

## Prevalencia de integrones clase 1 en enterobacterias de centros hospitalarios de Bogotá, Colombia

Andrea Paola Najjar Céspedes\*,  
Ingrid Yamile Pulido Manrique\*,  
Emilia María Valenzuela de Silva\*,  
María Teresa Reguero Reza\*,  
José Ramón Mantilla Anaya\*.

Prevalence of de case 1-integrations in enterobacteria isolated in Colombian Hospitals

Fecha de aceptación: marzo 2010

### Resumen

Se estudiaron 153 aislamientos de enterobacterias en ocho hospitales de la ciudad de Bogotá de 2002 a 2005 con el fin de determinar la presencia de integrones clase 1 y la relación con su fenotipo de resistencia.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Por reacción en cadena de polimerasa, se detectaron los genes *int1*, *qacEΔ1* y *sul1*. La región variable de los integrones detectados se analizó mediante RFLP-PCR. La asociación entre la presencia de integrones clase 1 con resistencia a antibióticos de diferentes clases se realizó con el test de Fisher.

**RESULTADOS.** De los aislamientos estudiados, 79.9% presentó integrones clase 1. El análisis por restricción de los amplificadores (RFLP-PCR) de la región variable de los integrones detectados mostró 16 arreglos de genes. Los genes más comunes fueron los que codifican resistencia a estreptomicina (79.4%), trimetoprim (34.3%) y β-lactámicos (18.6%). Además, se reporta por vez primera en un nuevo arreglo genético de la región variable. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la resistencia a estreptomicina y trimetoprim con presencia de integrones clase 1.

**CONCLUSIONES.** Los integrones clase 1 son muy frecuentes en las enterobacterias de nuestro estudio, lo cual se relaciona con la resistencia a estreptomicina y trimetoprim, mientras que la resistencia a otros antibióticos en nuestros aislamientos no se asoció a la presencia de estas estructuras.

**Palabras clave:** *enterobacterias, genes en cassette, integrones, multiresistencia.*

### Abstract

One hundred and fifty three enterobacteria isolated from eight different hospitals in Bogotá, Colombia, from 2002 to 2005, were studied in order to determine class 1 integrons presence and their relationship with isolates' resistance phenotype.

**MATERIAL AND METHODS.** Genes *int1*, *qacEΔ1*, and *sul1* were detected by polymerase chain reaction. Variable region of integrons was analyzed by RFLP-PCR. Association between integrons presence and resistance to different classes of antibiotics was done using Fisher test.

**RESULTS.** Seventy nine point nine percent of isolates studied showed class 1 integrons. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP-PCR) of integrons variable regions revealed 16 different gene arrays. Genes most commonly found were those codifying for streptomycin (79.4%), trimethoprim (34.3%) and β-lactams (18.6%) resistance. Additionally, one new cassette array identified on the variable region of was reported for the first time in this study. We found significant statistical association between streptomycin and trimethoprim resistance with presence of class 1 integrons.

**CONCLUSIONS.** Class 1 integrons are widespread in enterobacteria isolates studied, and their presence is associated with streptomycin and trimethoprim resistance whereas other antibiotic resistance was not associated with these structures.

**Keywords:** *multidrug resistance bacteria, enterobacteriaceae, gene cassettes, integrons.*

\* Grupo de Epidemiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia  
Avenida 30, núm. 45-03, Edificio Manuel Ancizar. Teléfono: (57-1) 31-65-000, ext. 16965, fax: (57-1) 31-65-415.  
E-mail: apnajar@unal.edu.co, jrmantillaa@unal.edu.co

