

Caracterización de la región variable de integrones clase 1 presentes en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*

MILITZA GUZMÁN^{1,2}, GUILLERMINA ALONSO²

¹Laboratorio de Bacteriología Molecular. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Estado Sucre-Venezuela.

²Laboratorio de Biología de Plásmidos. Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

El trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. Núcleo Sucre (PCI: 20401021253105) y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (PI-03335417 y PG-03335416).

Recibido el 17 de marzo de 2009, aceptado el 19 de enero de 2010.

Correspondencia a:
Dra. Militza Guzmán
Calle Bolívar. Antigua Escuela de Enfermeras. Primer piso, Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.
Teléfono: 0058-04166930701.
Fax: 0058-0293-4311175.
E-mail: miltzaguz@cantv.net

Characterization of the variable region within class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* nosocomial strains

Background: Integrons are responsible for the capture and dissemination of resistance genes in Gram negative bacteria. **Aim:** To characterize the variable region within class 1 integrons in nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Material and Methods:** Twenty nine *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients were analyzed. The variable region of class 1 integrons was characterized by polymerase chain reaction and direct sequencing. Genetic localization of class 1 integrons was determined by bacterial conjugation. **Results:** Ten strains contained class 1 integrons, with sizes ranging from 750 to 2000 base pairs. One integron element was present in nine strains and two elements in one single strain. Integrons were associated to plasmids. Cassettes *aadA*, *aac(6)-Iq*, *orfD*, *dfra]7*, *aadA5* and *aadB* were found. **Conclusions:** The presence of class 1 integrons may play an important role in the dissemination of hospital resistance against aminoglycosides.

(Rev Med Chile 2010; 138: 322-329).

Key words: Bacterial infections; Integrons; *Klebsiella pneumoniae*.

Las infecciones nosocomiales causadas por microorganismos multiresistentes han sido reconocidas como una importante causa de morbimortalidad en los pacientes hospitalizados¹. La multiresistencia es atribuida en primer lugar a la adquisición de moléculas plasmídicas, sin embargo, diversos estudios han demostrado la presencia de genes de resistencia en otros elementos genéticos conocidos como integrones²⁻⁴.

Un integrón es un elemento genético dinámico, que funciona como un sistema de captura de genes y provee un mecanismo para la adquisición y diseminación de genes de resistencia, el cual puede localizarse en plásmidos, transposones e incluso en el cromosoma bacteriano. En base a la secuencia del gen de la integrasa presente en los integrones, se han reportado más de nueve clases, siendo los integrones clase 1 los que con mayor frecuencia se han asociado a bacterias Gram negativas^{5,6}.

Un integrón clase 1 está conformado por dos regiones conservadas de ADN situadas en los extremos, denominadas 5' CS y 3' CS y una región variable ubicada entre las dos anteriores. En el extremo 5' CS se encuentra el gen *intI* que codifica para una integrasa encargada de catalizar una recombinación genética sitio específico; continuo a éste se encuentra la secuencia *attI*, que es el sitio de recombinación específico donde se insertan los casetes génicos separados por regiones intergénicas de aproximadamente 10 pb; entre *intI* y *attI* están los promotores P_c y P_i los cuales dirigen la expresión de los genes presentes en el casete y el gen *intI*. La región variable es donde se insertan los diferentes casetes génicos, que de acuerdo a estudios de secuenciación, son en su mayoría, pero no exclusivamente, genes que codifican resistencia a los antimicrobianos^{8,9}. En el extremo 3' CS se localizan tres tipos de genes *qacE 1*, *sul1* y *orf5*,

el primero confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternario que forman parte de algunos antisépticos y desinfectantes, el segundo confiere resistencia a sulfonamidas y el *orf5* es de función desconocida¹⁰.

Klebsiella pneumoniae es considerada una especie patógena-oportunista para el hombre¹¹. A partir de 1998 en Venezuela y América Latina se ubica entre los principales patógenos causantes de cuadros clínicos a nivel nosocomial¹². La presencia de ciertos mecanismos de resistencia, como producción de enzimas β -lactamasas (tipo SHV, TEM, CTX, GES, AmpC entre otras), enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloranfenicol-acetiltransferasas y Qnr, han originado fallas terapéuticas en el tratamiento de las infecciones causada por *K. pneumoniae*^{13,14}.

