

Plásmido conjugativo portador de integrón clase 1 responsable de la resistencia a los antibióticos en aislados de *Vibrio cholerae* O1 en Venezuela

Conjugative plasmid and a class 1 integron responsible for the resistance to antibiotics in *Vibrio cholerae* O1 isolates in Venezuela

Sandra Fernández-Figueiras*¹, Guillermina Alonso²

1. Laboratorio de Diagnósticos Especiales. 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: sfernandez@inhrr.gov.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
- * Autor para correspondencia.

RESUMEN

Se han descrito aislados de *Vibrio cholerae* resistentes a una amplia variedad de antibióticos. En Venezuela, durante el brote de cólera ocurrido entre noviembre de 1998 y enero 2000 fueron reportados por primera vez aislados de *V. cholerae* O1 resistentes a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazole. Usando experimentos de conjugación se determinó la capacidad de transferir los determinantes de resistencia a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazole en 11 aislados. La visualización de plásmidos se realizó utilizando la digestión con nucleasa S1 y electroforesis en campo pulsante. La presencia de integrones de clase 1 fue establecida por PCR y se obtuvo la secuencia de la región variable del integrón. Los determinantes de resistencia fueron transferidos en un plásmido conjugativo de aproximadamente 170 kbp, común a todos los aislados. La resistencia a trimetoprim esta codificada en el gen *dfra15*, el cual se encuentra en un integrón clase 1 presente en el plásmido. En este estudio, se caracterizó la localización genética de los determinantes que codifican la resistencia a los antibióticos, y al conocer el mecanismo probable de dispersión de los determinantes de resistencia se podrán implementar medidas de control más adecuadas.

Palabras clave: Cólera, *Vibrio cholerae*, resistencia a antibióticos, Plásmido, Integrón Clase 1, Trimetoprim, *dfra15*

ABSTRACT

Vibrio cholerae has been reported to be resistant to a wide range of antibiotics. *V. Cholerae* O1 strains resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole were isolated for the first time in Venezuela during a cholera outbreak that occurred between November 1998 and January 2000. Using conjugation experiments, the capacity of transfer of the resistance determinants in 11 strains resistant to ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole was investigated. Plasmid analysis was done by S1 nuclease digestion and pulsed field gel electrophoresis. The presence of class 1 integrons was determined by PCR and the sequence of the gene harbored in the variable region of the integron was obtained. The antibiotic resistance determinants were transferred by a conjugative plasmid of approximately 170 kbp, common to all the isolates. Resistance to trimethoprim is encoded by the *dfra15* gene that is harbored by a class 1 integron present in the plasmid. In this study, the genetic location of the determinants that code for resistance to antibiotics was characterized, and knowing the probable mechanism of dispersion of the determinants of resistance, control measures can be implemented most appropriate

Key words: Cholera, *Vibrio cholerae*, resistance to antibiotics, Plasmid, Class 1 integron, Trimethoprim, *dfra15*

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad infecciosa aguda epidémica que es causada por *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139. Desde el inicio de la séptima pandemia de cólera de Latinoamérica (1), se han producido tres brotes epidémicos en Venezuela. La resistencia de *V. cholerae* a una amplia variedad de antibióticos se ha reportado en varios países. Sin embargo, en Venezuela, aislados resistentes a ampicilina, trimetoprim y sulfametoxazole fueron reportados por primera vez durante el tercer brote de cólera ocurrido entre 1998 y 2000 (2). Este reporte es de gran importancia para el manejo de salud pública, en virtud que la emergencia de la resistencia a múltiples drogas es un problema clínico severo y en aumento, que limita tanto el tratamiento como la contención del cólera, tal como se observó por el incremento de la tasa de mortalidad desde 1% a 5,3% durante la epidemia de cólera en Guinea-Bissau entre 1996 y 1997 (3).

Desde la introducción de los antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, la resistencia a estos fármacos se ha diseminado dramáticamente entre las bacterias patógenas. El principal mecanismo involucrado en esta diseminación es la movilización horizontal de material genético entre los distintos géneros y especies bacterianas. En *V. cholerae*, los determinantes de resistencia se han reportado principalmente asociados con plásmidos auto-transferibles (3-5).

