

Original

Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium*

F. Gallardo¹, J. Ruiz¹, S.M. Soto², M.T. Jiménez de Anta¹ y J. Vila¹

¹Instituto de Infecciones e Inmunología, Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España;

²Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, España

RESUMEN

La resistencia a antibióticos detectada en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium* ha aumentado considerablemente en los últimos años. Algunos genes de resistencia pueden estar localizados en integrones. En este estudio hemos caracterizado integrones en 10 cepas de *S. typhimurium* y hemos analizado la relación epidemiológica entre ellas. En los genes de resistencia que hemos detectado encontramos genes que codifican betalactamasas ($bla_{\text{oxa-30}}$ en dos cepas y $bla_{\text{pse-1}}$ en cinco cepas, una de ellas presentando este cassette en dos integrones diferentes), enzimas modificantes de los aminoglucósidos ($addA2$ en cuatro cepas, una de ellas presentando este cassette en dos integrones diferentes, y $addA1$ en seis cepas) y dihidrofolato reductasa ($dfrA1$ en tres cepas). Se ha comprobado que cepas epidemiológicamente diferentes poseen el mismo integrón y que cepas epidemiológicamente relacionadas presentan integrones diferentes.

Palabras clave: *Salmonella* - Integrones - Resistencia

Different antibiotic resistance mechanisms associated with integrons in clinical isolates of *Salmonella typhimurium*

SUMMARY

Antibiotic resistance in clinical isolates of *Salmonella typhimurium* has steadily risen in recent years. Some of the resistance genes may be carried into integrons. In this study, integrons, both from 10 epidemiologically related and unrelated *S. typhimurium* clinical isolates, were characterized, showing that epidemiologically different strains can carry the same integron, and that epidemiologically related strain can carry different integrons. Among the resistance genes detected in this study were genes encoding β -lactamases ($bla_{\text{oxa-30}}$ in two strains, and $bla_{\text{pse-1}}$ in five strains, one of which was carrying this cassette in two different integrons); aminoglycoside-modifying enzymes ($addA2$ in four strains, one of which was carrying this cassette in two different integrons, and $addA1$ in six strains); as well dihydrofolate reductases ($dfrA1$ in three strains).

Key words: *Salmonella* - Integrons - Resistance

INTRODUCCIÓN

Salmonella typhimurium es causa frecuente de gastroenteritis, además de producir otras infecciones, como por ejemplo bacteriemias en pacientes inmunodeprimidos por el VIH (1-3). De manera habitual, el tratamiento de las gastroenteritis no requiere el uso de antibióticos, aunque en pacientes inmunodeprimidos puede ser necesario (2).

Durante los últimos años (4) ha aumentado la resistencia de las enterobacterias a los antimicrobianos, y el género *Salmonella* no es caso excepcional (5), observándose un auge en su resistencia en diferentes partes del mundo (4-6, 8, 12, 13).

La presencia de mutaciones en proteínas diana y la adquisición de genes de resistencia son los procesos que confieren resistencia a los aislamientos clínicos; por ejemplo, se han descrito mutaciones en la DNA girasa y en la topoisomerasa IV (proteínas diana de las quinolonas) como un mecanismo importante en la resistencia a las quinolonas (6, 7). Además, las síntesis de enzimas como betalactamasas, cloranfenicol acetiltransferasa y enzimas modificantes de aminoglucósidos, son mecanismos de resistencia que pueden estar codificados en genes localizados en elementos génicos (plásmidos, transposones o integrones) (8-10).

Los integrones son elementos génicos que, mediante un mecanismo de recombinación específico, incorporan genes denominados *cassettes* que confieren resistencia a los antimicrobianos; por lo general se localizan en plásmidos conjugables, aunque también se pueden encontrar en el cromosoma. En un integrón podemos distinguir tres partes bien diferenciadas. Hay dos regiones conservadas, entre las que se localiza una región de tamaño y composición variable, en la cual se encuentran los diferentes *cassettes* génicos. En el extremo 5' está el gen *int1*, encargado de la síntesis de una enzima que presenta similitud con la familia de las integrasas, y la región *att1*, lugar de recombinación. Por otro lado, en el extremo 3' de cada *cassette* génico se encuentra una pequeña secuencia palindrómica de 59 pb, también denominada *attC*, que interviene de manera importante en el proceso de recombinación. En el extremo 3' se localiza el gen *sul1*, que confiere resistencia a las sulfonamidas. Los genes que se localizan en los integrones pueden estar asociados o no con el desarrollo de resistencia a antimicrobianos. Hasta el momento se han descrito diferentes tipos de integrones, siendo los de tipo 1 los más frecuentes en las enterobacterias (10).

