por Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (tabla 1).^(7,8)

Se emplearon como cepas controles: *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

Tabla 1 - Antimicrobianos que se emplearan en las pruebas de susceptibilidad

Antimicrobianos	Carga (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Tetraciclina	30	≤ 11	12-14	≥ 15
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/ 23,75	≤ 10	11-15	≥ 16
Cloranfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamicina	30	≤ 13	14-17	≥ 18

Antimicrobianos	Criterios de interpretación MIC (µg/mL)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Doxiciclina	≤ 4	8	≥ 16
Azitromicina	≤ 2	-	-

Fuente: CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed.

Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline-Second Edition. M45-A2. 2010;30(18):36-7.

Criterio de multirresistencia: Se consideró como multirresistente aquellos aislamientos que mostraron resistencia a tres o más familias de antimicrobianos diferentes.⁽⁹⁾

Determinación de los factores de virulencia:

Determinación de la enzima DNasa.⁽⁹⁾

Determinación de la enzima gelatinas.⁽⁹⁾

Determinación de la enzima lecitinasa.⁽⁹⁾

Determinación de la actividad hemolítica.^(8,9)

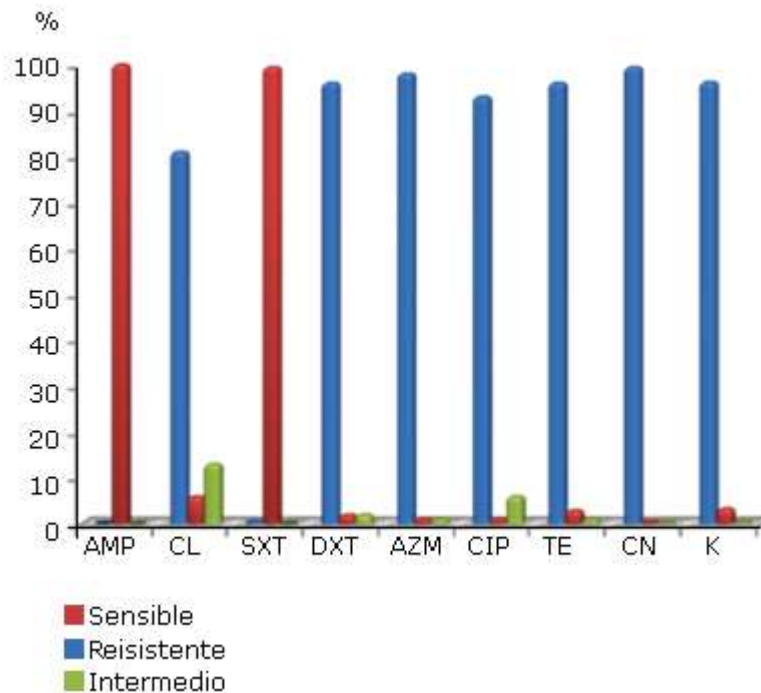
Los datos fueron almacenados y procesados con el programa Microsoft Office Excel 2015. El análisis de las variables cualitativas se realizó mediante la prueba de comparación de proporciones entre dos o más grupos, con el cálculo previo de las frecuencias absolutas y relativas. Cuando las frecuencias fueron pequeñas se usó la prueba de Fisher. La prueba de correlación de Spearman (r) se usó para determinar si existía una relación lineal entre las frecuencias de aislamientos resistentes, con las frecuencias de factores de virulencia, y si esta relación resultó estadísticamente significativa. En todos los casos los valores de probabilidad (p) se consideraron significativos cuando fueron menores de 0,05.

Todos los análisis fueron desarrollados empleando los paquetes de programas para análisis estadísticos GraphPadPrism versión 5.01 para Windows y Epidat 3.1.⁽¹⁰⁾

El protocolo de investigación que dio paso a los resultados de este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética Institucional del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (CEI-IPK-85-17).

Resultados

La figura 1 muestra el comportamiento in vitro de los 500 aislados de *V. cholerae* O1 frente a los nueve agentes antimicrobianos. Al comparar las frecuencias de aislamientos sensibles, resistentes y con sensibilidad intermedia entre todos los antimicrobianos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).



