

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos de cepas vacunales atenuadas de *Vibrio cholerae*

Angela Mariana Zayas-Tamayo, Grether Barreras-García, Karen Marrero-Domínguez*.

Departamento de Microbiología, Dirección de Medio Ambiente, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

*Departamento de Biología Molecular, Dirección de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Avenida 25 y 158, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. angela.zayas@cnic.edu.cu

Recibido: 11 de julio de 2013.

Aceptado: 3 de octubre de 2013.

Palabras clave: cólera, susceptibilidad, agentes antimicrobianos, cepas vacunales.

Key words: cholera, susceptibility, antimicrobial agents, vaccine strains.

RESUMEN. El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por la presencia del *Vibrio cholerae* O1 en el intestino delgado por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con *Vibrio cholerae* O1. En particular, las vacunas atenuadas parecen ser una de las variantes más promisorias para su prevención y para su aprobación, se hace necesaria su evaluación clínica. La agencia reguladora cubana [Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Medicamentos (CECMED)] tiene entre sus requerimientos la eliminación de la cepa vacunal en los voluntarios de los ensayos clínicos antes de ser dados de alta. Por tanto, es necesario determinar el patrón de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos que se usan en la terapia de las cepas vacunales en cuestión. El objetivo de la presente investigación consistió en determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas vacunales de *V. cholerae* para lo cual se utilizaron los agentes antimicrobianos siguientes: azitromicina, tetraciclina y ciprofloxacino y se probaron tres métodos diferentes: el sistema semi-automatizado DIRAMIC-10, Concentración Mínima Inhibitoria y difusión en agar (Kirby Bauer). Se analizaron nueve cepas de *V. cholerae*, que incluyeron al candidato vacunal oral cubano CV638, así como otras tres cepas, obtenidas a partir de una cepa del serogrupo O139. Los resultados obtenidos por los tres métodos empleados, evidenciaron que las cepas analizadas son sensibles a los agentes antimicrobianos evaluados, los cuales pudieran ser utilizados para la descontaminación de la cepa vacunal en voluntarios que se presenten a los ensayos clínicos para su evaluación.

ABSTRACT. Cholera is an acute diarrheal disease caused by the presence of *Vibrio cholerae* O1 in the small intestine after ingestion the food or water contaminated with *Vibrio cholerae* O1. In particular, attenuated vaccines seem to be one of the most promising variants and for their approval, is necessary clinical evaluation. The Cuban Regulatory Agency, Center for State Control of Drugs, Medical Equipment and Devices (CECMED) has among the requirements the elimination the vaccine strain in clinical trial volunteers before being discharged. It is, therefore, necessary to determine the pattern of susceptibility to antimicrobial therapy used in vaccine strains under question. The aim of this investigation was to determine the antimicrobial susceptibility of *V. cholerae* vaccine strains and the following antimicrobial agents were used: Azithromycin, Tetracycline and Ciprofloxacin and tested by three different methods: the semi-automated system DIRAMIC-10, the minimal inhibitory concentration and agar diffusion (Kirby Bauer). We analyzed nine strains of *V. cholerae*, which included the Cuban CV638 oral vaccine candidate as well as other three strains, obtained from a strain O139 serogroup. The results obtained by the three methods showed that the strains are sensitive to the antibiotics studied. Therefore, they could be used for decontamination of the vaccine strain in volunteers, submitted to clinical trials.

INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae es el agente etiológico de la enfermedad diarreica aguda conocida como cólera, que se caracteriza por diarreas profusas, con apariencia de agua de arroz. La forma clínica más severa, el cólera *gravis*, se define por una pérdida rápida de líquido y electrolitos a través del tracto gastrointestinal que de no tratarse adecuadamente conduce al shock hipovolémico, la acidosis metabólica y la muerte en poco tiempo.¹ En los últimos tres años, se ha reportado el aumento de la incidencia de *Vibrio cholerae* O1 por la Organización Mundial de la Salud (OPS) en países subdesarrollados principalmente Haití, lo que hace necesario la toma de decisiones que permitan tanto la eliminación del brote como la infestación de un número mayor de personas.² Una adecuada higiene, la rehidratación oral, el saneamiento de las aguas y el uso de antibióticos en situaciones no controladas son pautas para controlar la enfermedad,^{3,4} pero no siempre es posible garantizarlos en muchos escenarios en el plazo requerido, por lo que el desarrollo y uso de vacunas preventivas es una alternativa relevante en las condiciones actuales y el futuro inmediato como elemento importante en la prevención del cólera.⁵ En Cuba, se ha obtenido un candidato vacunal contra el cólera (CV638), a partir de la cepa de *V. cholerae* O1 atenuada 638.⁶ El CV638 O1 ha cursado satisfactoriamente estudios en adultos tanto en fase 0 como de fase I-II.^{7,8} Aunque O1 requiere aún la evaluación de fase I (seguridad y reactogenicidad) en adolescentes y niños, estudio que se llevará en individuos sanos hospitalizados. Por su carácter de vacuna viva atenuada no registrada aún, se requiere erradicar el agente vacunal mediante administración de antibióticos al quinto día de administrado el producto en estudio. La azitromicina es un antibiótico de elección para el tratamiento del cólera en niños,⁹ razones por las que se ha considerado usarlo para erradicar la infección de *V. cholerae* O1 638 al quinto día en los sujetos vacunados. Aunque *V. cholerae* O1, es generalmente sensible a numerosos agentes antimicrobianos, se ha reportado resistencia a partir de los 70 del siglo pasado.¹⁰ Por esta razón, la autoridad nacional reguladora (CECMED) responsable de aprobar el protocolo de ensayo clínico en Cuba, exige se demuestre *in vitro* que las cepas de *V. cholerae* O1 638 presenten sensibilidad al antibiótico que se utilizará, para descontaminar a los pacientes al concluir el estudio clínico. Para determinar la susceptibilidad de *V. cholerae* O1 a los agentes antimicrobianos, el Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, siglas en Ingles) ha desarrollado un conjunto de documentos de buenas prácticas que abarcan todos los aspectos de las pruebas microbiológicas.¹¹ La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de estudiar la susceptibilidad de cepas vacunales de *Vibrio cholerae* O1 y O139, a los agentes antimicrobianos azitromicina, tetraciclina y ciprofloxacino, mediante los métodos siguientes: Sistema semi-automatizado DIRAMIC-10, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y por difusión en agar (Kirby Bauer).¹¹

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, medios de cultivo y reactivos empleados

Las cepas bacterianas analizadas incluyeron clones de *V. cholerae* 638 (Serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Ogawa, Δ CTX Φ , *hap::celA*) provenientes del banco maestro del Instituto Finlay, que se usó como referencia de la cepa vacunal y de cuatro lotes vacunales producidos para ensayos clínicos en el mismo Instituto. Además, se utilizó la cepa 81 (Serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Ogawa, Δ CTX Φ), parental de 638, para evaluar si había ocurrido algún cambio en el patrón de resistencia a los agentes antimicrobianos durante la obtención de la cepa 638 y adicionalmente, se utilizaron las cepas atenuadas *V. cholerae* TLP01, TLP05 y TLP13 pertenecientes al serogrupo O139.¹² En todos los métodos utilizados, se emplearon tres agentes antimicrobianos: azitromicina, tetraciclina y ciprofloxacino. Se utilizaron como control de calidad para la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CLSI 2010).

Procesamiento de las muestras

Para el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el medio de cultivo LB (triptona, 1 %; extracto de levadura, 0,5 % y cloruro de sodio, 1 %) y para los ensayos de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, se empleó el medio de cultivo caldo Mueller-Hinton. Se evaluaron nueve cepas de *V. cholerae*, las cuales fueron sembradas en medio agar LB (Luria Bertani) y se incubaron a 37 °C en aerobiosis durante un período de 18 a 24 h. El estudio de susceptibilidad se realizó mediante los métodos siguientes: sistema semi-automatizado DIRAMIC-10, CMI y difusión en agar (Kirby Bauer). Se emplearon los discos de antibióticos de OXOID [azitromicina (30 μ g), tetraciclina (15 μ g) y ciprofloxacino (5 μ g)] y para la CMI se emplearon los compuestos activos de estos tres antibióticos producidos por la Empresa Farmacéutica Roberto Escudero y Reynaldo Gutierrez. Se realizaron tres réplicas por cada cepa de *V. cholerae* evaluada.