Los integrones son elementicos genéticos que también se han reportado como promotores de la diseminación de los mecanismos de resistencia. Se han identificado una variedad de integrones de acuerdo con la integrasa que codifican. Los integrones de clase 1 contienen, aparte del gen de la integrasa (*intI*), el sitio *attL*, en el cual el casete genético se inserta mediante mecanismos de recombinación específica de sitio, además de portar una secuencia promotora que permite la expresión del gen insertado (6). Dentro de la estructura del integrón clase 1 se han descrito dos regiones conservadas, el segmento conservado 5' (5'-CS) y el segmento conservado 3' (3'-CS). Estos dos elementos delimitan la región variable que porta los genes insertados que usualmente codifican para determinantes de la resistencia a los antibióticos (7).

Los integrones de clase 1 están ampliamente distribuidos en las cepas de *V. cholerae* multirresistentes. Dalsgaard y col., reportaron que aislados de *V. cholerae* O1 resistentes a sulfonamidas y estreptomina obtenidos en Vietnam después de 1990, portaban un integrón clase 1 (3). En un estudio posterior, los mismos autores, reportaron la existencia de diversos integrones clase 1 en aislados clínicos y ambientales de *V. cholerae* no-O1/no-O139, los cuales portaban los casetes genéticos *aadB*, *aadA2*, *blaP1*, *dfrA1* and *dfrA15* (8). Falbo y

col., demostraron la existencia de integrones de clase 1 localizados en el cromosoma de aislados de *V. cholerae* O1 que contenían el casete génico *aadA1* (9). Posteriormente, la presencia de los casetes génicos *dfrA5* y *dfrA12*, *aac(6')-Ib* y *ereA2* fueron reportados por primera vez en un integrón de clase 1 en aislados de *V. cholerae* no O1/no O139 obtenidos en la India (10). Más aún, el cambio en el patrón de sensibilidad de los aislados de *V. cholerae* O1 en Laos desde 1993 al 2000 fue atribuido a la presencia de un integrón de clase 1 que portaba el casete génico *aadA1* (11).

A partir de 1992, otro elemento genético, conjugativo e integrado al cromosoma (ICE), asociado con la diseminación de determinantes de resistencia a los antimicrobianos fue descrito en *V. cholerae*. Este elemento fue reportado por primera vez en *V. cholerae* O139, una nueva cepa epidémica que emergió en el sub-continente indio, la cual desplazó a *V. cholerae* O1 El Tor como la principal causa de cólera por aproximadamente seis meses. Este elemento es capaz de auto-transferirse por conjugación y porta los determinantes de resistencia para trimetoprim, estreptomina, sulfametoxazole y cloranfenicol (12). El gen *int* que se encuentra en el extremo 5' del elemento codifica una integrasa que permite su transferencia (13). *V. cholerae* O1 El Tor re-emergió como la cepa dominante, pero mostraba la resistencia a trimetoprim, sulfametoxazole y estreptomina, a través de la adquisición del elemento ICE (14). Desde 1994, ICE ha sido reportado en aislamientos de *V. cholerae* O1 en Mozambique, Suráfrica (15) y Laos (11).

En Venezuela no se han hecho reportes de la presencia de plásmidos, integrones o elementos ICE en aislados de *V. cholerae*. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de estos elementos en 11 aislados de *V. cholerae* O1, obtenidos durante el brote de cólera ocurrido en Venezuela desde 1998 hasta 2000, y su asociación con la aparición de la multirresistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados Bacterianos. Se utilizaron once aislados de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor representativos de los aislados obtenidos de pacientes durante el brote de cólera ocurrido desde 1998 a 2000 (Tabla 1). Los aislados están depositados en el Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas. Los aislados bacterianos fueron almacenados a -80 °C en caldo tripticasa de soya (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) que contenían 20% (vol/vol) de glicerol. La resistencia de los aislados a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazole fue confirmada luego de la recuperación por el método de Bauer et al. (16). Los discos de antibióticos utilizados fueron ampicilina (AM) (10 ug) y trimetoprim-sulfametoxazol (TMP) (25 ug), las cepas fueron clasificadas como

resistentes según los criterios interpretativos recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (17).