## Introducción

Las infecciones nosocomiales causadas por enterobacterias resistentes a múltiples clases de antibióticos son un problema creciente y complejo en todo el mundo.<sup>1</sup> Los genes de resistencia se adquieren por transferencia de plataformas genéticas, como transposones o plásmidos. Está comprobado que algunos genes de resistencia movilizables por plásmidos y transposones en bacilos gram-negativos se ubican a su vez en estructuras genéticas conocidas como integrones.<sup>2-7</sup> Los integrones son elementos clave en el problema de la resistencia a antibióticos debido a su capacidad para capturar y expresar genes de resistencia. Su ubicación en plataformas plasmídicas permite su movilización entre bacterias de la misma especie o de diferentes especies, lo que contribuye a la diseminación de genes de resistencia.<sup>8,9</sup> Los integrones clase 1 son los más comunes en aislamientos de origen clínico, y se han asociado a multiresistencia a antibióticos en ambiente hospitalario.<sup>1,9,10</sup> Estos integrones, además de la integrasa, presentan, en su mayoría en la región 3', los genes *su1* y *qacEΔ1*, que codifican resistencia a sulfonamidas y compuestos de amonio cuaternario, respectivamente.<sup>2,6</sup> Corriente abajo de la integrasa se localiza una región variable en la que se insertan genes de resistencia a múltiples antibióticos, como β-lactámicos, quinolonas y aminoglicósidos, entre otros.

Estudios anteriores han mostrado la participación de los integrones de clase 1 en la adquisición y diseminación de la resistencia a antibióticos entre bacilos gram-negativos.<sup>7,10-12</sup> Sin embargo, en Colombia, a pesar de los altos índices de resistencia a antibióticos detectados en enterobacterias,<sup>13</sup> no se ha investigado el papel de los integrones clase 1 en este fenómeno. El objetivo de este estudio fue establecer la prevalencia de integrones clase 1 en aislamientos clínicos de enterobacterias procedentes de varios hospitales de Bogotá, Colombia, y su relación con la resistencia mostrada por dichos aislamientos.

## Material y métodos

Se identificaron 153 aislamientos de enterobacterias en cada hospital con los sistemas MicroScan® (Dade Behring, West Sacramento, California) y API 20E (BioMérieux®). Las especies estudiadas de esta familia fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* (cuadro 1). Estos aislamientos fueron causantes de infección intrahospitalaria, acorde con los criterios de los Centros de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC),<sup>14</sup> y fueron productores de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), según la prueba recomendada por el CLSI realizada por cada institución.<sup>15</sup> La susceptibilidad antimicrobiana para 14 antibióticos de cuatro clases se determinó por la técnica de difusión en agar.<sup>15</sup> Se consideró multiresistente al aislamiento resistente, por lo menos a un antimicrobiano de tres o más clases.<sup>16</sup>

La detección de los genes *int1*, *qacEΔ1* y *su1* se llevó a cabo mediante iniciadores 15/13,<sup>3</sup> *QacEΔ1F*/*QacEΔ1B* y *Sul1F*/*Sul1B*,<sup>17</sup> respectivamente. El ADN molde

se obtuvo mediante lisis por ebullición de colonias frescas de cada aislamiento.<sup>18</sup> La mezcla de reacción para cada gen contenía los respectivos iniciadores en concentración 1 μM: deoxinucleótidos trifosfato, 0.2 mM; cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 1.5 mM; y Taq DNA-polimerasa (Invitrogen®), 0.04 U/μL en buffer 1X suministrado por Invitrogen®. La reacción de amplificación de ADN se realizó con termociclador iCycler® (Bio-Rad) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante cinco minutos a 95 °C; 30 ciclos de un minuto a 95 °C, un minuto a 55 °C y un minuto a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72 °C. En los aislamientos portadores del gen *int1* se amplificó la región variable del integrón con los iniciadores 5'CS y 3'CS,<sup>11</sup> y en las mismas condiciones de amplificación anteriores, excepto por la temperatura de hibridación, que fue de 63 °C. Los amplificados se resolvieron en geles de agarosa a 1% a 5 V/cm en buffer TBE 0.5 X, y se revelaron con 0.5 μg/mL de bromuro de etidio. Con el marcador DNA 100pb ladder (Invitrogen®) se estimaron los tamaños de los amplificados.

