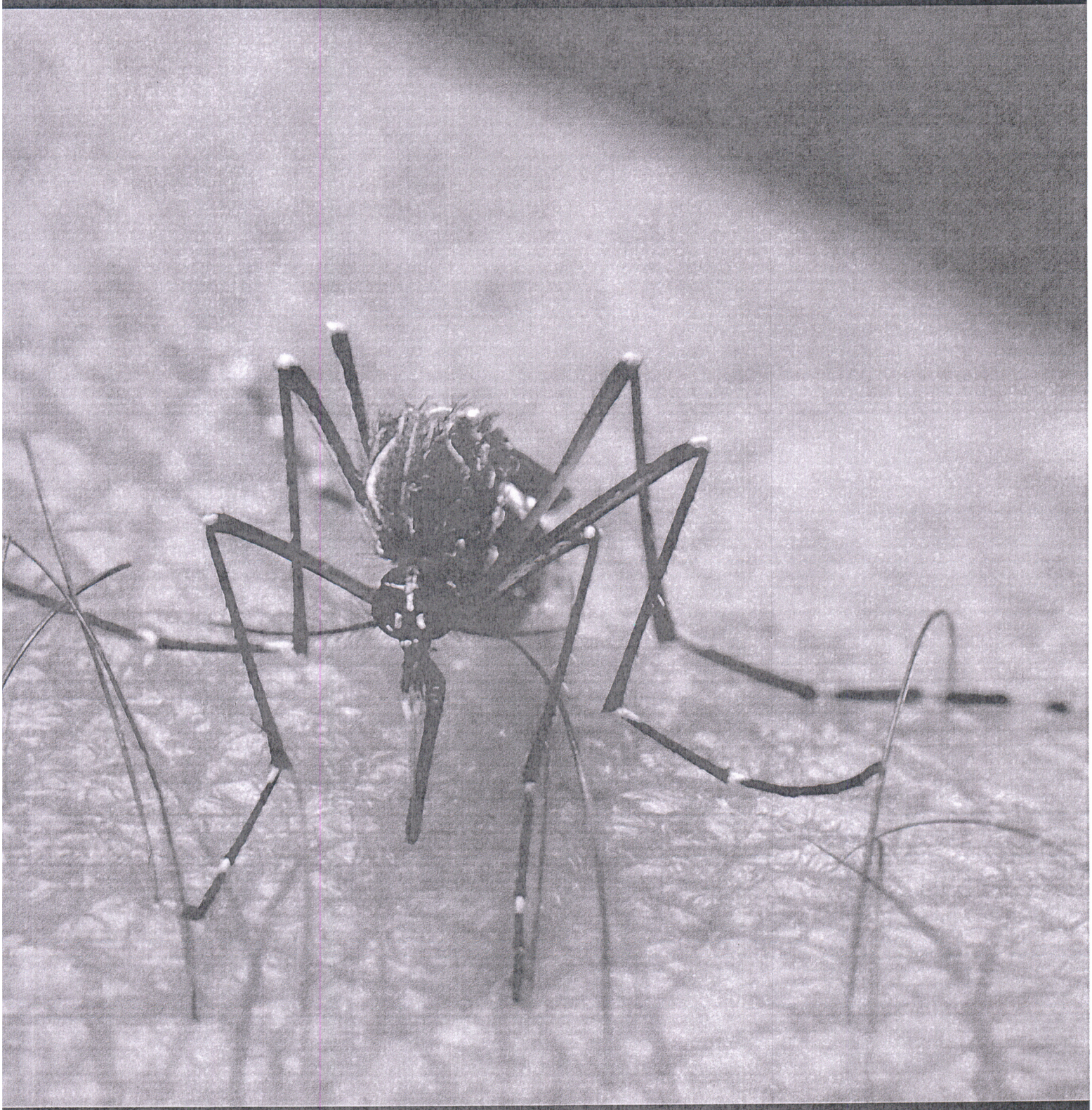
ISSN 2477-9115
ISSN 2477-9148

REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

REMCB



VOL. XXXVII - Nº 2 - NOVIEMBRE 2016

www.remcb.com

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen XXXVII Número 2 - Noviembre 2016
Version Impresa ISSN 2477 - 9113
Version Digital ISSN 2477 - 9148

Centro de Publicaciones de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Dir: Av. 12 de Octubre 1076 y Roca, Quito, Ecuador

Corrección de estilo: Alfonso Sánchez

Diseño y diagramación:



Fotografía de portada: Esteban Baus / CIEIC
Mosquito *Aedes aegypti* hembra, alimentándose de sangre humana, considerada una de las especies de insecto vector de mayor importancia para la salud pública a nivel global.