En los últimos años los integrones clase 1 han sido considerados como elementos importantes en la diseminación de genes que confieren resistencia a los β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas en *K. pneumoniae* y más de 60 genes que confieren resistencia a los antimicrobianos de interés clínico han sido reportados en la región variable de integrones clase 1^{15,16}.

Debido a que los integrones juegan un papel importante en la captura y diseminación de genes de resistencia, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los casetes génicos presentes en la región variable de dichos elementos genéticos en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*.

Material y Métodos

Cepas Bacterianas

Se estudiaron 29 cepas de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes con infección nosocomial, atendidos en diferentes áreas de hospitalización del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", durante el período comprendido entre junio del 2003 y mayo 2004. A la hora de seleccionar las cepas se mantuvo el criterio de seleccionar una cepa por paciente.

Pruebas de Sensibilidad a los antimicrobianos

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se realizó mediante el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos propuestos para enterobacterias por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)¹⁷. Se ensayaron los siguientes agentes antimicrobianos: cefotaxima,

ceftazidima, ceftriaxona, aztreonam, imipenem, amikacina, kanamicina, tobramicina, cefepima, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina y amoxicilina/ácido clavulánico.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN total se realizó mediante el método de ebullición¹⁸. En un tubo Eppendorf se mezclaron 200 μ l de un cultivo de la cepa crecido durante 18 horas con 800 μ l de agua estéril, la mezcla fue sometida a ebullición durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 3 minutos. El sobrenadante con el contenido de ADN total se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amplificación de la región variable de los integrones clase 1

La presencia de los genes insertados en la región variable de los integrones clase 1 se determinó utilizando los oligonucleótidos: 5' CS:5'-GGC ATC CAA GCA GCA A-3' y 3' CS:5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA 3'- los cuales son complementarios a los segmentos 5'CS y 3'CS¹⁸. Las condiciones de reacción fueron 94 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 1 min durante 30 ciclos, con una extensión final de 72 °C por 10 min. Se empleó como control negativo un lisado celular de la cepa de *Escherichia coli* J62-2, la cual no presenta integrones y un segundo control negativo que consistió en mezclar todos los componentes sin ADN molde, utilizando agua para completar el volumen (control de reactivos). Como control positivo se empleó un lisado de la cepa *K. pneumoniae* T9701, la cual presenta un integrón de 750 pb. Los productos de la PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un Gel Doc (Bio-Rad).

Conjugación Bacteriana y aislamiento de plásmidos

A las cepas de *K. pneumoniae* que presentaron integrones clase 1, se les realizó conjugación bacteriana en medio sólido¹⁹. Como cepa receptora se empleó *E. coli* J62-2 (CVCM131) la cual presenta el genotipo F-, *his*, *pro*, *trp*, *lac*, *rif*. Las cepas donantes y la receptora, fueron crecidas en caldo Luria Bertani a 37 °C durante toda la noche. Las transconjugantes fueron seleccionadas en agar MacConkey, suplementado con amikacina (20 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml) según el perfil de resistencia de cada cepa donante. A cada cepa

transconjugante se le determinó la susceptibilidad antimicrobiana, según el CLSI¹⁷.

Con el propósito de determinar la localización de los integrones, se procedió a extraer el ADN plasmídico en las cepas donantes y transconjugantes empleando la técnica modificada de lisis alcalina²⁰. Los productos de la extracción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (0,7%), fueron coloreados con bromuro de etidio y visualizados en un equipo Gel Doc (Bio-Rad).

Secuenciación de la región variable

La secuenciación de las regiones variables detectadas en las cepas donantes y transconjugantes se realizó en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN), ubicado en el Centro de Microbiología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), empleando un secuenciador Perkin-Elmer modelo ABI PRISM™ 377, previa purificación de los productos de PCR. La búsqueda de similitudes en la base de datos GenBank, se hizo vía internet (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov>) empleando los servicios BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)²¹.