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de los productos de PCR (RFLP-PCR) de las regiones variables se realizó con las enzimas *AluI* y *Hinfi* (Gibco®).<sup>19</sup> Las digestiones se analizaron en geles de agarosa a 1.5% a 6 V/cm en buffer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio (0.5 μg/mL). Se consideró que los amplímeros con igual perfil de restricción, para las dos enzimas, portaban los mismos genes en cassette. Se purificaron y secuenciaron productos de PCR de la región variable representativos de cada perfil de restricción en ambas cadenas por el método de terminación de cadena con un secuenciador ABI 3730xl (Applied Biosystems®). Los amplímeros mayores a 2 Kb se insertaron en el vector pCR® 2.1 TOPO® (Invitrogen®) y se secuenciaron mediante primer con los iniciadores universales M13. Los servicios de secuenciación fueron de Macrogen (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Las secuencias se editaron con el programa Bioedit® 7.0.0 (Isis Pharmaceuticals) y se compararon con secuencias de la base de datos Genbank mediante la aplicación BLAST (disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se asoció la presencia de integrones clase 1 a la resistencia a los antibióticos evaluados con el test exacto de Fisher y el programa de análisis estadístico Minitab® Statistical 14.1. Un valor  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## Resultados

En el cuadro 1 se muestra el perfil de resistencia de los organismos en estudio. De los aislamientos seleccionados, 47.7% (n = 73) presentó resistencia a antibióticos de las cuatro clases seleccionadas (β-lactámicos, aminoglicósidos, inhibidores de folato y quinolonas); 24.2% presentó resistencia a β-lactámicos, aminoglicósidos e inhibidores de folato; 26.8%, a β-lactámicos, aminoglicósidos y quinolonas; y 1.3%, a β-lactámicos, inhibidores de folato y quinolonas. Todos los aislamientos fueron resistentes a cefotaxima y susceptibles a imipenem.

**Cuadro 1**  
Asociación entre resistencia a antibióticos y presencia integrones de clase 1

| Antibiótico                  | % resistencia total<br>(número<br>de aislamientos) | % resistencia con 1 <sup>a</sup><br>(número<br>de aislamientos) | % resistencia sin 1 <sup>b</sup><br>(número<br>de aislamientos) | Valor p <sup>c</sup> |
|------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------|
| <b>β-lactámicos</b>          |                                                    |                                                                 |                                                                 |                      |
| Aztreonam                    | 94.8 (145)                                         | 93.4 (113)                                                      | 100.0 (32)                                                      | 0.205                |
| Cefepime                     | 49.0 (75)                                          | 47.9 (58)                                                       | 53.1 (17)                                                       | 0.692                |
| Cefoxitina                   | 17.0 (26)                                          | 19.0 (23)                                                       | 9.4 (3)                                                         | 0.290                |
| Ceftazidima                  | 82.4 (126)                                         | 82.6 (100)                                                      | 81.3 (26)                                                       | 0.799                |
| Ceftriazona                  | 99.3 (152)                                         | 99.2 (120)                                                      | 100.0 (32)                                                      | 1.000                |
| Piperacilina                 | 75.2 (115)                                         | 72.7 (88)                                                       | 84.4 (27)                                                       | 0.249                |
| <b>Aminoglicósidos</b>       |                                                    |                                                                 |                                                                 |                      |
| Amikacina                    | 83.7 (128)                                         | 81.8 (99)                                                       | 90.6 (29)                                                       | 0.291                |
| Gentamicina                  | 44.4 (68)                                          | 44.6 (54)                                                       | 43.8 (14)                                                       | 1.000                |
| Estreptomina                 | 88.2 (135)                                         | 91.7 (111)                                                      | 75.0 (24)                                                       | <b>0.025</b>         |
| <b>Quinolonas</b>            |                                                    |                                                                 |                                                                 |                      |
| Acido nalidíxico             | 62.7 (96)                                          | 60.3 (73)                                                       | 71.9 (23)                                                       | 0.304                |
| Ciprofloxacina               | 23.5 (36)                                          | 24.0 (29)                                                       | 21.9 (7)                                                        | 1.000                |
| <b>Inhibidores de folato</b> |                                                    |                                                                 |                                                                 |                      |
| Trimetoprim-sulfametoxazol   | 64.7 (99)                                          | 72.7 (88)                                                       | 34.4 (11)                                                       | <b>0.000</b>         |

<sup>a</sup>Total de aislamientos con: 121. <sup>b</sup>Total de aislamientos sin: 32. <sup>c</sup>Valores significativos en negritas.

