

**Tipificación molecular de aislados de *Vibrio cholerae* O1 causantes de dos brotes de cólera en Venezuela**

**Molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolates causing two outbreaks of cholera in Venezuela**

**Sandra Fernández-Figueiras\*<sup>1</sup>, Guillermina Alonso-Casanova<sup>2</sup>**

1. Laboratorio de Diagnósticos Especiales. Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ciudad Universitaria de Caracas, apartado postal 60412, Oficia del este, Caracas, Venezuela. Teléfono: 58-212-2191737. E-mail: [sandra.fernandez@inhrr.gob.ve](mailto:sandra.fernandez@inhrr.gob.ve)
2. Laboratorio de Biología de Plásmidos. Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Apartado 47114 Caracas 1041A, Venezuela. Teléfono: 58-212-7510766 - 7510377, Fax: 58-212-7535897. E-mail: [guillermina.alonso@ciens.ucv.ve](mailto:guillermina.alonso@ciens.ucv.ve)

\* Autor para correspondencia.

## RESUMEN

En Venezuela, en junio de 1996, se reportó que los casos de cólera eran causados por *V. cholerae* O1 serotipo Ogawa. A finales de 1998 se detectó un segundo brote de cólera causado por *V. cholerae* O1 serotipo Inaba resistente a la ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol. Para estudiar las relaciones entre las cepas se examinaron veinticinco aislados de *Vibrio cholerae* O1 obtenidos desde 1996 a 2000 en Venezuela, para determinar la presencia de genes de virulencia y perfiles genómicos. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa se determinó la presencia de genes de virulencia. Para determinar el perfil genómico de los aislamientos se utilizó ribotipificación y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Todos los aislados resultaron positivos para los genes *ctxA*, *ctxB*, *zot* y *ace*. El análisis RFLP de los genes RNAr mostró un único patrón de ribotipo V. El análisis de PFGE mostró una similitud de 91,5% independientemente del año o lugar de aislamiento, lo que indica la relación genómica entre los aislados. En conjunto, los datos sugieren que la cepa de *V. cholerae* O1 resistente a los antibióticos que apareció en 1998 surgió de la cepa epidémica anterior o de otro estrechamente relacionado con el clon anterior, con cambio de serotipo y ganancia de determinantes de resistencia a antibióticos. Es muy importante monitorear continuamente la aparición de las variantes porque mejorará la comprensión de la evolución de nuevos clones de *V. cholerae*.

**Palabras clave:** *V. cholerae* O1, cólera, relación genética, pulsotipo, ribotipo,

## ABSTRACT

In Venezuela, cholera reported in June 1996 was caused by *V. cholerae* O1 serotype Ogawa. Second outbreak of cholera caused by *V. cholerae* O1 serotype Inaba, resistant to ampicillin and trimethoprim- Sulfamethoxazole, was notified at the end of 1998. Twenty-five isolates of *Vibrio cholerae* O1 obtained from 1996 to 2000 in Venezuela were examined to study the relationships between strains, presence of virulence genes and genomic profiles. Presence of virulence genes was detected by Polymerase Chain Reaction. Ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were used to determine the genomic profile of isolates. All isolates shown PCR product for *ctxA*, *ctxB*, *zot* and *ace* genes. RFLP analysis of rRNA gene showed one unique pattern from ribotype V. PFGE analysis revealed a similarity of 91.5%, regardless year or place of isolation, suggesting genomic relatedness among them. Overall, these data suggest that antibiotic resistant *V. cholerae* O1 El Tor strain that appeared in 1998 emerged from the previous epidemic strain or from another closely related to the previous clone. It is important to continuously monitor the emergence of variants because it will improve our understanding of the evolution of new clones *V. cholerae*.

**Keywords:** *V. cholerae* O1, cholera, genetic relatedness, pulsotype, ribotype,

## INTRODUCCIÓN

*Vibrio cholerae* es una especie ambiental que ha sido asociada con siete pandemias de cólera desde 1817 (1). En la era de la microbiología moderna, las epidemias de cólera se han asociado con un número limitado de cepas estrechamente relacionadas en los grupos de O1 y O139. *V. cholerae* se somete a frecuentes cambios genéticos (ganancia de material genético y/o mutaciones) que le permiten mejorar su desempeño en su hábitat y estos cambios pueden incluir la resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, así como otros arreglos genéticos, por lo cual es una especie bacteriana que ha evolucionado rápidamente (2-5). Adicionalmente, se ha reportado que clones de *V. cholerae* O1 u O139 emergen, sustituyen al clon existente y se diseminan en oleadas. Conjuntamente, se ha observado que la emergencia de un nuevo clon está precedida por un cambio en el antibiograma del clon existente (6) o a la emergencia de un nuevo serotipo a partir de un clon prevalente (7).