Resultados

Se encontraron 7 cepas con resistencia a 10 antimicrobianos, 5 resistentes a la combinación de 12, 4 para 11 y 3 para la combinación de 14. Para combinaciones menores de 10 antimicrobianos se encontraron: 5 cepas para 6 combinaciones; 2 para 7 y 8 combinaciones respectivamente, y 1 para 5 combinaciones. Los mayores porcentajes de resistencia se presentaron para los -lactámicos y aminoglucósidos (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de resistencia presentado por las cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*

Cepa	Perfil de resistencia
Kp01	ATM CAZ AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp02	ATM CAZ AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp03	ATM CAZ AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP
Kp04	AMK K TOB GEN Nt TCY
Kp05	ATM CAZ CRO CTX CHL TCY
Kp06	ATM CAZ AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP OFLO
Kp07	ATM CAZ CRO CTX CHL TCY
Kp08	ATM CAZ AMK K TOB GEN Nt C TCY CIP
Kp09	TZP ATM CAZ CRO CTX FEP AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp10	TZP ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP OFX
Kp11	TZP ATM CAZ CRO CTX FEP AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp12	AMK K TOB GEN Nt
Kp13	TZP ATM CAZ CRO CTX FEP AMK K TOB GEN Nt CHL TCY OFX
Kp14	ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp15	TZP ATM CAZ CRO CTX FEP AMK K TOB GEN Nt CHL TCY OFX
Kp16	ATM CAZ CRO CTX TOB GEN TCY
Kp17	ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp18	ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp19	ATM CAZ CRO CTX TOB GEN
Kp20	ATM CAZ CRO CTX TOB GEN
Kp21	ATM CAZ CRO CTX AMK K CHL
Kp22	ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp23	ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp24	ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL TCY
Kp25	ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL OFX
Kp26	ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL OFX
Kp27	ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL TCY
Kp28	ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt TCY
Kp29	ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt TCY

Kp: *Klebsiella pneumoniae*, AMK: Amikacina, ATM: Aztreonam, CAZ: Cefotazidima, CHL: Cloramfenicol, CIP: Ciprofloxacina, CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima, FEP: Cefepima, GEN: Gentamicina, K: Kanamicina, Nt: Netilmicina, OFX: Ofloxacina, TCY: Tetraciclina, TOB: Tobramicina, TZP: piperacilina-tazobactam.