**Cuadro 2**  
Aislamientos de enterobacterias con los genes *intI1*, *qacEΔ1* y *sul1*

| Especies            | <i>intI1</i> +                           | <i>qacEΔ1</i> + | <i>sul1</i> + |
|---------------------|------------------------------------------|-----------------|---------------|
| <i>E. aerogenes</i> | 50 <sup>a</sup> (1/2) <sup>b</sup>       | 0 (0/1)         | 0(0/1)        |
| <i>E. cloacae</i>   | 100 (10/10)                              | 60 (6/10)       | 50 (5/10)     |
| <i>E. coli</i>      | 87 (20/23)                               | 100 (20/20)     | 95 (19/20)    |
| <i>K. oxytoca</i>   | 63 (10/16)                               | 90 (9/10)       | 80 (8/10)     |
| <i>K.pneumoniae</i> | 78 (80/102)                              | 94 (75/80)      | 85 (68/80)    |
| Total               | 79.1 <sup>a</sup> (121/153) <sup>b</sup> | 91 (110/121)    | 83 (100/121)  |

<sup>a</sup> Porcentaje de aislamientos. <sup>b</sup> Cantidad de aislamientos/total.

**Cuadro 3**  
**Perfiles de integrones y genes en cassette presentes en enterobacterias multirresistentes**

| Tipo de integron/<br>tamaño<br>(pb) | Número de<br>especies por<br>perfil                                                    | Genes<br>en<br>cassette <sup>a</sup>                   | Total<br>de<br>aislamientos | Número de aislamientos resistentes<br>al antibiótico <sup>b</sup> |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                     |                                                                                        |                                                        |                             | CRO                                                               | CAZ          | FEP          | FOX          | AZT          | PIP          | GEN          | AMK          | S            | CIP          | NAL          | TSX          |
| I / 700 pb                          | 4 <i>K. pneumoniae</i>                                                                 | No identificado                                        | 4                           | 4                                                                 | 3            | 4            | 0            | 4            | 3            | 1            | 3            | 2            | 0            | 1            | 3            |
| II / 900 pb                         | 1 <i>E. cloacae</i> -<br>1 <i>E. coli</i>                                              | <i>aac(6')lae</i>                                      | 2                           | 2                                                                 | 1            | 0            | 1            | 2            | 1            | 0            | 1            | 2            | 0            | 2            | 2            |
| III / 1000 pb                       | 2 <i>E. coli</i> - 1 <i>K. oxytoca</i> - 17 <i>K. pneumoniae</i>                       | <i>aadA1</i>                                           | 20                          | 20                                                                | 19           | 12           | 5            | 20           | 18           | 7            | 17           | 20           | 9            | 11           | 12           |
| IV / 1600 pb                        | 1 <i>E. cloacae</i> - 3 <i>E. coli</i> - 2 <i>K. oxytoca</i> - 4 <i>K. pneumoniae</i>  | <i>drfA1-aadA1</i>                                     | 10                          | 10                                                                | 9            | 5            | 3            | 7            | 8            | 8            | 9            | 10           | 4            | 5            | 10           |
| V / 1600 pb                         | 1 <i>E. cloacae</i> - 5 <i>K. pneumoniae</i>                                           | <i>aac(6')Iq-aadA1</i>                                 | 6                           | 6                                                                 | 4            | 2            | 1            | 5            | 3            | 4            | 4            | 6            | 0            | 4            | 4            |
| VI / 1600 pb                        | 1 <i>E. coli</i> - 2 <i>K. pneumoniae</i>                                              | <i>dfrA17-aadA5</i>                                    | 3                           | 3                                                                 | 3            | 3            | 0            | 3            | 3            | 1            | 0            | 3            | 2            | 2            | 3            |
