

Emergência da múltipla resistência a antimicrobianos em *Vibrio cholerae* isolados de pacientes com gastroenterite no Ceará, Brasil

Emergence of multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* isolated from patients with gastroenteritis in Ceará, Brazil

Ernesto Hofer, Bianca Ramalho Quintaes, Eliane Moura Falavina dos Reis, Dália dos Prazeres Rodrigues, Liliane Miyuki Seki, Iracema Sampaio Feitosa, Luiza Helena Feitosa Frota Ribeiro e Maria Rozzelê Ferreira

Resumo Das 7058 amostras de *Vibrio cholerae* isoladas de pacientes com suspeita de síndrome coleriforme, no período de 1991 a 1993, no Estado do Ceará, foram detectadas duas com as características de múltipla resistência aos antimicrobianos (tetraciclina, ampicilina, eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprima) e ao composto vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina). Do ponto de vista bacteriológico uma amostra foi identificada como *V. cholerae* sorogrupo O:1, biotipo El Tor e sorovar Inaba e a outra, caracterizada como *V. cholerae* sorogrupo O:22, classificada bioquimicamente no tipo II de Heiberg. Foi demonstrado que apenas na amostra do sorogrupo O:1, a multirresistência era codificada por um plasmídeo, transferível por conjugação para *Escherichia coli* K12 e amostras sensíveis de *V. cholerae* O1 e não O1, numa frequência entre 8×10^{-2} a 5×10^{-6} . O plasmídeo responsável pela multirresistência apresentou um peso molecular de 147 Kb, compatível com as descrições em outras partes do mundo.

Palavras-chaves: *Vibrio cholerae* O₁ e não O₁. Resistência antimicrobiana. Plasmídeo. Cólera.

Abstract Of 7058 *Vibrio cholerae* strains recovered from patients suspected of cholera in the State of Ceará between December 1991 and September 1993, two were resistant to antimicrobials (Ampicillin, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline) and to vibriostatic agent O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine). From the bacteriological standpoint, one strain was identified as *V. cholerae* serogroup O:1, biotype El Tor, serovar Inaba, and another as *V. cholerae* serogroup O:22, biochemically classified as Heiberg type II. It was shown that only in the serogroup O:1 strain, multiple resistance was encoded by a plasmid transferrable by conjugation to *Escherichia coli* K12 and a sensitive strains of *V. cholerae* O1 and non-O1, with at a frequency between 8×10^{-2} and 5×10^{-6} . The plasmid, with a molecular weight of 147 Kb, encoded both multiple resistance to antimicrobials and the vibriostatic compound (O/129), compatible with descriptions reported in other parts of world.

Key-words: *Vibrio cholerae* O₁ and non-O₁. Antimicrobial resistance. Plasmid. Cholera.

Laboratórios de Zoonoses Bacterianas e de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ e Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará, Fortaleza, CE.

Apoio financeiro parcial: CNPq e Coordenadoria de Laboratórios (COLAB) da Fundação Nacional de Saúde.

Endereço para correspondência: Dr. Ernesto Hofer. Dept^o Bacteriologia/IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido para publicação em 21/5/98.

O primeiro ensaio sobre a tetraciclina na terapêutica da cólera foi realizado por Das et al⁶ na Índia, em 1951, embora a generalização do esquema, resultou das observações de Greenough et al¹³ e Carpenter et al⁴. Estes autores demonstraram que o processo de reidratação com as soluções eletrolíticas secundado com à tetraciclina, reduzem efetivamente a duração da diarreia e do volume de fezes espelidas, além de erradicar o vibrião colérico do trato entérico. Posteriormente, Mc Cormack et al²¹ analisaram o valor da tetraciclina em contatos ou comunicantes pertencentes as famílias com pacientes coléricos, constituindo-se no primeiro passo da quimioprofilaxia.

Nas décadas mais recentes, várias investigações abordaram o problema da

resistência de *Vibrio cholerae* O₁ à tetraciclina e outros antimicrobianos em diversas áreas, predominantemente na África^{9 19 22 25 32} e Ásia^{11 12 29 30}.

Com a eclosão da epidemia na América Latina em 1991, um ano após no Equador foram caracterizadas amostras com múltipla resistência³¹, assim como, na Argentina²⁷. Em nosso meio até meados de 1993, o problema não tinha sido detectado e que só no final desse ano, foram reveladas amostras de *V. cholerae* multirresistentes^{5 17}.