Determinación de la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos

Sistema semi-automatizado DIRAMIC-10

Este sistema determina la sensibilidad a los agentes antimicrobianos en 4 h y detecta el crecimiento bacteriano mediante principios fotométricos. Además, utiliza como medio de cultivo DKD (Caldo Mueller-Hinton, sales Ca^{2+} y Mg^{2+} y Polímero) y discos de agentes antimicrobianos calidad reactivo (OXOID, Inglaterra). Está constituido por una bomba peristáltica, un sensor a microflujo continuo que detecta los cambios turbidimétricos del microorganismo en el

medio de cultivo. Colonias frescas de las cepas a analizar, crecidas en LB a 37 °C durante toda la noche, se resuspendieron en el medio DKD, a una concentración celular correspondiente a una turbidez de 0,5 en la escala McFarland. Estas suspensiones se inocularon por triplicado en frascos de medio DKD y posteriormente, se distribuyeron en las tiras de antibiograma (compuestas por 24 pocillos) que contenían por cada pocillo, un disco del agente antimicrobiano a evaluar al que se adicionaron 200 µL de la suspensión del inóculo. Cada tira contó con un control positivo (200 µL del medio de cultivo con el microorganismo sin agente antimicrobiano) y un control negativo (200 µL del medio de cultivo solo). Las mediciones se realizaron en las primeras cuatro horas después de realizado cada montaje e incubado a 37 °C. Seguidamente, se realizaron las mediciones de las muestras. Para ello, se determinó la densidad óptica del inóculo en el pocillo control positivo y a partir de esta, se calculó el índice de crecimiento. El Sistema DIRAMIC clasifica los resultados mediante criterios de corte establecidos de forma cualitativa: sensible, intermedio y resistente.¹³

Método de difusión en agar (Kirby-Bauer)

El estudio de la sensibilidad de las cepas vacunales se realizó además, mediante el método de difusión en agar, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI 2010.⁹ Se preparó un inóculo con una turbidez de 0,5 en la escala McFarland en caldo Müeller-Hinton, mediante resuspensión directa de dos o tres colonias crecidas en medio LB durante 24 h. Las suspensiones se extendieron por triplicado, de forma homogénea por toda la superficie de placas de agar de Müeller-Hinton, con ayuda de un hisopo estéril. Las placas inoculadas se dejaron secar durante 15 min y se colocaron en la superficie de ellas los discos de azitromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg) y ciprofloxacina (5 µg). Estas se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones aeróbicas y se realizó la medición de los halos de inhibición, los resultados se compararon con los reportados por CLSI 2010.

Concentración Mínima Inhibitoria mediante microdilución en placa

Se utilizaron placas (NUNC de 96 pocillos) que contenían concentraciones decrecientes (512 - 0,025 mg) de los tres agentes antimicrobianos, las cuales se prepararon a partir de las disoluciones madre y luego, se diluyeron en caldo Müeller-Hinton hasta obtener las concentraciones establecidas. Para la preparación del inóculo se ajustó la turbidez a 0,5 en la escala McFarland, se diluyó para que la concentración final fuese $5 \cdot 10^5$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) y se inocularon cuidadosamente en las placas con las diferentes concentraciones del agente antimicrobiano. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. La CIM correspondió a la mínima concentración de antibiótico a la que no se observó crecimiento bacteriano (turbidez), otro método empleado para realizar la evaluación fue la medición de la densidad óptica a 630 nm.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