Version impresa ISSN 2477-9113
Version electronica ISSN 2477-9148

REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLOGICAS
Volumen 37. No. 2, Noviembre 2016

Caracterización de la región variable de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes

María Fernanda Yauri[1]✉, Iliana Alcocer[1], Mercedes Rodríguez-Riglos[1]

[1] Laboratorio de Microbiología, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

✉ mfyaurib@puce.edu.ec

Recibido 01-07-2016, Aceptado 26-08-2016

RESUMEN.- Los integrones son estructuras observadas con frecuencia en bacilos Gram negativos, especialmente entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Se estudió la presencia de integrones clase 1 y su relación con la resistencia bacteriana. La presencia de integrones fue estudiada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación. Se analizaron treinta aislados resistentes a carbapenemes de *Klebsiella pneumoniae* que fueron positivos para el gen de la integrasa 1 *(intI1)*. En veintiseis de estos aislados se amplificaron regiones variables de alrededor de 2 000 pares de bases. El patrón común de genes obtenidos mediante el análisis de estas regiones fue *(dfrA12 - orfF - aadA2)*. La presencia de estas plataformas que promueven la diversidad genética provee a las bacterias de resistencia a una amplia gama de antibióticos. La alta prevalencia de integrones observadas entre estos aislados funciona como fuente de difusión de determinantes de resistencia.

PALABRAS CLAVES: carbapenemes,genes casete, integrones clase 1, *Klebsiella pneumoniae*, resistencia antibiótica.

ABSTRACT.- Integrons are structures frequently observed in Gram negative bacilli, especially among members of the Enterobacteriaceae family. The presence of class 1 integron and the relationship with bacterial resistance were studied. The integron presence was investigated by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Thirty carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates were analyzed and were positive for the *intI1* gene. Twenty six of these isolates amplified variable regions about 2000 base pairs. The common pattern of genes was *(dfrA12-OrfF-aadA2)*. The presence of these platforms that promote genetic diversity gives resistance a broad range of antibiotics. The higher integron prevalence in this isolates functions as source for dissemination of resistance determinants.

KEYWORDS: antibiotic resistance, carbapenems, class 1 integrons, gene cassette, *Klebsiella pneumoniae*.

INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae es un patógeno relacionado con infecciones adquiridas en la comunidad y el ambiente hospitalario, afectando especialmente a pacientes inmunocomprometidos. La capacidad de colonización, formación de biopelículas y adquisición de genes de resistencia a antibióticos por transferencia genética lateral (TGL), facilitan a *Klebsiella pneumoniae* persistir y propagarse rápidamente en el entorno hospitalario y mantenerse en la comunidad (Brat *et al*. 2010).

Klebsiella pneumoniae productora de carabpenemasa (KPC) es un grupo de bacterias emergentes altamente resistentes a antibióticos comúnmente empleados en el tratamiento de infecciones graves producidas por bacilos Gram negativos (Li *et al*. 2013). Las infecciones producidas por este tipo de aislados representan un reto terapéutico, sobre todo en el tratamiento empírico inicial. Esto conlleva a un incremento de las tasas de morbilidad y mortalidad entre los pacientes que las adquieren. Además, el costo adicional requerido para su tratamiento representa una importante carga económica a los diferentes sistemas de salud (Pacheco *et al*. 2014).

Las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de enzimas KPC se han convertido en un problema cada vez mayor alrededor del mundo, desde su primer reporte hace más de una década (Yigit *et al*. 2001). La producción de estas enzimas confiere a la bacteria resistencia contra todos los antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos e incluso carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem). Este último grupo es importantes en el

tratamiento de bacterias resistentes gracias a su amplio espectro de acción y resistencia a enzimas que hidrolizan antibióticos (Márquez *et al.* 2014).

Las bacterias son capaces de desarrollar o adquirir otros importantes mecanismos de resistencia, que pueden relacionarse entre sí y son: sistemas de expulsión del antibiótico por medio de bombas de flujo, alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática (a través de porinas) y modificación del sitio blanco de acción (por mutación) (Galdiero *et al.* 2010, Martínez-Martínez & Calvo 2010).

Los integrones son elementos genéticos de ADN provistos de un sistema de recombinación sitio-específica que permite integrar y movilizar genes. Esta estructura genética se encuentra formada por dos segmentos conservados, separados por una región variable. Los integrones se caracterizan por su capacidad de capturar genes que codifican: determinantes de resistencia a antibióticos, nuevas funciones bioquímicas o factores de virulencia. Los integrones no son móviles por sí mismos, pero con frecuencia se encuentran asociados a elementos genéticos móviles como son los transposones o plásmidos conjugativos. Esta relación garantiza su fácil transferencia a diferentes bacterias (Martínez *et al.* 2009).