O objetivo do presente trabalho foi analisar do ponto de vista bacteriológico, utilizando os métodos clássicos e moleculares, amostras de *V. cholerae* resistentes à tetraciclina e outros antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

O material está representado por duas amostras resistentes à tetraciclina (IOC nº 12129 e IOC nº 13408), selecionadas das 7058 cepas de *V. cholerae* O₁ e não O₁, isoladas de 21030 coprocultivos realizados no período de 10/12/91 a 20/09/93, pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará.

A primeira amostra caracterizada como *V. cholerae* O₁ El Tor, sorovar Inaba, recebeu o número IOC-12129, foi isolada de um paciente de 30 anos, agricultor no distrito de Catuana, município de Caucaia e hospitalizado no local em 11/09/93. As manifestações clínicas se concentraram na diarreia aquosa e profusa, com início em 06/09, acompanhada de dor abdominal, vômitos e desidratação moderada. Não fez uso prévio de qualquer medicação antimicrobiana.

No segundo caso, resultou no isolamento de *V. cholerae* não O₁, sorovar O:22, pertencente ao grupo II de Heiberg tendo recebido o nº IOC 13408, de um agricultor do município de Orós. Foi hospitalizado no local em 16/09, informando que o início da diarreia aquosa com até 10 evacuações/dia, ocorreu no dia anterior, acompanhado de cólicas abdominais e vômitos. Ambos se recuperaram após a reidratação venosa e oral.

Todo o processo de isolamento e identificação preliminar e conclusiva, se baseou nas orientações de Hofer¹⁵ e do Manual de Diagnóstico Laboratorial de Cólera, Ministério da Saúde²³.

Na análise da suscetibilidade aos antimicrobianos, tanto nas fase primária como

da análise dos transconjugantes, adotou-se o método da difusão em agar²⁴ com discos impregnados de ampicilina (10mcg), cloranfenicol (30mcg), eritromicina (15mcg), nitrofurantoína (300mcg), pefloxacina (10mcg), sulfametoxazol-trimetoprima. (23,75/1,25mcg) e tetraciclina (30mcg). A amostra padrão *Escherichia coli* ATCC 25.922 foi utilizada para o controle do antibiograma²⁴.

A toxina colérica (CT) foi pesquisada através do processo de aglutinação passiva reversa em latex (Vet-RPLA), Oxoid.

Na pesquisa da conjugação das amostras resistentes a drogas (transferência de plasmídios) se recorreu ao método descrito por Dias e Hofer⁸ tendo como bactérias receptoras, *Escherichia coli* K₁₂ C₆₀₀ F⁻, Nalr; *V. cholerae* O₁, Inaba, ATCC 14.033; *V. cholerae* O₁, Inaba, Ceará, IOC nº 12.128; *V. cholerae* O₁, Inaba, Ceará, IOC nº 13.203 e duas *V. cholerae* não O₁:IOC nº 13.217, Ceará e IOC nº 14.910, Pernambuco. Todas eram sensíveis à tetraciclina e demais antimicrobianos. No cálculo da frequência de transferência de plasmídios R, empregou-se a fórmula de Hermans et al¹⁴.

A análise do perfil do ADN plasmidial foi realizada segundo a técnica de Birnboim e Doly³, sem utilizar a lizozima na etapa inicial de lise, seguindo-se a eletroforese horizontal em gel de agarose a 0,6g% em tampão tris-borato pH 8.0 e da coloração com brometo de etídio (0,5µg/ml) por 15 minutos. Como marcadores de pesos moleculares dos plasmídios recorreu-se as amostras de *Escherichia coli* V517 e 39R861.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resistência múltipla aos antimicrobianos em *V. cholerae* não é um fato inusitado, embora a sua projeção não se identifica com aquela que ocorre nos membros da família *Enterobacteriaceae*, excetuando *Salmonella typhi*. Aliás, o problema da pouca afinidade à resistência do vibrião colérico aos antimicrobianos apresenta certa similaridade ao do bacilo tífico.

É interessante que apesar da aplicação em larga escala da quimioprofilaxia com a tetraciclina nas áreas epidêmicas de cólera, particularmente na África, o fenômeno da resistência ao fármaco não foi tão patente, embora na literatura, fortuitamente se registrem surtos provocados por formas resistentes^{9 11 19 22}.