El objetivo de este estudio fue caracterizar los integrones encontrados en cepas de *S. typhimurium* procedentes de aislamientos clínicos, relacionados o no epidemiológicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y análisis epidemiológico

Las diez cepas de *S. typhimurium* que se han analizado en este estudio procedían de aislamientos clínicos, obtenidos de heces de pacientes con diarrea, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de Barcelona en el año 1994. En ningún caso existía relación entre los pacientes ni se tomó más de una muestra de cada uno. En todas las cepas se determinaron las relaciones epidemiológicas mediante análisis del DNA cromosómico, digerido con *XbaI* y posterior electroforesis en campo pulsante (5).

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos

Se determinó el grado de resistencia de *S. typhimurium* a diversos agentes antimicrobianos (ampicilina, ceftazidima, imipenem, cloranfenicol, tetraciclina, espectinomicina, tobramicina y cotrimoxazol) por el método de difusión en agar siguiendo las directrices del NCCLS (11).

Detección y clonación de los integrones

La existencia de integrones de tipo 1 se puso de manifiesto mediante PCR, bajo las condiciones descritas previamente por Navia y cols. (8). Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (1,5% p/v) teñidos posteriormente con bromuro de etidio. La visualización de los integrones se realizó bajo luz ultravioleta. Estos productos amplificados se purificaron mediante el sistema *GeneClean* (Bio 101, Inc., La Jolla, California, USA) y clonados en el vector pCRII (*Invitrogen BV*, Leek, The Netherlands). Las cepas transformantes se hicieron crecer en medio que contenía X-Gal e IPTG. Una vez detectadas las cepas que contenían el plásmido transformante, éste fue extraído por lisis alcalina y posteriormente secuenciado utilizando el *Thermosequenase Dye Terminator Sequencing kit* (Amersham, Cleveland, USA) con un análisis posterior en secuenciador automático (377; Applied Biosystems). Los resultados obtenidos de la reacción de secuencia fueron cotejados con los presentes en el *GeneBank*.

Detección de betalactamasas

La detección de betalactamasas se realizó mediante determinación del pI siguiendo la metodología previamente descrita (5, 8). Adicionalmente se efectuó PCR con cebadores específicos (5, 8).

RESULTADOS

El estudio epidemiológico realizado con estas cepas reveló la existencia de tres clones diferentes, A, B, C, y un subclón A₁. Tres de ellas pertenecían al clon A, tres al clon B, dos al clon C y dos al subclon A₁ (Fig. 1). Todas las cepas estudiadas presentaron resistencia a ampicilina, tetraciclina, espectinomicina y tobramicina; ocho de diez presentaron resistencia al cloranfenicol y tres presentaron resistencia al cotrimoxazol, mientras que no se detectó ninguna cepa que fuese resistente al imipenem ni a la ceftazidima.

Por otro lado, todas las cepas que se estudiaron presentaban al menos un integrón, con un rango de tamaños que oscilaba entre 900 y 2000 pb (Fig. 2). Los genes presentes en los integrones detectados pertenecían a tres familias involucradas en la adquisición de resistencia a antibióticos: betalactamasas, enzimas modificantes de aminoglucósidos y dihidrofolato reductasas. Estos resultados nos permitieron definir cuatro fenotipos diferentes en cuanto a la presencia de integrones: una cepa presentaba tres integrones con tamaños de 900, 1100 y 1500 pb; tres cepas presentaban dos integrones de tamaños 900 y 1100 pb; dos cepas presentaban un único integrón de 2000 pb; y cuatro cepas presentaban un integrón de 1500 pb.