AMP: ampicilina; CL: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; DXT: doxiciclina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacina; TE: tetraciclina; CN: gentamicina; K: kanamicina.

Fig. 1 - Susceptibilidad antimicrobiana en aislados de *V. cholerae* O1.

Respecto a la ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol, prevalecieron los aislados resistentes a ambos antimicrobianos ($p < 0,005$). Sin embargo, frente a los otros antimicrobianos investigados la frecuencia de aislamientos sensibles fue mayor ($p < 0,005$), con valores de susceptibilidad superiores al 95%. Aunque predominaron los aislamientos sensibles al cloranfenicol, este antimicrobiano mostró el mayor porcentaje de aislamientos con sensibilidad intermedia ($p < 0,005$), seguido por la ciprofloxacina.

En la tabla 2 se ilustra la distribución de los aislados según los patrones de multirresistencia. Del total de aislados estudiados, 44 (8,8 %) mostraron multirresistencia. Se evidenciaron por primera vez en el país, 17 patrones de multirresistencia, lo que constituye un hallazgo novedoso en comparación con estudios anteriores realizados en el LNR-EDA-IPK.

Tabla 2 - Frecuencias de patrones multirresistencia de los aislados de *V. cholerae* O1

Patrones de multirresistencia	No.	%
AMP-SXT-K	8	17,39
AMP-SXT-TE	6	13,04
AMP-CL-SXT-DXT	4	8,69
AMP-SXT-DXT-TE-K	4	8,69
AMP-SXT-AZM	4	8,69
AMP-SXT-CIP-TE	4	8,69
AMP-CL-SXT-CIP-TE	2	4,34
AMP-SXT-CN	2	4,34
AMP-CL-SXT-DXT-TE	2	4,34
AMP-CL-SXT-DXT-AZM-TE	1	2,17
AMP-CL-SXT-DXT-TE-K	1	2,17
AMP-SXT-DXT-AZM-TE-K	1	2,17
AMP-SXT-DXT-CIP-TE	1	2,17
AMP-SXT-TE-K	1	2,17
AMP-SXT-DXT-CIP-TE-K	1	2,17
AMP-CL-SXT-CIP-TE-K	1	2,17
AMP-CL-DXT-AZM-K	1	2,17

AMP: ampicilina; CL: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; DXT: doxiciclina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacina; TE: tetraciclina; CN: gentamicina; K: kanamicina.

Factores de virulencia enzimáticos

En la figura 2 se muestra la frecuencia de aislados que expresaron los factores de virulencia DNasa, lecitinasa, gelatinasa y hemolisina. Se observa que la frecuencia de aislamientos positivos a gelatinasa (96 %) y lecitinasa (95 %) fue mayor que aquellos que resultaron negativos a estos factores enzimáticos ($p < 0,05$).