Em nosso meio, de abril de 1991 a dezembro de 1993, nas 7.524 amostras de *Vibrio* analisadas pelo Laboratório de Referência Nacional de Cólera, provenientes das mais variadas partes do Brasil, excetuando-se as duas amostras, do Ceará, todas as demais foram sensíveis à tetraciclina, como ao cloranfenicol, nitrofurantoína e pefloxacina, mas com 25 e 7% resistentes à eritromicina e ampicilina¹⁷, respectivamente.

Considerando as 7.058 cepas isoladas no Ceará nesse período, o nível de resistência à tetraciclina não ultrapassou a 0,03%.

A análise das características fenotípicas das duas amostras (Tabela 1), revela uma alteração importante do ponto de vista taxonômico. Assim, observa-se que ambas apresentaram resistência ao composto vibriocida O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina) até na sua concentração máxima (150µg). A importância do O/129 reside na sua capacidade de diferenciar através da suscetibilidade os membros do gênero *Vibrio* de outros bacilos Gram negativos, oxidase positivos, particularmente, *Aeromonas*. A totalidade das espécies de *Vibrio*, potencialmente patogênicos para o homem é sensível a concentração de 150µg, embora na Índia foram relatadas as ocorrências de *V. cholerae* O₁ resistentes ao O/129^{26 28}, assim como, em *V. cholerae* não O₁ nos Estados Unidos da América¹ e no Brasil¹⁸.

Um fenômeno interessante quanto a resistência de *V. cholerae* à pteridina relaciona-se que, às vezes estas bactérias também são resistentes à associação sulfametoxazol-

Tabela 1 - Características fenotípicas das amostras de *V. cholerae* isoladas

Testes	<i>V. cholerae</i> O ₁ (12.129)	<i>V. cholerae</i> O ₂₂ (13.408)
Hemólise total	+	+
Voges-Proskauer	+	+
Polimixina B (50U)	R	R
Fago IV (Lise)	R	R
Arabinose (ácida)	-	-
Mannose (ácida)	+	-
Sacarose (ácida)	+	+
Lisina descarboxilase	+	+
Arginina dihidrolase	-	-
Ornitina descarboxilase	+	+
O/129 10µg (disco)	R	R
150µg (disco)	R	R
Crescimento em NaCl:		
0%	+	+
3%	+	+
Suscetibilidade a:		
ampicilina (10)*	S	R
eritromicina (15)	R	R
cloranfenicol (30)	S	S
nitrofurantoina (300)	S	S
pefloxacina (10)	S	S
sulfametoxazol + trimetoprima (23,7/1,25)	R	R
tetraciclina (30)	R	R
Produção de CT (RPLA)	+	-

R = resistente; S = sensível

* Concentração dos discos em micrograma.

trimetoprima, em especial, ao último fármaco. Isto decorre que ambas substâncias apresentam uma estrutura química comum, a diaminopirimidina segundo Matsushita et al²⁰. Cabe ainda a estes autores a demonstração que esse marco genético era passível de transferência pela conjugação.

Do ponto de vista terapêutico, o problema se situa na multirresistência, envolvendo dois dos fármacos utilizados no tratamento da cólera³³, a tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima, este como eletivo para crianças, e em menor escala, a indicação da ampicilina e eritromicina (Tabela 1).

Sob o prisma clínico, salienta-se que a síndrome coleriforme foi indistingüível nos dois casos, embora um tenha sido provocado por *V. cholerae* O₁ toxigênico, enquanto que no outro o agente etiológico, *V. cholerae* O:22, era desprovido da toxina colérica. Anteriormente, Hofer¹⁶, analisando um surto de gastroenterite na Bahia, isolou *V. cholerae* O:10 desprovido de toxina colérica, mas que era capaz de produzir *in vitro* uma toxina contra as células Y₂ e *in vivo*, uma enterotoxina evidenciável em camundongos lactentes. Nos pacientes, os sinais clínicos eram idênticos à cólera. Em contraposição, Magalhães et al¹⁸ salientam nos seus achados em crianças que as amostras de *V. cholerae* não O₁ não produziam toxina colérica; entretanto, curiosamente os espécimens fecais evidenciavam leucócitos, figura mais característica da síndrome disenteriforme ou invasiva. Sem dúvida este é um acontecimento muito raro, pois como

conseqüência do mecanismo de agressão dos vibrios não coléricos predomina uma enterite de natureza não invasiva e muitas vezes indistinguível da cólera¹⁶.

