REVISTA DE CIENCIAS

ZUBÍA

MONOGRÁFICO

24

ier
Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO
REVISTA DE CIENCIAS.
Nº 24 (2012). Logroño (España).
P. 1-171, ISSN: 1131-5423

DIRECTORA
Purificación Ruiz Flaño

CONSEJO DE REDACCIÓN
Luis Español González
Rubén Esteban Pérez
Rafael Francia Verde
Juana Hernández Hernández
Luis Miguel Medrano Moreno
Patricia Pérez-Matute
Enrique Requeta Loza
Rafael Tomás Las Heras

CONSEJO CIENTÍFICO
José Antonio Arizaleta Urarte
(Instituto de Estudios Riojanos)
José Arnáez Vadillo
(Universidad de La Rioja)
Susana Caro Calatayud
(Instituto de Estudios Riojanos)
Eduardo Fernández Garbayo
(Universidad de La Rioja)
Rosario García Gómez
(Universidad de La Rioja)
José Mª García Ruiz
(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)
Javier Guallar Otazua
(Universidad de La Rioja)
Teodoro Lasanta Martínez
(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)
Joaquín Lasierra Cirujeda
(Hospital San Pedro, Logroño)
Luis Lopo Carramiñana
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)
Fernando Martínez de Toda
(Universidad de La Rioja)
Juan Pablo Martínez Rica
(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)
José Luis Nieto Amado
(Universidad de Zaragoza)
José Luis Peña Monné
(Universidad de Zaragoza)
Félix Pérez-Lorente
(Universidad de La Rioja)
Eduardo Viladés Juan
(Hospital San Pedro, Logroño)
Carlos Zaldívar Ezquerro
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

DIRECCIÓN Y ADMINISTRACIÓN
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26071 Logroño
publicaciones.ier@larioja.org

Suscripción anual España (1 número y monográfico): 15 €
Suscripción anual extranjero (1 número y monográfico): 20 €
Número suelto: 9 €
Número monográfico: 9 €

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

Monográfico Núm. 24

Panorama actual de la investigación biomédica en La Rioja

Coordinadora
Patricia Pérez-Matute

Gobierno de La Rioja
Instituto de Estudios Riojanos
LOGROÑO
2012

Panorama actual de la investigación biomédica en La Rioja / coordinadora, Patricia Pérez-Matute. – Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2012
171 p. : gráf. ; 24 cm – (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 24). – D.L. LR 413-2012
1. Ciencias biomédicas - Investigación - La Rioja. I. Pérez-Matute, Patricia. II. Instituto de Estudios Riojanos. III. Serie
61:001.891(460.21)
57:001.891(460.21)

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse ni transmitirse, por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

© Logroño, 2012
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26001-Logroño, La Rioja (España)

© Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación

© Imagen de la cubierta y contracubierta: Detalle de los efectos del tratamiento de 24 horas de un fármaco antirretroviral sobre el adipocito humano (*Patricia Pérez-Matute*). Fotografías con luz ultravioleta del cerebro (a la izquierda) y del corazón (a la derecha) de un ratón transgénico (*Alfredo Martínez*)

Producción gráfica: Reproestudio, S.A. (Logroño)

ISSN 1131-5423
Depósito Legal: LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

ÍNDICE

PRESENTACIÓN
Patricia Pérez-Matute *(Coordinadora)* 7-8

PRIMEROS AÑOS DE ANDADURA DEL CIBIR
José Ignacio Nieto *(Consejero de Salud y Servicios Sociales del Gobierno de La Rioja)*..... 9-10

MARTA PÉREZ-FERNÁNDEZ, JAVIER PÉREZ, JULIO GÓMEZ
Análisis mediante CG-MS de volátiles en el aliento de personas con cáncer en el tracto respiratorio
Study of breath compounds in people that suffer lung cancer 11-21

SARA VELILLA OSÉS, RUTH ABARZUZA CORTAIRE, EVA RODO ARNEDO, ANA IBÁÑEZ MUÑOZ, SARA MARTA GUALLAR LEZA
Seguimiento de un año con Ranibizumab para el edema macular diabético refractario: estudio piloto
One year follow-up of Ranibizumab for refractory diabetic macular edema: a pilot study 23-32

ELENA DOMÍNGUEZ-GARRIDO
Diagnóstico Molecular: Genética Humana y Salud en La Rioja
Molecular Diagnostic: Human Genetic and Health in La Rioja 33-40

SONIA MARTÍNEZ-HERRERO, IGNACIO M. LARRÁYOZ, LAURA OCHOA-CALLEJERO, JOSUNE GARCÍA-SANMARTÍN, ALFREDO MARTÍNEZ
Producción de ratones modificados genéticamente como modelos de enfermedades humanas
Production of genetically modified mice as models for human diseases..... 41-52

GERMÁN CUESTO, NURIA DOMÍNGUEZ-ITURZA, LILIAN ENRÍQUEZ-BARRETO, PATRICIA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, GADEA MATA, EMILIO SYRIANI, MIGUEL MORALES
La activación de PI3K controla la formación de sinapsis en el sistema nervioso central
PI3K activation controls synaptic formation in the central nervous system..... 53-80

ROSETE S. PAIS, ICIAR P. LÓPEZ, JOSÉ G. PICHEL
El sistema de IGFs en la homeostasis y patología del pulmón: implicación en su desarrollo, regeneración tras daño y cáncer no microcítico
The IGF system in lung homeostasis and disease: involvement on pulmonary development, injury recovery, and non-small cell cancer 81-112

LAURA VINUÉ, ELENA RUIZ, INÉS OLARTE, SERGIO SOMALO, BEATRIZ ROJO-BEZARES, FERNANDA RUIZ-LARREA, MYRIAM ZARAZAGA, YOLANDA SÁENZ, CARMEN TORRES
Frecuencia y caracterización de integrones en aislados clínicos y alimentarios de *Escherichia coli*. La relación entre los integrones y la multirresistencia a antibióticos
Occurrence and characterization of integrons in clinical and food Escherichia coli *isolates. The relation between integrons and antimicrobial multiresistance* 113-128

