

Integrone y *cassettes* genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos

Gerardo González R^{1a}, Sergio Mella M², Raúl Zemelman Z^{3b}, Helia Bello T^{1c}, Mariana Domínguez Y^{1c}.

Integrone and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials

Bacteria have developed sophisticated and successful genetic mechanisms to evade the action of antimicrobials. Bacterial multiresistance has caused serious problems in the treatment of nosocomial infections. Integrone and gene cassettes are considered the main genetic elements in the evolution of plasmids and transposons that actively participate in the mobilization of genes, codifying different bacterial resistance mechanisms. This article reviews the historical and structural aspects of integrone and resistance gene cassettes and the presence of these structures in Gram negative bacteria isolated from Chilean hospitals in the last ten years (Rev Méd Chile 2004; 132: 619-26).

(Key Words: Gene cassettes; Gram-Negative bacterial infectious; integrone; Microbial sensitivity tests)

Recibido el 26 de noviembre de 2002 y en versión corregida el 23 de marzo de 2004. Trabajo financiado por FONDECYT, Proyecto # 1981044 y 1000352.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas.

²Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

³Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad San Sebastián. Concepción, Chile.

^aLicenciado en Biología. Magíster en Microbiología. Doctor en Ciencias Biológicas

^bQuímico Farmacéutico. Diploma in Bacteriology. Master of Science in Public Health

^cBioquímica. Magíster en Microbiología

Los mecanismos de resistencia bacteriana muestran una elevada sofisticación bioquímica y genética, limitando seriamente la utilidad de la terapia antiinfecciosa^{1,2}. El hallazgo de determinantes de resistencia con propiedades similares en

organismos y ecosistemas notoriamente distantes sugiere la ocurrencia de un flujo genético entre células de diferentes comunidades microbianas³⁻⁵. En efecto, los genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos, en bacterias filogenéticamente no relacionadas, demuestran ser idénticos⁶, incluso en bacterias Gram positivas y Gram negativas^{7,8}. Se han identificado varios elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia, de los cuales los más conocidos son los plásmidos autotransferibles o

Correspondencia a: Gerardo González R. Grupo de Investigación en Resistencia a Antibióticos (GIRA), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Teléfono: 56-41-203237. Fax: 56-41-245975. E-mail: ggonzal@udec.cl

movilizables⁵. También se incluyen los transposones conjugativos y no conjugativos⁹, el ADN de bacteriófagos y, más recientemente, los integrones y *cassettes* genéticos de resistencia¹⁰. La transferencia de estos elementos entre diferentes bacterias puede ocurrir por conjugación¹¹, transformación¹² o transducción¹³, procesos básicos de transferencia de genes entre bacterias.

En la actualidad, es bien conocido el rol de plásmidos y transposones en la multiresistencia de las bacterias a los antibióticos y en la diseminación natural de los determinantes de resistencia⁵. Sin embargo, sólo en los últimos años se está estudiando la participación de los *cassettes* genéticos de resistencia y de los integrones en el proceso evolutivo de los plásmidos de resistencia (plásmidos R).

La presente revisión analiza aspectos históricos y estructurales de los integrones y su implicancia clínica, incluyendo resultados obtenidos por nuestro Grupo de Investigación en la Resistencia a Antimicrobianos (GIRA).

ASPECTOS HISTÓRICOS

El término integrón o elemento de integración fue propuesto por Stokes y Hall en 1989¹⁰, aunque la actual definición fue introducida en 1995 por Hall y Collis¹⁴: los integrones son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos. Los estudios iniciales se efectuaron con plásmidos del grupo de incompatibilidad Inc-W y con transposones relacionados a Tn21¹⁵⁻¹⁷ que poseían genes de resistencia a antibióticos en un mismo sitio, delimitado por secuencias nucleotídicas altamente conservadas. Varios de estos genes codificaban enzimas modificantes de aminoglicósidos (EMA)¹⁸, dihidrofolato reductasas¹⁹ o β -lactamasas del tipo OXA²⁰. Estudios con enzimas de restricción y secuenciación nucleotídica establecieron que las regiones de ADN que delimitaban estos genes eran muy similares en diferentes plásmidos y transposones¹⁹. A fines de la década de los 80 Stokes y Hall¹⁰ demostraron que las secuencias de ADN que delimitan las regiones con genes de resistencia representan zonas conservadas, con un extremo 5' conservado (5'CS) de

1,36 kb, y un extremo 3' conservado (3'CS) de 2 kb. La zona con los determinantes de resistencia presentaba longitud variable y era dependiente del número de genes insertos en dicho sitio.

