

Artículo original

Integrones clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Militza Guzmán^{a,*}, Guillermina Alonso^b

^aDepartamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre

^bInstituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela

Recibido 08 de abril de 2008; aceptado 29 de octubre de 2008

Resumen: Los integrones son elementos genéticos captadores de genes de resistencia, usualmente localizados en plásmidos y responsables de la diseminación de la resistencia en bacilos gramnegativos. En el presente trabajo se estudió la presencia de integrones clase 1 y su asociación con plásmidos en 23 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de diferentes servicios del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” estado Sucre-Venezuela. La transferencia de los determinantes de resistencia fue evaluada mediante conjugación bacteriana y la presencia de integrones clase 1 por la reacción en cadena de la polimerasa. Todos los aislamientos presentaron resistencia para ceftazidima y aztreonam. Los ensayos de conjugación demostraron la presencia de plásmidos conjugativos en todas las cepas de *K. pneumoniae* analizadas. Los integrones clase 1 fueron detectados en 10 (43,47%) aislamientos. Nueve cepas contenían un integrón y una cepa dos elementos. Todos los integrones identificados están asociados a plásmidos. La presencia de integrones clase 1 en las moléculas plasmídicas juega un papel importante en la epidemiología de la resistencia a los agentes antimicrobianos en las cepas clínicas.

Palabras clave: plásmidos, resistencia, integrón

Class 1 integrons associated to plasmids in *Klebsiella pneumoniae* strains

Abstract: Integrons are genetic elements able to capture resistance genes, usually located in plasmids and responsible for dissemination of resistance in Gram negative bacilli. The presence of class 1 integrons and its association with plasmids in 23 multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated from different services of hospital “Antonio Patricio de Alcalá” Sucre-Venezuela was studied. By bacterial conjugation and polymerase chain reaction the transference of resistance determinants and the presence of integrons class 1 were evaluated. All isolates were resistant to ceftazidime and aztreonam. Conjugation assays demonstrated the presence of conjugative plasmids in all *K. pneumoniae* strains analyzed. Integrons were detected in 10 (43.47%) isolates. One integron element was present in nine strains and two elements in one single strain. Integrons identified were associated a plasmids. The presence of integrons class 1 carried by plasmids must play an important role in the epidemiology of antibiotic resistance in clinical strains.

Keywords: plasmids, resistance, integron

* Correspondencia:
E-mail: miltzaguz@cantv.net

Introducción

La resistencia bacteriana, conjuntamente con las infecciones nosocomiales, representa un importante problema de salud pública, que trae como consecuencia un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados [1]. En *K. pneumoniae* los mecanismos de resistencia adquiridos por transferencia horizontal se encuentran asociados a plásmidos, transposones e integrones [2-4].

Un integrón es un elemento genético dinámico, que codifica para una integrasa con actividad de recombinación sitio específica y acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Estos elementos genéticos son considerados sistemas de expresión,

debido a que son capaces de integrar y expresar genes denominados casetes, los cuales en su mayoría confieren resistencia a los antimicrobianos [5,6].

Los integrones clase 1 están conformados por dos regiones conservadas de ADN situadas en los extremos, denominadas 5' CS y 3' CS. El extremo 5' CS tiene una longitud de 1,36 kb y contiene el gen *intI* que codifica para una integrasa (una proteína de 337 aminoácidos y tamaño calculado en 38 kDa), encargada de catalizar una recombinación genética sitio específico. Adyacente al gen *intI* se encuentra el sitio de recombinación específico *attI*, en el que se integran los casetes genéticos [7-9]. El dinamismo de un integrón se refiere a la capacidad de los genes estructurales presentes en él para escindir en forma de círculos

autónomos (no replicativos) y a la capacidad que tienen los casetes para integrarse a un elemento diferente [5].