Las otras cepas empleadas en el estudio fueron: *V. cholerae* O139 (amablemente donada por la Dra. Dos Praceres, Instituto FioCruz, Río de Janeiro, Brasil) como control positivo del elemento ICE; *E. coli* K12-J56 (amablemente donada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, Caracas, Venezuela) como cepa receptora en los experimentos de conjugación; y *E. coli* TM7 (amablemente donada por la Dra. Militza Guzmán, Universidad de Oriente, Venezuela) como control positivo para la presencia de integrones clase 1.

Transferencia de la Resistencia a Antibióticos. Cada aislado de *V. cholerae* O1 y *E. coli* transconjugante fue probado para la resistencia a los antibióticos (Sigma-Aldrich CO, St. Luis, USA). Se utilizó la cepa resistente a rifampicina *Escherichia coli* K12-J56 (F⁻ *lac*⁺, RIF^R) como receptora en los experimentos de conjugación para los aislados de *V. cholerae* O1. Los experimentos de conjugación fueron realizados mediante la mezcla de aislados donantes y receptora en una relación 1:5 en caldo Luria Bertani (LB), y fueron incubados sobre un filtro de Millipore en placas no selectivas de agar LB a 37°C por toda la noche. Luego de la conjugación, las bacterias fueron sembradas en agar MacConkey selectivo que contenía los antibióticos apropiados. La frecuencia de transferencia fue expresada como el número de células receptoras resistentes por célula donante en la mezcla de conjugación

Análisis de Plásmidos. La visualización de plásmidos en los aislados de *V. cholerae* y en las *E. coli* transconjugantes se realizó utilizando el método de nucleasa S1 y electroforesis de campo eléctrico pulsante (PFGE-S1) (18).

Pruebas de PCR. 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 Laboratories, Detroit, Michigan, USA) 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, Life Technologies, USA). 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.

Detección de ICE. La búsqueda de la presencia del elemento ICE se realizó utilizando los cebadores descritos previamente que producen un fragmento de 592 bp de la integrasa (Tabla 2) (18). La detección de los genes presentes en ICE que confieren resistencia a trimetoprim-sulfametoxazole se realizó mediante PCR usando cebadores descritos previamente (Tabla 2) (19).

Detección de integrones clase 1 por PCR. Todos los aislados fueron probados para detectar la presencia de integrones clase 1 mediante el uso de iniciadores que delimitan las regiones conservadas 3' y 5' de estas estructuras (Tabla 2) (20). La prueba fue realizada tal como se describió previamente (20), con ligeras modificaciones, para permitir que se obtuvieran productos de amplificación mayores de 1.000 pb, aumentando el tiempo de extensión en cada ciclo de amplificación a 3 minutos.

Obtención de la secuencia nucleotídica de los genes de resistencia. Con el fin de discriminar si los distintos aislamientos portan casetes génicos idénticos, los productos de PCR del mismo tamaño fueron analizados utilizando PCR-RFLP con una variedad de endonucleasas (resultados no mostrados). Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados por el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Sistem (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se eluyó el ADN purificado, se guardó en un tubo de micro centrífuga estéril y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La secuencia nucleotídica fue determinada en la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (UEGF) del IVIC, Caracas, Venezuela, utilizando un secuenciador de ácidos nucleicos Perkin-Elmer modelo ABI PRISM™ 377, usando protocolos estándares de secuenciación. La secuencia de nucleótidos de los productos fueron revisados con el programa Chromas Lite 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) para determinar la calidad de la secuencia según el tamaño y superposición de los picos de señal obtenidos. Una vez que se determinó aquellas secuencias con la calidad suficiente para ser analizadas se determinó las coincidencias nucleotídicas entre ellas mediante el programa CLUSTALW2 Multiple Sequences Aligment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Posteriormente, se utilizó el programa BioEdit (<http://www.mcbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) para determinar la similitud entre las secuencias obtenidas y descartar posibles errores de lectura.

Para analizar la identidad de la secuencia consenso se realizó la comparación con el banco de genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utilizando el software BLAST (21).

