

Determinación de biopelículas y betalactamasas de espectro extendido en *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 aislados de pacientes con diarreas en Cuba

Determination of biofilms and extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolates from patients with diarrhea in Cuba

Anabel Fernández-Abreu^{1*}

Laura del Carmen Bravo-Fariñas¹

Giselle Rivero-Navea²

Fidel Angel Nuñez-Fernández³

Yanaika Cruz-Infante¹

Adalberto Águila-Sánchez¹

Jenny Lázara Hernández-Martínez¹

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

² Hospital Calixto García. La Habana, Cuba.

³ Escuela Latinoamericana de Medicina. La Habana, Cuba.

*Autor de correspondencia: anabel@ipk.sld.cu

RESUMEN

Vibrio cholerae no-O1, no-O139 es el tercer grupo de bacterias del género *Vibrio* que con más frecuencia producen diarreas. Sobrevive en los ambientes acuáticos, utilizando la formación de biopelícula como mecanismo de supervivencia que propicia la transmisión de la enfermedad diarreica. Desde 1977 se caracterizan aislados de *V. cholerae* con resistencia múltiple, y algunos de los mecanismos involucrados incluyen la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Este trabajo tuvo como objetivo determinar la formación de biopelícula en los aislados cubanos de *V. cholerae* no-O1, no-O139, causantes de enfermedad diarreica aguda (EDA), y detectar la producción de BLEE en aquellos con resistencia total e intermedia a ampicilina. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, entre enero 2014 y junio 2015. Se estudiaron 55 aislados caracterizados

previamente, que formaban parte del cepario del Laboratorio Nacional de Referencia de EDA del Instituto “Pedro Kourí”. Para la determinación fenotípica de BLEE se estudiaron 43, de los que ya se conocía su susceptibilidad a ampicilina. El 54,5 % de los aislados resultaron positivos a la formación de biopelícula, y predominaron los clasificados como formadores moderados (46,6 %) y débiles (36,6 %). De los 34 resistentes a ampicilina, 26,5 % resultaron positivos a la producción de BLEE. En el caso de los nueve aislados con resistencia intermedia a ampicilina, 44,4 % resultaron positivos. Los resultados del presente estudio contribuyen al conocimiento sobre la capacidad que tienen de persistir en el ambiente y permiten profundizar sobre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* no-O1; no-O139; BLEE; biopelícula.

ABSTRACT

Vibrio cholerae non-O1, non-O139 is the third bacterium group from the genus *Vibrio* most commonly causing diarrhea. It survives in aquatic environments, using the formation of biofilm as a survival mechanism facilitating the transmission of diarrheal disease. Multi-drug resistant *V. cholerae* isolates have been characterized since the year 1977, and some of the mechanisms involved include the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). The purpose of the study was to determine the formation of biofilm in Cuban isolates of *V. cholerae* non-O1, non-O139 causing acute diarrheal disease (ADD), and detect the production of ESBLs in those with total or intermediate resistance to ampicillin. A descriptive cross-sectional study was conducted from January 2014 to June 2015. The study sample was 55 previously characterized isolates obtained from the strain collection at the ADD National Reference Laboratory of Pedro Kourí Institute. For phenotypic determination of ESBLs, 43 were studied which were known to be susceptible to ampicillin. 54.5 % of the isolates tested positive for biofilm formation, with a predominance of those classified as moderate (46.6 %) and weak (36.6 %) biofilm producers. Of the 34 isolates resistant to ampicillin, 26.5 % were positive for ESBL production. Of the 9 with intermediate ampicillin resistance, 44.4 % were positive. The results of the present study contribute knowledge about their ability to persist in the environment, and provide insight into antimicrobial resistance mechanisms.

Keywords: *Vibrio cholerae* non-O1; non-O139; ESBL; biofilm.

Recibido: 11/12/2018.

Aprobado: 04/04/2019.

En la región del Caribe la enfermedad diarreica aguda (EDA) provocada por el género *Vibrio* se ha incrementado a partir del terremoto ocurrido en la República de Haití en 2010.⁽¹⁾ La infección por *Vibrio cholerae* se adquiere por la ingestión de agua o alimentos contaminados. El ser humano es un huésped accidental y transitorio, pero es quien lo disemina hacia las fuentes de infección.^(2,3) Este microorganismo sobrevive en los ambientes acuáticos durante los períodos entre epidemias y alterna entre un rápido crecimiento dentro de su hospedero y una prolongada supervivencia en los ambientes acuáticos.^(4,5) Utiliza la formación de biopelícula como mecanismo de supervivencia en el medio ambiente biótico o abiótico, interviniendo en la transmisión de la enfermedad diarreica provocada por esta bacteria y en el tratamiento de las mismas, ya que se reconoce que la formación de biopelícula constituye reservorio de bacterias con multirresistencia.^(4,6)

V. cholerae de acuerdo con el lipopolisacárido capsular se clasifica en más de 200 serogrupos, divididos en O1, O139 y no-O1, no-O139. Estos últimos se aíslan en pacientes con manifestaciones clínicas que van desde diarrea leve hasta la deshidratación grave, pero no presentan potencial epidémico. Además se asocian con cuadros extraintestinales.^(2,7)

Por mucho tiempo no se informó resistencia significativa a los antimicrobianos en *V. cholerae*, pero desde 1977 se caracterizan aislamientos con resistencia múltiple. Los patrones varían en dependencia de la región, del uso de los antibióticos y de la fecha del análisis.