La séptima pandemia de cólera llegó en diciembre de 1991 a Venezuela, y hasta 1993 se notificaron 5.420 casos, 80 de los cuales fueron fatales (8). A principios de junio de 1996, después de una pausa de dos años, en el estado Zulia se reportaron casos de cólera causados por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Ogawa. Durante la semana epidemiológica 51, la epidemia llegó a la ciudad de Caracas. En total, el brote fue responsable de 2.557 casos con una letalidad del 2,3%. Después de varias semanas sin notificación de casos, a finales de 1998 se detectó un segundo brote de cólera en el Estado Delta Amacuro causado por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Inaba resistente a la ampicilina (AM), y el trimetoprim y sulfametoxazol (TMP), que se extendió a los estados, Sucre, Nueva Esparta, Monagas, Anzoátegui y Miranda (9). Recientemente se ha reportado que la multiresistencia a los antibióticos observada en estos aislados está codificada en un elemento transferible, un plásmido conjugativo de aproximadamente 170 kbp. La resistencia a trimetoprim está codificada por el gen *dfra15*, el cual se encuentra en un integrón clase 1 presente en el plásmido (10).

Las técnicas moleculares, tales como ribotipificación (11) y electroforesis en campo eléctrico pulsado (PFGE) (12) se han utilizado para estudiar las relaciones entre aislados clínicos y patogénicos de microorganismos. En este estudio, se examinaron veinticinco cepas de *V. cholerae* aisladas entre 1996 y 2000 para determinar la susceptibilidad a los antibióticos, la detección de la toxina colérica, y la presencia de los genes de virulencia que asocian a estos aislados como los causantes de los brotes. Se determinó la relación genética de las cepas mediante el uso de la ribotipificación y PFGE, a fin de establecer la relación clonal entre los aislados

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Aislados Bacterianos:**

Se recuperaron veinticinco aislados para su inclusión en el estudio. Todos estos aislados se obtuvieron inicialmente de pacientes de Venezuela, con diarrea entre 1996 y 2000. Las muestras de heces de los pacientes se procesaron por métodos estándar por el laboratorio del hospital local y se identificaron siguiendo métodos bacteriológicos (13). La tabla 1 muestra los detalles de la fuente, el año y el lugar de aislamiento. Las bacterias se conservan congeladas a -80 °C en caldo infusión cerebro corazón (Difco) suplementado con 20% (vol/vol) de glicerol (Sigma-Aldrich). Una alícuota de este caldo se utilizó para la preparación de cultivos de trabajo, a largo plazo, en tacos de medio del Instituto Pasteur que se mantuvieron a temperatura ambiente y oscuridad (13). Antes del uso, la identidad de los cultivos fue confirmada por pruebas bioquímicas seleccionadas y serología (13).

### **Pruebas de sensibilidad a los antibióticos:**

Todas las cepas de *V. cholerae* O1 fueron probadas para la susceptibilidad antimicrobiana por el método de Bauer y col. (14). Los discos de antibióticos utilizados fueron ampicilina (AM) (10 ug), cefotaxima (CTX) (30 ug), ceftriaxone (CRO) (30 ug), cloranfenicol (C) (30 ug), gentamicina (GM) (10 ug), ácido nalidíxico (NA) (30 ug), tetraciclina (TE) (30 ug), tobramicina (TOB) (10 ug), trimetoprim-sulfametoxazol (TMP) (25 ug), ciprofloxacina (CIP) (5 mg), norfloxacina (NOR) (10 ug) y doxiciclina (DO) (30 mg). Todas las cepas fueron clasificadas como susceptibles, intermedias o resistentes según los criterios interpretativos recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (15).

### **Ensayo para la producción de toxina del cólera (CT):**

La capacidad de las cepas de *V. cholerae* para producir CT *in vitro* se determinó mediante aglutinación pasiva reversa de látex (RPLA) (Oxoid). Los aislados se cultivaron en medio Craig antes de la prueba (13) y se verificó la presencia de CT en los sobrenadantes del cultivo bacteriano.

### **Detección de los genes de virulencia:**

La amplificación de los genes en estudio se realizó mediante PCR utilizando un lisado bacteriano como fuente de ADN molde. En resumen, las células bacterianas se crecieron en 5 ml de caldo infusión corazón (Difco) durante la

noche. Posteriormente, 1 ml de las células bacterianas fueron recolectadas por centrifugación. El sedimento bacteriano fue resuspendido en 1000 µl de agua destilada estéril y hervido por 10 min a 95 °C. Posterior a la lisis, los restos celulares fueron removidos por centrifugación y el sobrenadante que contiene el templado de ADN fue almacenado -20°C hasta su uso. Para cada PCR se utilizaron 2 µl de este ADN molde. Los cebadores utilizados se indican en la Tabla 2 (Invitrogen) (16, 17, 18). Las pruebas de PCR fueron realizadas utilizando condiciones de reacción estándares en un volumen total de 25 µl. Adicionalmente, en cada corrida de PCR se incluyeron controles positivos y negativos. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa en 40 mM Tris-[2] Acetate, 1 mM EDTA. Se usó la cepa *V. cholerae* O1 cepa M1502 como control (19).