RESULTADOS

La fecha, el lugar de obtención y el patrón de resistencia a los antibióticos de los aislados de *V. cholerae* utilizados en el presente estudio se muestran en la tabla 1. El patrón de resistencia corresponde a lo reportado previamente (2). Todos los aislados, aunque se obtuvieron de diferentes localidades y fechas durante el brote, mostraron antibiogramas idénticos. Tomando en consideración que la resistencia a las drogas se asocia con elementos genéticos móviles, realizamos experimentos para demostrar la movilidad de los determinantes de resistencia. Los experimentos de conjugación entre los aislados *V. cholerae* y *E. coli* K-12 mostraron crecimiento de transconjugantes con un promedio de frecuencia de 7×10^{-5} transconjugantes por donante utilizando como marcador de transferencia la ampicilina (AMP) y 9×10^{-5} transconjugantes por donante al utilizar como marcador trimetoprim-sulfametoxazole (TMP-SUL) (Tabla 1). Todas las bacterias transconjugantes exhibieron antibiogramas idénticos, demostrando la co-transferencia de la resistencia a los antibióticos.

El análisis del contenido de los plásmidos utilizando PFGE-S1 demostró que cada aislado de *V. cholerae* contiene un plásmido grande, de aproximadamente 170 kbp (Figura 1). El análisis del contenido de los plásmidos en las transconjugantes demostró que el plásmido de 170 kbp había sido transferido a la cepa receptora (Figura 1). Estos resultados sugieren la presencia de un plásmido conjugativo común, que porta los determinantes de resistencia.

Tomando en consideración que se ha reportado que las cepas de *V. cholerae* que portan el elemento ICE son resistentes a trimetoprim y sulfametoxazole, investigamos si la resistencia a este antibiótico en los aislados clínicos obtenidos durante el brote de cólera de Venezuela en el periodo 1998-2000 podría deberse a la presencia de este elemento. Todos los aislados de *V. cholerae* resultaron negativos para la búsqueda del gen *int*, que codifica para la integrasa específica del elemento ICE. Más aún, los aislados también resultaron negativos para la búsqueda de los genes *dfrA18* y *suII* los cuales codifican la resistencia a trimetoprim y sulfametoxazole, respectivamente, y que están

contenidos en el elemento ICE. Estos resultados indican que el elemento no estaba presente en los aislados obtenidos en Venezuela, y por lo tanto debe ser un tipo diferente de genes, cuyos productos confieren la resistencia a trimetoprim y sulfametoxazole, y que debería estar en el plásmido transferido por conjugación.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las cepas que son resistentes a los antibióticos contienen integrones, examinamos los aislados para la presencia de estos elementos. Todos los aislados bacterianos analizados, tanto *V. cholerae* como *E. coli* transconjugantes, contienen un integrón de clase 1. El producto obtenido por PCR tiene un tamaño de 750-800 pb (resultados no mostrados). Todos los amplicones obtenidos mostraron el mismo patrón de restricción con las enzimas ensayadas (resultados no mostrados). El análisis de la secuencia nucleotídica del producto de amplificación reveló que contenía un marco abierto de lectura, flanqueado por el sitio de recombinación específico de integrón de clase 1, y la secuencia conservada de la porción terminal 3' con el elemento de 59-bases, sugiriendo la presencia de un casete génico insertado en la región variable del integrón de clase 1 (Figura 2). La secuencia del casete génico tuvo un similitud del 100% al gen *dfrA15* el cual codifica la resistencia a TMP (22).

DISCUSIÓN

El brote de cólera ocurrido en Venezuela en 1998-2000 fue causado por aislados de *Vibrio cholerae* O1 El Tor resistentes a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazole, en contraste con el patrón de sensibilidad responsable por los brotes anteriores (2). En este estudio, los experimentos de conjugación demostraron que todos los aislados ensayados fueron capaces de transferir los determinantes que codifican las proteínas responsables para la resistencia a los antibióticos a la cepa receptora *E. coli*, con una frecuencia comparable con lo reportado anteriormente (23).

La co-transferencia de la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazole y ampicilina desde la cepa epidémica de *V. cholerae* O1 a la cepa receptora, indica que los genes que confieren la resistencia a estos antibióticos pueden estar contenidos en un único elemento genético, o en elementos separados que se transfieren de manera simultánea. Se ha reportado que el elemento ICE como responsable para la resistencia a cloranfenicol, estreptomina, sulfametoxazole y trimetoprim en *V. cholerae* O139 y O1 en el sub-continente Indio (9-11). Debido a que los aislados de *V. cholerae* O1 durante el brote 1998-2000 en Venezuela fueron resistentes a sulfametoxazole y trimetoprim, fueron analizados para la búsqueda del elemento ICE. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la

resistencia a los antibióticos observada en los aislados analizados no fue debida a la presencia de un elemento ICE convencional.