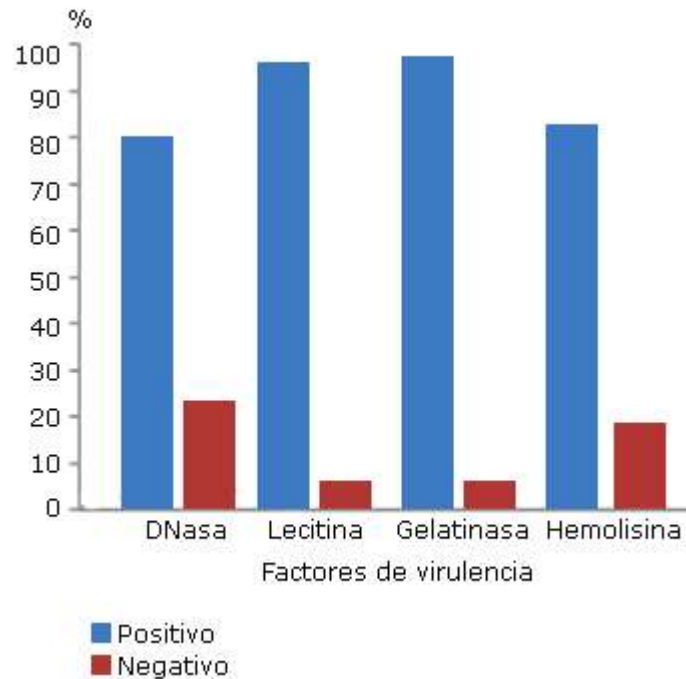


Fig. 2 - Comparación entre las frecuencias de aislamientos de *V. cholerae* O1 para cada factor de virulencia analizado.

Relación de la presencia de factores de virulencia enzimáticos con la resistencia a los antimicrobianos

Al observar los resultados se desprende que existe una correlación directamente proporcional entre la producción de las enzimas extracelulares y la resistencia antimicrobiana, o sea, a mayor frecuencia de aislamientos resistentes, mayor frecuencia de positividad de los factores de virulencia incrementándose en forma proporcional, lo cual se verifica para todos ellos con la prueba de correlación de Spearman ($p < 0,05$) (Fig. 3).

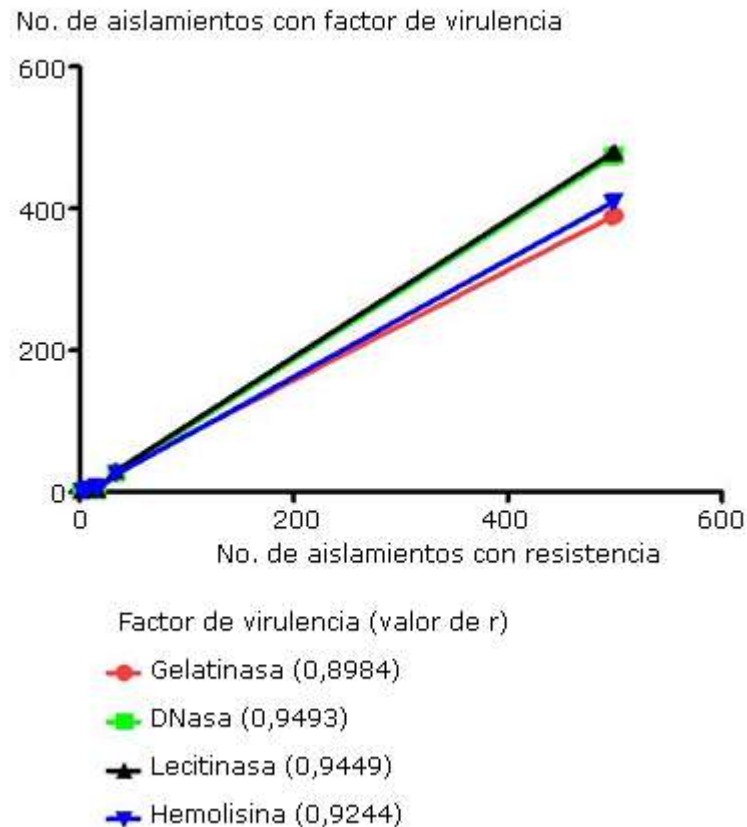


Fig. 3 - Relación entre las frecuencias de aislamientos con resistencia antimicrobiana de *V. cholerae* O1 con las frecuencias de cada uno de los factores de virulencia utilizando en la prueba de correlación de Spearman (r).

Discusión

Informes recientes indican que en los últimos años se ha constatado un incremento de la resistencia antimicrobiana a nivel mundial entre los aislamientos de *V. cholerae* frente a antibióticos de uso común, lo cual ha causado serios problemas en el tratamiento de los enfermos con cólera.⁽¹¹⁾