| VII / 2000 pb                       | 3 <i>E. coli</i> - 1 <i>K. oxytoca</i>                                                 | <i>estX-aadA16</i>                                     | 4                           | 4                                                                 | 4            | 2            | 1            | 4            | 1            | 3            | 1            | 4            | 3            | 4            | 4            |
| VIII / 2000 pb                      | 2 <i>E. coli</i> - 2 <i>K. oxytoca</i> - 13 <i>K. pneumoniae</i>                       | <i>dfrA12-orfF-aadA2</i>                               | 17                          | 17                                                                | 13           | 11           | 2            | 16           | 13           | 6            | 13           | 16           | 5            | 9            | 17           |
| IX / 2200 pb                        | 1 <i>E. cloacae</i> - 1 <i>K. pneumoniae</i>                                           | <i>pseu blaIMP13-dfrA7-bla<sub>OXA2</sub></i>          | 2                           | 2                                                                 | 2            | 1            | 1            | 2            | 2            | 2            | 2            | 2            | 0            | 0            | 2            |
| X / 2200 pb                         | 2 <i>E. coli</i>                                                                       | <i>bla<sub>OXA30</sub>-aadA1</i>                       | 2                           | 2                                                                 | 1            | 1            | 0            | 1            | 1            | 2            | 2            | 2            | 0            | 2            | 0            |
| XI / 3700 pb                        | 1 <i>E. cloacae</i> - 1 <i>E. coli</i> - 1 <i>K. oxytoca</i> - 12 <i>K. pneumoniae</i> | <i>aacA7-aadB-aadA4-orf105-bla<sub>OXA2</sub>-orfD</i> | 15                          | 15                                                                | 12           | 3            | 1            | 15           | 11           | 5            | 14           | 11           | 2            | 10           | 10           |
| XII / 1500-700 pb                   | 8 <i>K. pneumoniae</i>                                                                 | No identificado                                        | 8                           | 8                                                                 | 7            | 4            | 1            | 8            | 8            | 0            | 8            | 8            | 1            | 4            | 3            |
| XIII / 1500-1000 pb                 | 4 <i>K. pneumoniae</i>                                                                 | <i>aadA1</i>                                           | 4                           | 4                                                                 | 4            | 2            | 0            | 4            | 4            | 4            | 4            | 4            | 0            | 4            | 3            |
| XIV / 1500-1100 pb                  | 2 <i>E. coli</i>                                                                       | <i>dfrA12-orfF</i>                                     | 2                           | 1                                                                 | 2            | 0            | 0            | 2            | 1            | 0            | 2            | 2            | 0            | 1            | 2            |
| XV / 1500-600pb                     | 1 <i>K. oxytoca</i>                                                                    | <i>dfrB3</i>                                           | 1                           | 1                                                                 | 1            | 0            | 0            | 1            | 1            | 1            | 1            | 1            | 0            | 0            | 1            |
| XVI / 1500-800 pb                   | 1 <i>E. coli</i> - 1 <i>K. pneumoniae</i>                                              | No identificado                                        | 2                           | 2                                                                 | 2            | 0            | 1            | 2            | 1            | 0            | 2            | 2            | 0            | 1            | 2            |
|                                     |                                                                                        |                                                        | 102                         | 101<br>(99.0)                                                     | 87<br>(85.3) | 50<br>(49.0) | 17<br>(16.7) | 96<br>(94.1) | 79<br>(77.5) | 44<br>(43.1) | 83<br>(81.4) | 95<br>(93.1) | 26<br>(25.5) | 60<br>(58.8) | 74<br>(72.5) |

