

Caracterización molecular y resistencia antimicrobiana de *Vibrio cholerae* en Perú, 1991 - 2019

Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* in Perú, 1991 - 2019

Jimmy Ibarra-Trujillo^{1,a}, Débora Alvarado^{2,b}, Ronnie Gavilán^{1,3,c}

¹ Laboratorio de Referencia Nacional de Bacteriología clínica, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Laboratorio de Microbiología Acuática y Aplicaciones Tecnológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

³ Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Privada San Juan Bautista. Lima, Perú.

^a Biólogo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5671-5836>

^b Biólogo, magister en microbiología. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2191-1618>

^c Biólogo, doctor en biología molecular. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1437-5607>

An Fac med. 2024;85(2):146-155. / DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v85i2.28433>.

Correspondencia:

Jimmy Ibarra Trujillo
jibarra@ins.gob.pe

Recibido: 17 de abril 2024

Aprobado: 29 de junio 2024

Publicación en línea: 30 de junio 2024

Fuente de financiamiento: Autofinanciado.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

El presente estudio forma parte de la tesis: Ibarra T., Jimmy. Identificación y caracterización de integrones y su asociación con la resistencia a antibióticos en cepas de *Vibrio cholerae* 01, aisladas durante los años 1991 - 1998. Lima, Peru. [Tesis de Maestría]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2024.

Contribuciones de los autores: JIT:

Conceptualizó el estudio, realizó la curación de los datos, realizó el análisis formal de los datos, condujo la investigación, formuló el diseño metodológico, realizó la administración del proyecto y redactó el primer borrador original del artículo. DA: Conceptualizó el estudio, formuló el diseño metodológico, realizó la administración del proyecto y revisó y aprobó la versión final. RG: Administración del proyecto, formuló el diseño metodológico, revisó y aprobó la versión final.

Citar como: Ibarra-Trujillo J, Alvarado D, Gavilán R. Caracterización molecular y resistencia antimicrobiana de *Vibrio cholerae* en Perú, 1991 – 2019. An Fac med. 2024; 85(2):146-155. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v85i2.28433>.

Resumen

Introducción. Los integrones presentes en *Vibrio cholerae* son de interés en salud pública debido a su relación con la multiresistencia a los antimicrobianos. **Objetivo.** Realizar una caracterización molecular, establecer la presencia de integrones y evaluar la resistencia antimicrobiana de cepas de *Vibrio cholerae* de origen clínico y ambiental aisladas en Perú durante los años 1991 al 2019. **Métodos.** Se evaluaron 34 cepas de *Vibrio cholerae* de origen clínico y ambiental aisladas durante los años 1991 - 2019. Todas las cepas fueron reactivadas, luego sembradas en TCBS y en medios diferenciales para su identificación taxonómica. Se realizó un antibiograma a todas las cepas según el método disco difusión utilizando 16 antimicrobianos de uso clínico. Se procedió a la extracción del ADN genómico, luego se realizó la caracterización molecular por PCR y posteriormente los productos amplificados de las integrasas fueron secuenciados. **Resultados.** Todas las cepas evaluadas mostraron sensibilidad de 100% (n=34) para FEP, CTX, CAZ, CIP y CN. Los antimicrobianos que exhibieron mayor resistencia fueron AMP^R [26,5% (n=9)] y FZ^R [23,5% (n=8)]. En el presente estudio se establecieron 8 antibióticos. Todas las cepas presentaron el gen int4, excepto las de origen ambiental. Todas las integrasas de tipo IV tuvieron alta homología. **Conclusión.** *Vibrio cholerae* presenta un incremento en la resistencia antimicrobiana. El serogrupo O1 tuvo presencia de la integrasa de clase IV, así como una alta homología.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*; Pruebas de Sensibilidad Microbiana; Integrasas; Integrones; Farmacorresistencia Microbiana (fuente: DeCS BIREME)

Abstract

Introduction. The integrons present in *Vibrio cholerae* are of interest in public health due to their relationship with multiresistance to antimicrobials. **Objective.** Perform a molecular characterization, establish the presence of integrons and evaluate the antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* strains of clinical and environmental origin isolated in Peru during the years 1991 to 2019. **Methods.** 34 strains of *Vibrio cholerae* of clinical and environmental origin isolated during the years 1991 - 2019 were evaluated. All strains were reactivated, then grown in TCBS and in differential media for their taxonomic identification. An antibiogram was performed on all strains according to the disk diffusion method using 16 antimicrobials of clinical use. The genomic DNA was extracted, then the molecular characterization was carried out by PCR and subsequently the amplified products of the integrases were sequenced. **Results.** All strains evaluated showed 100% sensitivity (n=34) for FEP, CTX, CAZ, CIP and CN. The antimicrobials that exhibited the greatest resistance were AMP^R [26.5% (n=9)] and FZR [23.5% (n=8)]. In the present study, 8 antibiotics were established. All strains presented the int4 gene, except those of environmental origin. All type IV integrases had high homology. **Conclusion.** *Vibrio cholerae* presents an increase in antimicrobial resistance. Serogroup O1 had the presence of class IV integrase, as well as high homology.

Keywords: *Vibrio cholerae*; Microbial Sensitivity Testing; Integrases; Integrons; Microbial drug resistance (source: DeCS BIREME)

INTRODUCCIÓN

La epidemia de cólera en América Latina es uno de los eventos sanitarios mejor documentados en el siglo pasado. La séptima pandemia, la de mayor extensión, tanto geográficamente como en duración fue causada por *Vibrio cholerae* O1⁽¹⁻⁴⁾. En Perú la epidemia del cólera en la década de los 90 generó 5030 fallecidos. Los brotes epidémicos ocurridos en 1991 y 1998 fueron de gran relevancia debido a las condiciones ambientales, sociopolíticas y sanitarias que favorecieron la propagación de la enfermedad⁽⁵⁾.

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública causante de morbimortalidad hospitalaria. En las últimas décadas, *Vibrio cholerae* se ha manifestado como un patógeno resistente a diversos antibióticos, estos microorganismos pueden desarrollar resistencia por mutaciones en genes cromosómicos o captura de material genético, lo cual puede ser trasladados por plásmidos, transposones e integrones a través de la transferencia horizontal de genes (THG)^(6,7). Los integrones son elementos genéticos móviles (secuencias de ADN) que permiten la captura y expresión de casetes (genes exógenos) mediante una recombinación sitio específico^(8,9). Los integrones presentes en *Vibrio cholerae* son de interés debido a lo complejo que pueden ser y su relación con la multiresistencia.