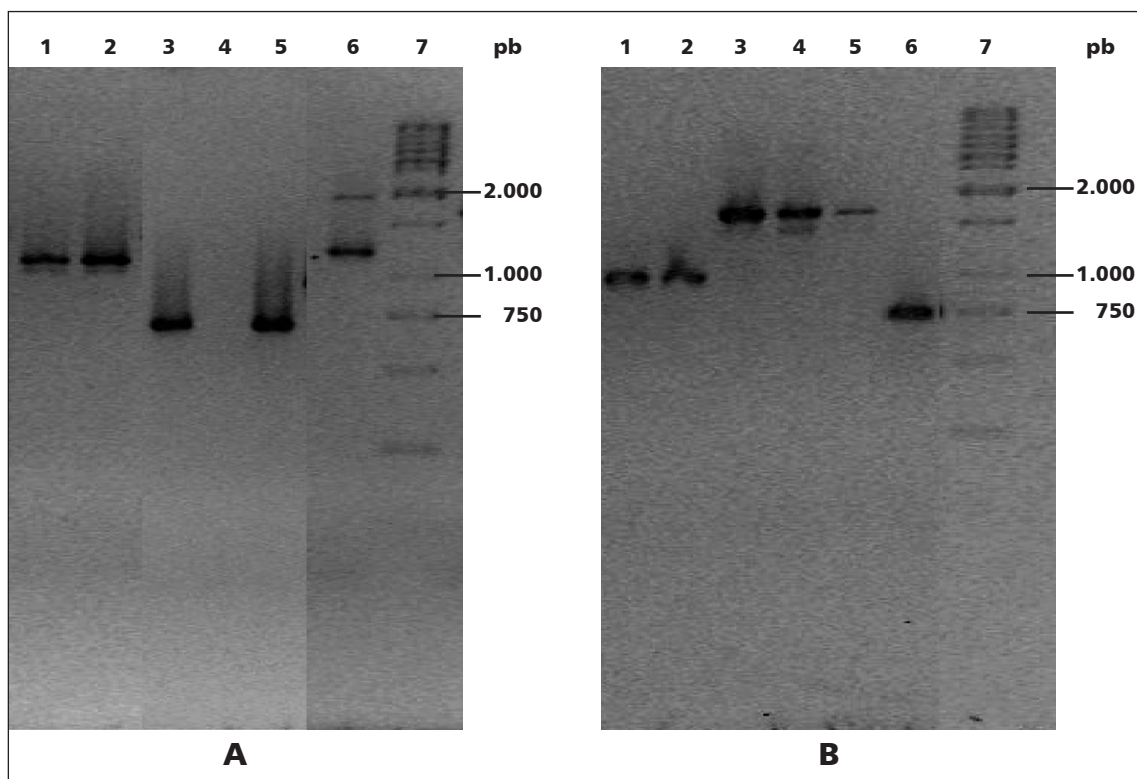


Figura 1. Amplificación de la región variable de integrones clase 1 mediante PCR. A. Integrones clase 1 en plásmidos conjugativos, aislados de las cepas transconjugantes. Líneas 1 a 7. T13, T15, T28, Control negativo, Control positivo, T14, Marcador de peso molecular. B. Integrones clase 1 en plásmidos no conjugativos, aislados de las cepas donantes. Línea 1 a 7. Kp09, Kp11, Kp25, Kp26, Kp27, Control positivo, Marcador de peso molecular. T: transconjugantes, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, kb: kilobases.

En las cepas transconjugantes se observó un fenotipo de resistencia semejante al de la célula donante. En todas las cepas donantes se observó la presencia de un plásmido de alto peso molecular (> 40 kb) el cual fue transferido a las células de *E. coli* con una frecuencia de conjugación de 10^{-2} y 10^{-3} transconjugantes/células donante (Datos no mostrados).

La amplificación para la región variable demostró que 34,5% (10/29) de las cepas presentaron integrones clase 1. Con respecto al número de elementos genéticos identificados nueve cepas (09, 11, 13, 15, 25, 26, 27, 28, 29) presentaron un integrón y una cepa (14) presentó dos elementos. El tamaño de los fragmentos amplificados osciló de 750 a 2000 pb. En 4 cepas el amplicón fue de 1000 pb, en 3 de 1700 pb, en dos de 750 pb y en una de 1200 y 2000 pb (Figura 1).

La presencia de integrones clase 1 fue detectada

en todos los aislamientos plasmídicos. Los amplificados de 750, 1.200, 2.000 y 1.000 pb se encontraron en plásmidos conjugativos, mientras que los de 1.700 pb estaban localizados en plásmidos no conjugativos. Sólo el amplificado de 1.000 pb se detectó en ambos tipos de plásmidos (Figura 1).

De acuerdo con el alineamiento en nucleótidos, se lograron identificar los casetes genéticos (*aadA*, *aadB*, *aac(6)-Iq*, *orfD*, *dfrA17* y *aadA5*) (Tabla 2). El producto de 1000 pb presente en las cepas 09, 11, 13 y 15 mostró 100% de similitud con el gen *aadA1* (número de acceso DQ141317), el cual codifica la enzima aminoglicósido 2'-O-adeniltransferasa, que confiere resistencia a los aminoglucósidos estreptomycin y espectomicina, mientras que el producto de 750 pb codifica para el gen *aadB* (número de acceso DQ141319) el cual confiere resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina.