Algunos estudios de resistencia bacteriana realizados en cepas hospitalarias de *K. pneumoniae*, han demostrado la presencia de integrones clase 1 que confieren resistencia a diversos agentes antimicrobianos (β -lactámicos, aminoglucósidos y cloranfenicol) [10-12]. La asociación de integrones con elementos móviles que promueven la transmisión horizontal entre plásmidos y cromosomas, así como entre diferentes replicones, contribuyen a la diseminación de genes de resistencia. Debido a que los integrones juegan un papel importante en la captura de genes de resistencia, en esta investigación nos propusimos determinar integrones clase 1 asociados a plásmidos en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se recolectaron 23 cepas de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes con infección nosocomial, atendidos en las diferentes áreas de hospitalización del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", durante el periodo comprendido entre junio del 2003 a mayo 2004.

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) [13]. Se emplearon los siguientes agentes antimicrobianos: cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), ceftriazona (30 μ g), aztreonam (30 μ g), imipenem (10 μ g), amikacina (30 μ g), kanamicina (30 μ g), tobramicina (30 μ g), cefepima (30 μ g), gentamicina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) y amoxicilina ácido clavulánico (2:1) (30 μ g).

Conjugación bacteriana y aislamientos de plásmidos

Los experimentos de conjugación se realizaron en medio sólido [14]. Como cepa receptora se empleó *E. coli* J62-2 (F-, *his*, *pro*, *trp*, *lac*, *rif*), CVC131. Las transconjugantes fueron seleccionadas en agar MacConkey, suplementado con rifampicina (100 μ g/ml) más ceftazidima (50 μ g/ml) para las cepas resistentes a ceftazidima y con rifampicina (100 μ g/ml) más ampicilina (120 μ g/ml) para las cepas sensibles a ceftazidima.

El ADN plasmídico de las cepas donantes y transconjugantes fue extraído empleando la técnica modificada de lisis alcalina [15]. 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 documentador de imágenes Gel Doc® (Bio-Rad).

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN total se realizó mediante el método de ebullición [16]. 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 se hirvió durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 3 minutos; este procedimiento se realizó para las cepas donantes. El sobrenadante con el contenido de ADN total se almacenó a -20°C hasta su uso.

Detección de integrones clase 1

La presencia de los genes insertados en la región variable de los integrones clase I se determinaron 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 dos segmentos conservados en el integrón clase 1, que delimitan la región variable [16]. 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 equipo documentador de imágenes Gel Doc® (Bio-Rad).

Resultados

En las cepas analizadas se evidenció que el 73,91% presentaban resistencia a más de nueve antimicrobianos. La mayor resistencia se presentó para el grupo de los β -lactámicos y aminoglucósidos (Tabla 1).

La evaluación del perfil plasmídico reflejó que todas las cepas presentaron plásmidos. El 46% presentaron, al menos, un plásmido de elevado peso molecular y el 54% más de uno, llegando a identificarse hasta 10 plásmidos en una cepa. Los experimentos de conjugación permitieron demostrar la presencia de plásmidos conjugativos en todas las cepas.

La transferencia de determinantes de resistencia a los β -lactámicos, se produjo con una frecuencia de conjugación de 10^{-2} transconjugantes/célula donante en las cepas resistentes a ceftazidima. Las cepas transconjugantes presentaron un perfil de resistencia compatible con el de la cepa donante. Adicionalmente, en las cepas transconjugantes se observó cotransferencia de determinantes de resistencia para otros antimicrobianos, como aminoglucósidos y cloranfenicol (Tabla 2). Las cepas Kp09, Kp10 y Kp18 no conjugaron cuando se empleó ceftazidima como antimicrobiano de selección, sin embargo, se obtuvo conjugación cuando se empleó ampicilina, obteniéndose transconjugantes con una frecuencia de 10^{-2} a 10^{-3} transconjugan-

tes/célula donante, observándose cotransferencia de determinantes para aminoglicósidos y cloranfenicol.

De 23 cepas estudiadas, 43 (47%) poseían integrones clase I. Todos los integrones fueron identificados en cepas que presentaban resistencia a diez o más antimicrobianos.

Con respecto al número de elementos genéticos identificados en las cepas, 9 de éstas contenían un integrón y una presentó dos elementos.