<sup>a</sup>El orden de los genes en cassette se lee de 5' a 3' de la región variable del integrón. <sup>b</sup>Entre paréntesis, porcentaje de aislamientos resistentes a cada antibiótico. Abreviaturas: CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FOX, cefoxitina; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; PIP, piperacilina; IMP, imipenem; AMK, amikacina; GEN, gentamicina; S, estreptomycin; TSX, trimetoprim/sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidíxico.

De los 153 aislamientos seleccionados, 121 (79.1%) fueron positivos para el gen *int1*. Entre los 121 aislamientos con el gen *int1*, 110 (91%) fueron positivos para el gen *qacEΔ1*, y 100 (83%), para el gen *su1* (cuadro 2). De los 121 aislamientos con integrones de clase 1, en 102 (84.3%) se obtuvieron amplificadas para la región variable. Los resultados de RFLP para estos amplímeros mostraron 16 perfiles de restricción. El análisis de secuencias de cada perfil reveló la presencia de genes de resistencia a β-lactámicos, aminoglicósidos y trimetoprim (cuadro 3). Respecto de los genes de resistencia a aminoglicósidos, se encontró que en 79.4% (n = 81/102) de las regiones variables estudiadas se hallaron los genes *aad* (-A1, -A2, -A4 -A5, -A16); en 22.5% (n = 23/102), los genes *aac* (*aac(6')/ae*, *aac(6')/q*, *aacA7*), y también se encontró el gen *aadB* en una región variable presente en 15 aislamientos (14.7%). Otros genes encontrados fueron los codificantes de dihidrofolato reductasas que imposibilitan la actividad del trimetoprim, en 34.3% (n = 35/102) de las regiones variables estudiadas. En 18.6% (n = 19/102) de estas regiones se identificaron los genes *bla*<sub>OXA2</sub> y *bla*<sub>OXA30</sub>. Del mismo modo, se halló el gen *estX* en cuatro regiones variables. En particular, el gen *dfrB3* se encontró en un aislamiento de *K. oxytoca*, el cual no se había detectado antes en esta especie (GenBank, número de acceso GQ150744). Además, se encontró un arreglo novedoso de seis genes en la región variable de un aislamiento de *K. pneumoniae* (*aacA7-aadB-aadA4-orf105-bla*<sub>OXA2</sub>-*orfD*) (GenBank, número de acceso GQ466184) (cuadro 3), dentro de los cuales se encontró un marco abierto de lectura que codifica para 105 aminoácidos y cuya función se desconoce.

La asociación de integrones de la clase 1 a la resistencia a los antibióticos evaluados en este estudio mostró que la resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol ( $p < 0.0001$ ) y a estreptomycin ( $p < 0.025$ ) se relaciona con integrones clase 1, mientras que para los antibióticos β-lactámicos, quinolonas y aminoglicósidos evaluados (amikacina y gentamicina) no se encontró esta relación (cuadro 1).

## Discusión

En el presente estudio, 79% de las enterobacterias seleccionadas presentó integrones de clase 1, cifra alta comparada con las reportadas en Europa en bacterias gram-negativas (43%),<sup>10</sup> en el oriente de Asia (59.9%)<sup>20</sup> y en Australia (49%),<sup>21</sup> pero menor que en Sudáfrica.<sup>22</sup> Este resultado puede reflejar las diferentes presiones selectivas por antibióticos en nuestra región y las altas tasas de diseminación de estas estructuras entre géneros y especies bacterianas, facilitada por su localización en plásmidos y/o transposones. La presencia de genes codificantes de resistencia a diferentes antibióticos en la región variable del integrón o en otra localización dentro del plásmido mismo facilitaría, por fenómenos de coselección, que estos integrones se diseminen y permanezcan en las enterobacterias de origen hospitalario.<sup>23</sup>

Se identificaron 11 tipos de integrones (del I al XI) con un solo producto de reamplificación de la región variable, y cinco (del XII al XVI) con dos amplificadas de diferente tamaño (cuadro 3). En los aislamientos que presentan integrones del I al XI puede asumirse que estos aislamientos sólo po-

seen un tipo de integrón o que no hubo amplificación de regiones variables de otros integrones, quizá debido a la falta o variación de la secuencia conservada 3'<sup>10,21</sup> o a regiones variables de gran tamaño<sup>6,8</sup> que no pudieron amplificarse en las condiciones experimentales empleadas.

La amplificación de más de un fragmento de la región variable sugiere la presencia de regiones variables estructuralmente complejas o la presencia en estos aislamientos de dos integrones con regiones variables de diferente tamaño. Las secuencias de las bandas de menor peso molecular mostraron genes característicos de integrones clase 1. No pudo establecerse la identidad de la banda de mayor peso molecular porque la reamplificación de este fragmento generó varios productos de menor tamaño molecular y, en todos los casos, a uno de los productos reamplificados con un tamaño similar al de la banda de menor peso molecular inicial (resultados no mostrados). Esta inespecificidad de la reamplificación de la banda mayor puede deberse a la existencia de secuencias internas en este fragmento de ADN que hibridizan con los iniciadores usados para amplificar la región variable o por la existencia de dos regiones conservadas 3' consecutivas en un mismo integrón.<sup>10</sup>