PATRICIA PÉREZ-MATUTE, JOSÉ RAMÓN BLANCO, LAURA PÉREZ-MARTÍNEZ, JAVIER AGUILERA-LIZARRAGA, EMMA RECIO, MERCEDES SANZ, CONCEPCIÓN GARCÍA-GARCÍA, JOSÉ ANTONIO OTEO
Investigación en VIH y Lipodistrofia en el Hospital San Pedro-Cibir: modelos *in vitro* de adipocitos para el estudio de los efectos tóxicos de fármacos antirretrovirales
Research on HIV and Lipodistrophy at San Pedro Hospital-Cibir: in vitro *adipocyte models for the study of toxic effects of antiretroviral drugs* 129-147

ARÁNZAZU PORTILLO, SONIA SANTIBÁÑEZ, PAULA SANTIBÁÑEZ, ANA M. PALOMAR, LARA GARCÍA-ÁLVAREZ, LOURDES ROMERO, LUIS METOLA, VALVANERA IBARRA, JOSÉ R. BLANCO, JOSÉ A. OTEO
1987: Un caso de enfermedad de lyme - 2012: Centro de Referencia en Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores
1987: A case of Lyme disease - 2012: Reference Centre of Rickettsioses and Arthropod-Borne diseases..... 149-163

Zubía. Monográfico 24 113-128 Logroño 2012

FRECUENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES EN AISLADOS CLÍNICOS Y ALIMENTARIOS DE *ESCHERICHIA COLI*. LA RELACIÓN ENTRE LOS INTEGRONES Y LA MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

LAURA VINUÉ[1], ELENA RUIZ[1],
INÉS OLARTE[2], SERGIO SOMALO[1],
BEATRIZ ROJO-BEZARES[3], FERNANDA RUIZ-LARREA[1],
MYRIAM ZARAZAGA[1], YOLANDA SÁENZ[3],
CARMEN TORRES[1,3*]

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema importante en el ámbito biomédico y veterinario. Los integrones son estructuras genéticas involucradas en la adquisición y posterior diseminación de genes de resistencia a los antibióticos. Se ha estudiado la prevalencia de integrones en 229 aislados clínicos y alimentarios de *Escherichia coli*. Se ha detectado su presencia en el 34,5% y 45,3% de los *E. coli* clínicos y alimentarios, respectivamente, siendo los más frecuentes los integrones de clase 1. Se ha identificado una gran diversidad de combinaciones de casetes génicos en dichos integrones, encontrándose distintas variantes de genes de resistencia a estreptomicina, trimetoprim, sulfamidas, cloranfenicol, beta-lactámicos, macrólidos o estreptotricina. El 89% de los aislados de *E. coli* portadores de integrones presentaron un fenotipo de multirresistencia, incluyendo al menos 3 o más familias diferentes de antibióticos. Los integrones son elementos importantes en la evolución de la resistencia a los antibióticos en el mundo bacteriano y son estructuras muy frecuentes en *E. coli* tanto de origen clínico como alimentario.

Palabras clave: integrón, resistencia a antibióticos, *Escherichia coli*.

Antibiotic resistance is an important problem both in medicine as well as in veterinary. Integrons are genetic structures involved in the acquisition and later dissemination of antibiotic resistance genes. The prevalence of integrons has

* E-mail: carmen.torres@unirioja.es.
1. Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España.
2. Laboratorio de Microbiología, Hospital San Pedro, Logroño, España.
3. Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España.

been analysed in a collection of 229 Escherichia coli isolates of clinical and food origins. Its presence has been evidenced in 34.5% and 45.3% of clinical and food isolates, respectively, being class 1 integrons the most frequently detected. A wide diversity of gene cassette combinations have been demonstrated among the integrons, identifying different variants of resistance genes for streptomycin, trimethoprim, sulfamides, cloramphenicol, beta-lactams, macrolides or estreptotricin. A multiresistance phenotype (including three or more antibiotic families) was detected in 89% of integron-positive isolates. Integrons are important genetic elements in the evolution of antibiotic resistance and these structures are very frequently detected among E. coli of clinical and food origins.

Key words: *integron, resistance to antibiotics, Escherichia coli.*

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema global que no sólo se ha extendido en ambientes muy selectivos, sobre todo entre las bacterias patógenas del entorno hospitalario, sino también en la comunidad, a lo largo de la cadena alimentaria o en el medioambiente, con consecuencias importantes para la salud pública. La capacidad de las bacterias para captar y expresar material genético, transmitido no sólo de las bacterias progenitoras a su descendencia (transmisión vertical) sino también de fuentes externas (transferencia lateral u horizontal), ha contribuido a la rápida emergencia y diseminación de bacterias multirresistentes en los distintos nichos ecológicos. Los plásmidos y transposones son los elementos genéticos móviles que permiten el intercambio de genes de resistencia a múltiples antibióticos, entre especies incluso poco relacionadas, representando el medio más común para adquirir determinantes de resistencia a antibióticos. Otra pieza importante de captación de material genético son los integrones, cuyo papel en la evolución de las bacterias multirresistentes se descubrió hace menos de tres décadas (Stokes and Hall, 1989).

Los integrones son elementos genéticos capaces de adquirir y expresar el material genético que forma parte de los denominados casetes génicos. La definición de integrón está basada en su plataforma funcional o región conservada 5' (5'CS), compuesta por tres elementos claves (figura 1): el gen que codifica la integrasa IntI; un sitio de recombinación sitio-específico, denominado *attI*; y la región de los promotores, Pc, para la expresión de los casetes génicos (Cambray *et al.*, 2010; Hall and Collis, 1995; Mazel, 2006; Stalder *et al.*, 2012). Los casetes génicos, a su vez, están formados por una pauta de lectura abierta (ORF) o gen, normalmente carente de promotor, y por una región *attC* que es reconocida por la integrasa (figura 1) (Cambray *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2009). La integrasa IntI es una recombinasa sitio-específica capaz de catalizar la integración y escisión de los casetes génicos (figura 2), pudiendo darse dos tipos de recombinación: 1) entre los sitios *attI* y *attC*, resultando en la inserción de un casete génico en la región *attI* y 2) entre dos sitios *attC*, permitiendo la escisión del casete génico (Mazel, 2006; Larouche

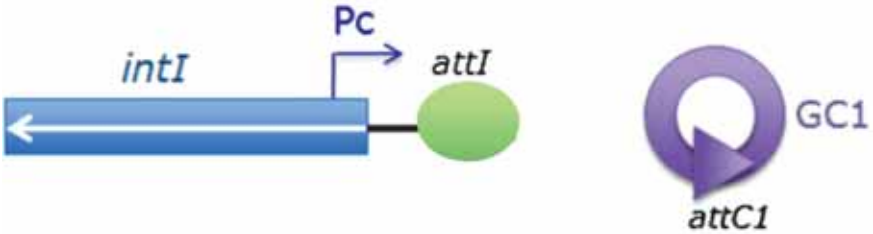


Figura 1. Estructura general de un integrón y un casete génico (GC). *intI1*, gen codificante de la integrasa IntI1; *attI1*, sitio de recombinación sitio específica del integrón y Pc, región de promotores para la expresión de los casetes génicos que se integren en forma lineal dentro de la estructura del integrón. Los GC son genes circularizados, normalmente carentes de promotor, con un sitio de recombinación *attC*. (Adaptación de Stalder *et al.*, 2012).