El análisis de plásmidos en los aislados en estudio y sus transconjugantes permitió la detección de un plásmido transferible de aproximadamente 170 kbp. Se ha reportado la presencia de plásmidos con pesos moleculares desde 54 a 150 kbp en aislados de *V. cholerae* O1 y no O1/no O139 obtenidos en Asia, África, Europa y Suramérica, con predominio de un elemento de 150 kbp (10).

La secuencia de nucleótidos de la región variable incluido en el integrón clase 1 demostró la presencia del casete génico *dfrA15*, que codifica para una dihidrofolato reductasa tipo 15, que confiere resistencia a trimetoprim. Este gen fue descrito por primera vez contenido en un intregón de clase 1 presente en un plásmido en una cepa entérica comensal de *E. coli* en Suráfrica y confiere alta resistencia a trimetoprim (22). El casete génico *dfrA15* ha sido detectado anteriormente en varias cepas de *V. cholerae* aisladas de Tailandia y Angola (24). Sin embargo, este es el primer reporte de este gen en un aislado de *V. cholerae* causante de infección en humanos en Venezuela.

Sulfonamidas y trimetoprim son antibióticos económicos que tienen efecto sinérgico y que se usan combinados para una amplia variedad de infecciones bacterianas. En Venezuela, la existencia y diseminación de casetes génicos de resistencia a trimetoprim es particularmente preocupante, pues trimetoprim-sulfametoxazole es el tratamiento habitual para la diarrea tanto en niños como en mujeres embarazadas. Nuestros resultados sugieren que la diseminación de genes de resistencia a trimetoprim entre aislados clínicos es probablemente mediada por integrones contenidos en plásmidos móviles. Más aún, el uso combinado de estos antibióticos podría jugar un papel importante en la adquisición y mantenimiento de los casetes génicos de resistencia a trimetoprim, producto de la selección de integrones de clase 1 que portan el gen *sull*.

El determinante de resistencia a ampicilina no está asociado al integrón clase 1 detectado. La resistencia a ampicilina fue transferida por conjugación, sugiriendo su posible localización en el plásmido conjugativo de 170 kb mostrado o en algún otro elemento movilizable no detectado en este estudio.

Nuestros resultados confirman que la multirresistencia a los antibióticos observada en aislados de *V. cholerae* O1 El Tor Inaba responsable del brote de cólera entre 1998 a 2000 en Venezuela está codificada en un elemento transferible que es capaz de diseminarse de diferentes maneras. Esta información es de vital importancia para el establecimiento de políticas públicas necesarias

para el instaurar las medidas de control a tomar en caso de futuros brotes. Estudios futuros deberán establecer si la cepa de *V. cholerae* O1 multirresistente provino de países vecinos, o fue una cepa local que adquirió los determinantes de resistencia por transferencia horizontal a partir de otras bacterias presentes en Venezuela, que comparten el mismo hábitat.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, el proyecto CDCH 03.00.7327.2008/1 a G.A. y el proyecto PEII No. 2012000977 a G.A. Agradecemos a los Drs. M. Guzmán, Y. Ramos y K. Rizzolo por toda su ayuda.

REFERENCIAS.

1. 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.
2. 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.
3. Dalsgaard A, Mortensen HF, Molbak 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 (5): 1189-1192.
4. Threlfall EJ, Rowe B, Huq I. Plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor from Bangladesh. Lancet. 1980; (8180); 1: 1247-1248.
5. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, et al. Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 (5): 1462-1468.
6. Sabate M, Prats G. Structure and function of integrons. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; 20 (7): 341-345.
7. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol. 1989; 3 (12): 1669-1683.
8. Dalsgaard A, Forslund A, Serichantalergs O, Sandvang D. Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44 (5): 1315-1321.