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS INTEGRONES

Los integrones han sido detectados principalmente en bacilos Gram negativos fermentadores, de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*²¹⁻²³, y en algunos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa*²⁴ y *Acinetobacter baumannii*²⁵. Además, se ha descrito un integrón funcional en bacterias Gram positivas, en una cepa de *Corynebacterium glutamicum*²⁶.

Formando parte de la estructura básica del integrón (Figura 1) se encuentra el gen *intI* que codifica una proteína con actividad de recombinasa específica de sitio (IntI), la integrasa, que forma parte de una familia de enzimas cuyo prototipo es la integrasa del bacteriófago λ ²⁷, actualmente denominadas tirosina-recombinasas²⁸. Adyacente a *intI* se encuentra el sitio de recombinación específica de sitio, *attI*, en el que se integra el *cassette* genético de resistencia²⁹. Entre *intI* y *attI* se encuentran dos promotores divergentes, P_I para la expresión de *intI* y P_C, para la expresión de los *cassettes* genéticos insertos río abajo, puesto que la mayoría de éstos no tiene promotor³⁰. La enzima IntI permite la interacción entre *attI* y el sitio *attC* o elemento de 59 pb de los *cassettes* genéticos, uniendo ambos sitios y facilitando la integración o escisión del *cassette* de resistencia en la zona variable del integrón (Figura 1).

Hasta la fecha se han descrito varias familias de integrones de acuerdo a la secuencia nucleotídica del gen *intI*³¹, al menos tres de ellas están relacionadas con la expresión de genes de resistencia. Sus integrasas presentan entre 45% y 58% de homología, sugiriendo una divergencia evolutiva por un período superior a 50 años, lo que corresponde, aproximadamente, a la era antibiótica³². Los integrones no pueden realizar autotransposición pero se asocian frecuentemente a secuencias de inserción o bien, a transposones y plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intra especie. Se han encontrado integrones de las clases 1 y 2 en

plásmidos y transposones, en tanto aquellos de clase 3 sólo han sido observados en plásmidos³³. Por último, los integrones de clase 4 o “superintegrone” se han identificado principalmente en el cromosoma de *Vibrio cholerae*^{22,34}.

En la mayoría de los integrones clase 1 descritos hasta ahora existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que codifican resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, a sulfonamidas y a una proteína con función desconocida^{32,35-37}. Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de *cassettes*

genéticos de resistencia. Las otras clases de integrones relacionadas con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o deleción de algunos genes o secuencias de inserción.

CASSETTES GENÉTICOS Y ELEMENTOS DE 59 pb
(SITIO *attC*)