Entre los integrones detectados se observó que los más frecuentes fueron los tipos III, IV, VIII y XI, correspondientes a los tamaños de 1000, 1600, 2000 y 3700 pb, respectivamente. Estos integrones se observaron en las especies estudiadas (cuadro 3), y algunos se detectaron en aislamientos recolectados en diferentes periodos y hospitales. Estos hallazgos pueden ser resultado de la diseminación entre especies de un limitado número de plásmidos o transposones que contienen un mismo integrón,<sup>10,23</sup> más que por evolución independiente de dichos elementos.<sup>10,21,23</sup> En la actualidad se adelantan otros estudios por cuenta de nuestro grupo para evaluar la localización de integrones en plásmidos conjugativos. En contraste, los integrones de los tipos I, XII y XIII aparecieron sólo en aislamientos de *K. pneumoniae*; los tipos X y XIV, en *E. coli*, y el tipo XV, en *K. oxytoca*, lo que sugiere que se trata de integrones específicos de especie.<sup>5,6</sup>

De manera particular, se identificó en el integrón tipo XI el arreglo de genes *aacA7-aadB-aadA4-orf105-bla*<sub>OXA2</sub>-*orfD*, lo cual muestra la habilidad de los integrones para capturar y reorganizar genes de resistencia y formar así nuevos arreglos.<sup>10</sup> Asimismo, el gen *dfrB3* se identificó en *K. oxytoca*, el cual sólo se había sido reportado en *E. coli* (GenBank, número de acceso AY123252), lo que corrobora la transmisión de estos genes entre especies diferentes.

Los resultados de asociación de la resistencia con la detección de integrones clase 1 sólo mostraron relación entre la resistencia a estreptomycin y a trimetoprim/sulfametoxazol con la presencia de estas estructuras. Este resultado es coherente con la identificación de los genes en cassette *aad* (79.4%) y *dfr* (34.3%) en los integrones estudiados además de la presencia del gen *su1* (83%), el cual se ha asociado a estos integrones.<sup>1,6,8,21</sup> El hallazgo de estos genes en cassette puede deberse a que son coseleccionados por la asociación que tienen con otros genes de resistencia,<sup>7,12</sup> o porque se seleccionan con la continua presión selectiva antibiótica, como sucede con trimetoprim/sulfametoxazol.<sup>22,24</sup>

Aunque en algunos aislamientos se detectaron los genes *aac* y *aadB* en el integrón, no se encontró asociación

con la resistencia a amikacina y a gentamicina, respectivamente. Algunos factores que influyen en la regulación de la expresión de los genes en cassette, como fuerza del promotor, número de copias del gen, presencia de promotores internos adicionales y/o estructura del sitio *attC* que precede al gen en cassette,<sup>2,10,25</sup> provocan que no haya relación entre la información genotípica y las características fenotípicas de los aislamientos.

De forma similar se identificaron los genes *bla*<sub>OXA</sub> en los integrones estudiados, pero no se encontró asociación estadística entre la presencia de integrones y la resistencia a antibióticos β-lactámicos. Este evento puede darse porque los genes que producen enzimas BLEE en los aislamientos estudiados (como SHV, TEM y CTX-M)<sup>13</sup> pueden no estar en la misma plataforma genética que soporta al integrón.<sup>1,26</sup> Aunque en otros estudios se ha encontrado asociación entre integrones clase 1 y resistencia a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación, monobactámicos, y también a aminoglicósidos y quinolonas,<sup>10,12,20,21</sup> en nuestro estudio estas relaciones no fueron estadísticamente significativas. Nuestros resultados contradicen la evidencia encontrada en otros estudios donde la resistencia a múltiples antibióticos, mostrada por microorganismos como *Salmonella sp.*, está mediada en gran parte por los integrones.<sup>6,19</sup> Así mismo, las investigaciones de multiresistencia en otros patógenos nosocomiales, como *Pseudomonas sp.*, indican que este fenómeno es consecuencia de otros mecanismos de resistencia (como sobreexpresión de

bombas de eflujo, cambios en la permeabilidad de la membrana, mutación de topoisomerasas) que no se relacionan con integrones clase 1.<sup>16,27</sup> Por lo tanto, la aparición de integrones clase 1 en nuestros aislamientos puede deberse a un proceso de selección de la plataforma donde se ubican, en virtud de la alta presión selectiva por antibióticos que reciben<sup>12,22,24</sup> mas no porque los genes en cassette del integrón participen en la resistencia a antibióticos de amplio uso en el entorno clínico.