### **Ribotipificación:**

Fue realizada por el procedimiento descrito por Popovic y colaboradores (10), la enzima de restricción *Bgl* I (Amersham) fue utilizada para digerir el ADN cromosómico. En resumen, los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y luego transferidos a una membrana de nylon (Zeta-Probe GT), utilizando un álcali mediante vacío. La hibridación se realizó con sonda de ARNr 16S marcada con digoxigenina. Se utilizó como marcador de peso molecular una mezcla de fragmentos de λDNA tratado con *Hind* III marcados con digoxigenina (Roche Diagnostics).

### **PFGE:**

Se realizó de acuerdo al protocolo de un día de PFGE de PulseNet para la tipificación (20). En pocas palabras, una colonia aislada de una cepa de *V. cholerae* se sembró en agar Columbia (Difco) con 5% sangre de carnero y se incubó a 37 °C durante 14 a 18 h. Los bloques de agarosa fueron preparados mezclando partes iguales de las suspensiones bacterianas y agarosa SeaKem Gold (FMC Bioproducts) al 1% fundida. Las células se lisaron y se lavaron antes de la digestión de restricción, que se llevó a cabo con 40 U de *Not* I (Sigma) a 37 °C durante 4 h. El estándar de ADN consistió en *Salmonella enterica* serotipo universal Braenderup (H9812) digerido con 40 U *Xba* I (Invitrogen) (21). Las condiciones de ejecución de la electroforesis fueron programadas en dos bloques con 6 V y un ángulo incluido de 120 ° sobre un CHEF-DR III (Bio-Rad). El bloque 1 corrió por 12 h, con un tiempo inicial y final de 2 s y 10 s, respectivamente, mientras que el bloque 2 duró 5 horas con un tiempo inicial y final de 20 s y 25 s, respectivamente. El buffer de corrida fue 0,5X Tris-borato-EDTA y se mantuvo a una temperatura constante de 14 °C. Después de la electroforesis, las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (1 mg

/ ml) (Sigma). Las imágenes fueron captadas con un sistema Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

### **Análisis de datos:**

Los patrones de PFGE se analizaron con la versión 4.0 del software BioNumerics (Applied Maths). Las imágenes TIFF se normalizaron mediante el estándar universal de PulseNet *Salmonella enterica* serotipo Braenderup (H9812) (21) en cada gel contra la referencia en la base de datos. Las cepas que difieren en una banda o más fueron asignados patrones de diferentes números. Los números de los patrones fueron designados exclusivamente para fines de discusión y no pretenden dar a entender la relación entre los aislamientos o el cumplimiento de un régimen de tipificación. La tabla 1 recoge el patrón de PFGE. Los perfiles de PFGE fueron comparados utilizando el coeficiente de Dice y el agrupamiento UPGMA (método de agrupamiento en pares sin asignación de peso utilizando medias aritméticas) con una ventana de tolerancia de banda de 1,5% y de 1,5% de optimización de la posición. El agrupamiento de los patrones de PFGE y asignación de bandas se confirmaron visualmente y se representaron gráficamente como dendrograma.

## **RESULTADOS**

El análisis de los genes de virulencia por PCR mostró que todos los aislados de *V. cholerae* estudiados portaban los genes *ctxA*, *ctxB*, *zot*, *ace* y producían CT (tabla 1). El análisis de los genes de ARNr con la enzima de restricción *Bgl* I produjo, en todos los aislados, un patrón único de ribotipo, con nueve bandas de 2,3; 3,0; 3,5; 4,0; 5,6; 5,8; 6,6; 6,8 y 8,0 kb. Este perfil de ribotipo guarda total concordancia con el patrón de la cepa *V. cholerae* O1 Ribotipo B5 reportado por Koblavi y colaboradores (22) y el ribotipo V reportado por Popovic y colaboradores (10) (figura 1).