Marcos A. Sulca y col. en el 2018 realizaron en Perú un estudio con 170 cepas de *Vibrio spp* aisladas en las costas de Lima, las cuales fueron resistentes a antimicrobianos especialmente del grupo de la penicilina. Se encontró un super integrón en una de las cepas estudiadas que correspondía a *V. cholerae*. Los investigadores concluyeron que la resistencia no estuvo relacionada con la presencia de integrones y que estos aislados pueden ser reservorios de genes de resistencia en ambientes marinos⁽¹⁰⁾.

Bhabatosh Das y col. en 2020 realizaron una publicación sobre la ecología y mecanismo de resistencia de *V. cholerae*, y concluyeron que los plásmidos, superintegrón, transposones y secuencias de inserción presentes en el genoma de *V. cholerae* cumplen un papel relevante en la resistencia antimicrobiana y que estos son muy

dinámicos⁽¹¹⁾. Un análisis metagenómico para ubicar genes asociados a integrones identificó 13 397 genes únicos asociados con este elemento genético. Los autores concluyeron que la mayor diversidad la presentaban las bacterias no cultivables⁽¹²⁾. Los integrones son estructuras genéticas complejas importantes en la resistencia a fármacos en procariontes⁽¹³⁾.

Los brotes epidémicos de cólera en Haití ocurridos en el 2010 y el más reciente en el 2022, indican que esta infección permanece latente y representa una amenaza para la región⁽¹⁴⁾. En Perú, existe una limitada información sobre la presencia de integrones en *Vibrio cholerae* desde el último caso reportado en el 2001. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue realizar una caracterización molecular, establecer la presencia de integrones y evaluar la resistencia antimicrobiana de cepas de *Vibrio cholerae* de origen clínico y ambiental aisladas en Perú durante los años 1991 al 2019.

MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas de *Vibrio cholerae* incluidas corresponden al banco de cepas del Laboratorio de Microbiología Acuática y Aplicaciones Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Adicionalmente, fueron incluidas cepas del laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS), las cuáles fueron obtenidas de la vigilancia de bacterias enteropatógenos de importancia en salud pública en Perú.

Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*

Todas las cepas fueron cultivadas en caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con NaCl 1% por 24 horas. Posteriormente fueron identificados tomando los criterios taxonómicos considerados en el Manual de Bergey del 2015⁽¹⁵⁾.

Determinación de la resistencia a antimicrobianos clínicos

Para evaluar la sensibilidad/resistencia se utilizaron 16 antimicrobianos median-

te el método disco difusión⁽¹⁶⁾. Los antimicrobianos fueron los siguientes: ácido nalidíxico (NA), amoxicilina- ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP), azitromicina (AZM), cefepime (FEP), cefotaxime (CTX), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (C), doxiciclina (DO), furazolidona (FZ), gentamicina (CN), imipenem (IPM), nitrofurantoina (F), tetraciclina (TE) y trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) marca Bioanalyse[®]. Se comprobó la eficacia de todos los antibióticos evaluados utilizando los cultivos de colección *american type culture collection* (ATTC). Para determinar la presencia de enzimas β lactamasa de espectro extendido (BLEE) se utilizó la prueba de sinergia en discos enfrentando amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) con cefalosporinas de 3ra y 4ta generación. Finalmente, todas las placas fueron incubadas a 37 °C por 18 horas. Se realizó la lectura de los antibiogramas según los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI-M45.2016⁽¹⁷⁾.

Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico del cultivo celular de las cepas evaluadas se realizó según el kit innuPREP DNA Mini Kit de Analytik Jena, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las concentraciones de ADN genómico de cada cepa fue medida en un espectrofotómetro *NanoDrop Lite de Thermo Scientific* para determinar la calidad de la muestra. Posteriormente, los extractos de ADN fueron almacenados en congelación a -20 °C para utilizarlos en las pruebas de reacción de cadena de la polimerasa (PCR).

Amplificación por PCR para identificación de especie, factores de virulencia y de la integrasa

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador para PCR (*ProFlex™ PCR System*), se preparó una mezcla de 25 μ L reacción que contenía: 2 μ L de iniciador (0,4 μ M) (1 μ L primer F y 1 μ L primer R), 0,5 μ L de dNTP (0,2 mM), 0,75 μ L de MgCl₂ (1,5 mM), 0,3 μ L Taq Pol. (1U) (invitrogen), 2,5 μ L de buffer 1x, 15,95 μ L de H₂O PCR y 3 μ L ADN muestra. La mezcla de la reacción que no presentaba ADN fue considerada como control

negativo. Tanto los controles positivos y negativos fueron incluidos en cada reacción de PCR.

Los iniciadores empleados en la caracterización fueron los genes VC O1 (*V. cholerae* O1 – *Lps*), VC O139 (*V. cholerae* O139 – *Lps*), *ctxAB* (enterotoxina del cólera subunidad AB), Vc-m: 16S – 23S ARNr (especie de *V. cholerae*), además, del grupo de cebadores utilizados para amplificar el gen de la integrasa (*intI*). Las condiciones de la mezcla se muestran en la tabla 1.

Se realizó la estandarización de las condiciones de la PCR, siguiendo las instrucciones provistas para la Taq polimerasa comercial y de las condiciones que requieran los iniciadores utilizados y el tamaño esperado del fragmento a amplificar.

Electroforesis y visualización de los productos de PCR

Para realizar la electroforesis de los amplificados, se tomó 3 µL de los amplificones y 2 µL de buffer de carga, los cuales fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1x, que contenía 10 µL de *Safe View*. El voltaje empleado fue de 100 mV en un tiempo de 40 minutos. Finalmente, el gel se colocó con cuidado en el transilu-

minador para observar las bandas de ADN amplificadas y luego se fotografió. Adicionalmente, se agregó un marcador *GeneRuler*® para determinar el peso molecular de los amplicones.