Los resultados del presente estudio relacionados con los hallazgos de resistencia antimicrobiana ante trimetoprim-sulfametoxazol son semejantes a los que se han publicado en varias regiones de Asia, África y otras regiones de América, donde se advierte sobre la alta incidencia de resistencia a este antimicrobiano.⁽¹¹⁾ Por ejemplo, en Ghana, *Eibach* y otros, en 92 aislamientos procedentes de un brote de cólera en niños mayores de 5 años muestran un 100 % de resistencia ante el trimetoprim-sulfametoxazol; sin embargo, los porcentajes de resistencia para la ampicilina obtenidos en esta investigación difieren de lo

publicado por *Eibach*, pues solo obtienen susceptibilidad intermedia en dicho antimicrobiano.⁽¹¹⁾

Otras investigaciones realizadas en Haití indican que en el análisis de 122 aislados de *V. cholerae* O1, procedentes de los 10 departamentos de ese país entre los años 2010-2011, obtuvieron elevados porcentajes de resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol y valores de susceptibilidad intermedios para ampicilina, ciprofloxacina y cloranfenicol en dos de los aislados.^(11,12) Por otra parte, en el año 2016 se informó en Nepal que 100 % de los aislamientos de *V. cholerae* analizados por *Gupta* y otros, resultaron resistentes a la ampicilina y al trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que 96,77 % resultó sensible frente al cloranfenicol.⁽¹²⁾

Sobre la base de las evidencias anteriores *Thapa* y otros., 2015, sugieren que los antimicrobianos como la ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol no deben ser empleados en el tratamiento de la enfermedad del cólera, debido a la evidencia de la existencia en la especie de *V. cholerae* de diferentes mecanismos de resistencia como la transferencia horizontal de genes de resistencia o las mutaciones espontáneas.⁽⁹⁾

En el caso de la resistencia antimicrobiana obtenida en los aislamientos de *V. cholerae* frente a la ampicilina en este estudio podría deberse a la producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), ya que la presencia de esta enzima se demuestra en varios estudios según la bibliografía, como los de *Gosh* y otros, en 2011, donde 92,8 % de los aislados existe la presencia de la misma,⁽¹²⁾ lo que podría deberse a la utilización por la bacteria de otros mecanismos de resistencia a la ampicilina que incluye alteraciones en la permeabilidad de la membrana a este antibiótico o a la presencia de bombas de eflujo que lo exportan. Investigaciones sobre los sistemas de eflujo en *V. cholerae* han determinado que la presencia de bombas de eflujo RDN en esta especie esté involucrada con la resistencia antimicrobiana.^(13,14)

Así mismo, los porcentajes evidenciados frente al trimetoprim-sulfametoxazol se pudieran atribuir a la posibilidad que tiene *V. cholerae* de portar el elemento SXT, que pertenece a alguna clase de EIC (elemento integrador conjugativo), descrito por vez primera por Waldor et al., como un elemento que le confiere la habilidad de adquirir genes de resistencia que provienen de enterobacterias resistentes a sulfametoxazol, trimetoprim y la estreptomina. En la actualidad muchos aislados de los serogrupos O1 y O139 alrededor del mundo ha adquirido el elemento SXT a través de diseminación natural.⁽¹⁵⁾

En este estudio se evidenciaron aislados con sensibilidad intermedia frente al cloranfenicol y la ciprofloxacina que incluye los aislados con concentraciones mínimas inhibitorias

(CIMs) cercanas a los niveles de antibiótico usualmente alcanzados en sangre o en los tejidos y para los cuales el grado de respuesta podría ser menor que con las cepas “sensibles”. Esto pudiera relacionarse con la presencia de mecanismos como resistencia mediada por plásmidos y el elemento integrador conjugativo para el primero y las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, los integrones y las bombas de eflujo para el segundo.⁽¹⁶⁾

En Cuba se han realizado varios estudios de susceptibilidad antimicrobiana en *V. cholerae*. En el 2004 los aislamientos mostraron bajos niveles de resistencia frente a ampicilina (14 %) y trimetoprim -sulfametoxazol (16 %);⁽¹⁷⁾ mientras que en 2008 se constata un aumento de los valores de resistencia hasta un 30,7 % con respecto a la ampicilina, manteniéndose niveles similares de susceptibilidad frente al trimetoprim-sulfametoxazol y disminuyendo los referentes a la tetraciclina y al cloranfenicol en un 13 % y 11 %, respectivamente.⁽⁴⁾

No obstante, en el 2016 se publicó un nuevo estudio realizado a 144 aislados de *V. cholerae* O1, los cuales mostraron valores de resistencia a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol por encima de 90 %, lo que representa un incremento con respecto a los valores obtenidos en los estudios previos, encontrándose en concordancia con los hallazgos de esta investigación.