Los resultados de los análisis de PFGE mostraron que el número de fragmentos de restricción generados por la enzima de restricción *Not* I estuvieron en el rango de 18 a 22 Kb. El tamaño molecular de los fragmentos de restricción PFGE visualizados para el análisis varió desde 29 hasta 374 kb. Se observaron nueve patrones distintos (figura 2). Las diferencias más evidentes entre los aislados fueron en los fragmentos de restricción que van desde 40 hasta 130 kb, independientemente de la procedencia geográfica o fecha de aislamiento. Los patrones de PFGE obtenidos a partir de aislamientos serotipo Inaba, de fecha posterior a 1998, diferían de las cepas serotipo Ogawa. Las cepas del serotipo Inaba consistentemente tenían una banda idéntica de aproximadamente 170 kb

pero ninguna de las cepas del serotipo Ogawa tenía esta banda. Los patrones de PFGE de los aislados entre 1996 y 2000 difieren en sólo una, dos o tres bandas, generando similitudes de 91,5% o superior. Los aislamientos se concentraron en tres grupos principales de PFGE (genotipos A, B y C) (Fig. 2). Los genotipos estaban estrechamente relacionados, y mostraron una considerable homogeneidad genética.

## DISCUSIÓN

La aparición en el estado Delta Amacuro, en noviembre de 1998, de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Inaba, mostrando resistencia a los antibióticos AM y TMP, portador de un plásmido conjugativo de 170 kpb, y concomitante con la desaparición del anterior serotipo Ogawa, motivó a iniciar el presente estudio para determinar las relaciones entre estos aislados.

La toxina colérica (CT) es el principal factor de patogenicidad de *V. cholerae*. Sin embargo, se ha reportado en varios países el aislamiento de grupos de *V. cholerae* O1 que carecen de la CT. Estos grupos no toxigénicos de *Vibrio cholerae* O1 normalmente se encuentran entre las cepas epidémicas de *V. cholerae* O1, y fueron llamados como *V. cholerae* O1 "variantes", "Amazonia" en Brasil (23), y "Tucuma" en Argentina (24). Estos tipos de variantes no se observaron en Venezuela, todas los aislados identificados dieron positivo para CT. La toxina colérica está codificada en un elemento móvil, el genoma de un bacteriófago filamentoso denominado CTX. Los genes de la toxina de zonula ocludens (*zot*) y de la toxina colérica accesoria (*ace*) son, en realidad, genes que codifican proteínas estructurales para CTX $\phi$  (25). La detección simultánea de los genes *zot* y *ace* en conjunto con *ctxA* y *ctxB* confirman la presencia del profago CTX en los aislados estudiados en este trabajo (Tabla 1).

La ribotipificación es una de las técnicas más confiables para monitorear y analizar la diseminación de cepas en los estudios de vigilancia de bacterias patógenas (26 - 30). Según los resultados obtenidos de la ribotipificación, todos los aislados analizados pertenecen a un grupo clonal, con el mismo ribotipo, que existe en Venezuela desde 1996 y se mantuvo hasta finales del año 2000, siendo además idéntico al ribotipo V de Popovic y colaboradores (10), la misma cepa reportada en los inicios de la pandemia en América Latina, y que estaba relacionada con aislamientos de la séptima pandemia de otras partes del mundo.

Aunque se observó un solo ribotipo, el análisis de PFGE –técnica con mayor poder discriminatorio- demostró la existencia de varios pulsotipos desde 1996 a 2000, indicando heterogeneidad entre los aislados. Sin embargo, los aislados de *V cholerae* de 1996-1997 mostraron pulsotipos similares, cercanamente relacionados con los aislados de los años 1998-2000. Las diferencias en una a



dos bandas en los patrones de PFGE en relación con cada brote, sugiere un evento genético único, como una mutación puntual, una inserción o una deleción, estos cambios genéticos que alteran los patrones de PFGE pueden ocurrir durante el transcurso de una brote (31).

La conversión de los serotipos ocurre por el resultado de la selección debido a la presión de los fagos líticos y la respuesta inmune durante la infección (32, 33). Tomando en consideración que el grupo de PFGE (genotipo B) está compuesto tanto por aislados del serotipo Ogawa de 1997, como por aislados del serotipo Inaba de 1998-1999, permite sugerir que los aislados del serotipo Inaba que surgieron son similares a los prevalentes del serotipo Ogawa, una situación similar también fue reportada anteriormente por Garg y colaboradores (34).

En general, los datos sugieren que los aislados de *V. cholerae* O1 serotipo Inaba resistentes a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol que aparecieron en 1998 pudieron emerger de algún aislado *V. cholerae* O1 serotipo Ogawa sensible a los antibióticos, por la adquisición del plásmido de 170 kpb que contiene los genes de resistencia a los antibióticos. Estos resultados reiteran la importancia de mantener los estudios de epidemiología molecular cuando se observa la aparición de nuevas variantes, pues mejorará nuestra comprensión de la evolución de nuevos clones de *V. cholerae*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Damos las gracias a todo el personal científico, administrativo y técnico que trabaja en el Departamento de Bacteriología del "Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel", por su excelente soporte de este estudio. Este estudio fue financiado por la Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, y el proyecto PEII No. 2012000977 a G.A.