Secuenciamiento de los productos de PCR del gen *intI*

Los amplicones obtenidos fueron enviados para su secuenciamiento en el INS. Se utilizó el método Sanger (Applied Biosystems Foster City, California, United States). Para ello se envió 40 µL de cada amplificado y 20 µL de cada *primer* a una concentración de 0,4 µM para el secuenciamiento de ambas hebras utilizando los iniciadores que se detallan en la tabla 1.

Análisis del secuenciamiento

Para establecer las relaciones evolutivas de los taxones se utilizó el método de Neighbor-Joining⁽¹⁸⁾. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de máxima verosimilitud compuesta⁽¹⁸⁾. La variación de la tasa entre sitios se modeló con una distribución gamma. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a+2^a+3^a+ no codificante. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación

por pares). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11⁽¹⁹⁻²²⁾.

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de Marcos. Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Salud y del Laboratorio de Microbiología Acuática y Aplicaciones Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El estudio no involucró la participación de seres humanos, ni de animales de laboratorio.

RESULTADOS

Caracterización molecular

De 34 cepas evaluadas, 20 correspondieron al INS y 14 a la UNMSM. Las cepas fueron de origen clínico y ambiental, aisladas durante los años 1991 al 2019 (Tabla 2).

Todas las cepas evaluadas fueron identificadas correctamente utilizando los criterios taxonómicos para el género

Tabla 1. Iniciadores utilizados en la identificación de *Vibrio cholerae*, factores de virulencia y de la integrasa.

Iniciador	Secuencia	Gen blanco	Condiciones de la PCR			Tamaño del amplicón (pb)
			Desnaturalización	Alineamiento	Amplificación	
VCO1-F2 VCO1-R2	3' CAACAGAATAGACTCAAGAA 5' 5' TATCTTCTGATACTTTTCTAC 3'	VC O1				647
VCO139- F2 VCO139- R2	3' TTACCACTCTACATTGCC 5' 5' TATCTTCTGATACTTTTCTAC 3'	VC O139	94 °C 1 min	55 °C 1 min	2 °C 2 min	741
ctxAB-F ctxAB-R	3'CGGGCAGATTCTAGACCTCT'5 5'CGATGATCTTGGAGCATTCCCA 3'	ctxAB				982
ctxA-F ctxA-R	3'CGGGCAGATTCTAGACCTCT'5 5'CGATGATCTTGGAGCATTCCCA 3'	ctxA	94 °C 30 s	60 °C 30 s	72 °C 60 s	564
pVC-F2 pVC-mR1	3' TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG 5' 5' AGTCACTTAACCATACAACCCG 3'	Vc-m	94 °C 45 s	60 °C 45 s	72 °C 45 s	300
INT-IU INT-ID	5' GTTCGGTCAAGTTCTG 3' 5' GCCAACTTTCAGCACATG 3'	intI1	94 °C 60 s	58 °C 60 s	72 °C 60 s	923
Inti2F Inti2R	5' GCAAATGAAGTGCAACGC 3' 5' ACACGCTTGCTAACGATG 3'	intI2	94 °C 60 s	53 °C 60 s	72 °C 60 s	467
Inti3F Inti3R	5' AGTGGGTGGCGAATGAGTG 3' 5' TGTTCTTGATCGGCAGGTG 3'	intI3	94 °C 60 s	62 °C 60 s	72 °C 60 s	600
INT-4U INT-4D	5' GTGTTTCGCGAATTTATGC 3' 5' ACGGGATAATGGCTTAA 3'	intI4	94 °C 60 s	56 °C 60 s	72 °C 60 s	936

VC O1: *V. cholerae* O1 (*Lps*), VC O139: *V. cholerae* O139 (*Lps*), *ctxAB*: Enterotoxina del cólera subunidad AB, Vc-m: 16S- 23S ARNr (especie *V. cholerae*). Integrasas: IntI1, IntI2, IntI3, IntI4

Tabla 2. Caracterización molecular de cepas de *Vibrio cholerae* aisladas en los años 1991- 2019. Lima- Perú.

Código	Vc O1	Vc O139	Vcm	ctxAB	Origen	Serotipo	Año	Procedencia
C1	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	INS
C2	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	INS
C3	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	INS
C4	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	INS
C5	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	INS
C6	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	INS
C7	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	INS
C8	+	-	+	+	Clínico	FR	1992	INS
C9	+	-	+	+	Clínico	FR	1992	INS
C10	+	-	+	+	Clínico	FR	1992	INS
C11	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1993	INS
C12	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1994	INS
C13	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1995	INS
C14	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	INS
C15	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C16	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C17	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C18	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C19	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C20	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C21	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C22	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	UNMSM
C23	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	UNMSM
C24	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	UNMSM
C25	+	-	+	+	Clínico	Inaba	1991	UNMSM
C26	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C27	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C28	+	-	+	+	Clínico	Ogawa	1998	UNMSM
C29	-	-	+	-	Clínico	-	2015	INS
C30	-	-	+	-	Clínico	-	2015	INS
C31	-	-	+	-	Ambiental	-	2018	INS
C32	-	-	+	-	Ambiental	-	2018	INS
C33	-	-	+	-	Ambiental	-	2019	INS
C34	-	-	+	-	Ambiental	-	2019	INS
	82,4 %	0	100 %	82,4%				

VC O1: *V. cholerae* O1 (Lps), VC O139: *V. cholerae* O139 (Lps), ctxAB: Enterotoxina del cólera subunidad AB, Vc-m: 16S- 23S ARNr (especie *V. cholerae*). FR: fase rugosa.

Vibrio y confirmadas por el equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker, Germany).

Resistencia a antimicrobianos

Todas las cepas evaluadas exhibieron sensibilidad de 100% (n = 34) para FEP, CTX, CAZ, CIP y CN. En términos de susceptibilidad intermedia, AMC y AMP presentaron valores de 11,8% (n = 4) y 8,8% (n = 3), respectivamente. Los demás antibióticos tuvieron sensibilidad intermedia inferiores al 6% (Tabla 3). Los antimicrobianos que exhibieron mayor resistencia fueron FZ^R, AMP^R y TE^R presentando 23,5% (n = 8), 26,5% (n = 9) y 11,8% (n = 4), respectivamente (Tabla 3).

