

Original

Asociación entre integrones de clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*

M. Álvarez-Fernández^{1,2}, T. Rodríguez-Sousa², E. Brey-Fernández², C. López-Meléndez² y L. Piñeiro³

¹Servicio de Microbiología y ²Laboratorio de Investigación, Hospital Xeral-Cíes de Vigo, Pontevedra;

³Servicio de Medicina Interna, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra

RESUMEN

La amplia diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos es motivo de preocupación. La asociación de los genes de resistencia con elementos génicos móviles favorece su presencia en distintas especies de bacterias, siendo los integrones un elemento importante. En este trabajo se estudia en 123 enterobacterias la presencia de integrones, identificándose éstos en el 20,3% de las cepas. La asociación entre integrones y resistencia múltiple a antimicrobianos fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Los aislamientos con integrones fueron con mayor frecuencia, estadísticamente significativa ($p < 0.05$), resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico, quinolonas y trimetoprima-sulfametoxazol. Todos los integrones formaban parte de plásmidos conjugativos. La prevalencia de integrones se incrementó del 21,2% en 1992-1994 al 72% en 1995-1997 ($p < 0.001$). Los genes *aacC1* y *aacC2* se identificaron en el 80% de los integrones. La relación entre integrones y plásmidos conjugativos debe preocuparnos, ya que podría contribuir a la diseminación de los genes de resistencia a antimicrobianos entre diferentes poblaciones bacterianas.

Palabras clave: Integrones clase 1 - *Enterobacteriaceae* - Resistencia antimicrobiana - Plásmidos conjugativos

Class 1 integrons in Enterobacteriaceae and its association with multidrug resistance and conjugative plasmids

SUMMARY

The prevalence of antimicrobial resistance genes is a cause of concern. The combination of antimicrobial resistance genes and mobile genetic elements leads to their widespread presence in different bacterial species, in which integrons are a new and important element. We studied the presence of integrons in 123 unrelated enterobacteria and identified them in 20.3% of the strains. The combination of integrons and multidrug resistance was shown to be statistically significant ($p < 0.001$). Integron-positive isolates were statistically ($p < 0.05$) more likely to be resistant to amoxicillin-clavulanic acid, quinolones and trimethoprim-sulfamethoxazole. All the integrons were identified in conjugative plasmids. The prevalence of integrons increased from 21.2% in 1992-1994 to 72% in 1995-1997 ($p < 0.001$). The *aacC1* and *aacC2* genes were identified in 80% of the integrons. The relationship between integrons and conjugative plasmids is a matter of concern because it could contribute to the dissemination of antimicrobial resistance genes among different bacterial populations.

Key words: Class 1 integrons - *Enterobacteriaceae* - Antimicrobial resistance - Conjugative plasmids

INTRODUCCIÓN

Los genes de resistencia a antimicrobianos se localizan frecuentemente en plásmidos y transposones, siendo los integrones un elemento de alta eficiencia recombinatoria (1) identificados como parte de la familia Tn 21 y caracterizados por poseer una estructura conservada y varios determinantes de resistencia (2). Se conocen cuatro clases de integrones definidos en función del tipo de integrasa (3), pero su estructura es similar. De las cuatro clases conocidas, la familia de la clase 1 es la más frecuente, posee secuencias flanqueantes conservadas en 5' que codifican una integrasa y en 3' con distintas secuencias de lectura abierta (ORF), incluyendo *qacΔI* y *sulΔI* (4). La inserción de material genético en estos elementos es el resultado de dos zonas de alta eficiencia de recombinación y de la enzima integrasa (3, 5, 6). La presencia de integrones en distintas poblaciones bacterianas es poco conocida (2, 7-14); no obstante, se han identificado diversos genes de resistencia formando parte de ellos, siendo frecuente la asociación de genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos e integrones (15, 16). En nuestro medio, el mecanismo de resistencia más habitual a gentamicina, tobramicina y netilmicina se debe a la presencia en plásmidos de los genes *aacC1* y *aacC2* (17).