En cuanto a doxiciclina, se encontró 94,1 % de sensibilidad, valor que es elevado, pero que pudiera sugerir que circulan aislamientos que han adquirido los plásmidos que portan resistencia para las tetraciclinas, por lo que se puede afirmar la necesidad de vigilancia de la resistencia de *V. cholerae* ante este medicamento, ya que es la primera opción terapéutica en los casos de cólera, y en la realización de quimioprofilaxis a los contactos. De igual forma los valores obtenidos frente a la azitromicina podría estar relacionado con la mayor actividad demostrada por este fármaco frente a *V. cholerae*,⁽¹⁸⁾ ya que su uso se ha recomendado solo para los pacientes de edad pediátrica o mujeres embarazadas con sospecha de EDA por cólera y como segunda opción en el resto de los casos.

Estudios publicados en Cuba por Fernández y otros, en el 2017, en *V. cholerae* no O1/no O139 mostraron un 4,8 % con patrones de multirresistencia (AMP-,C-,TE-; AMP-,SXT-,C; AMP-,SXT-,SUL-,AK-; AMP-,CIP-,SXT-,SUL-; AMP-, SXT-,C-,TE-,SUL-,DXT) diferentes a los de la presente investigación.⁽¹⁹⁾ Ceccarelli y otros, en el 2016, en un estudio realizado en *V. cholerae*, concluyeron que independientemente del serotipo, este microorganismo posee una elevada plasticidad genómica y una historia de exitosa asociación con plásmidos, transposones y elemento integrador conjugativo(ICE) que favorecen el fenotipo multirresistente que hoy caracteriza a este patógeno.⁽²⁰⁾

El número de aislados multirresistentes encontrado en el presente estudio podría estar relacionado con la presencia de integrones en los aislados, ya que los mismos son una de las causas principales de multirresistencia entre los enteropatógenos, tal y como reportan *Bakhshi* y otros, quienes sugieren que la presencia de un integrón clase 1 está distribuido entre los enteropatógenos, por lo que se hace necesario hacer estudios moleculares.^(19,21) Por esta razón, monitorear los cambios en los patrones de susceptibilidad e identificar los mecanismos de resistencia, constituye una prioridad para el control de la diseminación de los determinantes genéticos de resistencia ya que la resistencia ha sido reconocida en la actualidad por la OMS como un problema extremadamente serio.^(19,22)

Estudios realizados a nivel internacional en el género *Vibrio* sobre mecanismos implicados en la patogenicidad y virulencia, como son la producción de citotoxinas, proteasas y enzimas extracelulares; ha demostrado que los mismos están implicados en la aparición de hemorragias, edemas y alteraciones del sistema de defensa en el organismo. Muchos de estos cambios se ha debido a la presión de selección provocada por la introducción de los antimicrobianos, favoreciendo el desarrollo de los procesos infecciosos.^(19,23,24)

En este trabajo se encontró que los factores de virulencia enzimáticos la gelatinasa y la lecitinasa estuvieron presentes en la mayor cantidad de aislados, seguidos de hemolisinas y DNasa. En Cuba, estudios realizados por *Cabrera* y otros, en el 2008, a 65 cepas procedentes de muestras de heces, se demostró la presencia de al menos un factor de virulencia en todos los aislados. Se evidenció que la hemolisina y gelatinasa (100 %) se encontraron en mayor proporción, seguido de DNasa (78,8 %) y lecitinasa (80 %). Los resultados de dicha investigación son opuestos a los del presente estudio donde se obtuvo en mayor porcentaje o presencia a gelatinasa y lecitinasa.⁽²³⁾

