

José A. López-Portolés¹
M. Asunción Iborra²
Ignacio Sanchez³
Raquel Bendje²
Juan Mbá²
Rosa Bilogo²
M. Aurora Echeita¹

¹Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. ISCIII. Majadahonda. Madrid
²Centro de Referencia para el Control de Endemias. ISCIII. Bata y Malabo. Guinea Ecuatorial
³Centro Nacional de Medicina Tropical. ISCIII. Madrid

Correspondencia:
M. Aurora Echeita
Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología
CNM. 28220 Majadahonda. Madrid
E-mail: aecheita@isciii.es

Identificación de una cepa de *Vibrio cholerae* O1 como responsable de casos de enfermedad diarréica aguda de sucesivos brotes de cólera en Guinea Ecuatorial

ORIGINAL

Resumen

Fundamento: De 2004 a 2006 se produjeron varios brotes de Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en Guinea Ecuatorial. La etiología de los brotes se llevó a cabo mediante una investigación microbiológica.

Material y Métodos: Se realizaron coprocultivos de los enfermos con EDA. Las colonias sospechosas se identificaron bioquímicamente para establecer su especie. Las cepas de *Vibrio cholerae* se serotipificaron por aglutinación con antisueros específicos de serogrupo y serotipo y se determinó la resistencia frente a un grupo de antimicrobianos. Se investigó por PCR el gen *ctxA* de la toxina colérica y el gen responsable de la resistencia al vibriostático O129. La tipificación molecular se llevó a cabo por PFGE con la enzima *NotI*.

Resultados: Las cepas se identificaron como *V.cholerae* O1, serotipo Inaba, resistente al vibriostático O129 y a los antimicrobianos estreptomycin, trimetoprim y sulfametoxazol. Se amplificó el gen *ctxA* y se determinó la presencia del gen *dfrA1* responsable de la resistencia cruzada O129-trimetoprim. Todas fueron indistinguibles cuando se analizaron por PFGE.

Conclusiones: Los brotes de EDA en Guinea Ecuatorial tuvieron como causa una cepa de *V.cholerae* O1, serotipo Inaba, con el mismo perfil de resistencias a antimicrobianos e idéntico pulsotipo, lo que sugiere el origen clonal de las cepas estudiadas.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* O1. Serotipo Inaba. Brotes de cólera. O129-resistencia.

Summary

Basis: From 2004 to 2006 several outbreaks of Acute Diarrhoeal Diseases (ADD) happened in Guinea Equatorial. The etiological agent of outbreaks was determined by means of microbiological investigation.

Materials and Methods: Stool samples from patients were cultured. For specie identification, biochemical examination of suspicious colonies was performed. Serotyping of *Vibrio Cholerae* strains was carried on by slide agglutination. The sensitivity to different antimicrobians was determined. Amplification of the *ctxA* gene and the O129 resistance gene was carried out by PCR assays. Molecular typing of isolates was performed using PFGE with the restriction enzyme *NotI*.

Results: All tested strains were identified as *V.cholerae* O1, serotype Inaba, resistant to the vibriostatic O129 and to the antibiotics streptomycin, trimethoprim and sulfamethoxazole. The *ctxA* gene and the *dfrA1* gene responsible of the O129-trimethoprim cross resistance, were PCR amplified. All PFGE patterns were identical.

Conclusions: The consecutive Guinea Equatorial ADD outbreaks arose from a strain of *V. cholerae* O1, serotype Inaba, with identical pattern of resistance to antimicrobians and identical PFGE pattern, suggesting the clonal origin of all isolates.

Key words: *Vibrio cholerae* O1. Serotype Inaba. Cholera outbreaks. O129 resistance.

Introducción

El cólera es una infección intestinal provocada por *Vibrio cholerae*, que se caracteriza por la aparición de diarrea de forma muy brusca y vómitos ocasionales. Aunque en general el cuadro clínico es leve, una de cada 20 personas infectadas puede desarrollar la enfermedad en estado grave. En estos casos se produce una diarrea acuosa que ocasiona una deshidratación muy severa, llevando al paciente a un choque hipovolémico, desequilibrio electrolítico, acidosis, colapso circulatorio y muerte entre las 12 horas siguientes al inicio de los síntomas¹.