En este trabajo estudiamos la presencia de integrones en una colección de *Enterobacteriaceae* aisladas entre los años 1992 y 1997. El DNA total y el plasmídico se estudiaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) termoestable para determinar la presencia de integrones. Los fenotipos de resistencia a antimicrobianos se correlacionaron con la presencia de integrones. Los amplicones fueron identificados mediante PCR para los genes *aacC1* y *aacC2*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos

Se estudiaron 123 cepas de *Enterobacteriaceae* distintas procedentes otros tantos pacientes, y en la misma especie se descartó la clonalidad empleando la amplificación aleatoria del DNA total (*random amplified polymorphic DNA*, RAPD) (18) utilizando el *Ready to go RAPD Analysis kit* (Amersham Biosciences). La distribución de las distintas especies y las muestras de donde fueron aisladas se presentan en la Tabla 1. La identificación y la determinación de la sensibilidad (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, cefuroxima, cefalotina, ciprofloxacino, fosfomicina, gentamicina, nitrofurantoina, norfloxacin, trimetoprima-sulfametoxazol) se realizaron con el sistema *Vitek-1* (bioMérieux). Para ampicilina, sulfadiazina, estreptomycin, trimetoprima, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, tobramicina, kanamicina y neomicina, la sensibilidad se estudió además mediante el método de disco-placa siguiendo las recomendaciones del NCCLS (19).

Extracción del DNA total

De un cultivo de una noche en agar sangre se realizó una turbidez equivalente al 3 de la escala de McFarland en agua bidestilada estéril, se centrifugó a 15.000 rpm y se resuspendió nuevamente en agua bidestilada estéril. Esta suspensión se incubó a 100 °C durante 10 minutos, se centrifugó a 15.000 rpm y el sobrenadante se empleó en las PCR.

Conjugación

La cepa *Escherichia coli* K12 Az^R (azida sódica resistente), Na^R (ácido nalidíxico resistente), se empleó como

Tabla 1. Distribución de las especies estudiadas por muestra y presencia de integrones.

Especie bacteriana	Hemocultivo/ Integrones (%)	Urocultivo/ Integrones (%)	Heridas/ Integrones (%)	Total/ Integrones (%)
<i>Escherichia coli</i>	44/5 (11,4)	24/11 (45,8)	13/5 (38,5)	81/21 (25,9)
<i>Salmonella enterica</i>	4/0			4/0
<i>Enterobacter cloacae</i>	8/0	1/0	1/1 (100)	10/1 (10)
<i>Morganella morganii</i>	1/0			1/0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2/0	4/2 (50)		6/2 (33,3)
<i>Serratia marcescens</i>	3/0			3/0
<i>Proteus mirabilis</i>	1/0	6/0	6/0	13/0
<i>Citrobacter freundii</i>	2/1 (50)	2/0		4/1 (25)
<i>Providentia stuartii</i>		1/0		1/0
Total	65/6 (9,2)	38/13 (34,2)	20/6 (30)	123/25 (20,3)

receptora. Las conjugaciones se realizaron tras un cultivo de una noche de la cepa donante y receptora (20). Los posibles transconjugantes se seleccionaron en el medio Luria-Bertani agar con azida sódica (200 mg/l) y gentamicina (16 mg/l).

Extracción y visualización del DNA plasmídico

El DNA se extrajo empleando una técnica de lisis alcalina (21) y la electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0,7% con 0,5 mg/l de bromuro de etidio, visualizándolo bajo luz ultravioleta.

Amplificación del DNA

La presencia de integrones se estudió en los aislamientos clínicos y en los transconjugantes. Como control negativo se utilizó la cepa empleada como receptora en la conjugación. Para evaluar la integridad del DNA se emplearon dos oligonucleótidos adicionales específicos del gen 16S rRNA (7). La PCR para el estudio de la presencia de integrones se realizó en un volumen final de 100 µl, 10 µl de 10 X PCR buffer (500 mM HCL, 15 mM Cl₂Mg, 200 mM Tris-HCl, pH 8,3), 200 µM dNTPs (Bioline), 40 pmol de cada oligonucleótido, 1,25 U de Taq polimerasa (Bioline) y 30 µl de la solución de DNA. Los oligonucleótidos empleados fueron R1, 5' AAGCAGACTTGACCTGA, y L1, 5'GGCTACC-AAGCAGCAAG. La amplificación se realizó en 35 ciclos (Touch Down Thermal Cycling System, Hybaid), 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C y 2 min a 72 °C. Los productos de amplificación se observaron con luz ultravioleta tras electroforesis en geles de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio.