El producto amplificado de 1.200 pb presentó

Tabla 2. Características de los casetes génicos encontrados en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y perfil de resistencia de las transconjugantes obtenidas

Cepa	Fenótipo de resistencia de las cepas transconjugantes	Tamaño (pb)	Número de integrones	Localización	Casete
Kp09	AMP AMK K TOB GEN Nt	1000	1	PNC	aadA1
Kp11	AMP ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL	1000	1	PNC	aadA1
Kp13	AMP ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL FEP	1000	1	PC	aadA1
Kp14	AMP ATM CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL	1200; 2000	2	PC	aaC(6)-Iq, orfD; ND
Kp15	AMP ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL FEP	1000	1	PC	aadA1
Kp25	AMP ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL	1700	1	PNC	dfrA17, aadA5
Kp26	AMP ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL	1700	1	PNC	dfrA17, aadA5
Kp27	AMP ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL	1700	1	PNC	dfrA17, aadA5
Kp28	AMP ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt	750	1	PC	aadB
Kp29	AMP ATM TZP CAZ CRO CTX AMK K TOB GEN Nt	750	1	PC	aadB

AMK: Amikacina, ATM: Aztreonam, CAZ: Ceftazidima, CHL: Cloramfenicol, CIP: Ciprofloxacina, CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima, FEP: Cefepima, GEN: Gentamicina, K: Kanamicina, Nt: Netilmicina, OFX: Ofloxacina, TCY: Tetraciclina, TOB: Tobramicina, TZP: piperacilina-tazobactam, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Pb: pares de bases, PNC: Plásmido no conjugativo, PC: Plásmido conjugativo.

dos casetes génicos, *aac(6)-Iq* (número de acceso AF047556), el cual confiere resistencia a amikacina, tobramicina y gentamicina, y otro reportado como *orfD* en *Klebsiella pneumoniae* (número de acceso AM040449) que permanece como un marco abierto de lectura, de función desconocida.

La región de 1700 pb también presentó dos casetes génicos. Uno que corresponde al gen *dfrA17* (número de acceso AF220757) que codifica una dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a trimetoprim, y otro que tiene similitud con el gen *aadA5* (número de acceso AF220757) que confiere resistencia a amikacina y a tobramicina. El producto de 2.000 pb no pudo ser secuenciado.

Discusión

En los últimos años *K. pneumoniae* ha adquirido diversos mecanismos de resistencia a

los antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, lo que trae como consecuencia serias dificultades en el tratamiento de los pacientes^{11,12}. En *K. pneumoniae*, la resistencia suele asociarse con mayor frecuencia a la expresión de genes presentes en plásmidos, transposones e integrones, los cuales son elementos claves en la transmisión horizontal de la información genética, debido a que son capaces de propagar la resistencia entre los miembros de una misma o diferentes especies^{22,23}. En este estudio se encontró que todas las cepas presentaron elevados porcentajes de resistencia a los antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento de las infecciones causadas por enterobacterias, hecho que genera una disminución en las posibilidades terapéuticas, para tratar las infecciones ocasionadas por esta bacteria en el centro hospitalario.

El integrón clase 1 es el más estudiado en

bacterias Gram negativas, y su presencia se ha reportado en la gran mayoría de las especies que conforman la familia *Enterobacteriaceae*, así como en otros microorganismos pertenecientes a otras familias^{24,25}. En este trabajo, 34,48% de las cepas presentaron integrones clase 1. Al respecto, Reyes et al²⁶, en Chile, demostraron la presencia de integrones clase 1 en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*, mientras que a nivel nacional, Alonso et al²⁷ reportaron la presencia de integrones clase 1 en diferentes especies de enterobacterias aisladas de diferentes ambientes en Venezuela.

Todos los integrones detectados en este trabajo estaban localizados en plásmidos, sólo el integrón de 1000 pb se encontró tanto en plásmidos conjugativos como no conjugativos, hecho que soporta la transferencia horizontal de genes en las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas. Esta observación además permite inferir que los integrones pudieran estar asociados a secuencias de inserción o transposones, los cuales también garantizan su diseminación mediante transferencia horizontal. Zhang et al²⁸ sugieren que la amplia distribución de los casetes génicos presentes en un integrón, ha sido generada por la transferencia de plásmidos de amplio rango del hospedero. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Álvarez-Fernández et al²⁹, quienes encontraron integrones clase 1 en plásmidos conjugativos en cepas nosocomiales de enterobacterias y con los de Torres et al³⁰, quienes reportaron integrones localizados en plásmidos conjugativos y no conjugativos en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Proteus*.