Los integrones clase 1 presentan el gen de la integrasa 1 *(intI1)* y un sitio de unión (att1) que captura y expresa los genes casete que adquiere (Figura 1). El extremo conservado 3'-CS contiene los genes *qacEΔ1 y sul1*, que confieren resistencia a desinfectantes, compuestos de amonio cuaternario (QAC) y sulfonamidas (Wan & Chou 2015).

Los integrones se caracterizan por diseminarse ampliamente entre bacterias Gram negativas miembros de la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos como *Vibrio cholerae y Pseudomonas aeruginosa*. Los integrones poseen más de un gen de resistencia que se relaciona con el surgimiento de bacterias multidrogo resistentes (MDR). Esta característica ha sido observada en bacterias entéricas como *Klebsiella pneumoniae* (Khoramrooz *et al.* 2016).

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia y composición genética de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio.- Se seleccionaron 30 aislados resistentes a uno de los tres carbapenémicos empleados en la práctica clínica (meropenem, imipenem, ertapenem). Los 30 aislados de *Klebsiella pneumoniae* se obtuvieron a partir de muestras clínicas de pacientes atendidos en diferentes casas de salud de las ciudades de Quito y Guayaquil. El período de selección de los aislados fue comprendido entre noviembre 2012 a abril 2013. Los aislados bacterianos fueron conservados en congelación y forman parte de la Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas (Tabla 1).

Identificación Fenotípica de *Klebsiella pneumoniae*.- La identificación de la especie *(Klebsiella pneumoniae)* caracterizó a los aislados a base de su perfil de degradación de sustratos. A partir de colonias aisladas en placas de agar EMB (Eosina Azul de Metileno) se selecciona-

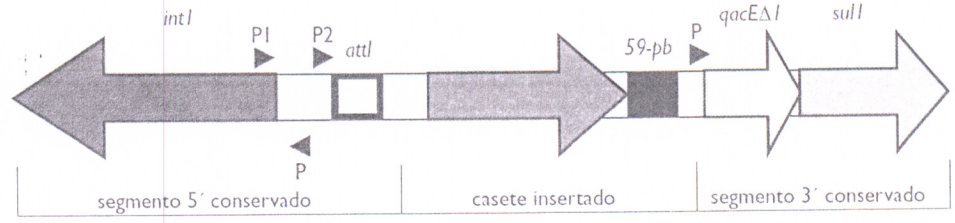


Figura 1. Estructura general de integrones clase 1: La plataforma génica se encuentra constituida por una región variable (casete) flanqueada por regiones conservadas, denominadas 5´CS y 3´CS. En la región 5´CS se localiza el gen de la integrasa, *intI1*, la región de recombinación attI y los promotores (P). Los promotores P1 y P2 permiten la transcripción de los genes que ingresan en la región variable. Hacia la región 3´CS se encuentran los genes de resistencia a antisépticos y desinfectantes qacEΔ1 y un gen de resistencia a sulfonamidas sul1.

La importancia de los integrones clase 1, en la dinámica de la resistencia bacteriana, se debe a su íntima relación con genes que generan resistencia. En esta clase se han identificado más de 100 diferentes arreglos directamente relacionados con una gran variedad de mecanismos de resistencia a casi todas las familias de antibióticos adquiridos en forma de casetes génicos (Conza & Gutkind 2010).

ron colonias grandes, rojas y de consistencia mucoide, características propias del género *Klebsiella*. A partir de estas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para su identificación fenotípica: Citrato de Simmons, Triple Azúcar y Hierro (TSI), Motilidad Indol Ornitina (MIO), Motilidad Indol Lisina (MILI), Rojo de Metilo (RM), Voges-Proskauer (VP), Fenilalanina (FA) y Urea. Todas las pruebas fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

Tabla 1. Datos y origen de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* analizados en este estudio.