Amplificación de los genes *aacC1* y *aacC2*

Los productos obtenidos mediante la PCR fueron separados en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% con bromuro de etidio, y tras cortar la banda correspondiente se extrajo ésta (21). Los integrones aislados fueron amplificados empleando oligonucleótidos específicos para los genes *aacC1* y *aacC2* (22).

Análisis estadístico

Para el análisis de las variables se empleó la prueba de Pearson χ^2 . Se utilizó el programa *Epiinfo v 6.04*.

RESULTADOS

Las cepas fueron clasificadas en dos grupos: resistentes a cuatro o menos antimicrobianos y resistentes a cinco o más antimicrobianos de los ensayos mediante difusión con disco y en cualquier combinación. El 47,1% (58 de 123) de las cepas fueron resistentes a cinco o más antimicrobianos, siendo el 52,8% (65 de 123) de las cepas resistentes a cuatro o menos antimicrobianos. De las 123 cepas estudiadas, el 20,3% (n = 25) poseían integrones. De las cepas con resistencia a cinco o más antimicrobianos, el 43,1% (25 de 58) poseían integrones, mientras que no se hallaban en las cepas con resistencia a cuatro o menos antimicrobianos (0 de 65) (p <0.001). En las cepas con resistencia a cinco o más antimicrobianos se observó un incremento en el número de integrones: en el trienio de 1992 a 1994 el 21,2% (7 de 33) de las cepas poseían integrones y en el trienio de 1995 a 1997 los presentaban el 72% (18/25) (p <0.001). El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 800 a 1500 pb, en dos cepas el amplicón fue de 800 pb, en 14 de 1000 pb y en 9 de 1500 pb. En ningún caso se detectó más de un amplicón. Los genes *aacC1* y *aacC2* se identificaron en 20 de 25 (80%) integrones (*aacC1* en 14 cepas y *aacC2* en 6 cepas). En todas las cepas con integrones, éstos formaban parte de plásmidos conjugativos, ya que se obtuvieron los mismos amplicones en los transconjugantes. En la Tabla 1 se presenta la distribución por muestras y especies bacterianas.

De los antimicrobianos estudiados mediante el sistema *Vitek-I*, la asociación entre la presencia de integrones y la resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico (20% integrón positivo y resistente vs. 9% integrón negativo y resistente; p <0.05), ciprofloxacino (20% vs. 9%; p <0.05), norfloxacino (30% vs. 9%; p <0.001) y trimetoprima-sulfametoxazol (50% vs. 27%; p <0.01) fue estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

Los integrones son elementos frecuentemente identificados en *Enterobacteriaceae* (7, 14, 23). En esta serie, la presencia de distintos tamaños en los productos de amplificación obtenidos entre las regiones conservadas sugiere que los insertos tendrían distintos orígenes. Es frecuente la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos localizados en integrones (2, 10, 24), detectándose en esta serie los genes *aacC1* y *aacC2* como causantes de la resistencia a aminoglucósidos de uso clínico (gentamicina, tobramicina y netilmicina) (17). La presencia de integrones en cepas con múltiple resistencia a antimicrobianos es conocida (7), hecho que se corrobora en el presente estudio. Dado que los integrones son un elemento extremadamente versátil para

la generación de *cassettes* de genes de resistencia, éste no debe ser el único entre cepas con resistencia múltiple, ya que en el 56,9% (n = 33) de las cepas resistentes a cinco o más antimicrobianos no se detectaron integrones. La ausencia de integrones en algunas especies bacterianas quizás esté en relación con el escaso número de representantes de ellas o bien con algún tipo de barrera biológica a estos elementos o los plásmidos que los alojan. La asociación entre integrones y resistencia a las quinolonas es un fenómeno conocido (7) y probablemente relacionado con la presencia de integrones en plásmidos mutagénicos (25, 26), o con plásmidos que porten genes que alteren la permeabilidad celular o que tengan mecanismos de transporte extracelular (27, 28). Entre los trienios 1992-1994 y 1995-1997 se ha producido un incremento de 2,57 veces en el número de aislamientos que presentan integrones (7 cepas vs. 18 cepas con integrones), hecho que puede estar relacionado con la creciente presión antimicrobiana sobre las distintas poblaciones bacterianas (23). Finalmente, la presencia de integrones en plásmidos conjugativos es un hecho que debe preocuparnos, ya que puede contribuir a aumentar la dispersión de genes de resistencia a los antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