9. Falbo V, Carattoli A, Tosini F, Pezzella C, Dionisi AM, Luzzi I. Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (3): 693-696.
10. Thungapathra M, Amita, Sinha KK, Chaudhuri SR, Garg P, Ramamurthy T, Nair GB, et al. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac* (6')-*Ib*, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46 (9): 2948-2955.
11. Iwanaga M, Toma C, Miyazato T, Insisiengmay S, Nakasone N, Ehara M. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48 (7): 2364-2369.
12. Waldor MK, Tschape H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol.* 1996; 178 (14): 4157-4165.
13. Hochhut B, Waldor MK. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol Microbiol.* 1999; 32 (1): 99-110.
14. Amita, Chowdhury SR, Thungapathra M, Ramamurthy T, Nair GB, Ghosh A. Class I integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (4): 500-502.
15. Dalsgaard A, Forslund A, Sandvang D, Arntzen L, Keddy K. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene located on class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48 (6): 827-838.
16. 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.
17. CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th Information Supplement. Vol. 30. Document M100-S20, Wayne, PA; 2010.
18. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995; 226 (2): 235-240.
19. Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (11): 2991-3000.
20. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39 (1): 185-191.

21. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403-410.
22. Adrian PV, M DUP, Klugman KP, Amyes SG. New trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase cassette, *dfrXV*, inserted in a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42 (9): 2221-2224.
23. Hofer E, Quintaes BR, dos Reis EM, Rodrigues Ddos P, Seki LM, Feitosa IS, et al. The emergence of multiple antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* isolated from gastroenteritis patients in Ceara, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32: 151-156.
24. Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50 (7): 2493-2499.

Recibido: 02 de diciembre de 2016 Aprobado: 09 de marzo de 2017

Tabla 1. Aislados de *V. cholerae* O1 utilizados, antibiograma y frecuencia de transferencia por conjugación

Fecha y lugar de aislamiento	Aislado	Perfil de resistencia	Frecuencia de transferencia (AMP)	Frecuencia de transferencia (TMP-SUL)	
Noviembre 1998	Delta Amacuro (Pedernales)	54990	AMP, TMP-SUL	$6,1 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-4}$
Enero 1999	Delta Amacuro (Pedernales)	55037	AMP, TMP-SUL	$3,1 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-4}$
Enero 1999	Delta Amacuro (Pedernales)	55315	AMP, TMP-SUL	$8,3 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-4}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57872	AMP, TMP-SUL	$7,2 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57874	AMP, TMP-SUL	$3,5 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-5}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57875	AMP, TMP-SUL	$5,8 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-3}$
Agosto 1999	Nueva Esparta (Salamanca)	57881	AMP, TMP-SUL	$6,6 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^{-3}$
Noviembre 1999	Monagas (Maturín)	58705	AMP, TMP-SUL	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$
Diciembre 1999	Monagas (Maturín)	60003	AMP, TMP-SUL	$8,6 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-6}$
Diciembre 1999	Miranda (Ocumare del Tuy)	58852	AMP, TMP-SUL	$4,0 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$
Enero 2000	Caracas (El Valle)	59195	AMP, TMP-SUL	$2,1 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$

AMP, ampicilina; TMP-SUL, trimetoprim-sulfametoxazole

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

Cebador	Secuencia (5' – 3')	Gen diana	Tamaño del amplificado (bp)	Referencia
INT1	GCT GGA TAG GTT AAG GGC GG	<i>int</i>	569	18
INT2	CTC TAT GGG CAC TGT CCA CAT TG			
SUL2-F	AGG GGG CAG ATG TGA TCG AC	<i>sulII</i>	625	18
SUL2-B	TGT GCG GAT GAA GTC AGC TCC			
TMP-F	TGG GTA AGA CAC TCG TCA TGG G	<i>dfrA18</i>	388	18
TMP-B	ACT GCC GTT TTC GAT AAT GTG G			
5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	<i>5'-CS</i>	Variable	19
3'CS	AAG CAG ACT TCA CCT GA	<i>3'CS</i>		