Código CB-QCA	Fecha de aislamiento	Ciudad	Sexo	Origen de la muestra
3501	24/9/12	GYQ	F	Colección Intrabdominal
3502	24/9/12	GYQ	M	Hemocultivo
3503	24/9/12	GYQ	M	Líquido peritoneal
3504	24/9/12	GYQ	F	Urocultivo
3505	24/9/12	GYQ	F	Líquido peritoneal
3508	24/9/12	GYQ	F	Aspirado traqueal
3509	9/9/12	GYQ	F	Punta de catéter
3510	9/9/12	GYQ	M	Secreción herida
3511	9/9/12	GYQ	F	Secreción bronquial
3513	21/8/12	GYQ	F	Secreción herida
3514	14/9/12	GYQ	F	Urocultivo
3517	30/10/12	QUI	M	Sonda vesical
3518	30/10/12	QUI	F	Punta de catéter
3519	30/10/12	QUI	M	Aspirado traqueal
3520	5/11/12	QUI	M	Sonda vesical
3521	5/11/12	QUI	M	Hemocultivo
3522	5/11/12	QUI	F	Secreción Herida
3523	5/11/12	QUI	F	Aspirado traqueal
3524	22/11/12	GYQ	F	Urocultivo
3525	22/11/12	GYQ	F	Urocultivo
3526	22/11/12	GYQ	M	Aspirado Traqueal
3527	10/12/12	QUI	F	Aspirado Traqueal
3528	14/12/12	GYQ	F	Sonda Vesical
3529	14/12/12	GYQ	M	Urocultivo
3530	14/12/12	GYQ	M	Secreción Herida
3531	14/12/12	GYQ	F	Sonda Vesical
3533	16/1/13	QUI	M	Secreción Herida
3537	24/1/13	QUI	M	Neonato
3541	10/4/13	QUI	M	Hemocultivo
3546	10/4/13	QUI	M	Urocultivo

Susceptibilidad a Antimicrobianos.- La sensibilidad antibiótica de los aislados bacterianos se determinó con el método de difusión en disco basado en la técnica de Kirby-Bauer, según las recomendaciones propuestas por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2015).

Los antibióticos carbapenémicos probados fueron: ertapenem (ETP), meropenem (MEM), imipenem (IPM), además de antibióticos empleados en el tratamiento de infecciones producidas por bacilos Gram negativos: ciprofloxacina (CIP), netilmicina (NET), cefepime (FEP), ácido nalidíxico (NA), cefoxitina (FOX), gentamicina (GM), aztreonam (ATM), tobramicina (NN), sulfametoxasol/trimetropin (SXT), amikacina (AN), ceftazidima (CAZ), estreptomicina (S), ampicilina (AM), ampicilina/sulbactam (SAM), cefazolina (CZ), ceftriaxona (CRO), levofloxacina (LEV), colistina (CT), nitrofurantoína (F) y piperacilina/tazobactam (PTZ).

El perfil de resistencia a la tigeciclina (TGC) y colistina (CO) fue determinado con el empleo de E-test para la obtención de concentración mínima inhibitoria (CMI). Los puntos de corte que determinaba la CMI para la Tigeciclina y Colistina fueron obtenidos del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2014).

Detección de genes que codifican KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa).- El ADN bacteriano fue obtenido mediante el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA, A1120) según las recomendaciones del fabricante.

En la detección del gen de resistencia a carbapenemes (bla_{KPC}) se diseñaron cebadores tomando en cuenta todas las variables alélicas descritas para el gen (Tabla 2).
La amplificación del gen se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) preparando soluciones con un volumen final de 25μl que contenían:

1μl de ADN templado, 1X de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA), 10μM de cada cebador y 9.5μl de agua de grado biología molecular para completar el volumen de la reacción.

El programa de amplificación se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 minutos de denaturación inicial, seguido por 25 ciclos que consistieron en un paso de denaturación del ADN a 95°C por 1 minuto, anillamiento de cebadores a 55.6°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, seguidos de una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Como control positivo se empleó 1 μl de ADN de la cepa control de *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen bla_{KPC}. La evidencia de la presencia de este gen corresponde a una banda de 738pb.

Detección de integrones Clase 1

Amplificación del gen de la Integrasa 1 *(intI1)*.- Para la amplificación y confirmación de la presencia de integrones clase 1 se emplearon los iniciadores intA e intB para la detección del gen de la Integrasa 1 *(intI1)*, descritos por Pitout *et al*. 2005 y detallados en la Tabla 2.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se prepararon reacciones de 25μl de volumen final que contenían: 1μl de ADN templado, 1X de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA), 10μM de cada cebador y 9.5μl de agua de grado biología molecular para completar el volumen de la reacción.

El programa de amplificación del ADN fue ejecutado en el termociclador GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial a 96°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos: denaturación a 96°C por 15 segundos, anillamiento de iniciadores a 56°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos, seguido de un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos.

El peso molecular de las bandas obtenidas se determinó con el empleo de un marcador de 100pb DNA Ladder Trackit (Invitrogen). Como control positivo se empleó la cepa CB-QCA 16 de *Pseudomonas aeruginosa* positiva a la presencia de integrones y como control negativo fue empleada agua de grado molecular.

Digestión con endonucleasa *Sph*I.- La autenticidad de los productos de amplificación del gen de la integrasa 1 *(intI1)* se confirmó con el empleo de la enzima de restricción *Sph*I (Promega). La digestión parcial de los productos de amplificación originó dos fragmentos de 393pb y 499pb (Vo *et al*. 2010).