A análise genética das cepas resistentes consistiu na tentativa de conjugação inicial com *E. coli* K₁₂, verificando-se que apenas *V. cholerae* O₁ -12.129 foi capaz de transferir um plasmídio com resistência à tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima e a pteridina (O/129), obtendo-se como freqüência de transferência 3,6 x 10⁻⁵. Em seqüência com o transconjugante carreando o plasmídio, foram realizadas as experiências visando transferir o fator de resistência para as culturas de *V. cholerae* O₁ e não O₁, sensíveis aos antimicrobianos, incluindo a pteridina. Todas as amostras de vibrios foram receptíveis à transferência por conjugação, numa freqüência que variou entre 8 x 10⁻² (IOC-14.910) a 5 x 10⁻⁶ (IOC-12.128), mas, selecionando-se como referência a amostra padrão 14.033-ATCC, com 5 x 10⁻³ de taxa de transferência. Os níveis de resistência aos antimicrobianos foram confirmados nos novos transconjugantes.

A análise plasmidial da amostra *V. cholerae* O₁-12.129, revelou um plasmídio distinto de peso molecular de aproximadamente 147Kb, transferível para a receptora K₁₂, assim como, ao transconjugante *V. cholerae* 14.033 ATCC, codificando tanto a múltipla resistência os antimicrobianos como ao composto O/129 (Figuras 1 e 2). Assinala-se que este fenômeno

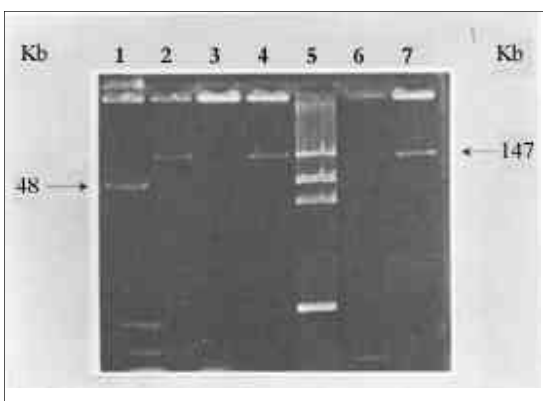


Figura 1 - Perfil plasmidial de *V. cholerae* O₁ n° 12.129, multirresistente. Linhas 1) *E. coli* V517; 2) *V. cholerae* O₁ 12.129; 3) *E. coli* K₁₂; 4) *V. cholerae* 12.129 x *E. coli* K₁₂ (T1*); 5) *E. coli* 39 R 861; 6) *V. cholerae* O₁ ATCC 14.033; 7) *E. coli* K₁₂ (T1) x *V. cholerae* 14.033*.

* Amostras receptoras de plasmídio.

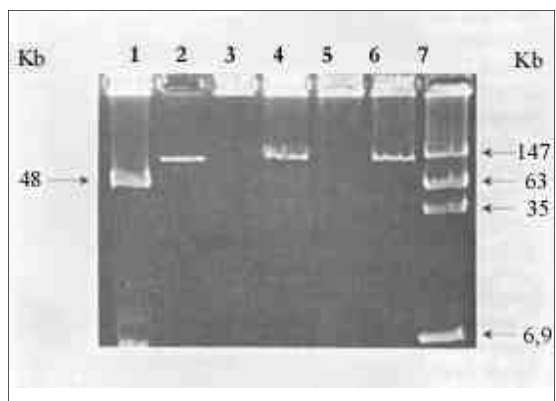


Figura 2 - Perfil plasmidial dos transconjugantes Linhas 1) *E. coli* V517; 2) *V. cholerae* O₁ 12.129 x *E. coli* K₁₂ (T1*); 3) *V. cholerae* O₁ 13.203, Inaba, Ceará; 4) *E. coli* K₁₂ (T1*) x *V. cholerae* O₁ 13.203; 5) *V. cholerae* O₁ 12.128, Inaba, Ceará; 6) *E. coli* K₁₂ (T1) x *V. cholerae* O₁ 12.128*; 7) *E. coli* 39 R 861.

* Amostras receptoras de plasmídio.

não ocorreu com a amostra de *V. cholerae* O:22 (IOC-13.408), desprovida de plasmídio. Considerando apenas a resistência à pteridina e ao sulfametoxazol-trimetoprima, segundo Gerbaud et al¹⁰, isto decorreria pela mediação de plasmídios e transposons, sendo que pelo último poderia haver a integração ao cromossoma e, desta forma, se perpetuar na bactéria. É possível que este mecanismo tenha ocorrido na amostra de *V. cholerae* O:22, tendo em vista a ausência do plasmídio de 147Kb, assim como, de qualquer outro que possibilitasse a transferência.