- Hall, R.M., Stokes, H.W. *Integrons: Novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination*. *Genetica* 1993; 90: 115-132.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Mabilat, C. *Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist* 1995; 1: 195-202.
- Hall, R.M., Collis, C.M., Kim, M.J., Partidge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W. *Mobile gene cassettes and integrons in evolution*. *Ann NY Acad Sci* 1999; 870: 68-80.
- Paulsen, I.T., Littlejohn, T.G., Radström, P. y cols. *The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 761-768.
- Collis, C.M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H.W., Hall, R.M. *Site-specific insertion of gene cassettes into integrons*. *Mol Microbiol* 1993; 9: 41-52.
- Hall, R.M., Collis, C.M. *Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination*. *Mol Microbiol* 1995; 15: 593-600.
- Martínez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Grek, V.S., Verhoef, J., Jones, M.E. *Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 689-696.
- Martínez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Verhoef, 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*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 686-689.
- Schmitz, F.J., Martínez-Freijo, P., Theis, S. y cols. *Prevalence of class I integrons and association with decreased antibiotic susceptibility in German gram-negative blood culture isolates*. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 496-498.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P.H. *PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-191.
- Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Arai, T. *Distribution of the antiseptic-resistance gene qacE delta I in gram-positive bacteria*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165: 295-299.
- Wireman, J., Liebert, C.A., Smith, T., Summers, A.O. *Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 494-503.
- Jones, M.E., Peters, E., Weersink, A.M., Fluit, A., Verhoef, J. *Wide-spread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria*. *Lancet* 1997; 349: 1742-1743.
- White, P.A., McIver C.J., Rawlinson W.D. *Integrons and gene cassettes in Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2658-2661.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J. *Class I integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 761-770.
- Martínez-Freijo, P. *Integrones. Nueva causa de resistencia a antibióticos*. *Rev Esp Quimioterap* 1997; 10: 191-194.
- Álvarez, M., Mendoza, M.C. *Molecular epidemiology of two genes encoding 3-N-aminoglycoside acetyltransferases AAC(3)I and AAC(3)II among gram-negative bacteria from a Spanish hospital*. *Eur J Epidemiol* 1993; 9: 650-657.
- Williams, J., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafelski, J.A., Tingey, S.V. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. *Nucl Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th informational supplement*. NCCLS 1999; M100-S9: Vol. 19.
- Hall, L.M.C., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H.E. *OXA-II, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1637-1644.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- Van de Klundert, J.A.M., Vliegthart, J.S. *PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes*. En: Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (Eds.). *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, DC 1993; 547-552.
- Schmitz, F.J., Hafner, D., Geisel, R. y cols. *Increased prevalence of class I integrons in Escherichia coli, Klebsiella species, and Enterobacter species isolates over a 7-year period in a German University Hospital*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3724-3445.
- Peters, E.D.J., Leverstein-van Hall, M.A., Box, A.T.A., Verhoef, J., Fluit, A.C. *Novel gene cassettes and integrons*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2961-2694.
- Pinney, R.J. *Distribution among incompatibility groups of plasmids that confer UV mutability and UV resistance*. *Mutat Res* 1980; 72: 155-159.
- Ambler, J.E., Pinney, R.J. *Positive R plasmid mutator effect on chromosomal mutation to nalidixic acid resistance in nalidixic acid-exposed cultures of E. coli*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 603-609.
- Piddock, L.J.V. *Mechanism of resistance to fluoroquinolones: State of the art (1992-1994)*. *Drugs* 1995; 49: 29-35.
- Poole, K. *Bacterial multi-drug resistance—Emphasis on efflux mechanisms in Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 453-456.