La digestión se realizó colocando 1.5 unidades de la enzima *Sph*I a 20μl de producto de amplificación. La mezcla fue incubada a 37°C durante 3 horas.

Los productos de amplificación y el resultado de la digestión fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%, a 10V/cm, corridos por una hora y empleando tampón TBE 0.5X.

Amplificación de la región variable de integrones Clase 1.- Para la amplificación de la Región Variable se emplearon los iniciadores 5'CS y 3'CS, descritos por Pitout et al. 2005 y detallados en la Tabla 2.

Como control negativo se empleó agua de grado biología molecular. La reacción en cadena de polimerasa consistió de un volumen final de 25μl que contenía: 1μl de ADN templado, 1X de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA), 10μM de cada cebador y 9.5μl de agua de grado biología molecular para completar el volumen de la reacción.

El programa de amplificación se llevó a cabo en el termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G y consistió de una denaturación inicial a 96°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de denaturación a 96°C por 15 segundos, anillamiento a 56°C por 20 segundos, con extensión a 70°C por 20 segundos y una extensión final a 70°C por 5 minutos. La visualización de los productos

Tabla 2. Iniciadores utilizados en la caracterización genotípica de *Klebsiella pneumoniae*.

Primers	Secuencia 5'-3'	Gen
bla_{KPC} F	CGGAACCATTCGCTAAACTC	*bla* $_{KPC}$
bla_{KPC} R	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT	*bla* $_{KPC}$
intA	ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG	*intI* 1
intB	GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC	*intI* 1
5' CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	5'CS
3' CS	AAGCAGACTTGACCTGA	3'CS

obtenidos por amplificación siguió los parámetros descritos anteriormente.

Purificación, Secuenciamiento y Análisis de los Productos de Amplificación por PCR.- Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de la región variable de integrones clase 1 fueron purificados a partir de geles de agarosa empleando el Kit de purificación Wizard® SV Gel PCR Clean-up System (Promega) según las especificaciones del fabricante. Los elementos purificados fueron colocados en tubos estériles de 1.5ml en un volumen de 20μl por muestra y secuenciados por la compañía Macrogen Corea.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas y analizadas en el programa Geneious Pro 5.6.4. y comparadas con secuencias de la base de datos NCBI-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nhi.gov).

Caracterización molecular por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).- Los aislados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* fueron tipificados con la técnica de Campo Pulsado. El ADN total de los aislados fue digerido con la enzima *Xba*I según el protocolo estandarizado para *Escherichia coli* descrito en http://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf.

Análisis Estadístico.- El análisis porcentual de los resultados se realizó mediante el empleo de Microsoft Office Excel 2010 (© 2010 Microsoft Corporation).

RESULTADOS

Población de Estudio.- De los 30 aislados resistentes a carbapenemes, 6 (20%) procedieron de urocultivos, 5 (17%) aspirado traqueal, 5 (17%) secreción de herida, 4 (13%) sonda vesical, 3 (10%) hemocultivo, 3 (10%) punta de catéter, 2 (7%) líquido peritoneal, 1 (3%) secreción bronquial y 1 (3%) colección intraabdominal (Figura 2).

Susceptibilidad a Antimicrobianos.- La susceptibilidad antibiótica fue interpretada a través de los puntos de corte establecidos por el CLSI, 2015 para cada uno de los antibióticos probados.

Los 30 aislados fueron resistentes a los 3 carbapenémicos probados: imipenem, meropenem, ertapenem; y a los 20 antibióticos restantes.

La determinación de la CIM para la tigeciclina con la técnica de E-test mostró que 7/30 aislados fueron resistentes a este antibiótico. En la determinación de la CIM para colistina con la técnica de E-test, un solo aislado