Um aspecto importante, refere-se a similaridade do presente resultado em relação ao peso molecular desse plasmídio conjugativo com os diversos estudos efetuados com amostras de *V. cholerae* O₁ e não O₁ isoladas na Ásia^{2 11 12 29}, África^{9 25} e América do Sul³¹, caracterizando plasmídios de pesos na faixa de 98 a 115Mda, com predominância de 100Mda.

Finalmente, assinala-se a estabilidade do plasmídio na amostra isolada em 1993 e manuseada rotineiramente no laboratório durante cinco anos, sem perder o fator de resistência. Aliás, Yokota et al³⁴, enfatizavam a instabilidade do fator R, em temperaturas em torno de 42-43°C, porém estável a 25°C razão pela qual, admitem uma importância do mecanismo de transmissão de fator R no meio ambiente. Todavia esta hipótese não encontra o devido respaldo na análise efetuada em amostras de *V. cholerae* não O₁ isoladas de estações de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro⁷.

Em síntese, o presente achado reforça a posição da Organização Mundial da Saúde³³, orientando para a execução rotineira do antibiograma nas amostras de *V. cholerae* O₁ isoladas dos processos entéricos, do ambiente e de alimentos, como medida de sentinela do aparecimento de formas resistentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. T. Shimada do National Institute of Health, Tokyo, Japan, pela caracterização antigênica do vibrio não colérico, as Drs. Nilma Cintra Leal e Tereza Cristina Arcanjo

Leal do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, pela análise plasmidial efetuada e aos serviços técnicos prestados por Deise Paranhos Feitosa, Junair Ribeiro e Darcília Maria de Andrade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott SL, Cheung WKW, Portoni BA, Janda JM. Isolation of vibriostatic agent O/129-resistant *Vibrio cholerae* non-O₁ from a patient with gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1598-1599, 1992.
2. Barja JL, Santos Y, Huq I, Colwell RR, Toranzo AE. Plasmids and factors associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae* non-O₁ in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology* 33:107-114, 1990.
3. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 7:1513-1523, 1979.
4. Carpenter CCJ, Barua D, Wallace CK, Mitra PP, Sack RB, Khanra SR, Wells AS, Dans PE, Chaudhuri RN. Clinical studies in asiatic cholera. IV. Antibiotic therapy in cholera. *Bulletin Johns Hopkins Hospital* 118:216-219, 1996.
5. Catão RMR, Lima EQ, Ceballos BSO. Sensibilidade *in vitro* de *Vibrio cholerae* O₁, de origem humana e ambiental, a produtos naturais e a antibióticos tradicionais. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 28:45-48, 1996.
6. Das AS, Ghosal S, Gupta SK, Chaudhuri RN. Terramycin in cholera. *Indian Medical Gazette* 86:437-439, 1951.
7. Dias JCAR, Hernandez D, Hofer E. Resistência a antimicrobianos em *Vibrio cholerae* não O₁ e *V. parahaemolyticus*. *Revista de Microbiologia São Paulo* 22:28-33, 1991.
8. Dias JCAR, Hofer E. Bactérias Gram negativas resistentes a antimicrobianos em alimentos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82:411-421, 1985.
9. Finch MJ, Morris Jr JG, Kaviti J, Kagwanja W, Levine MM. Epidemiology of antimicrobial resistant cholera in Kenya and East Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39:484-490, 1988.
10. Gerbaud G, Dodin A, Goldstein F, Courvalin P. Genetic basis of trimethoprim and O/129 resistance in *Vibrio cholerae*. *Annales de L'Institut Pasteur Microbiologie* 136B:265-273, 1985.
11. Glass RI, Huq I, Alim ARMA, Yunus M. Emergence of multiply antibiotic resistant *V. cholerae* in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases* 142:939-942, 1980.
12. Glass RI, Huq MI, Lee JV, Threlfall EJ, Khan MR, Alim ARMA, Rowe B, Gross RJ. Plasmid-borne multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* serogroup O₁, biotype El Tor: evidence for a point-source outbreak in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases* 147:204-209, 1983.
13. Greenough III WB, Rosenberg IS, Gordon RS, Davies BI. Tetracycline in the treatment of cholera. *Lancet* I: 355-357, 1964.