En el presente estudio se establecieron 8 antibiogramas. Las cepas con código C19 y C16 fueron multiresistente a por lo menos cuatro antibióticos probados y corresponden a los antibiogramas I y II cada uno. Los códigos C14, C27 y C29 presentaron resistencia a tres antimicrobianos y pertenecen a los antibiogramas III, IV y V. Los aislados C21 y C28 fueron resistente a dos antibióticos (AMP^R, FZ^R) y corresponden al antibiograma VI (Tabla 4). Los

antibiogramas del I al VI pertenecieron a las cepas aisladas en el brote de 1998. El antibiograma VII (AMP^R) fue reportado para el aislado clínico C26 y los aislados ambientales C31 – C34.

Finalmente, se observaron 4 cepas con códigos C20, C22, C24 y C25 que pertenecen al antibiograma VIII (FZ^R), de los cuales el primero pertenece al año 1998 y las otras tres a 1991.

Presencia del gen *intI4*

El 88,2% (n = 30) de cepas de origen clínico de diferentes epidemias dieron positivo a la amplificación del gen *intI4* y el 11,8% (n = 4) de cepas de *V. cholerae* aisladas de origen ambiental no amplificó el gen de la integrasa 4 (Figura 1). Todas las cepas evaluadas que fueron positivas para *intI4* presentaron fragmentos de aproximadamente 950 pb a 1200 pb.

No se observaron amplificadores con fragmentos mayores a 1500 pb., tampoco se visualizaron amplificadores para *intI1*, *intI2* e *intI3*. Todos los amplificadores se almacenaron en congelación para su posterior secuenciamiento.

Secuenciamiento del ADN

El árbol fue dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para generar el árbol filogenético. Para el análisis de los datos se utilizó aleatoriamente la secuencia nucleotídica de 5 cepas evaluadas: C2 (IT4-2), C3 (IT4-3) aisladas en el año 1991, C14 (IT4-14), C18 (IT4-18) aisladas en el año 1998 y la cepa C29 (IT4-29) aislada en el año 2015. Con la finalidad de realizar un análisis comparativo se seleccionaron 109 integrasas de clase IV que han sido almacenadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El programa bioinformático utilizado para este análisis es el MEGA11, el cual desarrolló un árbol filogenético con un total de 114 secuencias. En el árbol filogenético para poder observar las relaciones evolutivas de los taxones se pueden apreciar dos grupos (Figura 2).

El grupo I con 72 (63,2 %) secuencias nucleotídicas en las que se encuentran las 5 cepas seleccionadas, con las 67 secuencias de integrasas de tipo IV encontradas en la base de datos GenBank

Tabla 3. Susceptibilidad de cepa de *V. cholerae* O1 de origen clínico aislados en los años 1991 al 2019.

Antimicrobianos	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Ácido Nalidíxico (NA)	33	97,1	0	0,0	1	2,9
Amoxicilina-Ac. Clavulánico (AMC)	29	85,3	4	11,8	1	2,9
Ampicilina (AMP)	22	64,7	3	8,8	9	26,5
Azitromicina (AZM)	33	97,1	0	0,0	1	2,9
Cefepime (FEP)	34	100,0	0	0,0	0	0,0
Cefotaxime (CTX)	34	100,0	0	0,0	0	0,0
Ceftazidima (CAZ)	34	100,0	0	0,0	0	0,0
Ciprofloxacina (CIP)	34	100,0	0	0,0	0	0,0
Cloranfenicol (C)	33	97,1	0	0,0	1	2,9
Doxiciclina (DO)	32	94,1	0	0,0	2	5,9
Furazolidona (FZ)	26	76,5	0	0,0	8	23,5
Gentamicina (CN)	34	100,0	0	0,0	0	0,0
Imipenem (IPM)	32	94,1	2	5,9	0	0,0
Nitrofurantoina (F)	30	88,2	2	5,9	2	5,9
Tetraciclina (TE)	29	85,3	1	2,9	4	11,8
Trimetoprim/sulfametoxazol (SXT)	32	94,1	0	0,0	2	5,9

CLSI-M45.2016 (Clinical and Laboratory Standards Institute) ⁽¹⁷⁾

Tabla 4. Antibiotipos de resistencia en *Vibrio cholerae* O1 de origen clínico aislado en los años 1991 al 2019.

Antibiotipo	Espectro de resistencia	Cepas
I	AZM, DO, FZ, F, TE	C19
II	DO, FZ, F, TE	C16
III	AMC, Te, SXT	C14
IV	AMP, C, TE	C27
V	NA, AMP, SXT	C29
VI	AMP, FZ	C21, C28
VII	AMP	C26, C31 – C34
VIII	FZ	C20, C22, C24, C25
Total		16

Amoxicilina-acido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP), azitromicina (AZM), cloranfenicol (C), doxiciclina (DO) 30 µg, furazolidona (FZ), nitrofurantoina (F), tetraciclina (Te) y trimetoprim/sulfametoxazol (SXT).

(Figura 1). Este grupo presenta alta homología que corresponden en la mayoría a *Vibrio cholerae* O1. En este primer grupo se observaron cinco secuencias de integrasas que pertenecen a *V. cholerae* O139 que corresponden a los códigos LT992489, LT992493, CP060095, CP072850 y KF680548, aisladas en Bangladesh, la India y Japón.

Además, se encontró una secuencia de integrasa que fue aislada de una cepa de *Vibrio cholerae* O37 reportada en 1965 en Checoslovaquia con código CP047306. Se encontró 5 secuencias reportadas en Perú aisladas en los años 1991 y 1992 con los códigos CP024868, CP047296, CP064351, CP047298 y CP072848. Dentro de este grupo, se puede encontrar una cepa aislada en el año 1937 en Indonesia con código CP001234 y otra aislada en el año 1954 en Egipto con código CP013320. Finalmente se observó secuencias de origen ambiental (alimentos) en este grupo, con códigos CP002556, CP013013, CP012997, CP036500 y CP053795.

En los grupos II y III con 34 (29,8 %) y 8 (7%) secuencias nucleotídicas, respectivamente, se observó diversidad de la integrasa 4 (Figura 1). En este grupo encontramos gran parte de especies de *V. cholerae* con serogrupos O5, O17, O27, O45, O51, O63, O77, O96, O102 y O207. Todas fueron aisladas de agua de mar, alimentos, calamar, camarón, entre otros. Dicho grupo presentó secuencias de *V. cholerae* de origen clínico, no se pudo observar cepas con serogrupo O1.