## REFERENCIAS

1. Lacey SW. Cholera: calamitous past, ominous future. Clin Infect Dis. 1995 May;20(5):1409-1419.
2. Faruque SM, Islam MJ, Ahmad QS, Biswas K, Faruque AS, Nair GB, et al. An improved technique for isolation of environmental *Vibrio cholerae* with epidemic potential: monitoring the emergence of a multiple-antibiotic-resistant epidemic strain in Bangladesh. J Infect Dis. 2006 Apr 1;193(7):1029-1036.
3. Goel AK, Jain M, Kumar P, Bhadauria S, Kmboj DV, Singh L. A new variant of *Vibrio cholerae* O1 El Tor causing cholera in India. J Infect. 2008 Sep;57(3):280-281.
4. Beltran P, Delgado G, Navarro A, Trujillo F, Selander RK, Cravioto A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. J Clin Microbiol. 1999 Mar;37(3):581-590.
5. Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Dziejman M, Rahman MH, Sack DA, et al. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 17;101(7):2123-2128.
6. Bag PK, Maiti S, Sharma C, Ghosh A, Basu A, Mitra R, et al. Rapid spread of the new clone of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor in cholera endemic areas in India. Epidemiol Infect. 1998 Oct;121(2):245-251.
7. Sur D, Dutta S, Sarkar BL, Manna B, Bhattacharya MK, Datta KK, et al. Occurrence, significance & molecular epidemiology of cholera outbreaks in West Bengal. The Indian journal of medical research. 2007 Jun;125(6):772-776.
8. Bahamonde Harvez C, Stuardo Ávila V. La epidemia de cólera en América Latina: Reemergencia y morbimortalidad. Rev Panam Salud Pública. 2013; 33(1): 40-46.
9. Fernández S, Toro E, Quintero W, Vargas J, Blanco J, Spadola E. *Vibrio cholerae* O1 en Venezuela 1997-1998, sensibilidad a los antibióticos. Rev Inst Nac Hig. 2002;33:25-30.
10. Fernández-Figueiras S, Alonso G. Plásmido conjugativo portador de integrón clase 1 responsable de la resistencia a los antibióticos en aislados de *Vibrio cholerae* O1 en Venezuela. Rev Inst Nac Hig. 2016;
11. Popovic T, Bopp C, Olsvik O, Wachsmuth K. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. J Clin Microbiol 1993;31:2474-82
12. Cameron DN, Khambaty FM, Wachsmuth IK, Tauxe RV, Barrett TJ. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1994;32:1685-90

13. CDC). CpeCyPdE, (NCID). CNdEI, (OPS). OPdIS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Washington, D.C.; 1994.
14. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45:493-6.
15. CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th Information Supplement. Vol. 30. Document M100-S20, Wayne, PA; 2010.
16. Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J Clin Microbiol. 1992 Aug; 30(8):2118-2121.
17. Baudry B, Fasano A, Ketley J, Kaper JB. Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 1992 Feb;60(2):428-434.
18. Shi L, Miyoshi S, Hiura M, Tomochika K, Shimada T, Shinoda S. Detection of genes encoding cholera toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE) and heat-stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. Microbiology and immunology. 1998; 42(12):823-8
19. 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. 1993; 342:1172-1173.
20. Prevention CfDCa. Rapid Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Vibrio cholerae* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Center for Diseases Control and Prevention. Atlanta GA; 2006 [cited. Available from: [http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/vibrio\\_May2006.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/vibrio_May2006.pdf)]
21. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. J Clin Microbiol. 2005 Mar; 43(3):1045-1050.
22. Koblavi S, Grimont F, Grimont PA. Clonal diversity of *Vibrio cholerae* O1 evidenced by rRNA gene restriction patterns. Research in microbiology. 1990 Jul-Aug;141(6):645-657.
23. Coelho A, Andrade JR, Vicente AC, Salles CA. New variant of *Vibrio cholerae* O1 from clinical isolates in Amazonia. J Clin Microbiol. 1995 Jan; 33(1):114-118.
24. Pichel M, Rivas M, Chinen I, Martin F, Ibarra C, Binsztein N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. J Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1):124-134.
25. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996 Jun 28; 272(5270):1910-1914.