14. Hermans PWM, Saha SK, Leeuwen WJV, Verbrugh HA, Belkum AV, Goessens WHF. Molecular typing of *Salmonella Typhi* strains from Dhaka (Bangladesh) and development of DNA probes identifying plasmid-encoded multidrug-resistant isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 34:1373-1379, 1996.
15. Hofer E. Métodos utilizados para o isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. Informe de Patologia Clínica Rio de Janeiro 1:5-18, 1975.
16. Hofer E. *Vibrio cholerae* não O₁ associado à infecção entérica humana no Estado da Bahia. *Revista de Microbiologia São Paulo* 18:1-4, 1987.
17. Hofer E. Diarréia bacteriana: isolamento e sensibilidade aos antimicrobianos de membros do gênero *Vibrio*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27 (Supl. IV):208-210, 1994.
18. Magalhães M, Magalhães V, Antas MG, Tateno S. *Vibrio cholerae* non-O₁ isolated from sporadic cases of diarrhea in Recife, Brazil. *Revista de Microbiologia São Paulo* 23:1-4, 1992.
19. Maimone F, Coppo A, Pazzani C, Ismail SO, Guerra R, Procacci P, Rotigliano G, Omar KH. Clonal spread of multiply resistant strains of *Vibrio cholerae* O₁ in Somalia. *The Journal of Infectious Diseases* 153:802-803, 1986.
20. Matsushita S, Kudoh Y, Ohashi M. Transferable resistance to vibriostatic agent 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine (O/129) in *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Immunology* 28:1159-1162, 1984.
21. McCormack WM, Chowdhuri AM, Jahangir N, Ahmed ABF, Mosley WH. Tetracycline prophylaxis in families of cholera patients. *Bulletin of the World Health Organization* 38:787-792, 1962.
22. Mhalu FS, Mmari PW, Ijumba J. Rapid emergence of El Tor *Vibrio cholerae* resistant to antimicrobial agents during first six months of fourth cholera epidemic in Tanzania. *Lancet* I:345-347, 1979.
23. Ministério da Saúde, Comissão Nacional de Prevenção da Cólera, CNPC. Manual de Diagnóstico Laboratorial, 1ª edição. Brasília, DF, 1992.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eight informational supplement. NCCLS document M100-S8. Wayne, Pennsylvania, 1998.
25. Olukoya DK, Ogunjimi AA, Abaelu AM. Plasmid profiles and antimicrobial susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O₁ strain isolated during a recent outbreak in Nigeria. *Journal of Diarrhoeal Disease Research* 13:118-121, 1995.
26. Ramamurthy T, Pal SCPA, Nair GB. Taxonomical implications of emergence of high frequency of occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine-resistant strains of *Vibrio cholerae* from clinical cases of cholera in Calcuta, India. *Journal of Clinical Microbiology* 30:742-743, 1992.
27. Rossi A, Galas M, Binztein N, Rivas M, Caffer MI, Corso A, Radice M, Gutkind G. Unusual multiresistant *Vibrio cholerae* O₁ El Tor in Argentina. *Lancet* 342:1173, 1993.
28. Sundaram S, Murthy KV. Occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine resistance in human isolates of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiological Letters* 19:115-117, 1983.
29. Tabtieng R, Wattanasri S, Echeverria P, Seriwatana J, Bodhidatta L, Chatkaeomorakot A, Rowe B. An epidemic of *Vibrio cholerae* El Tor Inaba resistant to several antibiotics with a conjugative group C plasmid coding for type II dihydrofolate reductase in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41:680-686, 1989.
30. Threlfall EJ, Rowe B, Huq I. Plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor from Bangladesh. *Lancet* I:1247-1248, 1980.
31. Threlfall EJ, Said B, Rowe B, Dávalos-Perez A. Emergence of multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* O₁ El Tor from Ecuador. *Lancet* 342:1173, 1993.
32. Towner KJ, Pearson NJ, Mhalu FS, O'Grady F. Resistance of antimicrobial agents of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during the fourth cholera epidemic in the United Republic of Tanzania. *Bulletin of the World Health Organization* 58:747-751, 1980.
33. World Health Organization. Guidelines for Cholera Control. Programme for Control of Diarrhoea Diseases, Geneva. World Health Organization/CDD/SER/80.4 Rev:3, 1993.
34. Yokota J, Kasuga T, Kaneko M, Kuwahara S. Genetic behaviour of R factors in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 109:440-449, 1972.