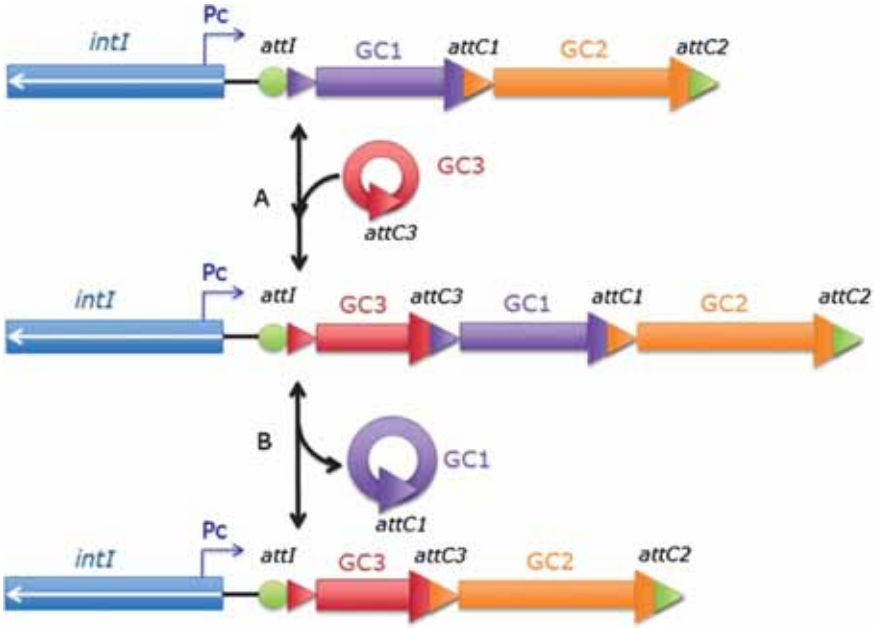


Figura 2. Mecanismo de recombinación de los casetes génicos. La integrasa IntI1 cataliza la inserción (A) y escisión (B) de los casetes génicos (GC) en el integrón. (Stalder *et al.*, 2012).

and Roy, 2011). La consecuencia de este sistema es que el último gen integrado está más próximo al promotor Pc, permitiendo su máximo nivel de expresión en el integrón (Cambray *et al.*, 2010).

Se han descrito dos grupos principales de tipos de integrones: los integrones cromosómicos o superintegrones (SIs) y los integrones móviles de resistencia (IMRs) (Fluit and Schmitz, 2004). Los SIs están localizados en el cromosoma de cientos de especies bacterianas (principalmente de los grupos *Vibrionaceae, Xanthomonadaceae* o *Pseudomonadaceae*) y pueden portar hasta 200 casetes génicos que codifican proteínas con funciones desconocidas (Cambray *et al.*, 2010). Los IMRs no son elementos transponibles por sí solos, pero se localizan en elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones, que permiten su diseminación. Los IMRs contienen un número limitado de casetes génicos (menos de 10), que normalmente codifican genes de resistencia a antibióticos (Mazel, 2006; Partridge *et al.*, 2009; Cambray *et al.*, 2010). Atendiendo a la secuencia aminoacídica de la integrasa, se han descrito cinco clases de IMRs, siendo las clases 1, 2 y 3 las más comúnmente detectadas (Cambray *et al.*, 2010; Stalder *et al.*, 2012).

Los integrones de clase 1 clásicos presentan una región conservada 3' (3'CS) compuesta por los genes *qacEΔ1* y *sul1* que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario y a sulfamidas, respectivamente. Sin embargo, se han descrito integrones que carecen de esta región 3'CS (Betteridge *et al.*, 2011; Partridge *et al.*, 2009; Sáenz *et al.*, 2010). Se han descrito diferentes promotores en los integrones de clase 1 que afectan a la expresión de los casetes génicos que contienen (Vinué *et al.*, 2011). Los integrones de clase 1 son los más frecuentemente descritos, siendo detectados entre el 22% y el 59% de las bacterias Gram-negativas de importancia clínica (Labbate *et al.*, 2009) y en cuya estructura se ha observado una gran variabilidad de combinaciones de casetes génicos (Partridge *et al.*, 2009). Por otra parte, en la mayoría de los integrones de clase 2 que están embebidos en transposones de la familia Tn*7*, el gen *intI2* está interrumpido por un codón de parada, resultando en una proteína truncada no funcional. Este hecho da lugar a una composición muy conservada de casetes génicos formada principalmente por los genes: *dfrA1* (resistencia a trimetoprim), *sat2* (resistencia a estreptotricina) y *aadA1* (resistencia a estreptomicina y espectinomicina) (Cambray *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2009; Stadler *et al.*, 2012). En el caso de los integrones de clase 3, son muy pocas las composiciones génicas detectadas y, aunque su papel en la resistencia antibiótica en clínica es menos importante que el de los integrones de clase 1 y 2, su relevancia en los ecosistemas medioambientales puede ser muy significativa (Stalder *et al.*, 2012).

Los IMRs están implicados en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos asociados a elementos genéticos móviles y transferidos entre bacterias principalmente de importancia clínica, pero también de origen animal, alimentario o medioambiental. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la detección y caracterización de integrones en aislados clínicos y alimentarios de *Escherichia coli* recogidos en la Comunidad de La Rioja, para determinar su frecuencia e importancia en la diseminación de la resistencia a antibióticos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Aislados bacterianos incluidos en este estudio

2.1.1. *Aislados clínicos de E. coli*

Se recogieron un total de 165 aislados de *E. coli*, a razón de 15 aislados al mes, desde febrero a diciembre de 2007, procedentes de diferentes pacientes con infecciones urinarias ingresados en el Hospital San Pedro de Logroño.