En los integrones analizados se hallaron dos genes que codificaban betalactamasas diferentes: *bla*_{pse-1} (presente en cinco cepas) y *bla*_{oxa-30} (presente en dos cepas). Adicionalmente, los estudios de PCR e isoelectroenfoque mostraron

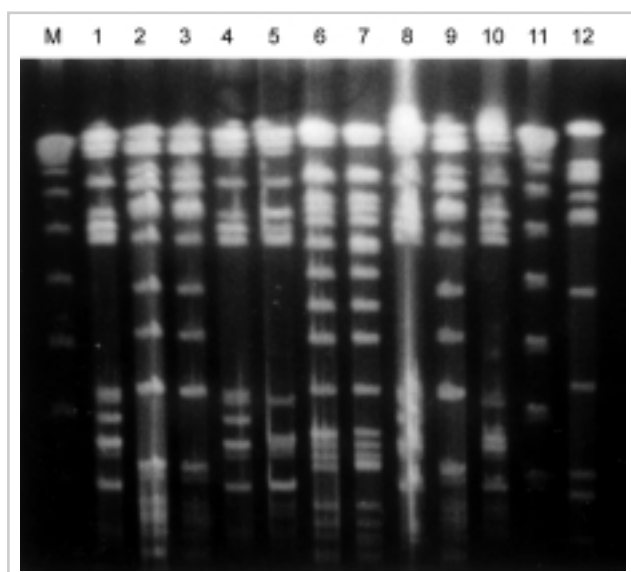


Figura 1. Electroforesis en campo pulsante. M: Marcador. Carril 1: cepa 3; carril 2: cepa 317; carril 3: cepa 410; carril 4: cepa 470; carril 5: cepa 643; carril 6: cepa 1215; carril 7: cepa 2120; carril 8: cepa 2545; carril 9: cepa 2557; carril 10: cepa 2675; carril 11: marcador; carril 12: *Salmonella enteritidis* (control).

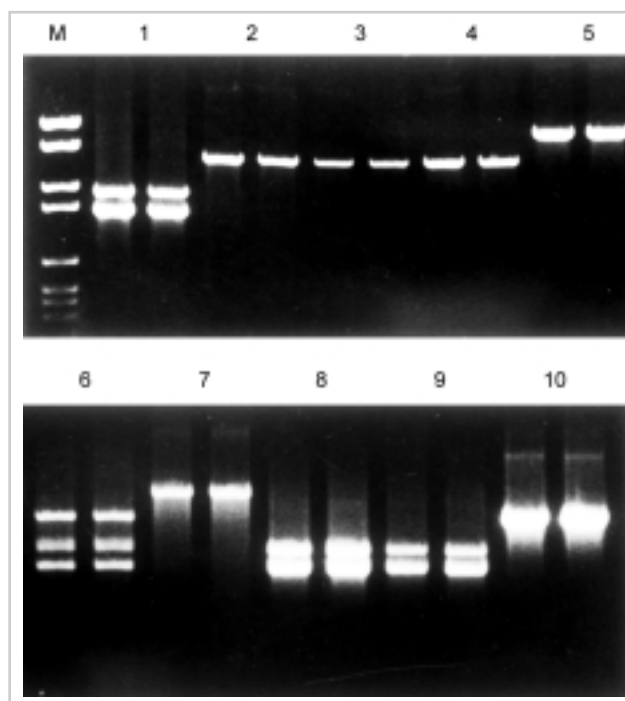


Figura 2. Integrones de las cepas estudiadas. Los productos de PCR están por duplicado. M: Marcador. Carril 1: cepa 3; carril 2: cepa 410; carril 3: cepa 2557; carril 4: cepa 317; carril 5: cepa 643; carril 6: cepa 2120; carril 7: cepa 2675; carril 8: cepa 2545; carril 9: cepa 470; carril 10: cepa 1215.

la presencia de betalactamasas tipo TEM en cinco de las cepas, así como de otra betalactamasa tipo OXA-30 que no se detectó al efectuar la PCR de integrones. Tan sólo se halló un gen codificador de DHFR (*dfrAI*), el cual estaba presente en tres cepas. Dos genes que codificaban enzimas modificantes de aminoglucósidos (*aadA1a* y *aadA2*) se identificaron en las diez cepas, de las cuales seis presentaban el gen *aadA1a* y el resto el gen *aadA2* (Tabla 1). Ninguna de las cepas estudiadas presentaba dos genes de manera simultánea pertenecientes a la misma familia.