Este resultado es similar a los encontrados en Cuba por *Pérez* y otros, en el 2013, en un estudio realizado a 70 aislamientos procedentes de muestras clínicas; no siendo así para el resto de la presencia de los factores de virulencia.⁽²⁵⁾ Asimismo, en el 2017 *Fernández* y otros, en estudios relacionados con la resistencia y la presencia de genes de virulencia en 125 aislamientos de *V. cholerae* no-O1/no-O139 identificados en muestras de origen clínico, demostraron la presencia de la enzima gelatinasa (100 %), lecitinasa (77,6 %), hemolisina (61,6 %) y para la DNasa (60 %).⁽²¹⁾

Los resultados de la presente investigación sobre la presencia de factores de virulencia enzimáticos en los aislamientos puede estar relacionado con el hecho de que los microorganismos pueden producir varias proteínas extracelulares e intracelulares para

invadir el sistema inmunológico del hospedero y lograr su colonización, ya que *V. cholerae* tiene varias “herramientas” en su arsenal para lograr completar el proceso infeccioso.⁽²⁴⁾

Los mecanismos bacterianos implicados en la patogenicidad y virulencia son en la actualidad objeto de numerosos estudios en el ámbito de la microbiología médica infecciosa. Sin embargo, estos mecanismos han experimentado un proceso largo evolutivo dependiente de la relación hospedero-patógeno. Muchos de estos cambios se han debido a la presión de selección provocada por la introducción de los antimicrobianos en medicina.⁽²⁵⁾

Conclusiones

El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana demuestra la factibilidad de continuar con el esquema de tratamiento antimicrobiano de primera y segunda línea establecidos por el Programa Nacional de Enfermedades de Trasmisión Digestiva para pacientes con cólera en Cuba.

Se evidencia por primera vez en el país aislados de *V. cholerae* con un espectro de multiresistencia incrementado, lo que constituye una expresión del avance de la resistencia antimicrobiana en la especie.

Se demuestra que todos los aislados cubanos estudiados poseen al menos dos de los factores de virulencia enzimáticos reconocidos en la especie, sugiriendo este hecho un alto potencial de virulencia.

Se evidencia una relación directa y proporcional entre la presencia de los factores de virulencia y resistencia antimicrobiana, sinergismo que surge mayor patogenicidad de los aislados estudiados procedentes de brotes epidémicos.

Referencias bibliográficas

1. Fernández S, Alonso G. Cólera y *Vibrio cholerae*. Revista del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. 2009;40(2).
2. González S, Villagra de Trejo A, Pichel M, Figueroa S, Merletti G, Caffer M. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. Rev Argent Microbiol. 2009 41:11-19.
3. Baffone W, Pianetti A, Bruscolini F, Barbieri E, Citterio B. Occurrence and expression of virulence- related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. Int J Food Microbiol. 2000;54(3):9-18.