En la región variable de los integrones clase 1 se han reportado aproximadamente 100 casetes génicos que confieren resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y quinolonas, siendo los genes que confieren resistencia a aminoglucósidos los que con mayor frecuencia se han reportado^{31,32}. Los estudios de secuenciación de la región variable de los integrones clase 1, revelaron que éstos codifican para dos clases de enzimas: enzimas modificantes de aminoglucósidos y dihidrofolato reductasa. De acuerdo con los genes detectados (*aadA1*, *aadB*, *acc(6)-Iq*, *aadA5* y *dfrA17*) se demuestra que todos los integrones codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos. La presencia de estos genes coincide con el fenotipo de

resistencia presentado por las cepas, sin embargo, al observar los distintos patrones de resistencia, se puede inferir la presencia de otros genes de resistencia a aminoglucósidos no detectados en estos elementos genéticos.

Los aminoglucósidos son antimicrobianos ampliamente utilizados en el tratamiento de las infecciones nosocomiales. La presión selectiva generada por ellos en el centro hospitalario pudiera explicar la presencia y permanencia de los genes en las cepas de *K. pneumoniae*. El casete *aadA1* fue el que se logró identificar con mayor frecuencia (5 cepas), seguido de *aadA5-dfrA17* (tres cepas), *aadB* (dos cepas) y *aac(6)-Iq* (1 cepa).

El casete *aadA* codifica resistencia a espectomicina y estreptomicina; estos antimicrobianos actualmente son poco usados como opción terapéutica. Sin embargo, se ha demostrado que los casetes génicos *aadA* pueden permanecer en un integrón aun cuando no exista presión selectiva o cese el uso de estos antimicrobianos^{33,34}.

El gen *dfrA17* confiere resistencia a trimetoprim, mientras que el gen *aadA5* codifica una 3Q-adeniltransferasa que confiere resistencia a espectomicina y estreptomicina. La presencia de estos genes ha sido detectada en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* a nivel mundial³⁵. Se ha reportado que la selección del casete *dfrA17* encontrado en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, se debe al uso de trimetoprim como opción terapéutica en el tratamiento de infecciones urinarias^{33,37}.

El casete génico *aadB* confiere resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina. Este casete ha sido reportado en plásmidos transferibles presentes en cepas de *Klebsiella* spp resistentes a gentamicina y asociados a la presencia del gen *bla_{SHV}* en cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido³⁸.

El casete *aac(6)-Iq* codifica para una acetiltransferasa que confiere resistencia a amikacina. Este casete ha sido reportado en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella*. La secuencia de este casete tiene similitud con otros genes como *aaC(6)-Ia*, *aaC(6)-Ip* y *aaC(6)-It*. En *aac(6)-Iq* la presencia del codón de inicio TTG en lugar de ATG, genera un bajo nivel de expresión a la amikacina^{39,40}.

Los integrones clase 1 se han reconocido como elementos genéticos importantes en la evolución del genoma bacteriano, razón por la cual juegan un papel importante en la captación y diseminación

de genes de resistencia entre cepas de diferentes ambientes. En este trabajo se pudo determinar la presencia de integrones en plásmidos y los distintos casetes génicos localizados en la región variable, responsable de la resistencia principalmente a aminoglucósidos en las cepas.