Los *cassettes* genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura

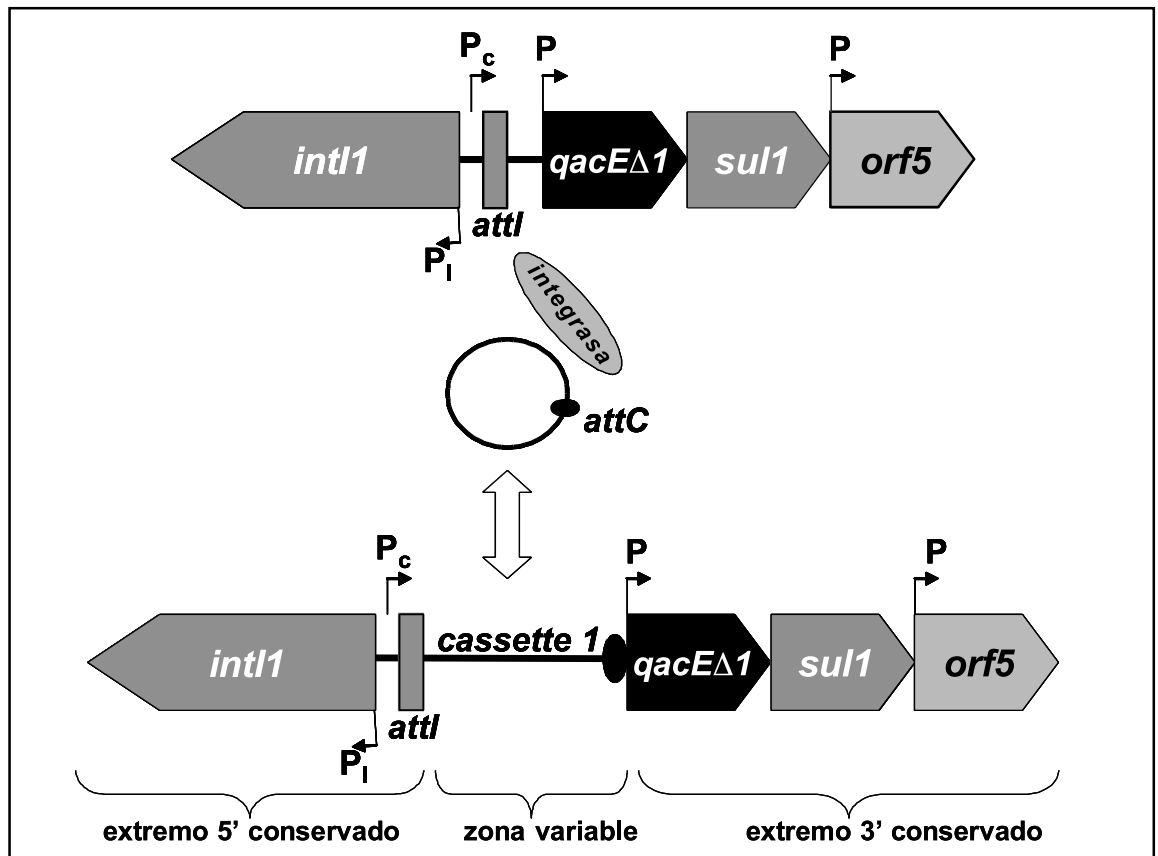


FIGURA 1. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. *intI1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; P_i : promotor que transcribe la integrasa; P_c : promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *attC*: sitio de recombinación del *cassette* genético (esquema no dibujado a escala).

abierto completo (*orf*), o región codificante (gen)^{14,35}. Además, formando parte de su estructura, a continuación del *orf*, existe un sitio de recombinación específica denominado elemento de 59 pb, o sitio *attC*, localizado en el extremo 3' del gen^{29,36}. Aunque se considera que los *cassettes* genéticos son elementos móviles³⁵, no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización¹⁴. Estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el *cassette* desde un integrón^{29,36}. La inserción específica de sitio de los *cassettes* genéticos al interior de la región variable de los integrones ha sido solamente detectada en las células que expresan la actividad de la integrasa. Esto indica que esta recombinasa es necesaria para la integración de los *cassettes*, predominantemente dentro del sitio *attI* del integrón^{36,37}, aunque también es posible la recombinación entre dos sitios *attC*³⁸. La integrasa interactúa con los dos sitios primarios de recombinación, el sitio *attI* de los integrones y el sitio *attC* de cada *cassette* genético³⁷. Por otra parte, la especificidad de la orientación de los *cassettes* genéticos integrados permite su transcripción desde un promotor común localizado en el extremo 5'CS de los integrones¹⁴, cuya secuencia nucleotídica es altamente conservada y en el cual pequeñas variaciones afectan la fuerza de transcripción del promotor, llegando incluso a niveles tan bajos de expresión que la bacteria aparece fenotípicamente susceptible, aunque es potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia. Por lo tanto, el uso de un determinado antibiótico, al ejercer la correspondiente presión selectiva, puede seleccionar las cepas con promotores más fuertes y capaces de expresar el gen, determinando la resistencia de las bacterias al antibiótico³⁸. El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un *cassette* genético de resistencia, depende de su posición en el integrón, más cercana o lejana del promotor común. Collis y Hall³⁸ demostraron que las bacterias manifiestan niveles de resistencia más elevados cuando el gen de resistencia se ubica

en el primer *cassette*, esto es, muy cercano al promotor y estos niveles se reducen a medida que los genes están en *cassettes* posteriores, río abajo del promotor.