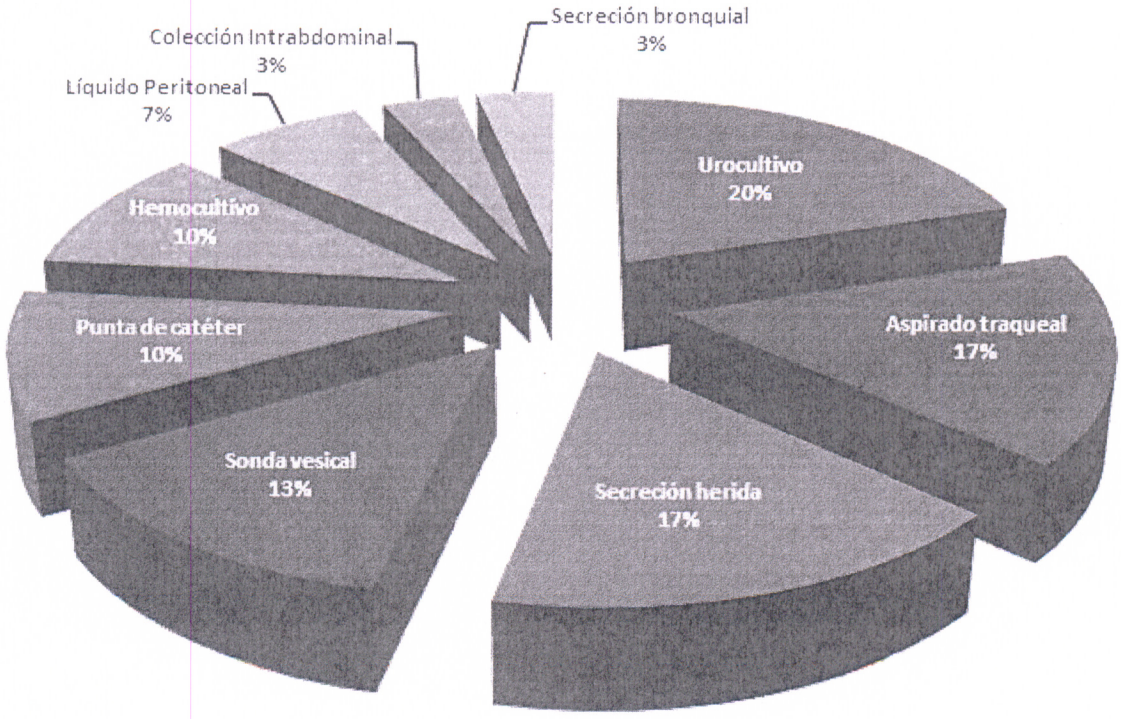


Figura 2. Distribución porcentual del origen de las muestras de los aislados de *Klebsiella pneumoniae*

mostró un CIM de 4µg/ml, considerándose resistente a este antibiótico según el Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2014).

Detección de genes que codifican KPC *(Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa).- En todos los aislados estudiados se amplificó un fragmento de aproximadamente 738pb correspondiente al gen bla_{KPC}, que codifica la enzima KPC *(Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) (Figura 3). La variante alélica del gen correspondió a KPC 2 y fue determinada por medio de secuenciamiento.

Amplificación del gen de la Integrasa 1 (intI1).- *El* gel *intI1* fue identificada en los 30/30 (100%) aislados analizados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes. Con el análisis electroforético se identificó una banda de aproximadamente 890pb que corresponde al peso molecular identificado del gen codificante *(intI1)* característico de integrones clase 1.

Digestión con endonucleasa *Sph*I.- La digestión de los productos de PCR del gen *intI1* confirmó la identidad de la integrasa 1. El producto de la digestión evidenció la presencia de dos bandas. Se puede observar una banda de aproximadamente 890pb que corresponde a la amplificación del gen *IntI1*. Las dos bandas adicionales obtenidas de peso molecular de 500 y 390pb. respectivamente corresponden al resultado de la digestión con la enzima de restricción *Sph*I.

Amplificación de la región variable de integrones Clase 1.- De los 30 aislados analizados, 26/30 (87%) presentaron una banda de aproximadamente 2 000 pares de bases, resultado de la amplificación de la región variable de integrones clase 1. Los 26 aislados mostraron la presencia de una sola banda.

Caracterización de integrones Clase 1.- Los productos de amplificación de aproximadamente 2 000 pares de bases fueron analizados mediante secuenciamiento. Los 26 aislados analizados mostraron un solo tipo de arreglo de genes casete en la región variable de integrones clase 1, en la combinación *(dfrA12-orfF-aadA2)*.

Caracterización Molecular por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).- La tipificación molecular determinó un solo patrón clonal compuesto de 26 aislados. La relación clonal del grupo fue del 98 % de similitud (Figura 3).

DISCUSIÓN

La presencia de integrones clase 1 en el 100% de los aislados estudiados revela la importancia de estos elementos genéticos en la diseminación de la resistencia. Los integrones son importantes plataforma genéticas provistos de casetes génicos móviles que difunden genes de resistencia a múltiples familias de antibióticos, entre diferentes aislados bacterianos (Wan & Chou 2015).