Vibrio cholerae se encuentra frecuentemente en ambientes acuáticos y es parte de la flora habitual de aguas salobres y de estuarios². Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, curvados y móviles por medio de un único flagelo que les confiere un movimiento errático. La estructura antigénica de la pared es similar a la de las enterobacterias, con un antígeno somático "O" y un antígeno flagelar "H". El antígeno "O" es utilizado para la clasificación de *V. cholerae* en serogrupos, habiéndose identificado unos 206 serogrupos. Sin embargo, solamente los serogrupos O1 y O139 se asocian con la enfermedad del cólera y tienen potencial pandémico. *V. cholerae* O1 se divide en dos biotipos, Clásico y El Tor, aunque sin valor epidemiológico, y en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima, cuya determinación es imprescindible para la identificación de las cepas virulentas³.

La toxina colérica, codificada por los genes *ctxB* y *ctxA*, es el factor de virulencia más importante. Es una enterotoxina que altera el funcionamiento intestinal incrementando los niveles intracelulares de AMPc y la hipersecreción de sales y agua⁴. La toxina colérica es producida solamente por las cepas de *V. cholerae* O1 de los serotipos Inaba, Ogawa o Hikojima o de *V. cholerae* O139.

La principal causa del cólera son las medidas sanitarias deficientes, diseminándose la enfermedad rápidamente en áreas con tratamientos inadecuados del agua potable y del agua del alcantarillado⁵. El ser humano adquiere la enfermedad bebiendo agua o comiendo alimentos contaminados con la bacteria y raramente por contacto con personas infectadas. En las áreas altamente endémicas es una enfermedad principalmente de los niños, aunque durante la lactancia los niños se ven raramente afectados. Las manifestaciones clínicas del cólera son similares en niños y adultos y los pacientes con diarrea media por *V. cholerae* son difíciles de diferenciar de aquellos con *Escherichia coli* enterotoxigénicos (ECET) o rotavirus.

El cólera es una enfermedad que puede tratarse fácilmente. La rápida administración de sales de rehidratación oral para reponer los líquidos perdidos logra casi siempre la curación (80% de los casos), aunque en los casos particularmente graves puede ser necesario infundir líquidos por vía intravenosa. El uso de antimicrobianos es importante para la reducción del volumen fecal, el tiempo de hospitalización y, en general, la mejora del pronóstico. Históricamente, las tetraciclinas han sido los antimicrobianos de primera elección. La doxiciclina es la más utilizada actualmente y constituye uno de los medicamentos esenciales para la Organización Mundial de la Salud⁶. Sin embargo, la aparición de resistencias y su contraindicación en mujeres embarazadas y

niños han incitado nuevas búsquedas. Entre otros, la azitromicina, antibiótico que pertenece a la familia de los macrólidos, y que tiene la ventaja de su duración prolongada. Una única dosis de azitromizina es eficaz en el tratamiento del cólera. El trimetoprim-sulfametoxazol, la eritromicina y el cloranfenicol son tratamientos alternativos⁷ (http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_DRS_2001_8/en/).

Desde finales del 2004 hasta 2006, se sucedieron diferentes picos de enfermedad diarreica aguda (EDA) en las principales ciudades de Guinea Ecuatorial (<http://www.afrol.com/es/articulos/15773>). Los Laboratorios de Referencia de Microbiología de los Hospitales Regionales de Bata y Malabo llevaron a cabo el estudio microbiológico de los pacientes diagnosticados con EDA. Este trabajo describe el aislamiento y caracterización de las cepas *V. cholerae* aisladas durante la epidemia. Se determinaron sus propiedades bioquímicas y serológicas, la resistencia a antimicrobianos y la detección del gen *ctxA* presente en la toxina colérica. Finalmente, para analizar si nos encontrábamos ante diferentes brotes ocasionados por la persistencia de una misma cepa o por cepas distintas, también se llevó a cabo la tipificación molecular de las cepas aisladas, por electroforesis en campo pulsante.

Material y métodos

Identificación de las cepas aisladas de los coprocultivos

De diciembre de 2004 hasta marzo de 2006, fueron remitidas 503 muestras de heces a los Laboratorios de Referencia de Microbiología (LRM) de los Hospitales Regionales de Bata y Malabo. Todas las muestras fueron cultivadas en los medios selectivos agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar MacConkey, agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) y en los medios de enriquecimiento Caldo de Selenito y Agua de Peptona Alcalina, siendo subcultivados estos últimos en agar SS y agar TCBS, respectivamente. Los medios se incubaron a la temperatura, atmósfera y durante el tiempo habitualmente recomendado.