IMPLICANCIA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN INTEGRÓN-CASSETTE GENÉTICO DE RESISTENCIA

White y col³⁹ han informado que la diseminación de genes de resistencia aumenta considerablemente cuando ellos forman parte de *cassettes* genéticos móviles, lo cual los habilita para su transferencia horizontal por varios mecanismos. Algunos incluyen la movilización de *cassettes* entre integrones, mediada por la integrasa. En el caso de integrones que forman parte de un transposón, pueden transponerse desde el cromosoma hacia plásmidos y viceversa. Por su parte, los plásmidos conjugativos pueden transferirse de una bacteria a otra de la misma o de diferente especie, fenómeno genético particularmente importante por la presión selectiva existente a nivel nosocomial^{4,5}. Los *cassettes* genéticos codifican resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y, según informaciones recientes, a quinolonas^{30,39,40}. Además, los integrones clase 1 contienen genes que podrían ser remanentes de *cassettes* genéticos como parte de su estructura conservada 3'CS y ellos codifican resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) y sulfonamidas (*sulI*)³². Los mecanismos de resistencia relacionados con genes de integrones son variados e incluyen la síntesis de enzimas como las EMA²¹, cloranfenicol acetyl transferasas (CAT)^{38,39}, modificantes de rifampicina⁴¹, β -lactamasas, especialmente aquellas de más reciente descripción, incluyendo carbapenemasas^{42,43}, dihidrofolato reductasas²¹. Además, se han descrito proteínas protectoras de la ADN girasa y bombas de eflujo^{40,44}.

Los integrones han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial³⁷. De igual forma estas estructuras, con sus respectivos *cassettes* de resistencia, han sido detectadas en

bacterias aisladas de ambientes acuáticos⁴⁵ y de animales domésticos y de crianza⁴⁶, lo cual refleja su amplia diseminación en la naturaleza. Algunas clases de integrones han sido detectadas exclusivamente en cepas ambientales (*Treponema denticola*, *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*)⁴⁷. Más aún, se ha demostrado la presencia de integrones en microorganismos ancestrales de diferentes géneros, corroborando que estas estructuras son antiguas y que han evolucionado conjuntamente con el genoma bacteriano⁴⁷.

Existen escasos estudios sistemáticos acerca de la distribución de integrones en diferentes especies bacterianas, pero los que han sido realizados establecen que la prevalencia de una u otra clase de integrón en bacterias Gram negativas depende de la especie bacteriana en cuestión y, en algunos casos, de la localización geográfica en que se recolectan las cepas⁴⁸.

INTEGRONES EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS AISLADAS EN HOSPITALES DE CHILE

En 1998, González y col²⁵, publicaron las primeras evidencias de la presencia de integrones en bacilos Gram negativos aislados de productos patológicos en hospitales chilenos. Estos autores informaron que los integrones clase 2 son frecuentes en cepas de *A baumannii*, principalmente en aquellas de los biotipos 9 (76,3% de cepas con integrones) y 8 (16,7% de cepas con integrones). Estudios posteriores establecieron que las cepas con integrones son las mismas que presentan los patrones de resistencia más amplios⁴⁹ como así también que los integrones están presentes en la mayoría de las cepas de *A baumannii* resistentes a cefalosporinas de tercera generación⁵⁰. Los autores, sin embargo, no encontraron ningún tipo de asociación entre la presencia de integrones y de genes codificantes de β-lactamasas del tipo TEM y SHV. Posteriormente, Ramírez⁵¹ y González⁵² demostraron que integrones de cepas de *A baumannii* poseían los *cassettes* genéticos *aac(6)Ib*, *aac(3)IV*, *ant(3)I*, explican-

do la resistencia de las cepas a diversos antibióticos aminoglicósidos. Además, en la mayoría de las cepas se encontraron los *cassettes* genéticos *dfxA1*, *sat* y *ant(3)I*, que constituyen un bloque que forma parte del transposón Tn7 y que determina resistencia a trimetoprim, estreptotricina, estreptomina y espectinomina, respectivamente. Ramírez, también demostró la presencia de un *cassette* genético que codifica una β-lactamasa del tipo OXA, formando parte de un integrón clase 2 en una cepa de *A baumannii*⁵¹.