En los integrones que sólo presentaban un gen, éste se identificó como codificante de betalactamasas, *bla*_{pse-1}, o bien una enzima modificante de aminoglucósidos *aadA2*. La presencia del mismo gen se detectaba en integrones diferentes pertenecientes a la misma cepa, como es el caso del gen codificante de la PSE-1 betalactamasa, presente en un integrón de 900 bp y en otro de 1500 pb, o el caso del gen *aadA2*, presente en un integrón con un tamaño aproximado de 1100 pb y en un integrón de 1500 pb, detectados en la cepa 2120. Sin embargo, un mismo integrón se localizaba en cepas epidemiológicamente diferentes, como sucedía con el integrón que contenía los genes *dfrAI* y *aadA1a* en las cepas 410, 2557 y 1215 (fenotipo B las dos primeras y C la tercera).

Tabla 1. Grupos epidemiológicos y composición genética de los integrones.

Cepa	Grupo epidemiológico	Betalactamasas		Tamaño	Integrón		Resistencia
		pI	PCR		gen 1	gen 2	
3	A	5,6	PSE-1	c.900 c.1100	<i>bla</i> _{pse-1} <i>aadA2</i>		AmpCmTetSptTob
470	A	5,6	PSE-1	c.900 c.1100	<i>bla</i> _{pse-1} <i>aadA2</i>		AmpCmTetSptTob
2545	A	5,6	PSE-1	c.900 c.1100	<i>bla</i> _{pse-1} <i>aadA2</i>		AmpCmTetSptTob
643	A ₁	7,0	OXA	c.2000	<i>bla</i> _{oxa-30}	<i>aadA1a</i>	AmpCmTetSptTob
2675	A ₁	7,0	OXA	c.2000	<i>bla</i> _{oxa-30}	<i>aadA1a</i>	AmpCmTetSptTob
410	B	5,4	TEM	c.1500	<i>dfrAI</i>	<i>aadA1a</i>	AmpCmTetSptTobSxt
2557	B	5,4/7,0	TEM/OXA	c.1500	<i>dfrAI</i>	<i>aadA1a</i>	AmpCmTetSptTobSxt
317	B	5,4/5,6	TEM/PSE-1	c.1500	<i>bla</i> _{pse-1}	<i>aadA1a</i>	AmpTetSptTob
2120	C	5,4/5,6	TEM/PSE-1	c.900 c.1100 c.1500	<i>bla</i> _{pse-1} <i>aadA2</i> <i>bla</i> _{pse-1}	<i>aadA2</i>	AmpTetSptTob
1215	C	5,4	TEM	c.1500	<i>dfrAI</i>	<i>aadA1a</i>	AmpCmTetSptTobSxt

DISCUSIÓN

La presencia de integrones se ha asociado con el transporte y la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en un gran número de microorganismos, entre los que se encuentra *S. typhimurium* (9), siendo su composición genética muy variada: betalactamasas diferentes (OXA, CARB...), enzimas modificantes de aminoglucósidos, dihidrofolato reductasas y otros genes que confieren resistencia a antibacterianos (sulfonamidas) (6, 8, 9, 11-14). Se ha descrito que las enzimas modificantes de aminoglucósidos son las que con más frecuencia se presentan en los integrones (9, 10), lo cual se hace evidente en las cepas objeto de este estudio, en donde de los 15 integrones detectados y estudiados, 11 contienen un gen de esta familia (*aadA1a* o *aadA2*).

Algunos autores (10) han descrito la prevalencia de tres tipos de regiones de DNA, con tamaños que oscilan entre 800, 1000 y 1500 pb, como las más frecuentes en los integrones de tipo I presentes en las enterobacterias procedentes de aislamientos clínicos. Estos *cassettes* genéticos presentan la misma composición (*aacA4*, *aadA* y *dfrAI* más *aadA1*, respectivamente) independientemente de cuál sea su origen y organismo huésped. En el caso de *S. typhimurium*, patógeno objeto de este estudio, los integrones analizados presentan tamaños y composiciones similares a los descritos por Martínez-Freijoo y cols. (10), los cuatro integrones de 1100 pb y uno de 1500 pb contienen un gen *aadA2*, y los cuatro integrones restantes de 1500 pb contie-

nen un gen *aadA1*. Este hecho refuerza la hipótesis formulada por Martínez-Freijoo y cols. (10), de que la transferencia de integrones entre una misma especie y entre especies diferentes se lleva a cabo a partir de una estructura básica, no a través de genes individuales; esto facilitaría la diseminación mundial de los integrones y, por consiguiente, de las resistencias a ellos asociadas. En este sentido, uno de los integrones que forman parte de este estudio, de un tamaño cercano a 2000 bp, contiene un gen *bla*_{oxa-30} más un gen *aadA1a*, que únicamente ha sido descrito en cepas de *Shigella flexneri* aisladas en China (15) y en una cepa de *S. typhimurium* aislada de heces de una viajera a su vuelta de diferentes países (Arabia Saudí, Pakistán y Turquía) (16). Cabe decir, asimismo, que este mismo gen *bla*_{oxa-30} se ha hallado en una cepa de *Escherichia coli* aislada de heces de niños sanos en La Rioja (España) (17).