2.1.2. *Aislados de E. coli de origen alimentario*

Se incluyeron 64 aislados de *E. coli* recogidos a partir de muestras de alimentos crudos derivados de pollo (hamburguesa, salchicha, picadillo) y de distintas partes de la anatomía del pollo y del pavo (piel de muslo o cuello, pechuga, carcasa), adquiridas en distintos establecimientos de Logroño en los que la venta de productos de pollería o carnicería y charcutería se realizaban en el mismo lugar. El procesamiento de las muestras consistió en resuspender aproximadamente 0,3 g del alimento en 3 ml de solución salina y sembrar una alícuota de esa suspensión en placas de agar Levine (suplementadas o no con antibiótico). Tras incubar a 37ºC durante 24h, se aisló una colonia por muestra con morfología sospechosa de *E. coli* y se identificó mediante pruebas bioquímicas.

Las muestras alimentarias se recogieron en dos períodos de tiempo: a) 1er período: 35 cepas de *E. coli* aisladas durante los años 1997-1998 a partir de 35 muestras de alimentos sembrados en placas no suplementadas con antibiótico; b) 2º período: 29 cepas de *E. coli* aisladas durante los años 2007-2008 a partir de 29 muestras de alimentos, 15 de las 29 cepas se aislaron en placas de agar Levine suplementadas con cefotaxima (CTX, 2 μg/ml).

2.2. Fenotipo de resistencia a antibióticos

En todos los aislados se estudió la sensibilidad a 16 agentes antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, imipenem, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, tetraciclina, sulfamidas, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol mediante el método de difusión en disco o antibiograma, siguiendo las recomendaciones y los puntos de corte propuestos por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). En los aislados procedentes de alimentos se estudió el fenotipo de resistencia a tres antibióticos adicionales: amikacina, tobramicina y fosfomicina (CLSI, 2007).

2.3. Detección y caracterización de integrones

En los 229 aislados que forman parte de este estudio, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de los genes *intI1*, *intI2* e *intI3*, codificantes de las integrasas de clase

1, 2 y 3, así como la región 3'CS (*qacEΔ*1 + *sul1*) en los integrones de clase 1. La región variable de integrones de clase 1 y de clase 2 se caracterizó por PCR y posterior secuenciación. En la tabla 1 se muestran los cebadores y las temperaturas de hibridación de los mismos, empleados para las distintas PCRs. Se utilizó una estrategia de "PCR primer-walking" para determinar la composición de casetes génicos contenidos en la región variable de integrones carentes de la región 3'CS (Sáenz *et al.*, 2010).

TABLA 1.

Cebadores empleados para la detección y caracterización de integrones

Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación (ºC)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
intI1-F	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	62	483	Mazel *et al.*, 2000
intI1-R	ACATGCGTGTAAATCATCGTC			
intI2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	62	788	Mazel *et al.*, 2000
intI2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
intI3-F	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	62	979	Mazel *et al.*, 2000
intI3-R	ACGGATCTGCCAAACCTGACT			
qacEΔ1-F	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	62	1.126	Mazel *et al.*, 2000
Sul1-R	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG			
r.v.intI1-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	55	variable	Lévesque and Roy, 1993
r.v.intI1-R	AAGCAGACTTGACCTGA			
r.v.intI2F	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATT	60	variable	White *et al.*, 2001
r.v.intI2-R	GATGCCATCGCAAGTACGAG			
CmlA-F	TGTCATTTACGGCATACTCG	55	455	Sáenz *et al.*, 2004
CmlA-R	ATCAGGCATCCCATTCCCAT			
Sul3-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	51	792	Perreten and Boerlin, 2003
Sul3-R	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA			
AadA-F	GCAGCGCAATGACATTCTTG	60	282	Madsen *et al.*, 2000
AadA-R	ATCCTTCGGCGCGATTTTG			
EreA-F	GGAGAACGACCAGAACACTT	60	882	Este trabajo
EreA-R	CCCATGGGAACAGCCGTA			
QacH-F	TGAAGAACTGGCTCTTTCTGG	55	324	Este trabajo
QacH-R	CGCTGACCTTGGATAGCAG			
MefB-F	ATGAACAGAATAAAAAATTG	55	1.129	Liu *et al.*, 2009
MefB-R	AAATTATCATCAACCCGGTC			
IS26Urev	TCACTCCACGATTTACCGCT	55	2.235	Este trabajo

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Detección y caracterización de integrones en los aislados clínicos y alimentarios de *E. coli.*

El porcentaje de detección de integrones entre los aislados clínicos fue de un 34,5% (57 aislados de 165 totales), y entre los aislados alimentarios fue de un 45,3% (29 de 64 aislados), observándose una frecuencia de un 40% y de un 51,7% en el primer y segundo período de estudio de las muestras alimentarias, respectivamente. El gen de la integrasa de clase 1 (*intI1*) fue detectado en 67

aislados (30,3% de muestras clínicas, y 20% y 34,5% de alimentos del 1er período y del 2º período, respectivamente); el de la integrasa de clase 2 (*intI2*) en 13 aislados (3; 11,4 y 13,8% , respectivamente) y los dos genes *intI1* e *intI2* en los restantes 6 aislados (1,2; 8,6 y 3,4% , respectivamente) (tabla 2). El integrón de clase 1 fue el más frecuente entre los *E. coli* de origen clínico y alimentario, mientras que en ninguno de los 229 aislados estudiados se detectó la presencia del gen codificante de la integrasa de clase 3 (*intI3*), observaciones que se habían descrito previamente en múltiples trabajos realizados con *E. coli* de origen humano, animal y alimentario (Cocchi *et al.*, 2007; Soufi *et al.*, 2009; Stalder *et al.*, 2012; Trobos *et al.*, 2008; Vinué *et al.*, 2008; Vinué *et al.*, 2010).

TABLA 2.