Nuestro grupo ha estudiado la presencia de integrones en enterobacterias, encontrando que los integrones clase 1 son predominantes en *Klebsiella pneumoniae* (68,4%) y *E coli* (36,5%). Las cepas de *Serratia marcescens* poseen, mayoritariamente, integrones clase 2. En cambio, la mayoría de las cepas de *Shigella flexneri* (75%) y de *Proteus mirabilis* (56,6%) posee integrones clase 1 y 2, simultáneamente^{53,54}. En general, los integrones de las cepas de enterobacterias están constituidos por alguno de los *cassettes* genéticos *acc(6)Ib*, *ant(2)I* y *ant(3)I*, lo que explica la resistencia de estas bacterias a tobramicina, dibekacina, amikacina, netilmicina, sisomicina, kanamicina, gentamicina, estreptomina y espectinomina. En varias cepas se encontraron integrones, pero los *cassettes* de resistencia no estaban presentes.

De lo anteriormente expuesto, es claro que los integrones funcionan como sistemas de captación de genes que confieren ventajas selectivas para la bacteria. Dada su capacidad para reconocer una amplia variedad de secuencias de recombinación, su capacidad de intercambio y origen remoto, estas estructuras permiten a las bacterias una rápida adaptación a los cambios ecológicos, cuyo ejemplo más reciente corresponde sin duda al advenimiento de la moderna era de la quimioterapia antimicrobiana.

El conocimiento de estas nuevas estructuras y sus propiedades es un llamado de alerta para la implementación de programas de uso adecuado de antimicrobianos y de normas básicas de control de infecciones.

REFERENCIAS

1. DAVIES J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 1994; 264: 375-82.
2. HART CA. Antibiotic resistance: an increasing problem? *BMJ* 1998; 316: 1255-6.
3. LEVY SB. Ecology of antibiotic resistance determinants. *Banbury Report* 1986; 24: 17-29.
4. LEVY SB. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. En: *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. Ed. Chadwick DJ Goode J. Ciba Foundation Symposium 207, 1997; 1-14.
5. AMABILE-CUEVAS CF, CHICUREL ME. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 1992; 70: 189-99.
6. SALYERS AA, AMABILE-CUEVAS C. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2321-5.
7. DOUCET-POPULAIRE F, TRIEU-CUOT P, ANDREMONT A, COURVALIN P. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 502-4.
8. COURVALIN P. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1447-51.
9. SALYERS AA, SHOEMAKER NB, LI LY, STEVENS AM. Conjugal transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* 1995; 59: 579-90.
10. STOKES HW, HALL RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989; 3: 1669-83.
11. ZATYKAA M, THOMASA CM. Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol Rev* 1998; 21: 291-319.
12. COHENS N, CHANG ACY, HSU L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1972; 69: 2110-4.
13. THOMPSON B. Bacterial antibiotic resistance and evolution. *Reason and Revelation* 1994; 14: 61-3.
14. HALL RM, COLLIS CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. *Mol Microbiol* 1995; 15: 593-600.
15. WARD JM, GRINSTED J. Physical genetic analysis of the Inc-W group plasmids R388, S and R7K. *Plasmid* 1982; 7: 239-50.
16. KRATZ J, SCHMIDT F, WIEDEMANN B. Characterization of Tn2441 and Tn2410, two transposons derived from R-plasmid R1767 and related to Tn2603 and Tn21. *J Bacteriol* 1983; 155: 1333-42.
17. SCHMIDT F, KLOPFER-KAUL I. Evolutionary relationship between Tn21-like elements and pBP201, a plasmid from *Klebsiella pneumoniae* mediating resistance to gentamicin and eight other drugs. *Mol Gen Genet* 1984; 197: 109-19.
18. MEYER JF, NIES BA, WIEDEMANN B. Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn2424. *J Bacteriol* 1983; 155: 755-60.
19. CAMERON FH, GROOT-OBINK DJ, ACKERMAN VP, HALL RM. Nucleotide sequence of the AAD(2") aminoglycoside adenyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucl Acids Res* 1986; 14: 8624-35.
20. HALL RM, VOCKLER C. The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucl Acids Res* 1987; 15: 7491-501.
21. JONES ME, PETERS E, WEERSINK AM, FLUIT A, VERHOEF J. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* 1997; 349: 1742-3.
22. MAZEL D, DYCHINCO B, WEBB VA, DAVIES J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 1998; 280: 605-8.
23. SCHMIDT AS, BRUUN MS, LARSEN JL, DALSGAARD I. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 735-43.
24. BISSONNETTE L, ROY PH. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1992; 174: 1248-57.
25. GONZÁLEZ G, SOSSA K, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, MELLA S, ZEMELMAN R. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 161: 125-8.