26. Khuntia HK, Pal BB, Samal SK, Kar SK. Rapid spread of *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant in Odisha, Eastern India, in 2008 and 2009. J Clin Microbiol. 2013; 51:1909-12.
27. Mohapatra SS, Ramachandran D, Mantri CK, Singh DV. Characterization of the genetic background of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Inaba strains isolated in Trivandrum, Southern India. J Med Microbiol. 2007;56(Pt 2):260-5.
28. Qu M, Xu J, Ding Y, Wang R, Liu P, Kan B, et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O139 in China: Polymorphism of ribotypes and CTX elements. J Clin Microbiol 2003;41:2306-10
29. Dalsgaard A, Mortensen HF, Mølbak K, Dias F, Serichantalergs O, Echeverria P. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated during cholera outbreaks in Guinea-Bissau. J Clin Microbiol. 1996;34:1189-92
30. Faruque SM, Abdul Alim AR, Roy SK, Khan F, Nair GB, Sack RB, et al. Molecular analysis of rRNA and cholera toxin genes carried by the new epidemic strain of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. J Clin Microbiol. 1994;32:1050-3.
31. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995 Sep; 33(9):2233-2239.
32. Mukhopadhyay AK, Garg S, Mitra R, Basu A, Rajendran K, Dutta D, et al. Temporal shifts in traits of *Vibrio cholerae* strains isolated from hospitalized patients in Calcutta: A 3-year (1993 to 1995) analysis. J Clin Microbiol. 1996; 34:2537-43.
33. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1301-14
34. Garg P, Nandy RK, Chaudhury P, Chowdhury NR, De K, Ramamurthy T, et al. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Inaba from the prevailing O1 Ogawa serotype strains in India. J Clin Microbiol. 2000 Nov; 38(11):4249-4253.

Recibido: 24 de marzo de 2017

Aprobado: 30 de junio de 2017

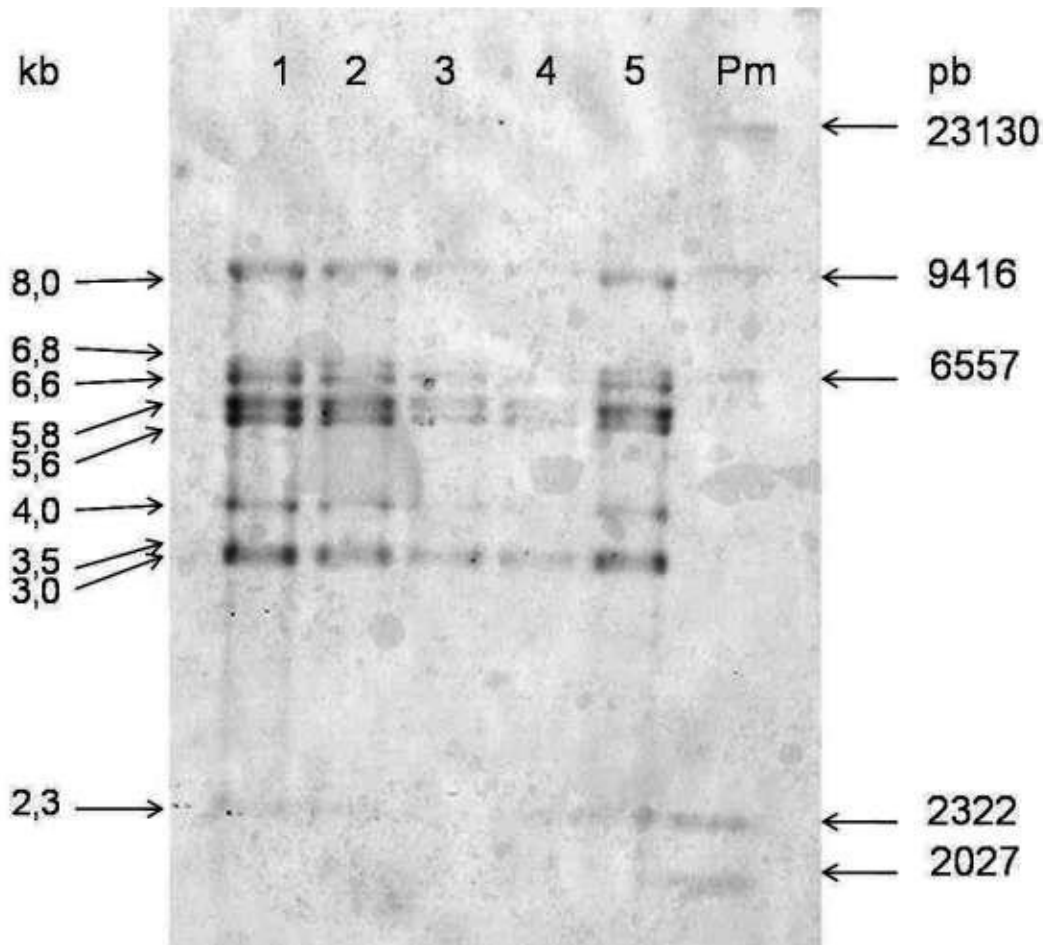
**Tabla 1: Patrón de resistencia a los antibióticos, presencia de genes de virulencia y resistencia a antibióticos, ribotipo y patrón de PFGE en aislados de *Vibrio cholerae* O1 obtenidos en Venezuela desde 1996 a 2000.**