Prevalencia de los genes codificantes de integrasas de clase 1 y clase 2 en los aislados de *E. coli* de origen clínico y alimentario

Gen	Número de aislados de origen (%)			Nº total de aislados (%) n=229
	Clínico n=165	Alimentario 1er período n=35	Alimentario 2º período n=29	
intI1	50 (30,3)	7 (20,0)	10 (34,5)	67 (29,2)
intI2	5 (3,0)	4 (11,4)	4 (13,8)	13 (5,7)
intI1+intI2	2 (1,2)	3 (8,6)	1 (3,4)	6 (2,6)
	57 (34,5)	14 (40,0)	15 (51,7)	86 (37,5)

3.1.1. *Integrones de clase 1*

Se detectaron integrones de clase 1 clásicos portadores de ambas regiones 5'CS y 3'CS (figura 3A) en 47 de los 73 aislados *intI1*-positivos (32 de clínica y 15 de alimentos). Se observaron 7 combinaciones de casetes génicos que fueron las siguientes (número de aislados clínicos / alimentarios): *aadA* (11 /6), *dfrA1* + *aadA1* (8 / 7), *dfrA17* + *aadA5* (6 / 1), *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* (3 / 0), *dfrA7* (2 / 0) y *dfrA16* + *aadA2* (1 / 1) (tabla 3). No fue posible detectar la composición de casetes génicos en el aislado restante portador de esta estructura clásica de integrón de clase 1.

Los 26 aislados *intI1*-positivos restantes (35,6%, 20 de clínica y 6 de alimentos) no presentaban la clásica estructura del integron de clase 1, habiendo perdido su región 3'CS (figura 3B). Los casetes génicos localizados en la región variable de estos integrones se estudiaron en profundidad mediante la estrategia "PCR primer-walking" y las 11 estructuras diferentes detectadas fueron las siguientes (número de aislados clínicos / alimentarios): *dfrA17* + *aadA5* (2 / 0), *dfrA16* + *aadA2* (0 / 2), *dfrA5* + *ereA2* (1 / 0), *dfrA1* + *aadA1* (1 / 0), bla_{OXA-1} + *aadA1* (1 / 0), *dfrA7* (1 / 0), *dfrA14* (4 / 0), *dfrA5* (1 / 0); *estX* + *psp* + *aadA2* + *cmlA1* + *aadA1*+ IS*440*+ *qacH* + *sul3* (0 / 4) (figura 3C); *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* + *cmlA1* + *aadA1* + IS*440*+ *qacH* + *sul3* + *mef(B)Δ* + IS*26* (3 / 0) (figura 3C); *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* + *cmlA1* + *aadA1* + *qacH* (2 / 0) (figura 3D).

A) Estructura clásica de los integrones de clase 1

B) Estructura de integrones de clase 1 carentes de la región 3'CS

C) Estructura de los integrones de clase 1 que han sustituido la region clásica 3'CS por una asociada a *sul3*.

D) Estructura de integron de clase 1 en el que la región que sustituye a 3'CS está formada solo por el gen *qacH*.

Figura 3. Estructuras esquematizadas de los integrones de clase 1 detectados en las cepas de *E. coli*.

En los 4 aislados restantes no se pudo determinar la composición de su región variable porque todas las PCRs realizadas fueron negativas (tabla 3).

Más de la mitad de los integrones de clase 1 detectados presentaban una estructura clásica, sin embargo resulta relevante el importante porcentaje de integrones carentes de la región 3'CS (35.6%), tanto en los aislados *E. coli* de muestras clínicas como de alimentos (38,5% y 28,6%, respectivamente). Este fenómeno se ha descrito previamente en *E. coli* aislados de distintos orígenes (Cocchi *et al*., 2007; Partridge *et al.*, 2009; Sáenz *et al.*, 2010; Soufi *et al.*, 2009; Sunde, 2005; Vinué *et al.*, 2008; Vinué *et al.*, 2010). El fragmento *qacE* 1-*sul1* de la región 3'CS se sustituyó por la composición *qacH*-IS*440*-*sul3* en 7 integrones, destacando que la estructura *estX* + *psp* + *aadA2* + *cmlA1* + *aadA1* + *qacH* + IS*440* + *sul3* sólo se detectó entre los aislados alimentarios y la *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* + *cmlA1* + *aadA1* + *qacH* + IS*440* + *sul3* sólo entre los aislados clínicos. Todas las secuencias de este tipo de estructuras que actualmente hay registradas en GenBank se han encontrado en cepas de *E. coli*, *Salmonella* o *Klebsiella pneumoniae* de distintos orígenes (Antunes *et al*., 2007; Chang *et al.*, 2009; Sáenz *et al.*, 2010; Soufi *et al.*, 2009; Sunde, 2005), lo que apunta a la posible existencia de una estructura ancestral común en la que las organizaciones génicas que la componen se recombinan.

TABLA 3.

Casetes génicos detectados en los integrones de clase 1 y de clase 2 de los aislados clínicos y de origen alimentario

Clase de integrón	Casetes génicos detectados	Aislados clínicos (n=57)	Aislados alimentarios (n=29)
Clase 1 clásicos	*aadA*	11*	6*
	dfrA7	2	0
	dfrA1 + aadA1	8	7*
	dfrA17 + aadA5	6	1
	dfrA16 + aadA2	1	1*
	dfrA12 + orfF + aadA2	3	0
	Desconocido	1	0
Clase 1 carente de 3'CS	*dfrA5*	1	0
	dfrA7	1	0
	dfrA14	4	0
	dfrA1 + aadA1	1	0
	dfrA17 + aadA5	2	0
	dfrA16 + aadA2	0	2
	bla_{OXA-1} + *aadA1*	1	0
	dfrA5 + ereA2	1	0
	dfrA12 + orfF + aadA2 + cmlA1 + aadA1 + qacH	2	0
	dfrA12 + orfF + aadA2 + cmlA1 + aadA1 + qacH + IS*440* + *sul3* + *mef(B)Δ* + IS*26*	3	0
	estX + psp + aadA2 + cmlA1 + aadA1 + qacH + IS*440* + *sul3*	0	4
	Desconocido	4	0
Clase 2	*dfrA1 + sat + aadA1*	6*	8*
	estX + sat2 + aadA1	0	2*
	sat + aadA1	1	2*

*****Alguna de las cepas presentaba a la vez integrones de clase 1 y clase 2.

La frecuencia de integrones de clase 1 puede estar subestimada en la literatura, porque la mayoría de los estudios de integrones descritos se realizan empleando la PCR y cebadores específicos diseñados en las regiones 5'CS y 3'CS. Según nuestros resultados, el alto porcentaje de integrones carentes de la región 3'CS se perderían porque no se obtendría un amplicón de PCR. Por ello, se pueden considerar como marcadores predictivos de integrones no clásicos la ausencia de *qacEΔ1+sul1*, y la amplificación de genes como *sul3*, *qacH* o *cmlA*. Además la región 3'CS puede delecionarse o truncarse por la acción de secuencias de inserción (IS*26*, IS*1*, IS*6100*) o por la presencia de genes asociados a transposones como los del Tn*402* (Partridge *et al.*, 2009; Toleman *et al.*, 2007).