Las colonias sacarosa positivas en medio de TCBS, sospechosas de corresponder con *Vibrio cholerae*, se identificaron mediante la batería de pruebas bioquímicas Api 20E (BioMerieux, Francia). También se determinó la presencia de la enzima Citocromo C oxidasa (Bactidrop, Remel Lenexa K.S), la producción de la enzima catalasa (Pronadisa, España), así como el test de la cuerda³.

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos y el vibriostático O129

Se utilizó el método de difusión en agar del antimicrobiano en discos, de Kirby-Bauer (Bauer, *et al.*, 1966). Se emplearon discos comerciales (Bio-Rad, Francia, Oxoid S.A., España) de ampicilina (AMP, 10µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC, 30µg), cefalotina (CEP, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), imipenem (IMP, 10µg), eritromicina (ERY, 15µg), cloranfenicol (CHL,

30 µg), estreptomina (S, 10 µg), ácido nalidixico (NAL, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), tetraciclina (TCY, 30 µg), doxiciclina (DOX, 30 µg), trimetoprim (TMP, 5 µg) sulfonamidas (SSS 300 µg) y la combinación trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg) (siglas WHONET: <http://www.spch.cl/vigilancia/vigilancia/Herramientas/Estandares/CodigosWhonetAntibioticos.htm>). La interpretación de los resultados se realizó según las normas establecidas por la guía CLSI para Enterobacteriaceae⁹. Se determinó de igual manera la sensibilidad frente al vibriostático O129 (2,4-diamino 6,7-diisopropylpteridine phosphate) (150 mg por disco).

Serotipificación

Las cepas identificadas como *V. cholerae* en los Laboratorios de Referencia de Bata y Malabo fueron enviadas al laboratorio de Referencia del CNM del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) para su posterior caracterización fenotípica y genotípica. La serotipificación se llevó a cabo por aglutinación en porta con antisueros comerciales frente al serogrupo O1 y los serotipos Inaba y Ogawa (Seiken, Oxioid, España y Microkit, España).

Determinación de la presencia de toxina colérica

En las cepas de *V. cholerae*, serogrupo O1, serotipo Inaba, se amplificó por PCR del gen *ctxA*, que forma parte de operón que codifica para la toxina colérica. Como ADN molde de la PCR se utilizaron 5 µl de lisados crudos de las bacterias. Para ello, las bacterias se cultivaron en medio de TSA durante 24 h. Aproximadamente 1/10 parte de un asa de siembra de cada cultivo se resuspendió en 200 µl de agua destilada. Las suspensiones se hirvieron durante 5 min., se centrifugaron a 3.000 rpm durante 1 min. y se recogieron los sobrenadantes.

La reacción de PCR se llevó a cabo con el sistema Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare Life Sciences, UK) con un volumen final de 25 µl por reacción. Cada mezcla de reacción contenía 5 unidades de ADN Taq polimerasa, 200 µM de cada

dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 5 µl de ADN molde y 5 pmol de cada uno de los primers CTX2: CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G y CTX3: CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC, que amplificaban una región de 564 pb del gen *ctxA*⁹.

La amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min., seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C, y un ciclo final de elongación de 7 min a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis horizontal a 95 voltios, en geles de agarosa (MS8, Pronadisa, España) al 1,2% en TAE 1x y se visualizaron a la luz UV después de teñir los geles sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio en agua destilada a la concentración de 1 µg/ml.

Caracterización molecular de la resistencia a trimetoprim

Se utilizaron como ADN molde los mismos lisados crudos que para la amplificación del gen *ctxA* y el mismo sistema Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare Life Sciences) con las mismas condiciones. Se amplificó por PCR el gen *dhfrA1* con los primers P3: ACG GAT CCT GGC TGT TGG TTG GAC GC y P4: CGG AAT TCA CCT TCC GGC TCG ATG TC, previamente descritos¹⁰ que amplifican un fragmento de 238 pb. La amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min., seguido de 30 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 58°C y 1,5 min a 72°C, y un ciclo final de elongación de 7 min a 72°C. Cinco microlitros del producto de PCR se sometieron a electroforesis para verificar la amplificación del fragmento de ADN del tamaño esperado. El resto se purificó con las columnas GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. De 1 a 3 µl del producto purificado se secuenciaron en ambas direcciones, con los primers P3 y P4, en la Unidad de Secuenciación del CNM (ISCIII), con el reactivo Big Dye Ready Reaction Mix version 3.1 (Applied Biosystems, USA). Las secuencias se compararon electrónicamente con las

del sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para su comparación con otras secuencias similares existentes en las bases de datos genómicas.

Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Todas las cepas previamente identificadas como *V. cholerae*, serogrupo O1, serotipo Inaba, se tipificaron por PFGE, siguiendo el método estandarizado en PulseNet USA (http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/vibrio_May2006.pdf). Para la preparación del ADN intacto de cada cepa, una suspensión de bacterias fue embebida en agarosa SeaKem Gold (Seakem Gold. Iberlabo. España) al 1 % (peso/vol) en tampón TE y dispensada en moldes hasta su solidificación. Las bacterias inmovilizadas se lisaron con una disolución de Proteínasa K en tampón de lisis. Tras sucesivos lavados con TE a 50°C y agitación suave, una pequeña porción del bloque formado se digirió con 40 unidades de la enzima de restricción NotI (Roche, España). La cepa "*Salmonella enterica* serotipo Braenderup 17 Universal Marker", amablemente suministrada por PulseNet US, CDC y digerida con la enzima XbaI (Roche, España) fue utilizada como marcador molecular de referencia.

Las porciones de los bloques, con las bacterias digeridas, se incluyeron en cada uno de los pocillos de un gel de agarosa SeaKem Gold (Seakem Gold. Iberlabo. Spain) al 1,2 % (peso/vol) en TBE 0,5x, preparado en los moldes suministrados a tal efecto con el sistema de electroforesis en campo pulsante Chef DRIII (Bio-Rad, España). La electroforesis se llevó a cabo en TBE 0,5x, a 6 Voltios, con un ángulo de 120° y a una temperatura de 14°C en dos tramos: 18 horas con una rampa de 2,2 s. a 17,3 s., seguido de 4 horas con una rampa de 0,3 s. a 5 s.

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron sumergiéndolos en una disolución de bromuro de etidio en agua destilada a la concentración de 1 µg/ml, durante 20 min. Y se destiñeron en agua destilada durante otros 60 min. Los patrones de bandas generados se visualizaron a la luz ultravioleta y las imágenes se capturaron

para su posterior documentación y análisis con el sistema GelDoc (Bio-Rad, España).

El análisis de los patrones obtenidos se realizó con el paquete informático Fingerprinting II Informatix Software (BioRad, España), utilizando el coeficiente de Dice con una tolerancia del 1,5%. El dendrograma de similitud entre patrones se construyó con el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages).

Resultados y discusión

El cólera continúa siendo una amenaza global a la salud y uno de los indicadores en desarrollo social. Mientras no se plantee como un serio problema en los países con insuficientes condiciones higiénicas, no se realizarán los cambios que garanticen agua segura y condiciones sanitarias adecuadas. Casi todos los países en vías de desarrollo, se enfrenta con demasiada frecuencia a un brote o amenaza de epidemia de cólera. En relación con otras áreas, un número desproporcionado de brotes de cólera ocurren en África. Además los brotes tienden a ser de proporciones mucho mayores, lo que sugiere unas deficientes medidas de control.

Sin duda, el mayor factor de riesgo es el agua contaminada, aunque el factor dominante puede variar entre regiones. Así, el clima, las lluvias intensas, las inundaciones y los desplazamientos poblacionales son otros importantes factores de riesgo⁵.

Desde finales de 2004, durante 2005 y principios de 2006 se produjeron varios picos de EDA en las ciudades de Bata y Malabo de Guinea Ecuatorial. Los enfermos desarrollaban una diarrea severa y deshidratación.

El procesamiento de las correspondientes muestras de heces remitidas a los Laboratorios de Referencia de Microbiología (LRM) de los Hospitales Regionales de Bata y Malabo en los períodos en los que se produjeron dichos brotes, dio lugar al aislamiento e identificación bioquímica de 53 cepas de *Vibrio cholerae* procedentes de 503 coprocultivos. Sin embargo y aunque la sensibilidad frente al vibriostático O129 suele utilizarse para diferenciar *Vibrio* spp de *Aeromonas* y otros bacilos gram negativos (3), estas cepas de *V. cholerae* eran resistentes a dicho compuesto. Otros trabajos también han descrito cepas de estas características^{11,12}, estimándose que un 5% de las cepas de *V. cholerae* O1 pueden ser resistentes al vibriostático O129.