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

Cepa	Fuente de aislamiento	Perfil de Resistencia
Kp01	Sangre	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp02	Sangre	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp03	Sangre	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP
Kp04	Secreción	AMK K TOB GEN Nt TCY
Kp05	Secreción	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL TCY
Kp06	Secreción	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP OFLO
Kp07	Orina	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL TCY
Kp08	Sangre	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP
Kp09	Sangre	CAZ ATM CTX CRO FEP AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp10	Sangre	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP OFX
Kp11	Sangre	CAZ ATM CTX CRO FEP AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp13	Sangre	CAZ ATM CTX CRO FEP AMK K TOB GEN Nt CHL TCY OFX
Kp14	Sangre	CAZ ATM CTX CRO AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp15	Sangre	CAZ ATM CTX CRO FEP AMK K TOB GEN Nt CHL TCY OFX
Kp17	Secreción	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp18	Secreción	CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp21	Secreción	CAZ ATM CTX CRO AMK K CHL
Kp22	Sangre	CAZ ATM CTX CRO AMK K TOB GEN Nt CHL
Kp25	Orina	CAZ ATM CTX CRO AMK K TOB GEN Nt CHL OFX
Kp26	Catéter	CAZ ATM CTX CRO AMK K TOB GEN Nt CHL OFX
Kp27	Secreción	CAZ ATM CTX CRO AMK K TOB GEN Nt CHL TCY
Kp28	Orina	CAZ ATM CTX CRO AMK K TOB GEN Nt TCY
Kp29	Sangre	CAZ ATM CTX CRO AMK K TOB GEN Nt TCY

Kp: *Klebsiella pneumoniae*

ATM: Aztreonam CRO: Ceftriazona K: Kanamicina CIP: Ciprofloxacina
 TOB: Tobramicina TCY: Tetraciclina AK: Amikacina CTX: Cefotaxima
 GEN: Gentamicina CAZ: Cefotaxidima Nt: Netilmicina CHL: Cloramfenicol
 OFX: Ofloxacina FEP: Cefepima.

Tabla 2. Perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas transconjugantes obtenidas mediante el proceso de conjugación.

Cepa	Perfil de resistencia
T01	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T02	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T03	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T04	AMP AMK K TOB GEN Nt
T05	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T06	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T07	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T08	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T09	AMP AMK K TOB GEN Nt
T10	AMP AMK K TOB GEN Nt
T11	AMP CAZ ATM AMK K TOB GEN Nt CHL
T13	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL FEP
T14	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
T15	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL FEP
T17	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
T18	AMP AMK K TOB GEN Nt CHL
T21	AMP CAZ ATM CTX CRO AMK K CHL
T22	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
T25	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
T26	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
T27	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt CHL
T28	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt
T29	AMP CAZ ATM CRO CTX AMK K TOB GEN Nt

T: Transconjugante

ATM:Aztreonam K: Kanamicina AMK: Amikacina GEN: Gentamicina
 TOB: Tobramicina CTX: Cefotaxima CRO: Ceftriazona CAZ: Cefotaxidima
 Nt: Netilmicina CHL: Cloramfenicol AMP: Ampicilina FEP: Cefepima

El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 750 a 2000 pb. En 4 cepas el amplicón fue de 1000 pb, en 3 de 1500 pb, en dos de 750 pb y en una de 1200 y 2000 pb (Figura 1).

Los integrones determinados en este estudio se encontraban asociados a plásmidos. Cinco de ellos fueron localizados en plásmidos conjugativos (T13, T14, T15, T28 y T29) y cinco en plásmidos no conjugativos bajo la metodología empleada (Kp09, Kp11, Kp25, Kp26 y Kp27).