En resumen, los integrones analizados y caracterizados en cepas de *S. typhimurium* presentan una composición genética muy similar a la de los descritos hasta el momento en otras enterobacterias. La presencia de integrones distintos en cepas pertenecientes al mismo clon sugiere que la adquisición de este elemento génico puede marcar una diferencia génica en las cepas epidemiológicamente iguales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por las becas FIS 00/0997 y FIS 00/0632 del Fondo de Investigaciones Sanitarias.

S.M. Soto disfruta de una beca de FPU (ref. AP98).

Correspondencia: Dr. Jordi Vila, Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, España. Fax: 93 227 54 54. Teléfono: 93 227 55 22. E-mail: vila@medicina.ub.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Akalin, H.E. *Quinolones in the treatment of acute bacterial diarrhoeal diseases*. *Drugs* 1993; 45 (Suppl. 3): 114-118.
2. Glaser, J.B., Morton-Kute, L., Berger, SR. y cols. *Recurrent Salmonella typhimurium bacteremia associated with the acquired immunodeficiency syndrome*. *Ann Intern Med* 1985; 102: 189-193.
3. Casado, J.L., Valdezate, S., Calderón, C., Navas, E., Frutos, B., Guerrero, A. *Zidovudine therapy protects against Salmonella bacteremia recurrence in human immunodeficiency virus-infected patients*. *J Infect Dis* 1999; 179: 1553-1556.
4. Prats, G., Mirelis, B., Llovet, T., Muñoz, C., Miró, E., Navarro, F. *Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1140-1145.
5. Gallardo, F., Ruiz, J., Marco, F., Towner, K.J., Vila, J. *Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of Salmonella serotype typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance*. *J Med Microbiol* 1999; 48: 367-374.
6. Ruiz, J., Capitano, L., Nuñez, L. y cols. *Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant Salmonella typhimurium isolated from fish*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 699-702.
7. Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., Jiménez de Anta, M.T. *Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 491-493.
8. Navia, M.M., Capitano, L., Ruiz, J., Vargas, M., Urassa, H., Schelleberg, D. *Typing and characterization of the mechanisms of resistance in Shigella spp. isolated from faeces of children in Ifakara (Tanzania)*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3113-3117.
9. Guerra, B., Soto, S., Cal, S., Mendoza M.C. *Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among Salmonella serotypes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2166-2169.
10. Martínez-Freijoo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Verhoeff, J., Jones, M.E. *Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 42: 689-696.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1997.
12. Vila, J., Navia, M., Ruiz, J., Casals, C. *Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2757-2759.
13. Tosini, F., Visca, P., Luzzi, I. y cols. *Class I integron-borne multiple antibiotic resistance carried by IncF1 and IncLM plasmids in Salmonella enterica serotype typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3053-3058.
14. Colonna, B., Bernardini, M., Micheli, G., Malmone, F., Nicoletti, M., Casalino, M. *The Salmonella wien virulence plasmid pZM3 carries Tn1935, a multiresistance transposon containing a composite IS1936-kanamycin resistance element*. *Plasmid* 1988; 20: 221-231.
15. Siu, L.K., Lo, J.Y., Yuen, K.Y., Chau, P.Y., Ng, M.H., Ho, P.L. *Beta-lactamases in Shigella flexneri isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like beta-lactamase, OXA-30*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2034-2038.
16. Hanson, N.D., Moland, E.S., Hossain, A., Neville, S.A., Gosbell, I.B., Thomson, K.T. *Unusual Salmonella enterica serotype typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 β -lactamases*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 1011-1014.
17. Domínguez, E., Zarazaga, M., Saenz, Y., Briñas, L., Torres, C. *Mechanisms of antibiotic resistance in Escherichia coli isolates obtained from healthy children in Spain*. *Microb Drug Resist* 2002; 8: 321-327.