Algunos de los mecanismos detrás de este fenómeno incluyen la producción de β -lactamasas.⁽⁸⁾ La producción de estas enzimas, se informa como un importante mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos. Han sido detectadas en *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *V. cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella* spp.⁽⁹⁾

La EDA provocada por *V. cholerae* ocupa un lugar importante dentro del sistema de salud en Cuba, y *V. cholerae* no-O1, no-O139 es considerado un patógeno emergente internacional.⁽¹⁰⁾ Este trabajo tiene como objetivo determinar la formación de biopelícula en los aislados cubanos de *V. cholerae* no-O1, no-O139, causantes de EDA, y detectar la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en aquellos con resistencia total e intermedia a ampicilina.

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, entre enero 2014 y junio 2015.

Muestras: Se estudiaron 55 aislados de *V. cholerae* no-O1, no-O139, los cuales estaban preservados en medio de conservación Pasteur, y pertenecían a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio Nacional de Referencia Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNR-EDA-IPK). De ellos, se seleccionaron 43 aislados que ya se conocía eran resistentes o mostraron resistencia intermedia a ampicilina para el estudio de la determinación fenotípica de BLEE.

Detección de biopelícula: Se realizó a partir de un cultivo puro de *V. cholerae* no-O1, no-O139 en agar hierro y dos azúcares de Kligler según la metodología descrita por O'Toole y otros 2011. Se clasificaron en cuatro categorías desde una cruz hasta cuatro cruces de acuerdo con la intensidad de la coloración.⁽¹¹⁾

Detección de BLEE: Se utilizaron las pruebas de sinergia de doble disco y la de discos combinados con inhibidor.⁽⁹⁾

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Formación de biopelícula: En los 55 aislados de *V. cholerae* no-O1, no-O139, el 54,5 % resultó positivo para la formación de biopelícula. La distribución de estos según la intensidad del color, evidenció que de 30 aislamientos positivos, el 36,67% (11/30) se clasificó con una cruz, el 46,67 % (14/30) con dos cruces, el 10 % (3/30) con tres cruces y el 6,67 % (2/30) con cuatro cruces.

Según investigaciones realizadas, se ha demostrado que la formación de biopelícula es más común en aislados de *V. cholerae* epidémicos que en los no epidémicos, lo cual constituye un factor clave para la supervivencia ambiental y la transmisión.⁽¹²⁾ La evolución de los métodos analíticos de los estudios de imagen ha permitido diseñar diferentes estrategias para el estudio de la biopelícula, entre las cuales se encuentran varios modelos específicos.

Las placas de microtitulación representan una herramienta importante para el estudio de las etapas de formación de la biopelícula bacteriana. Publicaciones indican que la biopelícula formada en placas de microtitulación desarrolla algunas características de la biopelícula madura, como la tolerancia antibiótica y la resistencia al sistema inmune.⁽¹¹⁾ La base de esta resistencia bacteriana aún se está investigando. Entre las razones observadas se incluye, la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituyen la matriz de exopolisacáridos, el crecimiento lento de las bacterias dentro de la biopelícula, la existencia de

microambientes que antagonicen con la acción del antibiótico, la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y a la aparición de un fenotipo específico de biopelícula que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas.⁽⁴⁾

Los resultados del presente estudio son superiores a los hallados en Haití, donde se obtuvo el 46,5 % de los aislados positivos a la formación de biopelícula.⁽¹³⁾ Además, predominaron los clasificados con una y dos cruces, lo cual es diferente a lo publicado en Tailandia donde todos los aislados formadores de biopelícula se clasificaron entre tres y cuatro cruces.⁽¹⁴⁾ Se considera que es importante identificar las bacterias que son formadoras fuertes de biopelícula *per se*, así como a las que bajo determinados cambios del medio son capaces de formarlas, ya que este hecho puede condicionar el pronóstico y el tratamiento de la infección por dicho microorganismo.⁽¹⁵⁾

Presencia de betalactamasas de espectro extendido: En la tabla se representa que de un total de 43 aislados, el 30,2 % (13/43) fue positivo a BLEE. De los 34 que mostraron resistencia a la ampicilina, el 26,5 % (9/34) resultó positivo y en el caso de los nueve aislamientos con resistencia intermedia a este antimicrobiano, el 44,4 % (4/9) resultó BLEE positivo.