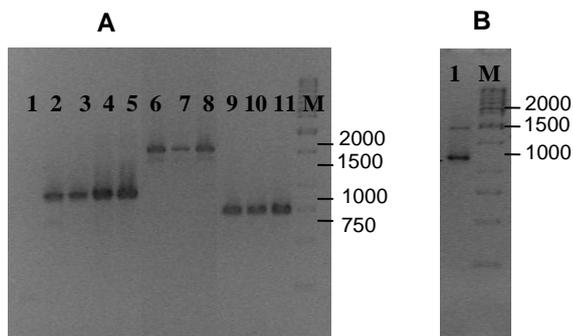


Figura 1. Integrones clase 1 localizados en plásmidos presentes en cepas de *K. pneumoniae*. A) Línea 1: control negativo (*E. coli* J62-2). Líneas 2 a 10: cepas de *E. coli* Kp09, Kp11, T13, T15, Kp25, Kp26, Kp27, T28 y T29 respectivamente. Línea 11: control positivo (*E. coli* T9701). Línea 12: marcador de peso molecular. B) Línea 1: *E. coli* T14. Línea 2: marcador de peso molecular Kp: *Klebsiella pneumoniae*. T: Transconjugante.

Discusión

La emergencia y diseminación de la resistencia antimicrobiana, es considerada un problema de salud pública complejo donde elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones juegan un papel importante [17].

En este estudio se evidenciaron elevados porcentajes de resistencia a los antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento de las infecciones causadas por *K. pneumoniae*, encontrado determinantes de resistencia a más de un grupo lo que hace concluir que la mayoría de las cepas son multirresistentes, hecho que genera una disminución en las posibilidades terapéuticas.

En *K. pneumoniae*, la resistencia suele asociarse con mayor frecuencia a la expresión de genes presentes en plásmidos, los cuales son elementos claves en la transmisión horizontal de la información genética, debido a que son capaces de propagar la resistencia a los antibióticos entre los miembros de una misma o diferente especie [18,19]. En la presente investigación se determinó que todas las cepas de *K. pneumoniae* presentaban plásmidos conjugativos de elevado peso molecular, capaces de transferir hasta 12 determinantes de resistencia para tres familias o grupos de antimicrobianos (β -lactámicos, aminoglucósidos y cloranfenicol), lo que coincide con lo reportado por diversos autores, quienes han demostrado la presencia de mecanismos de resistencia en plásmidos conjugativos de elevado peso molecular [20-22].

Se han descrito cinco clases de integrones, donde los de clase 1 son los más frecuentes en enterobacterias. La prevalencia de una u otra clase de integrón en bacterias gram-

negativas depende de la especie bacteriana y, en algunos casos, de la localización geográfica en que se recolectan las cepas [23,24]. En este trabajo se detectó un 43,47% de integrones clase 1 en aislados de *K. pneumoniae* con resistencia principalmente a β -lactámicos y aminoglucósidos. Reyes *et al* [25] en Chile demostraron que los integrones clase 1 se encuentran con mayor frecuencia en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*. A nivel nacional Alonso y col [26] demostraron la presencia de integrones clase 1 en especies de enterobacterias aisladas de diferentes ambientes.

Se ha establecido una asociación entre cepas multirresistentes y la presencia de integrones clase 1 [27]. En este trabajo se encontraron cepas multirresistentes que no presentaron integrones, lo que permite inferir que no siempre la característica de multirresistencia que presenta una cepa esta relacionada a la presencia de integrones clase 1; al respecto, hay que considerar la presencia de otros elementos genéticos como plásmidos, transposones o secuencias de inserción que porten genes de resistencia.

En los integrones clase 1 detectados en enterobacterias de origen nosocomial se han descrito la prevalencia de tres tipos de regiones de ADN, con tamaños que oscilan entre 800, 1000 y 1500 pb [28]. En este estudio siete de los integrones detectados presentaron tamaños similares (1000 y 1500 pb) a los mencionados anteriormente. En integrones clase 1 se han descrito más de 60 casetes génicos que confieren resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y trimetropin, entre otros. Con estos resultados no se puede inferir cuales genes estarían presentes en los amplicones detectados. Al analizar el tamaño de los amplicones de la región variable, se encontraron tamaños comunes en diferentes cepas, lo que permite sugerir que estos amplicones pueden pertenecer a un integrón específico, que se disemina entre los diferentes aislados de *K. pneumoniae* y, lo más probable, también a otros géneros o familias, o sugerir la presencia de un determinante con el mismo tamaño pero diferente. La solución a este problema se resolvería con un análisis de secuenciación.