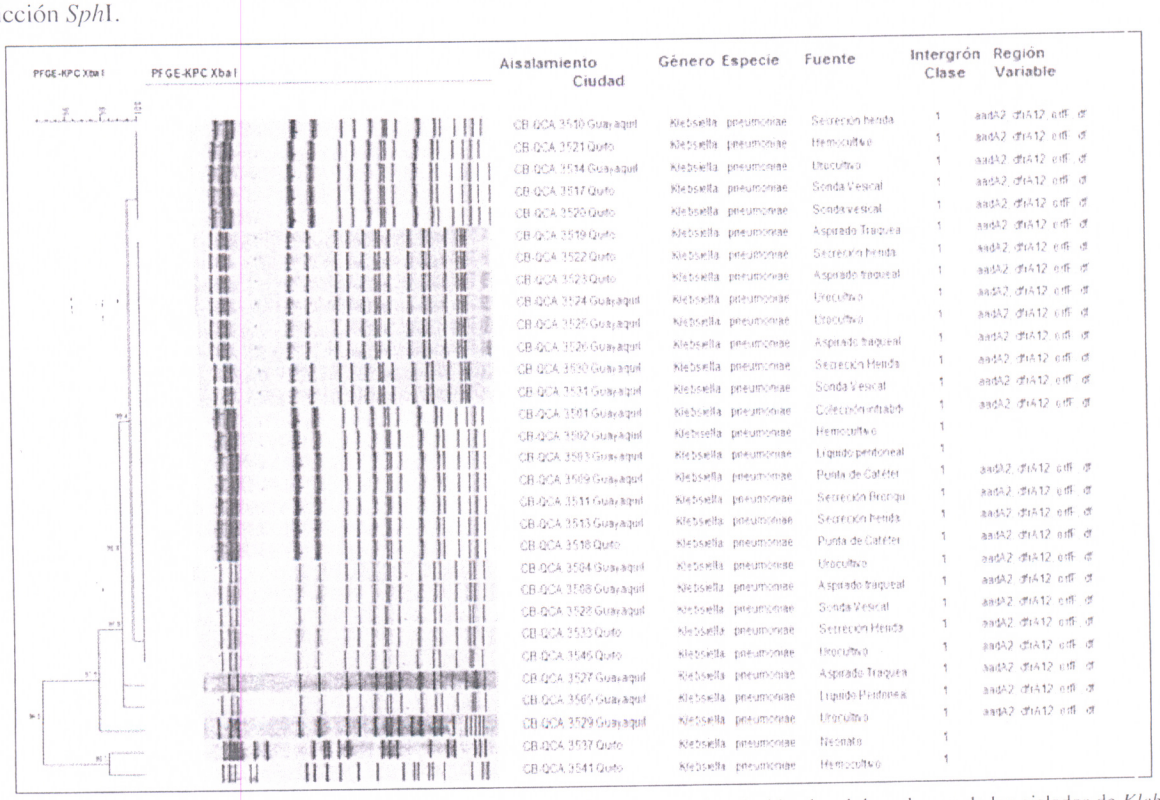


Figura 3. Dendrograma obtenido con el programa BioNumerics 7.0 donde se observa la relación clonal de cada uno de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de KPC-2, la ciudad de procedencia, el origen clínico de la muestra, la presencia de Integrón clase 1 y los genes casete presentes en la región variable de este tipo de integrones.

El 87% (26/30) de los aislados amplificaron regiones variables (RV) sobre las 1000pb. El análisis de las secuencias amplificadas demostró el predominio de 3 casetes génicos: *dfrA12, orfF y aadA2*. El análisis también demostró una composición y disposición idéntica de genes entre los diferentes aislados estudiados.

El gen *dfrA12* codifica la enzima dehidrofolato reductasa que confiere resistencia a trimetroprim, un antibiótico bacteriostático derivado de la trimetoxibenzilpirimidina y empleado en el tratamiento de infecciones urinarias. Se combina comúnmente con sulfametoxazol para incrementar su espectro de acción.

El gen *orfF* es un gen casete cuyo producto es una proteína hipotética, con función desconocida (Li *et al*. 2013).

El gen *aadA 2* corresponde a un gen casete asociado a plásmidos pSa. Este gen codifica la enzima aminoglucósido adeniltransferasa que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina. Ambos pertenecen a la familia de los antibióticos aminoglucósidos. La estreptomicina es de gran importancia en el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis* y la espectinomicina es empleada en el tratamiento de la gonorrea (Li *et al*. 2013).

La elevada prevalencia de integrones clase 1 en aislados multirresistentes, no solo favorece la transmisión de la resistencia, sino también baja sensibilidad a desinfectantes, antisépticos y sulfonamidas. Los genes casete: *aadA2, dfr12 y orfF* identificados en la región variable de los 26 aislados son los genes casetes más frecuentemente identificados y reportados en el interior de integrones clase 1 (Shahcheraghi *et al*. 2014). Se han identificado más de 130 diferentes genes casete que contienen diversos genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos como betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, macrólidos, sulfonamidas, trimetroprim, eritromicina y rifampicina (Hou *et al*. 2015).