V. cholerae es un patógeno en el que solo dos serogrupos epidémicos son capaces de causar la enfermedad del cólera: los serogrupos O1 y O139. Las cepas de *V. cholerae* aisladas durante este estudio se serotipificaron como pertenecientes al serogrupo O1, serotipo Inaba. Este serotipo ha sido también identificado en las recientes epidemias acontecidas en Sudán (http://www.who.int/csr/don/2006_06_21a/es/index.html) y Angola (http://www.who.int/csr/don/2006_05_18/es/index.html) en 2006 y probablemente en otros países de África (<http://www.who.int/csr/don/archive/disease/cholera/en/>) aunque solo en ocasiones se llega a la identificación del serotipo de las cepas involucradas en los brotes.

Los 3 serotipos patogénicos de *V. cholerae* O1: Inaba, Ogawa y el menos frecuente Hikojima, producen enterotoxinas similares y un cuadro clínico muy semejante. No obstante, se determinó en todas las cepas del estudio la presencia del gen *ctxA* que forma parte de la toxina colérica, amplificándose por PCR el fragmento esperado de ADN de 564 pb.

Siempre que se han descrito cepas de *V. cholerae* resistentes al vibriostático O129, esta resistencia estaba asociada a la resistencia a trimetoprim y en la mayoría de los casos a la combinación trimetoprim-sulfametoxazol (SxT)^{11,12}. Las cepas de este estudio fueron sensibles a todos los antimicrobianos probados excepto a estreptomocina, sulfonamidas, trimetoprim y por lo tanto a SxT. Para determinar si la resistencia cruzada entre el compuesto O129 y el trimetoprim era debida a la presencia el gen *dhfrA1*, responsable de la producción de la enzima dihidrofolato reductasa de tipo I, se amplificó específicamente dicho gen en todas las cepas. Además, los fragmentos amplificados de 8 cepas fueron secuenciados para confirmar que se trataba del gen *dhfrA1*.

La resistencia cruzada O129-trimetoprim, puede conducir a una identificación errónea de las cepas de *V. cholerae*¹³, pero es también preocupante desde el punto de vista clínico ya que el trimetoprim-sulfametoxazol constituye una alternativa al tratamiento del cólera cuando se desarrollan resistencias a otros antibióticos de primera elección como doxiciclina y otras tetraciclinas⁷.

Como la epidemia de cólera tuvo una difusión espacio-temporal, expandiéndose a las provincias continentales e insulares de Guinea Ecuatorial a lo largo de 16 meses, decidimos investigar si los diferentes picos epidémicos detectados habían sido producidos por una misma cepa, mediante la tipificación de los aislamientos del estudio.

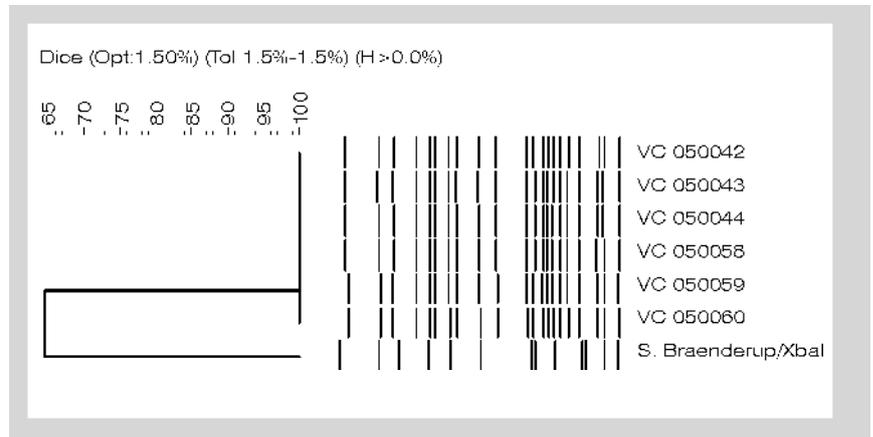
En *V. cholerae* O1, se pueden diferenciar 2 biotipos, Clásico y Eltor. Teóricamente el biotipo Eltor es capaz de producir acetil metil carbinol (test de Voges-Proskauer, VP) mientras que el biotipo Clásico no. Sin embargo, la disponibilidad de técnicas con mayor sensibilidad ha demostrado que ambos biotipos son igualmente VP positivos. El biotipo Clásico es sensible frente a polimixina, pero a medida que se desarrolla una epidemia se va haciendo resistente. Por último, ambos biotipos han ido variando en su capacidad de hemolizar hematíes de carnero o en su sensibilidad frente a determinados fagos y en definitiva, los métodos tradicionales de tipificación fenotípica no tienen el suficiente valor epidemiológico¹⁴.