DISCUSIÓN

La incidencia del cólera en Perú manifestó una disminución notable en los últimos años, siendo el último brote epidémico importante el del año 1998. En la actualidad no se reportan casos de *Vibrio cholerae* O1 toxigénico de muestras clínicas. No obstante, en Haití han ocurrido dos grandes brotes epidémicos en los años 2010 y 2022⁽¹⁴⁾, aislándose algunas cepas *V. cholerae* multidrogoresistente, en consecuencia, el riesgo de una reemergencia del Cólera en Perú y las Américas está latente.

Con respecto a la identidad de la especie, se destaca la presencia de cepas en su mayoría con el serogrupo O1 (82,4 %), al igual que el gen de la toxina colérica CT. Con respecto a los serotipos, 11 fueron Inaba, 14 Ogawa, 2 no se les pudo determinar porque presentaban forma rugosa y 6 cepas se les clasificó como No O1/O139.

La resistencia a diversos fármacos plantea una amenaza global que va en aumento afectando la salud pública, el ecosistema, la producción y la seguridad alimentaria⁽²³⁾. Los ensayos realizados para evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos de uso clínico dieron como resultado un 100% de sensibilidad para quinolonas, cefalosporinas y aminoglucósidos. Estos antimicrobianos han demostrado tener buenos efectos bioquímicos y fisiológicos en todas las cepas evaluadas, las quinolonas son antibióticos cuya función es la de afectar el metabolismo o arquitectura del genoma^(24–26).

Los antimicrobianos que presentan valores elevados de sensibilidad como la azitromicina, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol, doxiciclina, nitrofurantoina, amoxicilina – ácido clavulánico, y tetraciclina ya han sido utilizados desde hace años en el tratamiento del cólera con buenos resultados^(27,28).

Los antibióticos que exhibieron mayor resistencia antimicrobiana en el presente estudio fueron la ampicilina y furazolidona. Estos resultados también fueron reportados en otras investigaciones con cepas de *V. cholerae* de origen clínico y ambiental^(11,25,29), y en un análisis en Perú que encontró resistencia a ampicilina en cepas de *Vibrio* de origen ambiental⁽¹⁰⁾. Los hallazgos señalan que la resistencia a ampicilina estuvo presente en cepas aisladas de origen clínico como ambiental. Las investigaciones en áreas endémicas muestran altos valores de resistencia para este antibiótico⁽²⁵⁾.

Con respecto a los perfiles de resistencia a antimicrobianos, los antibiotipos I al VI corresponden a cepas que pertenecen al año 1998, y presentan resistencias a varios antibióticos. Los antibiotipos VI y VII incluyen a los antimicrobianos furazolidona y ampicilina, que como ya se ha mencionado, son los antimicrobianos que más resistencia han presentado.

La resistencia a los antimicrobianos en *Vibrio cholerae* en las últimas décadas se ha ido incrementando⁽²⁹⁻³¹⁾. Estudios previos señalan la sensibilidad a diferentes fármacos cuando apareció el brote epidémico en nuestro país en el año 1991⁽²⁸⁾. Posteriormente, nuestros hallazgos muestran una emergencia en la resistencia, especialmente luego del brote epidémico de 1998, explicado probablemente por las condiciones sociales imperantes y al evento climatológico el Niño que ocurrió entre 1997 y 1998, el cual fue considerado como extraordinario⁽³²⁾.

La resistencia a los antibióticos requiere de medidas coordinadas para evitar la aparición de cepas multiresistentes, esto es todo un desafío que requiere la participación no solo de investigadores, personal sanitario, población en general, sino también de organismos gubernamentales.

En cuanto a la búsqueda de genes de integrasa, encontramos la integrasa de

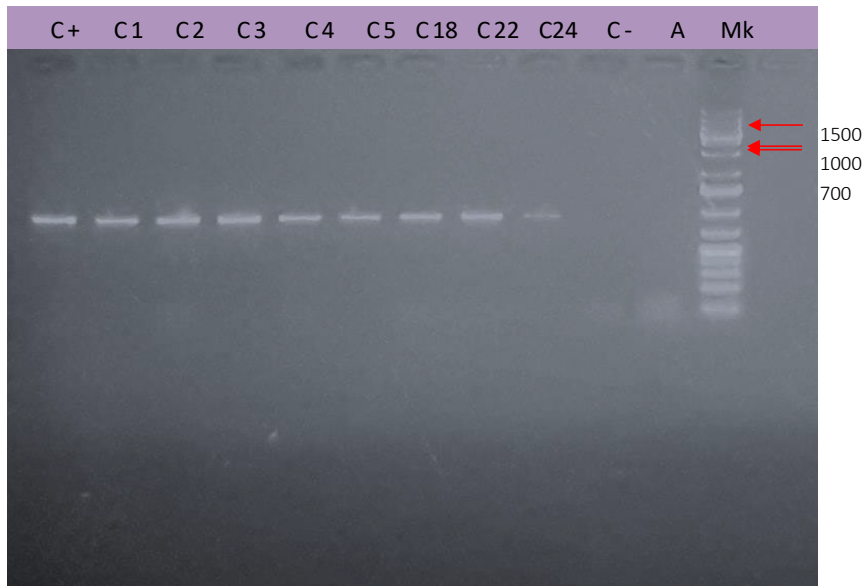


Figura 1. Cepas evaluadas para el super integrón aisladas en el año 1991 y 2019

C+: *Vibrio cholerae* O1, Mk: GeneRuler, A: *V. cholerae* origen ambiental.

clase 4 (*intI4*) en la mayoría de las cepas evaluadas (88,2%). El *intI4* estuvo presente en las cepas sensibles como en las resistentes. Investigaciones sobre la presencia del gen *intI4* en cepas de *Vibrio cholerae* de distintos serogrupos aisladas en diferentes años, sugieren que el gen *intI4* es ubicuo en la especie⁽³³⁻³⁶⁾.