Referencias

- Gupta A, Ampolo K, Rubenstein D, Saiman L. Extended spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *J Perinatol* 2003; 23: 439-43.
- Carattoli A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol* 2003; 5: 113-22.
- Rowe-Magnus DA, Davies J, Mazel D. Impact of integrons and transposons on the evolution of resistance and virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 264: 167-88.
- Partridge SR, Brown H, Stokes W, Hall RM. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1263-70.
- Collis C, Hall R. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 155-62.
- Hall R, Stokes H. Integrons. Novel DNA elements which capture genes by site-specific recombinations. *Genetics* 1993; 90: 115-32.
- González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Domínguez Y. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Med Chile* 2004; 132: 619-26.
- Stokes H, Hall R. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989; 3: 1669-83.
- Collis C, Hall R. Site-specific deletion and rearrangement of insert genes catalyzed by the DNA integrase. *J Bacteriol* 1992; 174: 1574-85.
- Fluit A, Schmitz FJ. Resistance integrons and superintegrons. *Clin Microbiol Infec* 2004; 10: 272-88.
- Podschum R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 589-603.
- Gales C, Jones R, Gordon K, Sader H, Wilke W, Beach M. Activity and spectrum of antimicrobial agents tested again urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin América: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Antimicrob Chemother* 1998; 45: 295-303.
- Byarugaba D. View on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 105-10.
- Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Nine Teaching Hospitals in China. *Antimicrob Agents chemother* 2008; 52: 4268-73.
- Yao F, Quian Y, Chen S, Wang P, Huang Y. Incidence of Extended-spectrum b-lactamases and characterization of integrones in extended-spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Shantou, China. *Acta Bioch Bioph Sin* 2007; 39: 527-32.
- Shi W, Zhou J, Quin J. Transconjugation and genotyping of the plasmid-mediated AmpC b-lactamase and extended-spectrum b-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Chi Med J* 2009; 12: 1090-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, M100-S18. *CLSI* 2008. Wayne, PA.
- Levesqué C, Pichel L, Larose C, Roy P. PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-91.
- Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005; 25: 29-34.
- Sambrook I, Russell D. *Molecular cloning a laboratory manual*. 3ª Edition. Cold Spring Harbor: New York: 2001.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389-402.
- Essack S, Hall L, Livermore D. *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple TEM, SHV and AmpC β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 398-400.
- Schjorring S, Struve C, Krogfelt KA. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1086-93.
- Labuschagne C, Weldhagen GF, Ehlers MM, Dove MG. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J antimicrob Agents* 2008; 31: 527-30.
- Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in

- bacteria. *Trends Microbiol* 2007; 15: 301-309.
26. 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: 317-21.
 27. Alonso G, Malaver E, Guzmán M, Rodríguez V. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multirresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. *MIBE* 2005; 4: 81-84.
 28. Zhang H, Shi L, Li L, Guo S, Zhang X, Yamasaki S, et al. Identification and Characterization of Class 1 Integron Resistance Gene Cassettes among *Salmonella* Strains Isolated from Healthy Humans in China. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 639-45.
 29. Álvarez-Fernández M, Rodríguez-Sousa T, Brey-Fernández E, López-Meléndez C, Piñeiro L. Asociación entre integrones de clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*. *Rev Esp Quimioterap* 2003; 16: 394-7.
 30. Torres L, Benítez M, Domínguez M, Torres O, Gagliotta V, Calvo A, et al. Detección de integrones clase 1 en cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro expandido tipo SHV y CTX-M grupo 2. *VITAE Academia Biomédica digital*. 2005; 25: Disponible en <http://caibco.ucv.ve>. [Acceso 2 de julio de 2008].
 31. Fluit Ac, Schmitz J. Class 1 integrons, gene cassettes mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 761-70.
 32. Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1223-7.
 33. White P, Melver C, Rawlinson W. Integrons and gene cassette in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2658-61.
 34. Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, et al. Population Structure and Resistance Genes in Antibiotic-Resistant Bacteria from a Remote Community with Minimal Antibiotic Exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1179-84.
 35. Lee JC, Oh JY, Cho JW, Park JC, Kim JM, Seol SY, et al. The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 599-604.
 36. France A, Kugeler KM, Freeman A, Zalewski CA, Blahna M, Lixin Z, et al. Clonal Groups and the Spread of Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1101-7.
 37. Yu HS, Lee JC, Kang HY, Jeong YS, Lee EY, Choi CH, et al. Prevalence of *dfr* genes associated with integrons and dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 445-50.
 38. Jones L, McIver C, Kim M, Rawlinson W, White P. The *aadB* gene cassette is associated with *bla*_{SHV} genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 794-7.
 39. Centron D, Roy PH. Characterization of the 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6')-Iq* from the integron of a natural multiresistance plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1506-8.
 40. Fonseca EL, Mykytczuk OL, Asensi MD, Reis EM, Ferraz LR, Paula FL, et al. Clonality and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Infantis Isolates from Four Public Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2767-72.