El alto porcentaje de integrones de clase 1 portadores de una gran variedad de casetes génicos obtenido, sugiere una evolución genética, por lo que estos elementos constituyen un método efectivo de diseminación de genes de resistencia a múltiples antibióticos en bacterias de muy diversos ecosistemas. De hecho, en este estudio se observa que los casetes génicos que forman parte de la estructura de los integrones de clase 1 detectados en todos los aislados

de este estudio, son genes mayoritariamente implicados en la resistencia a trimetoprim (genes *dfrA*) y a estreptomicina y espectinomicina (genes *aadA*), aunque también se detectan genes de resistencia a otros antibióticos como beta-lactámicos, cloranfenicol, eritromicina o sulfamidas (tablas 3 y 4).

TABLA 4.

Casetes génicos detectados en integrones de clase 1 y de clase 2 y su relación con la resistencia a antibióticos

Casetes génicos detectados	Proteína	Confiere resistencia a:
aadA1, aadA2, aadA5	Aminoglucósido 3' adeniltransferasa	Estreptomicina y espectinomicina
bla_{OXA-1}	Oxacilinasa	Beta-lactámicos
cmlA1	Cloranfenicol acetiltransferasa	Cloranfenicol
dfrA1, dfrA5, dfrA7, dfrA12, dfrA14, dfrA16, dfrA17	Dihidrofolato reductasa	Trimetoprim
ereA2	Eritromicina esterasa	Eritromicina
sat	Estreptotricina acetiltransferasa	Estreptotricina
sul3	Dihidropteroato sintetasa	Sulfamidas

3.1.2. *Integrones de clase 2*

Resulta de interés destacar la mayor prevalencia de integrones de clase 2 en los aislados de alimentos que en los de clínica. Se detectaron tres tipos de estructuras en los 19 aislados portadores de integrón de clase 2 (7 aislados clínicos y 12 alimentarios): *dfrA1* + *sat2* + *aadA1* (6 / 8), *estX* + *sat2* + *aadA1* (0 / 2) y *sat2* + *aadA1* (1 / 2) (tabla 3). Estas estructuras son las más frecuentemente descritas en la literatura asociadas al transposón Tn*7* y sus derivados (Hansson *et al.*, 2002; Partridge *et al.*, 2009, Stalder *et al.*, 2012). Las combinaciones de casetes génicos están muy conservadas en los integrones de clase 2, en comparación con la gran variabilidad detectada entre los integrones de clase 1, lo que corrobora que debido a que la mayoría de los integrones de clase 2 presentan su integrasa inactivada, existe una pérdida de dinamismo en la captura y escisión de casetes génicos en estos integrones.

3.2. Porcentajes de resistencia antibiótica

Los porcentajes de resistencia a los distintos antibióticos estudiados en los 57 aislados clínicos portadores de integrones se presentan en la figura 4. Además de los elevados niveles de resistencia a sulfamidas (87,7%), trimetoprim-sulfametoxazol (73,7%) y estreptomicina (77,2%) detectados, hay que destacar los altos porcentajes de resistencia observados frente a antibióticos no directamente relacionados con la presencia de integrones, como la ampicilina o la tetraciclina, (80,9% y 63,1%, respectivamente). Por otra parte, todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima e imipenem. Cuarenta

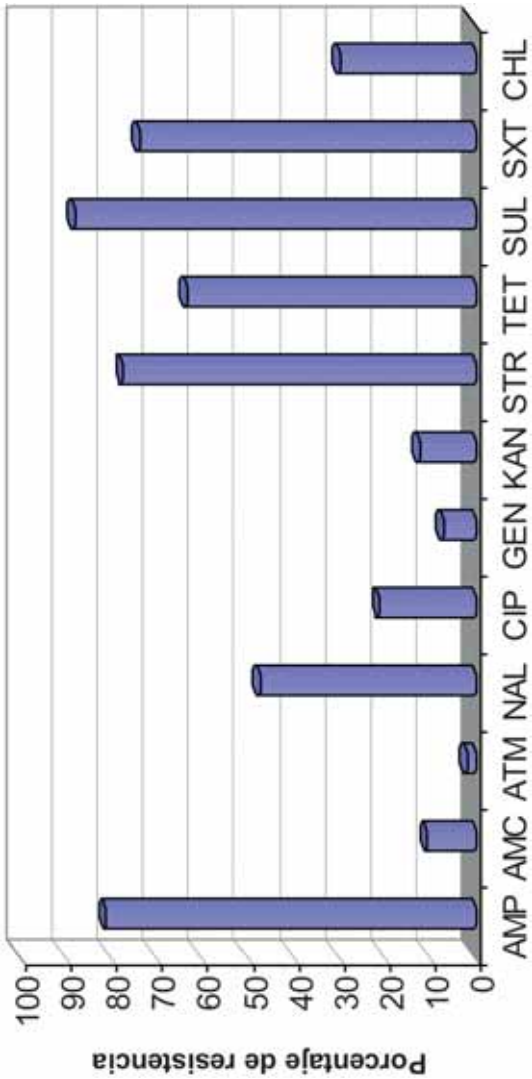


Figura 4. Porcentajes de resistencia detectados en los 57 aislados clínicos integrón-positivos. Todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima e imipenem. AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-acido clavulánico, ATM: aztreonam, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, STR: estreptomicina, TET: tetraciclina, SUL: sulfamidas, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol.

y nueve aislados (86%) presentaron un fenotipo de multirresistencia, es decir, fueron resistentes a tres o más familias de antibióticos diferentes.

En cuanto a los aislados procedentes de alimentos, los porcentajes de resistencia correspondientes a los dos períodos de tiempo se representan en la figura 5. Se presentan por separado los aislados obtenidos en placas con o sin suplemento de CTX en el segundo período de estudio. Los mayores porcentajes de resistencia detectados en ambos períodos se observaron para sulfamidas, estreptomicina, tetraciclina, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol. Los aislados del primer período fueron más resistentes a gentamicina, kanamicina y a cloranfenicol. Sin embargo, los aislados del segundo período fueron más resistentes a los beta-lactámicos (ampicilina, amoxicilina ácido clavulánico, aztreonam, cefotaxima y cefoxitina), a quinolonas y a estreptomicina. En los aislados seleccionados en placas con CTX, se observaron elevados porcentajes de resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y tetraciclina. Se detectó un fenotipo de multirresistencia en 13 de los 14 aislados (92,8%) del primer período y en todos los aislados del segundo período. Sin embargo, todos los aislados procedentes de alimentos fueron sensibles a imipenem y amikacina.