La mayoría de las cepas que presentaban la *intI4* dieron un fragmento de aprox. 950 pb, que es el tamaño esperado para *intI4*. Sin embargo, una cepa con código C12 aislada el año 1994 y tres cepas con códigos C8, C9 y C10 procedentes del año 1992 (datos no mostrados) produjeron fragmentos de aprox. 1200 pb, que es 264 pb más grande del tamaño esperado. Lei Shi y col reportan integrón cromosomal o super Integrón (ICs) con tamaño de hasta 2200 pb, es decir con un 1,3 Kpb del tamaño esperado, esto fue explicado por la presencia de una secuencia de inserción IS1369 presente en el integrón⁽³⁵⁾.

Los 4 aislados de *Vibrio cholerae* de origen ambiental presentaron resistencia a ampicilina que es común en especies de *Vibrio* aisladas en ambientes acuáticos, causado por la presencia de un gen de β -lactamasa que se localiza en su genoma⁽³⁷⁾. Algunos investigadores reportan la presencia de los genes *intI1* e *intI2*, en

cepas de *Vibrio cholerae* multirresistentes de origen clínico y ambiental^(1-3, 38, 39).

Según los resultados obtenidos de la sensibilidad antimicrobiana, no se encontró una relación entre la resistencia y la presencia del *intI4*. Estos resultados coinciden con otras investigaciones, como la realizada en Perú con 170 cepas de Vibrios de origen ambiental multirresistentes a antibióticos. El estudio reportó la presencia de un ICs (integrón cromosomal) en una cepa de *Vibrio cholerae*, concluyendo que la resistencia a los antimicrobianos no está relacionada con la presencia de los integrones⁽¹⁰⁾.

Con respecto al análisis del secuenciamiento del gen integrasa de clase IV (*IntI4*), en el grupo I se pudo determinar la homología que existe entre las distintas secuencias nucleotídicas comparadas, el serogrupo predominante fue el O1. Este alto nivel de conservación de las secuencias se pudo observar también en cepas del serogrupo O139 y una cepa con serogrupo O37 (aislada en el año 1965), esto como consecuencia que estas plataformas de recombinación genética son elementos clave en la adaptación y evolución del genoma bacteriano⁽⁴⁰⁾. Es importante destacar que las cepas más antiguas utilizadas en el presente estudio y registradas en el GenBank fueron de los años 1937 y 1954,

casi al inicio de la era de los antibióticos. Así también lo demuestra un estudio realizado con cepas de *Vibrio metschnikovii* aisladas en 1888⁽⁴¹⁾, lo que se podría suponer que su aparición en el genoma bacteriano no es el resultado de un proceso exclusivamente de resistencia antimicrobiana.

Las secuencias analizadas en el presente estudio también tienen homología con 5 secuencias registradas en el GenBank que fueron aisladas de Perú en los años 1991 y 1992⁽⁴²⁾, lo que demuestra el elevado grado de conservación de estas integrasas en *Vibrio cholerae* O1.

Las secuencias clasificadas como grupo II y III exhibieron una diversidad para la integrasa de tipo IV, en este grupo se observa la presencia de *Vibrio no epidémicos* (*V. cholerae* No-O1/O139) que como ya se sabe presentan factores de virulencia que pueden generar brotes epidémicos^(10, 43). Las secuencias de vibrios considerados en este grupo fueron aisladas de ambientes acuáticos (especies marinas o dulceacuicolas) y clínicas. Estas secuencias han sido aisladas de cepas provenientes del continente asiático y de Estados Unidos. Las condiciones ambientales como la temperatura, la concentración de Na, el pH, la disponibilidad de nutrientes; inclusive la recombinación de genes presentes en integrones de arqueas podría desempeñar un papel fundamental en la evolución⁽⁴⁴⁾.

Los integrones todavía nos proporcionan mucha información sobre las estrategias para capturar genes exógenos de diferentes orígenes, todo esto con la finalidad de adaptarse a cualquier ambiente y prosperar en diferentes nichos ecológicos a través del tiempo. El *Vibrio cholerae* es una especie ampliamente estudiada, que todavía encierra muchos misterios en su genoma.

Las limitaciones del estudio incluyen el tiempo limitado para poder secuenciar más cepas de *Vibrio cholerae*. Además, en el caso de aquellas cepas de *V. cholerae* de origen ambiental que dieron negativo a la integrasa de tipo IV sería conveniente realizar un secuenciamiento de su genoma, debido a que unos integrones llevan secuencias de inserción (SI) que podría dificultar su reconocimiento por los iniciadores convencionales.