En el inicio del tercer milenio, el cólera continúa siendo un problema de salud para muchos países del mundo, es una enfermedad que evoluciona con una infección intestinal aguda.¹⁴ Cuando se utiliza un agente antimicrobiano es crucial elegir aquel para el cual el microorganismo sea susceptible. Los agentes antimicrobianos de primera línea recomendados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para el tratamiento del cólera son: doxiciclina (para adultos) y azitromicina o eritromicina en caso de embarazadas o niños. Las drogas de segunda línea son: ciprofloxacino o azitromicina para adultos y ciprofloxacino o doxiciclina para niños.^{15,16} La evaluación del patrón de susceptibilidad de las cepas vacunales mediante el sistema semiautomatizado DIRAMIC-10 mostró que las cepas evaluadas son susceptibles a la azitromicina, tetraciclina y ciprofloxacino (Tabla 1). Los resultados informados por García y cols¹⁵, mostraron que las cepas atenuadas y sus parentales fueron sensibles a tetraciclina, doxiciclina, cloranfenicol, estreptomina, rifampicina, kanamicina, eritromicina, ácido nalidíxico y ciprofloxacino mediante el sistema semiautomatizado DIRAMIC-10. Estos resultados sugieren que este sistema puede ser utilizado para determinar el patrón de susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos de cepas atenuadas de *V. cholerae* O1 y O139, incluidas como ingredientes farmacéuticamente activos en candidatos vacunales orales contra el cólera.

Tabla1. Susceptibilidad de las cepas vacunales de *V. cholerae* a diferentes antibióticos, de acuerdo con los resultados del análisis con el Sistema DIRAMIC-10

Cepas evaluadas	Discos de antibióticos		
	Ciprofloxacino	Tetraciclina	Azitromicina
638, Banco maestro	S	S	S
638, lote vacunal 207	S	S	S
638, lote vacunal 209	S	S	S
638, lote vacunal 301	S	S	S
638, lote vacunal 302	S	S	S
81	S	S	S
TLP01	S	S	S
TLP05	S	S	S
TLP13	S	S	S
<i>E. coli</i> 25922	S	S	S
<i>S. aureus</i> 25923	—	—	S

La técnica de difusión en agar es el método más comúnmente usado para las pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Mediante los método de difusión en agar y CMI se comprobó que las cepas evaluadas eran sensibles a todos los agentes antimicrobianos, teniendo en cuenta lo establecido por el CLSI (2010) (Tablas 2 y 3).¹¹ Estos criterios de interpretación de la zona de inhibición del crecimiento (halo) de las cepas de *V. cholerae* solo para la ampicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol y no para el ciprofloxacino y la azitromicina. En este ensayo, se determinó la susceptibilidad a ciprofloxacino y azitromicina mediante los criterios para las enterobacterias. Según CLSI 2010, los resultados relacionados con la susceptibilidad de las cepas obtenidos con los discos de tetraciclina pueden ser utilizados para predecir la susceptibilidad a la doxiciclina, o a los antibióticos estructuralmente relacionados; si la cepa es susceptible a tetraciclina, también será susceptible a doxiciclina.^{14,17}

Tabla 2. Susceptibilidad a diferentes antibióticos de las cepas atenuadas de *V. cholerae* según el método de difusión en agar (Kirby-Bauer)

Cepas Evaluadas	Antibiótico (halo en mm)					
	Ciprofloxacino (≥ 21)		Tetraciclina (≥ 19)		Azitromicina (21-26)	
638, banco maestro	32	S	21	S	24	S
638, lote vacunal 207	31	S	23	S	25	S
638, lote vacunal 209	30	S	22	S	25	S
638, lote vacunal 301	33	S	23	S	26	S
638, lote vacunal 302	32	S	22	S	26	S
81	32	S	26	S	27	S
TLP01	31	S	22	S	28	S
TLP05	31	S	21	S	26	S
TLP13	29	S	23	S	22	S
<i>E. coli</i> 25922	32	S	27	S	—	—
<i>S. aureus</i> 25923	—	—	—	—	32	S

S Sensible

Punto de corte: ≥ 21 para Ciprofloxacino; ≥ 19 para Tetraciclina y $\geq 21-26$ para Azitromicina.

Tabla 3. Susceptibilidad a diferentes antibióticos de las cepas vacunales de *V. cholerae* según el método de evaluación de la CMI.