Entre los métodos de tipificación molecular, la electroforesis en campo pulsante (PFGE) ha sido utilizada como método de referencia en el análisis de una gran variedad de bacterias y es el método que parece tener un mayor poder de discriminación entre aislamientos de *V. cholerae* O1¹⁵. Aunque los patrones "pulsotipos" obtenidos utilizando la enzima de restricción NotI, resultaron complejos, todos los aislamientos de este estudio generaron pulsotipos indistinguibles unos de otros, con independencia del origen geográfico o del episodio de cólera del que procedían (Figura 1).

En conclusión, durante el final del año 2004 y hasta principios del 2006 se produjeron sucesivos episodios de Enfermedad

Diarreica Aguda (EDA), que posteriormente fueron clínica y microbiológicamente identificados como casos de cólera. Las cepas causantes del brote fueron identificadas como *V. cholerae* O1, serotipo Inaba, productoras de toxina colérica, con un mismo perfil de resistencias frente a los antimicrobianos y con un único patrón de electroforesis en campo pulsado, indicando el origen clonal de todas ellas. Además, cabe prestar atención al hecho de que fueran resistentes al vibriostático O129, por lo que esta prueba deja de tener utilidad como herramienta taxonómica de diferenciación entre los géneros *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp.

Figura 1. Dendrograma de los patrones PFGE de las cepas de *V. cholerae* O1, serotipo Inaba digeridas con la enzima *NotI*



Agradecimientos

Este trabajo se ha llevado a cabo como consecuencia del proyecto 03/ESP36-6 financiado por el ISCIII. Agradecemos al Dr. Agustín Benito, a Ana Aladueña y a Manuela de la Fuente su colaboración en la realización del trabajo. Agradecemos al MINSABS de Guinea Ecuatorial, por la cesión de las instalaciones y personal.

Bibliografía

- Bennish MH. Cholera: Pathophysiology, clinical features, and treatment. En: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik Ø (ed). *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*. Washington, D.C.: ASM Press 1994:229-255.
- Faruque SM, Biswas K, Udden SM, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB, Mekalanos JJ. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:6350-5.
- Bradford AK, Bopp CA, Wells JG. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. En: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik Ø (ed). *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*. Washington, D.C.: ASM Press 1994:3-25.
- Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992;56:622-47.
- Griffith DC, Kelly-Hope LA, Miller MA. Review of reported cholera outbreaks worldwide, 1995-2005. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:973-7.
- OMS. Medicamentos Esenciales 13.ª edición. Lista Modelo de la OMS (revisada en abril de 2003). http://www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13_sp.pdf (accesible agosto 2003)
- Perez-Trallero E, Iglesias L. Tetracyclines, sulfonamides and metronidazole. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:520-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard. CLSI document M100-S15. CLSI, Wayne, Pa. 2005.
- Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik Ø. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol* 1992;30:2118-21.
- Gibree A, Skold O. High-level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (*dfp1* and *dfp9*) expressing drug-insensitive dihydrofolate reductases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3059-64.
- Gerbaud G, Dodin A, Goldstein F, Courvalin P. Genetic basis of Trimethoprim and O/129 resistance in *Vibrio cholerae*. *Ann Inst Pasteur / Microbiol* 1985;136:265-73.
- Nath G, Sanyal SC. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 resistant to vibriostatic agent O/129. *Lancet* 1992;340:366-7.
- Ramamurthy T, Pal A, Pal SC, Nair GB. Taxonomical implications of the emergence of high frequency of occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine-resistant strains of *Vibrio cholerae* from clinical cases of cholera in Calcutta, India. *J Clin Microbiol* 1992;30:742-3.
- Dodin A. Diagnóstico del Vibrión colérico en el laboratorio. *Laboratorio* 1983;75:431-9.
- Usera MA, Echeita A, Olsvik O, Evins GM, Cameron DN, Popovic T. Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 strains recently isolated from patient, food and environmental samples in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:299-303.