Los integrones clase 1 examinados en este estudio no representaron el fenotipo de resistencia obtenidas mediante las pruebas de difusión en disco observados en los aislados de *Klebsiella pneumoniae*. El análisis de las secuencias amplificadas de la región variable de integrones clase 1 no encontró relación alguna con genes codificantes de BLEE, Serin-β-lactamasas o Metalo-β-lactamasas (Li *et al*., 2013). Esto podría reflejar la presencia de otros elementos genéticos móviles o mecanismos de resistencia asociados que no fueron detectados en la regiones variables (RV) analizadas.

CONCLUSIONES:

La detección molecular de integrones clase 1 demostró una elevada presencia de estos elementos genéticos, generalmente asociados a la resistencia bacteriana. De los 30 aislados que amplificaron el gen de la integrasa 1 *(intI1)*, únicamente 26 aislados amplificaron regiones variables asociados a este tipo de integrones.

La determinación de los casetes génicos insertados en la región variable de los integrones clase 1 mostró que los genes que codifican enzimas que hidrolizan betalactámicos (betalactamasas) no estaban insertos en esta región. Los genes que predominaron en la región variable amplificada de los 26 aislados fueron: *dfrA12-orfF-aadA2*. Estos genes son también importantes porque contribuyen al incremento de las tasas de resistencia bacteriana contra otros grupos de antibióticos y desinfectantes.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, en especial a la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito por el financiamiento para el desarrollo del presente estudio, así como por la facilidad de las instalaciones donde se llevó a cabo la investigación. Este estudio fue realizado con fondos del Proyecto "Genotipaje de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas" (Código G13034) financiados por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brat S, Tulane P, Karumudi U, Quale J, *et al*. 2010. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumonia* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56:** 128-132.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S2

Conza D, Gutkind G. 2010. Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología* **42**: 63-78.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versión 4.0.

Galdiero S, Falanga A, Cantisani M., Tarallo R, Pepa MED, D'Oriano V and Galdiero, M. 2012. Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. Current Protein & Peptide Science 13(8), 843–854. http://doi.org/10.2174/138920312804871120

Hou, X., Song, X., Ma, X., Zhang, S., & Zhang, J. 2015. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. Brazilian Journal of Microbiology 46(3), 759–768. http://doi.org/10.1590/S1517-838246320140138

Khoramrooz, S., Sharifi, A., Yazdanpanah, M., Hosseini, S., Emaneini, M., Gharibpour, F., Khosravani, S. 2016. High Frequency of Class 1 Integrons in *Escherichia coli* Isolated From Patients With Urinary Tract Infections in Yasuj, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal* **18**(1):e26399.

Li B, Hu Y, Wang Q, Yi Y, Woo P, Jing H and Liu C. 2013. Structural Diversity of Class 1 Integrons and Their Associated Gene Cassettes in Klebsiella pneumoniae Isolates from a Hospital in China. *PLoS ONE* **8**(9): e75805.

Márquez C, Ingold A, Echeverría N, Acevedo A, Vignoli R, García-Fulgueiras V and Galiana A. 2014. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization. *New Microbes and New Infections* **2**(3), 58–63. http://doi.org/10.1002/nmi2.40

Martínez-Martínez L and Calvo J. 2010. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos Gram negativos: situación actual. Enfermedades *Infecciosas y Microbiología Clínica* **28**, Supplement 2, 25–31. http://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70027-6

Martínez-Romero E, Garza-Ramos U and Silva-Sánchez J. 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México* **51**: 439-446.

Pacheco R, Osorio L, Correa A y Villegas M. 2014. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen blaKPC en hospitales de Colombia. Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones. *Biomédica* **34**(1): 81-90.

Pitout J, Gregson D and Poirel L. 2005. Detection of Pseudomonas aeruginosa producing Metallo-β-Lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (7): 3129-3135.

Shahcheraghi F, Rahmati G, Nobari S, Torabi E, Mousavi S, Aslani FM and Shahcheraghi F. 2014. Identification and characterization of class 1 integrons among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age. *Iranian Journal of Microbiology* **6**(3), 156–162.

Vo A, van Duijkere, E, Gaastra W and Fluit A. 2010. Antimicrobial Resistance, Class 1 Integrons, and Genomic Island 1 in *Salmonella* Isolates from Vietnam. *PLoS ONE* **5**(2), e9440.

Wan M and Chou Ch. 2015. Class 1 Integrons and the Antiseptic Resistance Gene (qacEΔ1) in Municipal and Swine Slaughterhouse Wastewater Treatment Plants and Wastewater—Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**: 6249-6260.

Yigit H, Queenan A, Anderson M, Domenech-Sanchez G, Biddle A, Steward J and Tenover F. 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem - Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(4), 1151–1161. http://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001