En este estudio se demuestra que existe una gran asociación entre la presencia de integrones y el fenotipo de multirresistencia en aislados de *E. coli* tanto de origen clínico como alimentario. La estructura clásica de un integrón de clase 1 y la presencia de dos casetes génicos implicados en la resistencia a dos familias de antibióticos diferentes, ya supone que la bacteria que lo porte sea resistente a tres familias antimicrobianas. De ahí la importancia de estas estructuras genéticas como vehículo de diseminación de multirresistencia antibiótica.

4. CONCLUSIONES

El uso intensivo de antibióticos en medicina, veterinaria o agricultura ha originado que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia frente a dichos agentes terapéuticos. Como hemos observado en este trabajo, no sólo los aislados de *E. coli* obtenidos de infecciones urinarias presentan un fenotipo de multirresistencia a antibióticos asociado a una amplia variedad de genes de resistencia, principalmente localizados en elementos genéticos como los integrones, sino que los alimentos crudos de origen animal también pueden portar aislados de *E. coli* multirresitentes, lo que supone un importante problema de salud humana y animal.

Los integrones son elementos genéticos capaces de reconocer y capturar genes de resistencia a antibióticos que pueden ser movilizados en transposones o plásmidos para diseminarse entre bacterias diferentes. Los integrones le confieren ventajas selectivas a la bacteria portadora, ya que en su estructura pueden incorporar casetes génicos implicados en resistencia a antibióticos como las sulfamidas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, o trimetoprim, entre otros, y permitir así que la bacteria adquiera multirresistencia. Las combinaciones de casetes génicos observadas en los integrones de clase 1 entre las cepas de dife-

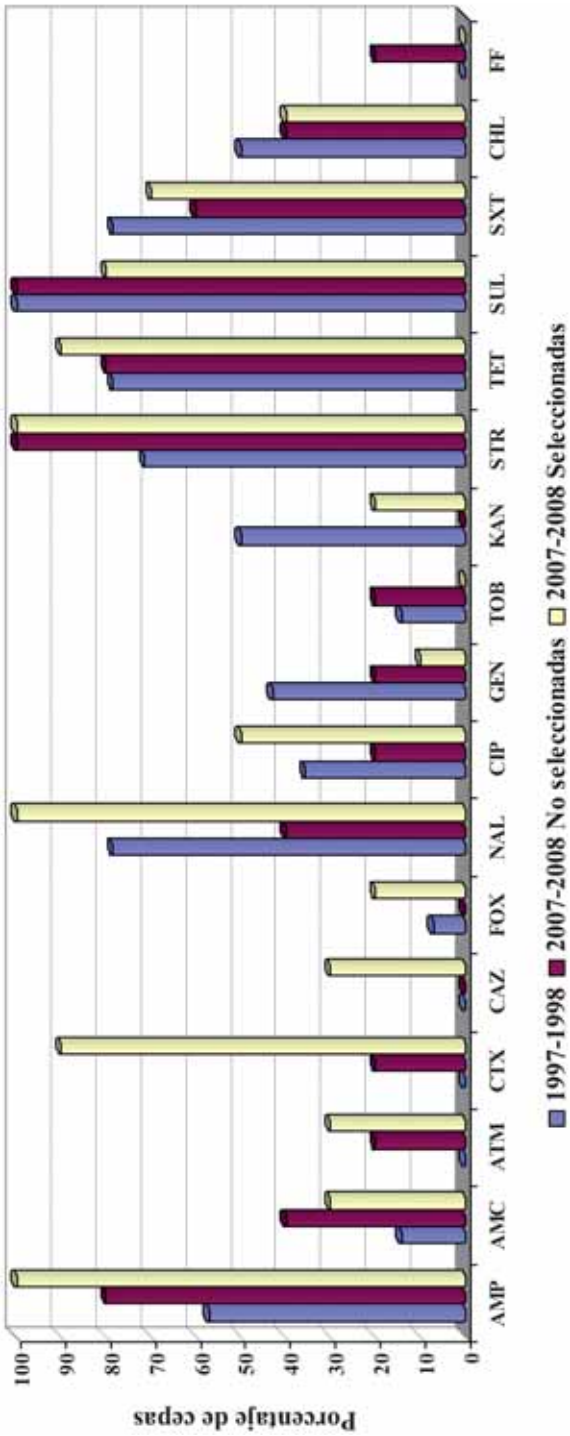


Figura 5. Porcentajes de resistencia detectados en los aislados alimentarios integrón-positivos recogidos en dos períodos de tiempo. Todos los aislados fueron sensibles a amikacina e imipenem.

AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-acido clavulánico, ATM: aztreonam, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FOX: cefoxitina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, KAN: kanamicina, STR: estreptomicina, TET: tetraciclina, SUL: sulfamidas, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, FF: fosfomicina.

rentes orígenes presentan mayor variabilidad que las combinaciones de los integrones de clase 2. Este hecho puede deberse, muy probablemente, tanto por la mayor frecuencia de los integrones de clase 1 detectada en este y en otros trabajos, que favorece la diseminación de los casetes génicos que portan, como a la inactividad de las integrasas de tipo 2.

La emergencia y diseminación de bacterias multirresistentes en diferentes ecosistemas es un problema de salud pública que exige abordarlo desde un enfoque multidisciplinar analizando en profundidad todos los factores que están contribuyendo a aumentar este problema. El uso racional de los antibióticos en todos los ámbitos es una prioridad, así como la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones.

BIBLIOGRAFÍA

Antunes, P., Machado, J., Peixe, L. (2007). Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with unusual 3'conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51 (4), 1545-1548.

Betteridge, T., Partridge, S. R., Iredell, J. R., Stokes, H. W. (2011). Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrob. Agents Chemother*. 55(8), 3939-3943.

Cambray, G., Guerout, A. M., Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44, 141-166.

Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, E., Da Re, S., González-Zorn, B., Ploy, M. C., Barbé, J., Mazel, D., Erill, I. (2011). Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob. DNA.* 2(1), 6.

Chang, C. Y., Fang, Y. T., Tsai, S. M., Chang, L. L., Yu, W. L. (2009). Characterization of class 1 integrons and gene cassettes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65 (2), 214-216.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth Informational Supplement Approved standard M100-S17. CLSI, Wayne, PA, USA.

Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., Piffaretti, J. C. (2007). Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50(1), 126-32

Fluit, A. C., Schmitz, F.-J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 272-288.

Hall, R. M., Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15(4), 593-600.

Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., Roy, P. H. (2002). IntI2 integron integrase in Tn*7*. *J Bacteriol.* 184(6), 1712-1721.

Labbate, M., Case, R. J., Stokes, H. W. (2009). The integron/gene cassette system: an active payer in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* 532, 103-125.

Larouche, A., Roy, P. H. (2011). Effect of *attC* structure on cassette excision by integron integrases. *Mob. DNA.* 2, 3.

Lévesque, C., Roy, P. H. (1993). PCR analysis of integrons, pp. 590-594. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, T. J. White (eds.), Diagnostic Molecular Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Liu, J., Keelan, P., Bennett, P. M., Enne, V. I. (2009). Characterization of a novel macrolide efflux gene, *mef*(B), found linked to *sul3* in porcine *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 423-426.

Madsen, L., Aarestrup, F. M., Olsen, J. E. (2000). Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella Typhimurium*. *Vet. Microbiol.* 75, 73-82.

Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 608-620.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1568-1574.

Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757-784.

Perreten, V., Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1169-1172.

Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3996-4001.

Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C. (2010). Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet. Microbiol.* 144(3-4), 493-497.

Soufi, L., Abbassi, M. S., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C. (2009). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in

Escherichia coli isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(9), 1067-1073.

Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3, 1-13.

Stokes, H. W., Hall, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 1669-1683.

Sunde, M. (2005). Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 1019-1024.

Toleman, M. A., Vinodh, H., Sekar, U., Kamat, V., Walsh, T. (2007). *bla*VIM-2- harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2636-2638.

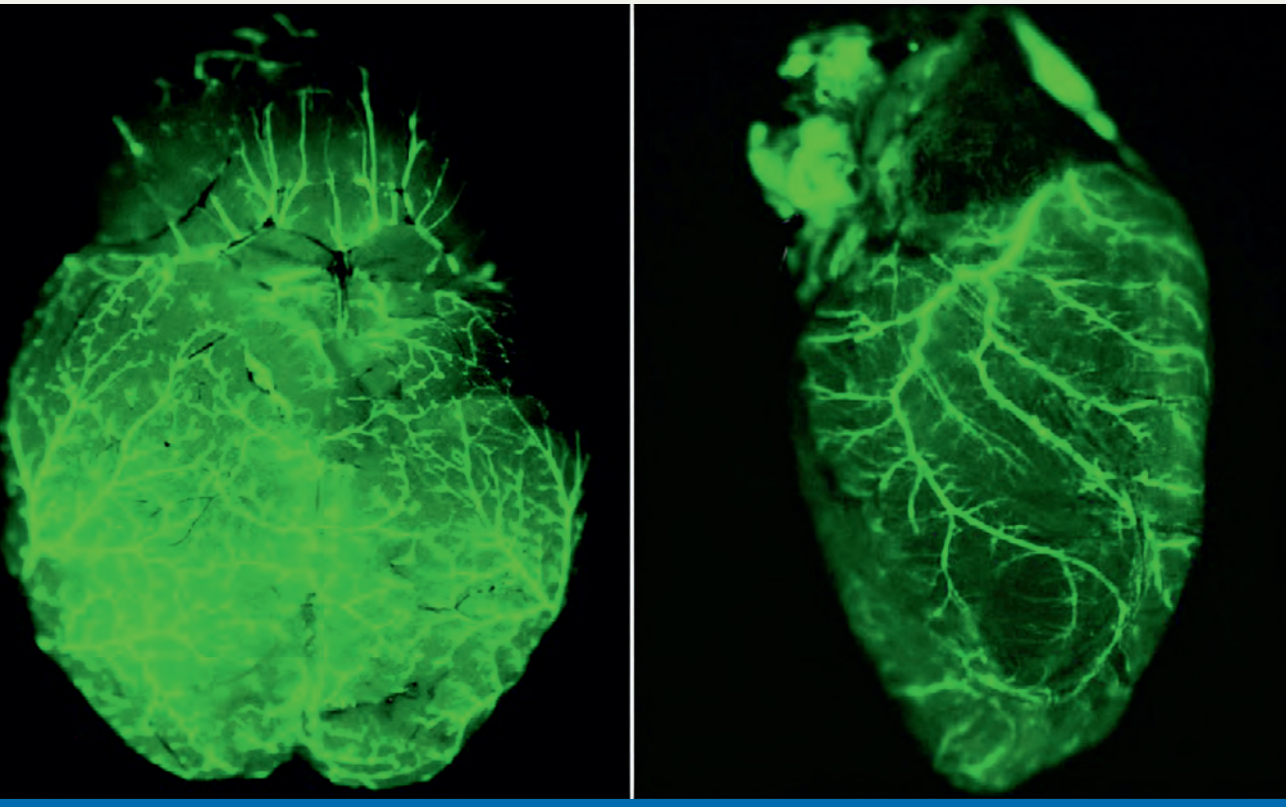
Trobos, M., Jakobsen, L., Olsen, K. E., Frimodt-Møller, N., Hammerum, A. M., Pedersen, K., Agersø, Y., Porsbo, L.J., Olsen, J.E. (2008). Prevalence of sulphonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli* isolates obtained from broilers, broiler meat, healthy humans and urinary infections in Denmark. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 32, 367-369.

Vinué, L., Jové, T., Torres, C., Ploy, M. C. (2011). Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38, 526-529.

Vinué, L., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Olarte, I., Undabeitia, E., Somalo, S., Zarazaga, M., Torres, C. (2010). Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35, 492-496.

Vinué, L., Sáenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M. A., Ruiz-Larrea, F. Torres C. (2008). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 934-937.

White, P. A., McIver, C. J., Rawlinson, W. D. (2001). Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2658-2661.



ZUBÍA

24

9 771131 542004 00024

Gobierno de La Rioja
www.larioja.org

Instituto
de Estudios
Riojanos