| Aislado | Fecha de aislamiento | Lugar de aislamiento | Serotipo | Patrón de resistencia a los antibióticos | Producción de toxina del cólera | Presencia de genes de virulencia |             |            |            | Ribotipo | Patrón de PFGE-NotI ** | Grupo de Bionumerics ** |
|---------|----------------------|----------------------|----------|--|---------------------------------|----------------------------------|-------------|------------|------------|----------|------------------------|-------------------------|
|         |                      |                      |          |  |                                 | <i>ctxA</i>                      | <i>ctxB</i> | <i>zot</i> | <i>ace</i> |          |                        |                         |
| VC22956 | Junio 1997           | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 7                      | B                       |
| VC23178 | Junio 1997           | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 7                      | B                       |
| VC24220 | Junio 1997           | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 7                      | B                       |
| VC24424 | Junio 1997           | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 7                      | B                       |
| VC24653 | Julio 1997           | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 7                      | B                       |
| VC24977 | Julio 1997           | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 7                      | B                       |
| VC51117 | Septiembre 1997      | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 8                      | B                       |
| VC51127 | Septiembre 1997      | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 9                      | C                       |
| VC51386 | Septiembre 1997      | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 9                      | C                       |
| VC51412 | Septiembre 1997      | Caracas              | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 9                      | C                       |
| VC52522 | Enero 1997           | Zulia                | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 9                      | C                       |
| VC52524 | Noviembre 1997       | Zulia                | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 9                      | C                       |
| VC52525 | Noviembre 1997       | Zulia                | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 9                      | C                       |
| VC52526 | Noviembre 1997       | Zulia                | Ogawa    | -  | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 3                      | A                       |
| VC54990 | Noviembre 1998       | Delta Amacuro        | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 5                      | B                       |
| VC55037 | Enero 1999           | Delta Amacuro        | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 6                      | B                       |
| VC55315 | Enero 1999           | Delta Amacuro        | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 4                      | B                       |
| VC57872 | Agosto 1999          | Nueva Esparta        | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 4                      | B                       |
| VC57874 | Agosto 1999          | Nueva Esparta        | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 4                      | B                       |
| VC57875 | Agosto 1999          | Nueva Esparta        | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 4                      | B                       |
| VC57881 | Agosto 1999          | Nueva Esparta        | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 2                      | A                       |
| VC58705 | Noviembre 1999       | Monagas              | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 1                      | A                       |
| VC58852 | Diciembre 1999       | Miranda              | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 1                      | A                       |
| VC59195 | Enero 2000           | Caracas              | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 2                      | A                       |
| VC60003 | Diciembre 1999       | Monagas              | Inaba    | AM,TMP                                   | +                               | +                                | +           | +          | +          | V        | 2                      | A                       |

AM: ampicilina, TMP: Trimetoprim-sulfametoxazole, +: presencia del gen, - : ausencia del gen. \*\* Los patrones de PFGE y los grupos de Bionumerics fueron asignados arbitrariamente.