4. Cabrera L, Bravo L, Ramírez M, 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;19:138-44.
5. Caffer M, Terragno R, González S, Viñas M, Pichel M, Binsztein N. Manual de procedimientos, aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2008.
6. Motulsky H. Analyzing Data with GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego CA. (Manual en línea) 1999 [acceso: 02/10/2016]; Disponible en: URL: <http://www.graphpad.com/manuals/PrismUsersGuidepdf>
7. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Supplement M100. 27th ed. Pennsylvania: CLSI; 2017.
8. CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline-Second Edition. M45-A2. 2010;30(18):36-7.
9. Thapa U, Adhikari N, Maharjan R, Banjara M, Rijal K, Basnyat S, et al. Multidrug resistant *Vibrio cholerae* O1 from clinical and environmental samples in Kathmandu city BMC Infectious Diseases. 2015;15:104.
10. Santiago M, Hervada X, Naveira G, Silva L, Fariñas H, Vázquez E. El programa epidat: uso y perspectivas. Rev Panam Salud Pública. 2010; 27: 80-82.
11. Rashed S, Hasan N, Alam M, Sadique A, Sultana M. *Vibrio cholerae* O1 with reduced susceptibility to ciprofloxacin and azitromycin isolated in a Rural Coastal Area of Bangladesh. Frontiers in Microbiology. 2017;8(252).
12. Talkington D, Bopp C, Tarr C, Parsons M, Dahourou G, Freeman M. Characterization of Toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010-2011. Emerg Infect Dis. 2011;17(11):2122-9.
13. Zanetti S, Spanu T, Deriu A, Romano L, Sechi LA. *In vitro* susceptibility of *Vibrio* spp isolated from the environment. Int J Antimicrob Agents. 2001;17(5):407-9.
14. Mandal J, Dinooop K. Increasing antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* Biotype El Tor strains isolated in a tertiary-care centre in India. J Health Popul Nutr. 2012;30(1):12-6.
15. Kitaoka M, Miyata S, Unterweger D, Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. Journal of Medical Microbiology. 2011;60:397-407.
16. Quilici M, Massenet D, Gake B, Olson D. *Vibrio cholerae* O1 variant with reduced susceptibility to ciprofloxacin, West Africa. Emerg Infect Dis. 2010;16(11):1804-5.

17. Bravo L, Cabrera R, Cabrera L, Ramírez M, Castañeda N, Fernández A, et al. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Vibrio Cholerae* no-O1 aisladas de pacientes en Cuba. Rev Esp Quimioterap. 2004;17(2):200-1.
18. Calvo-Barbado D, Delgado-Martínez I. Formulario Nacional de Medicamentos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2014. [acceso: 02/10/2016]. Disponible en: http://www.bvssldcu/libros_texto/formulario_nac_medicamentos_4taed/indice_phtm
19. Fernández A, Bravo L, Rivero G, Cabrera N, Nuñez F, Cruz Y, et al. Determinants of Virulence and Antimicrobial Susceptibility in Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Isolates. MEDICC Review. 2017;19(4).
20. Ceccarelli D, Alam M, Huq A, Colwell R. Reduced susceptibility to extended-spectrum β -Lactams in *Vibrio cholerae* isolated in Bangladesh. Frontiers in Public Health. 2016;4(231).
21. Bakhshi B, Eftekhari N, Pourshafie M. Genetic Elements Associated With Antimicrobial Resistance Among Intestinal Bacteria Jundishapur. J Microbiol. 2014;7(5):9924.
22. OMS / WHO. Cholera, 2014. Weekly Epidemiological Record. 2015;90: 517-44.
23. Cárdenas-Perea M, Cruz y López O, Gándara-Ramírez J, Pérez-Hernández M. Factores de virulencia bacteriana: La “inteligencia” de las bacterias. Elementos. 2014;94:35-43.
24. Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. J Nat Toxins. 1999;8(2):259-69.
25. Pérez C. Caracterización fenotípica de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 de pacientes con Enfermedad Diarreica Aguda en Cuba. Cuba: La Habana; 2013.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Yanaika Cruz Infante: Diseñó la investigación, supervisó e interpretó los resultados y realizó los estudios microbiológicos.

Anabel Fernández Abreu: Diseñó la investigación, supervisó e interpretó los resultados.

Laura Bravo Fariñas: Participó en la ejecución de los estudios microbiológicos y en la interpretación de los resultados.

Fidel A. Nuñez: Participó en la interpretación de los resultados y realizó el análisis estadístico.

Adalberto Águila Sánchez: Participó en el diseño la investigación.

Jenny L. Hernández Martínez: Participó en la ejecución de los estudios microbiológicos.

Aurora Longa: Participó en el diseño de la investigación y supervisó e interpretó los resultados.

Zurisnay Ramírez Mejías: Participó en la ejecución de los estudios microbiológicos.

Brenda Conesa Sánchez: Participó en la ejecución de los estudios microbiológicos.

Ana María Cordero Azcuy: Participó en la ejecución de los medios de cultivo.

Eduardo A Valdés Ramos: Participó en la ejecución de los medios de cultivo.