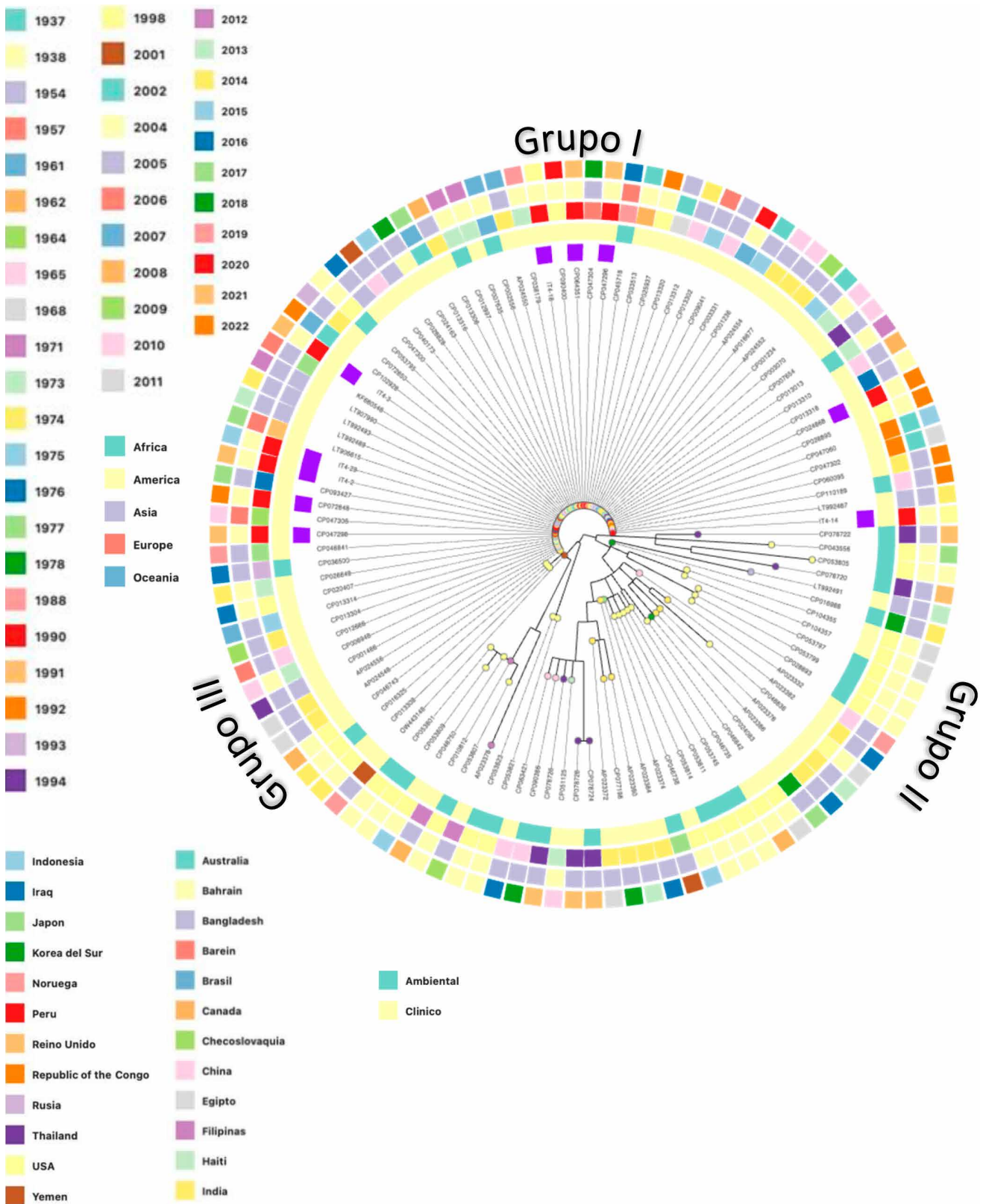


Figura 2. Filogenia de 114 secuencias las integrasas de tipo 4 de *Vibrio cholerae*. Se observa el grupo I que reúne las cinco secuencias evaluadas y las secuencias obtenidas del NCBI el serogrupo predominante es el O1, el grupo II y III que junta las secuencias de *V. cholerae* de otros serogrupos. Estas secuencias del género *Vibrio* fueron reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Concluimos que el gen integrasa de clase IV está presente, según nuestros resultados, en las cepas de *Vibrio cholerae* de origen clínico. Con respecto a las secuencias analizadas para la integrasa, estos presentaron una alta homología especialmente las que pertenecen al serogrupo O1. Finalmente, las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos nos demuestran un incremento de la resistencia para algunos antibióticos especialmente para ampicilina y furazolidona.