Los integrones que portan genes de resistencia se encuentran habitualmente formando parte de transposones y/o plásmidos [5]. Todos los integrones detectados en este estudio estaban asociados a plásmidos (conjugativos o no conjugativos bajo la metodología ensayada). Estos resultados concuerdan con los reportados por Álvarez-Fernández y col [29] quienes encontraron en cepas nosocomiales de enterobacterias, integrones clase 1 en plásmidos conjugativos y con los de Torres y col [20] quienes reportaron integrones localizados en plásmidos conjugativos y no conjugativos de cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Proteus*.

En este estudio únicamente el integrón de 1000 pb se encontró tanto en plásmidos conjugativos como en no conjugativos. Esta observación permite inferir que además de su localización en plásmidos, los integrones pudieran estar asociados con secuencias de inserción o transposones, los cuales garantizarían su diseminación mediante transferencia horizontal.

La presencia de integrones en cepas de *K. pneumoniae* es un tema de interés en Salud Pública, ya que estos ele-

mentos genéticos constituyen un aporte importante en la diseminación de genes de resistencia entre las cepas bacterianas de un ambiente determinado.

Agradecimientos

Al personal del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" por su apoyo. Financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. Núcleo Sucre (PCI: 204010212531-05) y el CDCH de la Universidad Central de Venezuela (PI-03.335417-2004 y PG-03335416-2004).

Referencias

- Gupta A, Ampolo K, Rubenstein D, Saiman L. Extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *J Perinatol*. 2003; 23: 439-43.
- 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.
- 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.
- Carattoli A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol* 2003; 5: 113-22.
- Hall R, Stokes H. Integrons. Novel DNA elements which capture genes by site-specific recombinations. *Genetic*. 1993; 90: 115-32.
- Collis C, Hall R. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 155-62.
- 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.
- Gravel A, Fournier B, Roy P. DNA complexes obtained with the integron integrate IntI1 at the *attI1* site. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26: 4347-55.
- Girlich D, Poirer L, Leelaporn A, Karin A, Tribuddharat C, Fennwald M, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 175-82.
- Gruteke P, Goessens W, Gils J, Peerbooms P, Toom N, Santen-Verheuvell M, et al. Patterns of resistance associated with integrones, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 1161-66.
- 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement, M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007; 27 (1).
- 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 ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
- 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.
- White P, Melver C, Rawlinson, W. Integrons and gene cassette in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2658-61.
- Brian L. General mechanisms of resistance to antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1989; 22: 1-15.
- Ayres E, Kuehner D, Figurski D. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. *J Bacteriol*. 1995; 178: 1457-64.
- Torres L, Benítez M, Domínguez M, Torres O, Gagliotta V, Calvo A, Rodríguez N y col. 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://www.caibco.ucv.ve>. Acceso: 2 de julio de 2008.
- Araque M, Nieves B, Lauretti L, Rossolini, G. Molecular basis of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 15: 37-42.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum β -Lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 2720-7.
- Gallardo F, Ruiz J, Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J. Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislados clínicos de *Salmonella typhimurium*. *Rev Esp Quimioterap*. 2003; 16: 398-402.
- Peter E, Leverstein-Van Hall M, Box AT, Verhoef J, Fluit AC. Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrob Agent Chemother*. 2001; 45: 2961-94.
- Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, Gonzáles G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 317-21.
- Alonso G, Malaver E, Guzmán M, Rodríguez Lemoine V. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multirresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. *MIBE*. 2005; 4: 81-4.
- Peirano G, Agersø Y, Aarestrup F, Rodrigues D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55: 301-5.
- Martínez-Freijoo P, Fluit A, Schmitz F, Veihoeff J, Jones M. Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolates from wide spread geographic regions in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 42: 689-96.
- 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.