Tabla. Determinación de BLEE en aislados de *V. cholerae* no-O1, no-O139 (n= 43)

Ampicilina	BLEE positivo (%)	BLEE negativo (%)	Total (%)
Resistente	9 (26,5)	25 (73,5)	34 (100)
Sensibilidad intermedia	4 (44,4)	5 (55,6)	9 (100)

El porcentaje de aislados positivos a BLEE en el presente estudio puede estar relacionado con el hecho de que determinadas cepas BLEE positivas pueden parecer sensibles *in vitro* a los betalactámicos, dado a que pueden existir diferencias cuantitativas en la actividad hidrolítica de determinadas cepas BLEE sobre los sustratos; así como si el inóculo es muy elevado y/o si la producción de betalactamasa se asocia con otro mecanismo de resistencia.⁽¹⁶⁾

Resultados superiores se publicaron en la India, con el 100 % de positividad a la expresión de BLEE, en los aislados de *V. cholerae* estudiados. Se informan además, casos de susceptibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación.⁽¹⁷⁾ La caracterización

genética más reciente de la multirresistencia y producción de BLEE en esta especie, fue una betalactamasa de origen plasmídico codificada por el gen *bla*TEM-63, detectada en cepas asociadas a un brote de cólera en Sudáfrica en 2008, así como aislados clínicos de *V. cholerae* no-O1/no-O139 obtenidos de sangre humana en China, los cuales poseían el gen *bla*PER-1 embebido en un integrón de Clase 1 contenido en el plásmido conjugativo IncA/C.⁽¹⁸⁾ La presencia de plásmidos que portan genes de resistencia a varias familias de antimicrobianos juega un papel importante en la propagación de este fenómeno.⁽¹⁹⁾

Una de las limitaciones de esta investigación fue que no se determinó por métodos genotípicos la presencia de BLEE, así como su posible relación con la capacidad de formación de biopelículas en los aislados estudiados. No obstante, sus resultados contribuyen al conocimiento sobre la capacidad que tienen de persistir en el ambiente y permiten profundizar sobre los mecanismos de resistencia a los diferentes antimicrobianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cólera. 2012 [citado 25 Abr 2019] . Disponible en: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs107/es/index.html>
2. González S, Villagra de Trejo A, Pichel M, Figueroa S, Merletti G, Caffer MI, et al. Caracterización de aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. Rev Argent Microbiol. 2009;41(1):11-9.
3. Chin J. El control de las enfermedades transmisibles. 17th ed. Washington, DC: OPS; 2001. Publicación científica y técnica No. 581.
4. Marrero K, Fando-Calzada R. Formación de biopelícula por *V. cholerae*. Rev CENIC Ciencias Biológicas. 2011;42(2):69-80.
5. Silva AJ, Benitez JA. *V. cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004330. doi: 10.1371.
6. Nadell CD, Drescher K, Wingreen NS, Bassler BL. Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. The ISME Journal. 2015;9:1700-9.
7. Farmer J, Janda J, Brenner F, Cameron D, Birkhead K. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Published Online. 2015. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01078.
8. Fernández S, Alonso G. Cólera y *V. cholerae*. Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel. 2009;40(2):50-9.

9. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2011;29(7):524-34.
10. Fernández A, Bravo L, Aguila A, Cruz Y, Illnait M, Llop A, et al. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos cubanos de *V. cholerae* O1 procedentes de muestras clínicas. *Rev Cub Med Trop.* 2016;68(1):51-8.
11. O'Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE.* 2011 [cited 2019 Abr 25]. Disponible en: <http://www.jove.com/details.php?id=2437>. doi: 10.3791/2437.
12. Kaur S, Sharma P, Kalia N, Singh J, Kaur S. Anti-biofilm Properties of the Fecal Probiotic Lactobacilli Against *Vibrio* spp. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:120. doi: 10.3389.
13. Rahman M, Jubair M, Alam MT, Weppelmann TA, Azarian T, et al. High-Frequency Rugose Exopolysaccharide Production by *V. cholerae* Strains Isolated in Haiti. *PLoS ONE.* 2014;9(11):e112853. doi:10.1371.
14. Preeprem S, Mittraparp-Arthorn P, Bhoopong P, Vuddhakul V. Isolation and characterization of *V. cholerae* isolates from seafood in Hat Yai City, Songkhla, Thailand. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(11):881-6. doi: 10.1089.
15. Gómez J, Gómez-Lus ML, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre JR, et al. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Esp Quimioter.* 2013;26(2):97-102
16. Perozo M, Armindo J, González C, Maribel J. Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;pii:AAC.00166-15.
17. Bhattacharya D, Dey S, Roy S, Parande MV, Telsang M, Seema MH, et al. Multidrug-Resistant *Vibrio cholerae* O1 was Responsible for a Cholera Outbreak in 2013 in Bagalkot, North Karnataka. *Jpn J Infect Dis.* 2015;68:347-50.
18. Ceccarelli D, Alam M, Huq A, Colwell R. Reduced susceptibility to extended-spectrum β -Lactams in *V. cholerae* isolated in Bangladesh. *Frontiers in Public Health.* 2016;4.
19. Rajpara N, Nair M, Bhardwaj AK. A Highly Promiscuous Integron, Plasmids, Extended Spectrum Beta Lactamases and Efflux Pumps as Factors Governing Multidrug Resistance in a Highly Drug Resistant *Vibrio fluvialis* Isolate BD146 from Kolkata, India. *Indian J Microbiol.* 2018;58(1):60-7. doi: 10.1007.