Cepas Evaluadas	Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)		
	Ciprofloxacino	Tetraciclina	Azitromicina
638, Banco maestro	I	1	4
638, lote vacunal 207	I	4	8
638, lote vacunal 209	I	2	16
638, lote vacunal 301	I	1	4
638, lote vacunal 302	0,25	1	4
81	0,25	1	8
TLP01	0,5	1	8
TLP05	0,5	1	2
TLP13	0,5	1	4
<i>E. coli</i> 25922	I	0,5	—

I Indeterminado

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por los métodos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana empleados en el presente trabajo evidenciaron que las cepas 638, 81 y TLP son susceptibles a los antibióticos ciprofloxacino, tetraciclina y azitromicina, por lo que su uso resulta efectivo para erradicar la colonización intestinal remanente en los voluntarios seleccionados después de su participación en los ensayos clínicos con las cepas vacunales de *Vibrio cholerae* O1.

BIBLIOGRAFIA

1. Bajaj JK, Baradker VP, Joshi SG, Damle AS, Kayararte RP, Deshmukh AB. Epidemiology of cholera a five year study. J Commun Dis. 2001; 33(4): 5-282.
2. Organización Mundial de la Salud. Consultado 24 de abril del 2013. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cholera/es>.
3. Saha D, Karim MM, Khan WA, Ahmed S, Salam MA, Bennish ML. Single-dose azithromycin for the treatment of cholera in adults. N Engl J Med. 2006; 354(23): 2452-62.
4. Bhattacharya SK. An evaluation of current cholera treatment. Expert Opin Pharmacother. 2003; 4(2): 141-6.
5. Schaetti C, Chagnat CL, Hutubessy R, Khatib AM, Ali SM, Schindler C, *et al*. Social and cultural determinants of anticipated acceptance of an oral cholera vaccine prior to a mass vaccination campaign in Zanzibar. Hum Vaccin. 2011; 7 (12).
6. García L, Jidy MD, García H, Rodríguez B L, Fernández R, Ano G, *et al*. The vaccine candidate *Vibrio cholera* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. Infect Immun. 2005; 73 (5): 3018-24.
7. Talavera A, Ano G, García H, Moreira T, Delgado H, Riverón L, *et al*. Process development for a Cuban cholera vaccine based on the attenuated strain *Vibrio cholera* 638. Vaccine. 2006; 24 (18): 3746-9.
8. Valera R, García HM, Días Jidy M, Mirabal M, Armesto M, Fando R, *et al*. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine 638 in Cuban adults. Vaccine. 2009; 27(47): 6564-9.
9. Khan WA, Saha D, Rahman A, Salam MA, Bogaerts J, Bennish ML. Comparison of single-dose azithromycin for child hood cholera: a randomized, double-blind trial. Lancet. 2002; 360: 1722-1727.
10. Barra OJ, Flores EL, García HR, Alvarado ED. Estudio preliminar de la resistencia de *Vibrio cholerae* O1, Brote Epidémico 1998, a Antimicrobianos Rev. Perú. Biol. 2000; Vol. 7 (1)
11. Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement (M100-S19). 2011. Disponible en: <http://www.clsi.org/source/orders/free/m100-s19.pdf>.
12. Ledón T, Ferrán B, Pérez C, Suzarte E, Vichi J, Marrero K, Oliva R, Fand. R. TLP01, an msh A mutant of *Vibrio cholerae* O139 as vaccine candidate against cholera. o. Microbes and Infection 2012, 14: 968-978.
13. Espino HM, Álvarez VE, Zayas TA y Contreras AR. Detección de cepas productoras de β lactamasas de espectro extendido por el sistema DIRAMIC: Comparación con los métodos doble difusión con discos y E-test. Rev Chil Infect. 2010; 27(6): 544-550.
14. Oliva R, García H, Infante JF, García L, Pérez JL, Cedré B, Balmaseda T, Talavera A. Biomodel for evaluating attenuated *Vibrio cholerae* strains as human cholera vaccine candidates. I. Virulence, colonizing capacity and adherence to the intestinal mucosa. 2008; 1025-0298.
15. García HM, Año G, Cedré B, Balmaseda T, Maestre JL, Díaz M, Mirabal M, Talavera A, García L. Selección de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* para la obtención de candidatos vacunales atenuados orales contra el cólera. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2005; 1561-3054.
16. Manual de procedimientos. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Vibrio cholerae*. Instituto de enfermedades infecciosas, Argentina, 2010.
17. Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia 1999