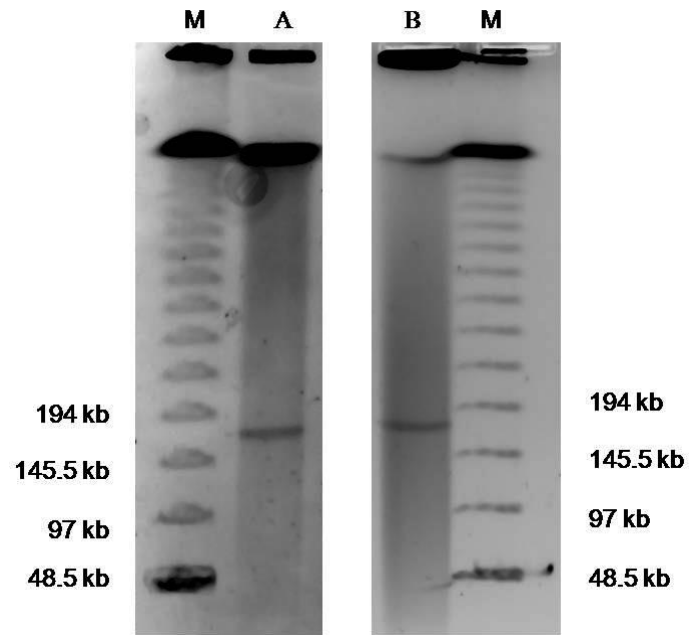


Figura 1. Electroforesis en campo eléctrico pulsante con nucleasa S1; (A) *V. cholerae* 55315; (B) *E. coli* transconjugante T-55315; (M) Marcador de peso molecular concatámeros del fago λ desde 48,5 a 970 kb; kb, Kilopares de bases.


```

Query 3   GGCATCCAGCAGCAAGGCCGTTAOCOCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAA 62
/-----porción conservada 5'-----
Query 63  CGATGTTAOCAGCAGGGCAGTGCOCCTAAAACAAAGTTAACCCCTAAGGAAGTATCGTG 122
-----porción conservada 5-----/

Query 123 AAACATCACTAATGGCAGCAATTCGAAGAATGGAGTTATCGGAAATGGCCCAGATATT 182
/-----gen drfA15-----

Query 183 CCATGGAGTGCCAAAGGGGAACAATTACTCTTCAAAGOGATTACCTATAATCAGTGGCTT 242
-----gen drfA15-----

Query 243 TTGGTAGGCCGAAAGACTTTCGAGTCAATGGGGCTTTACCCAACCGAAAATATGCCGTT 302
-----gen drfA15-----

Query 303  GTAACCTCGTTCAAGCTTCACTTCCAGTGATGAGAATGTATTGGTATTTCCATCTATCGAT 362
-----gen drfA15-----

Query 363  GAAGGCCTAAATCATCTGAAGACGATAACGGATCATGTGATTGTGTCTGGTGGTGGTGAA 422
-----gen drfA15-----

Query 423  ATATACAAAGCCTGATCGATAAAGTTGATACTTTACATATTTCAACAATCGACATTGAG 482
-----gen drfA15-----

Query 483  CCAGAAGGTGATGTCATTTTCCAGAAATCCCAGTAGTTTTAGGCCAGTTTTAGCCAA 542
-----gen drfA15-----

Query 543  GACTTCGTGCTAACATAAATTATAGTTACCAAATCTGGCAAAGGGTTAACAAGTGGCA 602
-----gen drfA15-----/
/-----elemento-59 bases-----

Query 603  GCAACTGACCGCCAAAAGTGTCACTTGTGTTTGCCAAAAGCCGGCRAAAACAAGGCCCAAT 662
-----elemento de 59 -bases-----

Query 663  TTTGTCGGCAGCTGTGCCAGGCGTTAGATGCACTAAGCACATAATTCTCACAGCCAAAC 722
-----elemento de 59 bases/-----región conservada 3'-----

Query 723  TATCAGGT-AAGTCTGCTT 740
-----3'-----/

```

Figura 2. Secuencia “consenso” del elemento móvil insertado en el integrón clase 1. Los números a los lados indican el número de nucleótido de inicio y culminación. Del nucleótido 1 a 97 es la región conservada 5', que incluye del nucleótido 1 al 17, anclaje del iniciador 5'CS, se distingue incluido en el rectángulo. Del nucleótido 98 al 683 se encuentra el casete génico *dfrA15*. Del nucleótido 133 al 591 el gen *drfA15*. El codón de inicio ATG subrayado y resaltado en amarillo. Del nucleótido 586 al 683 se encuentra el elemento de 59-bases. Del nucleótido 684 al 739 la región conservada 3', que incluye del nucleótido 725 al 738, anclaje del iniciador 3'CS, se distingue incluido en el rectángulo. Las posiciones de los sitios de restricción de la enzima *HaeIII* (posiciones 173, 252 y 528), se indican subrayadas y resaltadas en rojo. Las posiciones de los sitios de restricción de la enzima *HhaI* (posiciones 22, 369 y 658) se indican subrayadas y resaltadas en verde.