26. NESVERA J, HOCHMANNOVA J, PATEK M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 169: 391-5.
27. AZARO MA, LANDY A. λ integrase and the λ Int family. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, DC, USA 2002; 118-48.
28. VAN DUYNNE GD. A structural view of tyrosine recombinase site-specific recombination. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, DC, USA 2002; 93-117.
29. PARTRIDGE SR, RECCHIA GD, SCARAMUZZI C, COLLIS CM, STOKES HW, HALL RH. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiol* 2000; 146: 2855-64.
30. RECCHIA GD, SHERRAT DJ. Gene acquisition in bacteria by integron mediated site specific recombination. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, DC, USA 2002; 162-76.
31. PAULSEN IT, LITTLEJOHN TG, RADSTRÖM P, SUNDSTRÖM L, SKÖLD O, SWEDBERG G, SKURRAY RA. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 761-8.
32. BENNETT PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 1-4.
33. ARAKAWA Y, MURAKAMI M, SUZUKI K, ITO H, WACHAROTAYANKUN R, OHSUKA S ET AL. A novel integron-like element carrying the metallo β -lactamase gene bla_{IMP}. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1612-5.
34. MANNING PA, CLARK CA, FOCARETA T. Gene capture in *Vibrio cholerae*. *Trends Microbiol* 1999; 7: 93-5.
35. RECCHIA GD, HALL RM. Origins of mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 1997; 5: 389-94.
36. COLLIS CM, GRAMMATICOPOULOS G, BRITON J, STOKES HW, HALL RM. Site-specific insertion gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* 1993; 9: 41-52.
37. CARATTOLI A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 2001; 32: 243-59.
38. COLLIS C, HALL RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integron. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 155-62.
39. WHITE PA, McIVER CJ, RAWLINSON WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2658-61.
40. TRAN JH, JACOBY GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5638-42.
41. TRIBUDDHARAT C, FENNEWALD M. Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 960-2.
42. POIREL L, NAAS T, NICOLAS D, COLLET L, BELLAS S, CAVALLO J-D ET AL. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-7.
43. POIREL L, LE THOMAS I, NAAS T, KARIM A, NORDMANN P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622-32.
44. BISSONNETTE L, CHAMPETIER S, BUISSON J-P, ROY PH. Characterization of nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmIA*) gene of the In4 integron of Tn1696: Similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J Bacteriol* 1991; 173: 4493-502.
45. ROSSER SJ, YOUNG H-K. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 11-8.
46. GOLDSTEIN C, LEE MD, SÁNCHEZ S, HUDSON C, PHILLIPS B, REGISTER B ET AL. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 723-6.
47. SABATÉ M, PRATS G. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 341-5.
48. GALLEGO L, TOWNER KJ. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. *J Med Microbiol* 2001; 50: 71-7.

49. MUÑOZ J, GONZÁLEZ G, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, MELLA S, ZEMELMAN R. Prevalencia de integrones en cepas intrahospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp* y su relación con la resistencia a antibióticos aminoglicósidos. *Anales Microbiol* 2000; 3: 72.
50. RAMÍREZ C, PINO C, GONZÁLEZ G, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, MELLA S ET AL. Presencia de integrones y su relación con la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Acinetobacter baumannii* de origen nosocomial. *Rev Méd Chile* 2000; 128: 863-7.
51. RAMÍREZ CA. Presencia de integrones y su relación con la resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas intrahospitalarias de *Acinetobacter baumannii* resistentes a cefalosporinas de tercera generación. *Tesis para optar al grado de Magíster en Microbiología* 2001; Escuela de Graduados. Universidad de Concepción, 94 pp.
52. GONZÁLEZ G. Rol de integrones y *cassettes* genéticos en la resistencia de *Acinetobacter baumannii* a antibióticos aminoglicósidos. *Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas* 2002; Escuela de Graduados. Universidad de Concepción, 201 pp.
53. REYES A, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, MELLA S, ZEMELMAN R, GONZÁLEZ G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 317-21.
54. MUÑOZ J, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, MELLA S, ZEMELMAN R, GONZÁLEZ G. Integrones y *cassettes* genéticos de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Shigella flexnerii*. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 727-33.