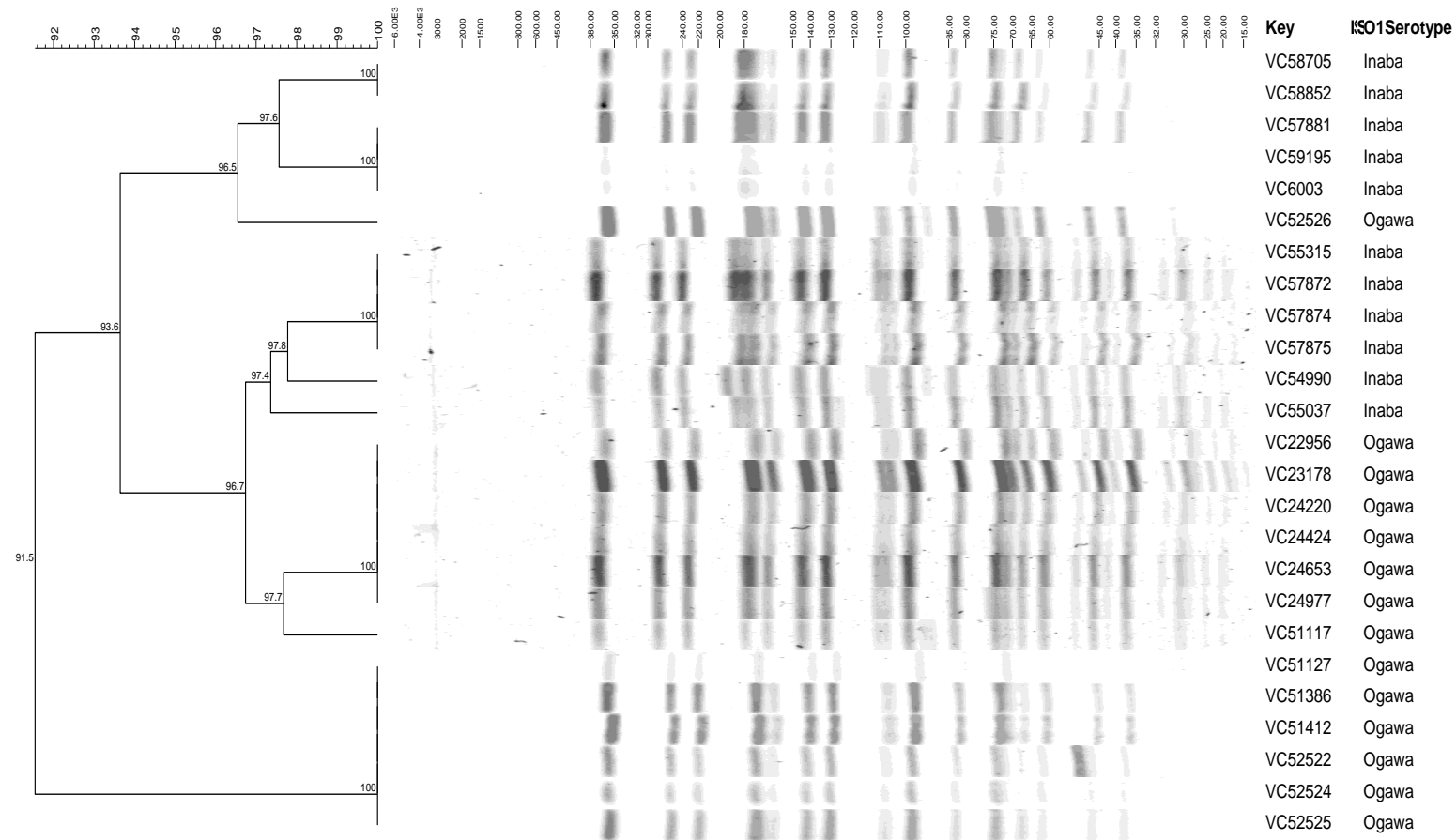
**Tabla 2. Cebadores para la PCR utilizados en este estudio.**

| <b>Cebador</b>               | <b>Secuencia<br/>(5' – 3')</b>  | <b>Gen<br/>diana</b> | <b>Tamaño del<br/>amplificado<br/>en pb</b> | <b>Referencia</b> |
|------------------------------|---|----------------------|---|-------------------|
| <b>CTX 2</b><br><b>CTX3</b>  | CGC GCA GAT TCT AGA CCT CCT G<br>CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC       | <i>ctxA</i>          | 564   | 14                |
| <b>CTX 7</b><br><b>CTX 9</b> | GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC<br>GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT    | <i>ctxB</i>          | 460   | 14                |
| <b>ZOT 1</b><br><b>ZOT 2</b> | TGG CTT CGT CTG CTG CCG CGC GAT<br>CAC TTC TAC CGA CAG CGC TTG CG     | <i>Zot</i>           | 1083 (834)                                  | 15                |
| <b>ACE 1</b><br><b>ACE 2</b> | TAA GGA TGT GCT TAT GAT GGA CAC GC<br>CGT GAT GAA TAA AGA TAC TCA TAG | <i>Ace</i>           | 316   | 16                |



**Figura 1. Patrón de los ribotipos generados en aislamientos representativos de *V. cholerae* O1 aislado desde 1996 al 2000.**

Resultado de la restricción enzimática de ADN genómico con *Bgl*I mediante hibridación por Southern Blot con la sonda 16S de ADN ribosomal marcada con digoxigenina. Línea 1, VC24220; línea 2, VC51117; línea 3, VC57874; línea 4, VC52524; línea 5, VC58705; línea Pm, ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III; kb, kilo pares de bases; pb, pares de bases. Los números a ambos lados de la figura indican tamaño.



**FIG. 2. Dendrograma generado por el programa Bionumerics.** Se muestra las relaciones entre los patrones (PFGE *Not* I) de 25 aislados de *V. cholerae* O1, obtenidos desde 1996 al 2000. Los números en la parte superior indican los tamaños moleculares en kilopares de bases.