AGRADECIMIENTO

Al Mg. Manuel Ibarra Trujillo por su orientación y ayuda metodológica en el desarrollo de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wang R, Li J, Kan B. Sequences of a co-existing SXT element, a chromosomal integron (CI) and an IncA/C plasmid and their roles in multidrug resistance in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor strain. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 48(3):305–9. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.05.020
- Mala W, Kaewkes W, Tattawasart U, Wongwajana S, Faksri K, Chomvarin C. Sxt element, class 1 integron and multidrug-resistance genes of *Vibrio Cholerae* isolated from clinical and environmental sources in northeast Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. [Internet]. 2016 [citado el 26 de junio de 2024];47(5):957–66. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29620801/>
- 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* [Internet]. 2016 [citado el 26 de junio de 2024];47(1-2):43-60. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772016000100005&lng=es
- Lacotte Y, Ploy MC, Raheison S. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J*. 2017 Jul 1;11(7):1535–44. Doi:10.1038/ismej.2017.38
- Ministerio de Salud. Cólera CIE 10: A00. 2006. [Internet]. Lima. Oficina general de epidemiología, MINSA; 2006 [citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/buho/buho_colera.pdf
- Chen DQ, Jiang YT, Feng DH, Wen SX, Su DH, Yang L. Integron mediated bacterial resistance and virulence on clinical pathogens. *Microb Pathog*. 2018;114: 453–7. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.029
- Abana D, Gyamfi E, Dogbe M, Opoku G, Opere D, Boateng G, et al. Investigating the virulence genes and antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 in environmental and clinical isolates in Accra, Ghana. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1). DOI: 10.1186/s12879-019-3714-z
- Marathe NP, Berglund F, Razavi M, Pal C, Dröge J, Samant S, et al. Sewage effluent from an Indian hospital harbor novel carbapenemases and integron-borne antibiotic resistance genes. *Microbiome*. 2019;7(1). DOI: 10.1186/s40168-019-0710-x
- Sabbagh P, Rajabnia M, Maali A, Ferdosi-Shahandashti E. Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. *Iran J Basic Med Sci*. 2021;24(2):136–42. DOI: 10.22038/ijbms.2020.48905.11208
- Sulca MA, Orozco R, Alvarado DE. Antimicrobial resistance not related to 1, 2, 3 integrons and Superintegron in *Vibrio* spp. isolated from seawater sample of Lima (Peru). *Mar Pollut Bull*. 2018;131:370–7. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.04.050
- Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020;38. A83–92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031
- Buongermino M, Österlund T, Eriksson KM, Backhaus T, Axelsson-Fisk M, Kristiansson E. A comprehensive survey of integron-associated genes presents in metagenomes. *BMC Genomics*. 2020; 21(1). DOI: 10.1186/s12864-020-06830-5
- Patel H, Wu Z-X, Chen Y, Bo L, Chen Z-S. Drug resistance: from bacteria to cancer. *Mol Biomed*. 2021;2(1). DOI: 10.1186/s43556-021-00041-4
- Rebaudet S, Moore S, Rossignol E, Bogreau H, Gaudart J, Normand AC, et al. Epidemiological and molecular forensics of cholera recurrence in Haiti. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–11. DOI: 10.1038/s41598-018-37706-0
- Farmer JJ, Michael Janda J. *Vibrionaceae*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* Wiley;2015. p. 1-7. DOI: 10.1002/9781118960608.bfm00212
- Ministerio de Salud. Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión. 2002. [Internet] Lima: Instituto Nacional de Salud. MINSA; 2002. [citado el 20 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/417394/439893732843877347520191106-32001-1v6bak.pdf?v=1573077224>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 2016. Diponible en: https://clsi.org/media/1450/m45ed3_sample.pdf
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406–25. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci*. 2004. DOI: 10.1073/pnas.0404206101
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38(7):3022–7. DOI: 10.1093/molbev/msab120
- Stecher G, Tamura K, Kumar S. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Mol Biol Evol*. 2020;37(4):1237–9. DOI: 10.1093/molbev/msz312
- Felsenstein Joseph. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N Y). 1985;39(4):783–91. DOI: 10.2307/2408678
- Gagetti P, Pasteran F, Ceriana P, Prieto M, Cipolla L, Tuduri E, et al. Evolución del desempeño de Laboratorios de Referencia de América Latina en la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Rev Panam Salud Pública*. 2020; 44:1. DOI: 10.26633/rpsp.2020.42
- Onohuean H, Agwu E, Nwodo UU. Systematic review and meta-analysis of environmental *Vibrio* species – antibiotic resistance. *Heliyon*. 2022;8(2020):11. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e08845
- Garberm SC, Chu TC, Yang P, Gainey M, Nasrin S, Kanekar S, et al. Clinical and socio-environmental determinants of multidrug-resistant *Vibrio cholerae* O1 in older children and adults in Bangladesh. *Int J Infect Dis*. 2021; 105:436–41. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.02.102
- Uddin ME, Akter T, Sultana P, Sultana P, Hasan MI, Lubna MA, et al. Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility Profile Analysis of *Vibrio cholerae* O1 from Stool Samples of Bangladesh. *Adv Microbiol*. 2018; 08(03):188–96. DOI: 10.4236/aim.2018.83013
- Lloyd NA, Nazaret S, Barkay T. Genome-facilitated discovery of RND efflux pump-mediated resistance to cephalosporins in *Vibrio* spp. isolated from the mummichog fish gut. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19: 294–300. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.05.006
- Bravo, N y Guillen, A. Reporte histórico: primer aislamiento de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 biovar el tor serovar Inaba durante la epidemia de cólera en el Perú 1991. 2011. DOI: 10.1590/s1726-46342011000100021
- Gupta P, Modgil V, Kant V, Kaur H, Narayan C, Mahindroo J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in clinical isolates of *Vibrio cholerae* over a decade (2002–2016). *Indian J Med Microbiol*. 2022;40(1):24–9. DOI: 10.1016/j.ijmmb.2021.11.008
- Gladkikh AS, Feranchuk SI, Ponomareva AS, Bochalgin NO, Mironova L V. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;78. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104096
- Eziyenli DS, Ogbonna DN, Peekate LP. Antibiogram of Putative Bacterial Pathogens Isolated from Some Water Bodies in Rivers State, Nigeria. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2022; 11(1):93–103. DOI: 10.20546/ijcmas.2022.1101.012
- Ramírez IJ, Lee J. Deconstructing the spatial effects of El Niño and vulnerability on cholera rates in Peru: Wavelet and GIS analyses. *Spat Spatiotemporal Epidemiol*. 2022;40. DOI: 10.1016/j.sste.2021.100474
- Fonseca É, Vicente AC. Integron Functionality and Genome Innovation: An Update on the Subtle and Smart Strategy of Integrase and Gene Cassette Expression Regulation. Vol. 10, *Microorganisms*. MDPI; 2022;10(2) DOI: 10.3390/microorganisms10020224
- Boyd EF, Carpenter M.R, Chowdhury. N, Cohen AL, Haines-Menges BL, Kalburge SS, et al. Post genomic analysis of the evolutionary history and innovations of the family *Vibrionaceae*. *Microbiol Spectr*. 2015;3(5):10.1128/microbiolspec.VE-0009-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.VE-0009-2014
- Shi L, Fujihara K, Sato T, Ito H, Garg P, Chakrabarty R, et al. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J Med Microbiol*.

- 2006; 55(5):575–83. DOI: 10.1099/jmm.0.46339-0
36. Akrami F, Rajabnia M, Pourmajaf A. Resistance integrons; A mini review. Vol. 10, Caspian Journal of Internal Medicine. Babol University of Medical Sciences; 2019. p. 370–6. DOI: 10.22088/cjim.10.4.370
37. Aguirre LE, Sánchez-Suárez HA, Ordínola-Zapata A. Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2021;32(4). DOI: 10.15381/rivep.v32i4.19386
38. Gong L, Yu P, Zheng H, Gu W, He W, Tang Y, et al. Comparative genomics for non-O1/O139 *Vibrio cholerae* isolates recovered from the Yangtze River Estuary versus *V. cholerae* representative isolates from serogroup O1. Molecular Genetics and Genomics. 2019; 294(2):417–30. DOI: 10.1007/s00438-018-1514-6
39. De Sá LLC, da Fonseca ÉL, Pellegrini M, Freitas F, Loureiro ECB, Vicente ACP. Occurrence and composition of class 1 and class 2 integrons in clinical and environmental O1 and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains from the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(2):229–32. DOI: 10.1590/s0074-02762010000200021
40. Ghaly TM, Gillings MR, Penesyan A, Qi Q, Rajabal V, Tetu SG. The natural history of integrons. Microorganisms. 2021;9(11):1-12. DOI: 10.3390/microorganisms9112212
41. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio cholerae* Genome. Science. 1998;280(5363):605–8. DOI: 10.1126/science.280.5363.605
42. National Center for Biotechnology Information. NCBI. 2023 [citado el 20 de marzo de 2023] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=CP047298>
43. Motta JC, Forero C, Arango Á, Hernández-Linares I, Sánchez M. Bacteriemia por *Vibrio cholerae* (no-O1/no O139): reporte de caso. Acta Medica Perú. 2020;37(3). DOI: 10.35663/amp.2020.373.993
44. Ghaly TM, Tetu SG, Penesyan A, Qi Q, Rajabal V, Gillings MR. Discovery of integrons in Archaea: platforms for cross-domain gene transfer. bioRxiv. 2022.8(46) DOI: 10.1126/sciadv.abq6376