Este es el primer estudio en nuestro país que determina la frecuencia de integrones clase 1 en enterobacterias de origen hospitalario y su asociación con la resistencia a antibióticos. Nuestros resultados indican que la alta prevalencia de estas plataformas genéticas y su permanencia en los aislamientos de enterobacterias estudiados no se relaciona con la resistencia a los antibióticos evaluados, excepto a trimetoprim/sulfametoxazol y estreptomina. Este tipo de estudios contribuye a la comprensión de los mecanismos moleculares por los cuales aparece y se determina la resistencia a antibióticos en aislamientos de origen hospitalario en nuestro entorno.

### Agradecimientos

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias, a la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

## Bibliografía

- Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. "Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin". *J Infect Dis* 2003; 187: 251-259.
- Hall RM, Collis CM. "Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination". *Mol Microbiol* 1995; 15(4): 593-600.
- Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. "Novel class 1 integron (InS21) carrying blaCTX-M-2 in *Salmonella enterica* serovar infantis". *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(7): 2257-2261.
- Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M *et al.* "The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance". *J Bacteriol* 2008; 190(14): 5095-5100.
- Dubois V, Parizano MP, Arpin C, Coulange L, Beziau MC, Quentin C. "High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella spp.* of worldwide origin". *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(4): 1333-1340.
- Fluit AC, Schmitz FJ. "Resistance integrons and super-integrons". *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(4): 272-288.
- Álvarez-Fernández M, Rodríguez-Souza T, Brey-Fernández E, López-Meléndez C. "Asociación de integrones de clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en Enterobacteriaceae". *Rev Esp Quimioterap* 2003; 16(4): 394-397.
- Rowe-Magnus DA, Mazel D. "The role of integrons in antibiotic resistance gene capture". *Int J Med Microbiol* 2002; 292(2): 115-125.
- Sabate M, Prats G. "Estructura y función de los integrones". *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(7): 341-345.
- Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME. "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(6): 689-696.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. "PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes". *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1): 185-191.
- Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. "Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals". *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(2): 317-321.
- Valenzuela de Silva EM, Mantilla-Anaya JR, Reguero-Reza MT, González-Mejía EB, Pulido-Manrique IY, Darío-Llerena I *et al.* "Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bogotá, Colombia". *J Clin Microbiol* 2006; 44(5): 1919-1920.
- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. "CDC definitions for nosocomial infections". *Am J Infect Control* 1988; 16: 128-140.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. 8a ed., estándar aprobado, M2-A8, Wayne, Pensilvania, CLSI, 2003.
- Tenover FC. "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria". *Am J Med* 2006; 119(6 supl. 1): S3-10, S62-70.
- Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. "Characteri-

- zation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104". *FEMS Microbiol Lett* 1997; 160: 37-41.
18. Pulido Manrique IY. "Caracterización de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> resistentes a ceftazidima". Tesis de magister scientiae en microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, posgrado Interfacultades en Microbiología, Bogotá, 2006.
  19. Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza MC. "Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(8): 2166-2169.
  20. Gu B, Pan S, Wang T, Zhao W, Mei Y, Huang P et al. "Novel cassette arrays of integrons in clinical strains of *Enterobacteriaceae* in China". *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(6): 529-533.
  21. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. "Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*". *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(9): 2658-2661.
  22. Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. "Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in *Enterobacteriaceae*, Central African Republic (CAR)". *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 742-745.
  23. Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Cantón R, Baquero F et al. "Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum B-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003)". *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 2201-2204.
  24. Huovinen P. "Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole". *Clin Infect Dis* 2001; 32(11): 1608-1614.
  25. Jacquier H, Zaoui C, Sanson-le Pors MJ, Mazel D, Berçot B. "Translation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites". *Mol Microbiol* 2009; 72(6): 1475-1486.
  26. Paterson DL. "B-lactamase inhibitors and new B-lactamases". *Curr Treat Opt Infect Dis* 1999; 1: 85-87.
  27. Strateva T, Yordanov D. "*Pseudomonas aeruginosa*—A phenomenon of bacterial resistance". *J Med Microbiol* 2009; 58(pt. 9): 1133-1148.