

La resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión

BETINA ORMAN

Cátedra de Farmacología.
Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires

La utilización de sustancias con efecto antibiótico para el tratamiento de las infecciones bacterianas no es una metodología nueva, ya hace 2500 años en la China se utilizaban plantas para el tratamiento del carbunco. En 1928, Alexander Fleming descubrió en forma accidental el primer antibiótico, la penicilina, y en 1940, Florey y Chain utilizaron la penicilina en tratamientos en seres humanos. Cuando se comenzó a utilizar la penicilina para tratar infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*, el 10% de los aislamientos eran resistentes al antibiótico, a los seis años los aislamientos resistentes representaban el 60% y en la actualidad más del 90%.

La utilización masiva de antibióticos en el medio hospitalario y en la comunidad da lugar a la selección de bacterias multirresistentes, o sea que una cepa bacteriana porta la resistencia a más de un antibiótico. Este fenómeno muestra la importancia del estudio de la diseminación de la resistencia por la aparición de cepas cada vez más resistentes.

Los mecanismos de transferencia de material genético entre las bacterias son la conjugación, la transducción y la transformación.

La conjugación es un proceso de transferencia genética que requiere contacto de célula a célula. Este mecanismo requiere de una bacteria donante conteniendo un plásmido conjugativo y una bacteria receptora que carece de él. Los genes que regulan la transferencia están situados en una región del plásmido llamada *tra*. Algunos genes de la región *tra* están relacionados con la síntesis del *pili*. Los *pili* permiten el apareamiento específico entre ambas bacterias dando lugar a la formación de un puente de conjugación a través del cual pasa el ADN de una bacteria a otra. El ADN a transferir es el plásmido conjugativo, pero a veces también pueden ser movilizados ADN de otros plásmidos no conjugativos e inclusive el cromosoma bacteriano.

En la transducción el ADN se transfiere de una bacteria a otra por medio de un bacteriófago. La transducción puede ser generalizada o especializada.

En la transducción generalizada, un ADN bacteriano, tanto cromosómico como plasmídico, pasa a formar parte del ADN de la partícula viral madura en lugar del genoma del virus. En la transducción especializada, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente en el genoma del virus. La partícula viral transductora es defectiva como virus, ya que genes virales necesarios fueron reemplazados por genes bacterianos. La transducción se encontró en bacterias Gram positivas, Gram negativas y en Archaeobacterias.

La transformación es un proceso por el cual ADN libre se incorpora a una bacteria receptora competente y se lleva a cabo una recombinación genética. Cuando una bacteria es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada se dice que es competente. Sólo algunas cepas son transformables, sugiriendo que puede ser una característica heredable. La transformación natural ocurre en bacterias Gram negativas y Gram positivas. La transformación natural de alta eficiencia se encuentra en pocos géneros, es por ello que se desarrolló la transformación artificial en la que se induce competencia en bacterias a partir de un tratamiento con calcio y baja temperatura. Esta técnica es muy utilizada en biología molecular.

Los mecanismos de dispersión de los genes de resistencia están mediados por plásmidos, transposones e integrones que portan los genes de resistencia a antibióticos.

LOS PLÁSMIDOS

Los genes que codifican para la resistencia bacteriana a los antibióticos pueden estar ubicados tanto en el cromosoma como en plásmidos. Los plásmidos son elementos genéticos que se replican independientemente del cromosoma bacteriano, están constituidos de ADN doble cadena, son circulares y su tamaño varía entre 10^3 a 10^6 pares de bases (pb.). Los plásmidos se

encuentran en bacterias Gram positivas y Gram negativas, conociéndose miles de plásmidos diferentes. Sólo en cepas de *E. coli* se aislaron más de 300 plásmidos naturales. Gran parte de los genes de resistencia a antibióticos relevantes en la clínica se encuentran en plásmidos.

Los plásmidos de resistencia (plásmidos R) constituyen uno de los grupos de plásmidos más extendido en los aislamientos clínicos, confieren resistencia a los antibióticos y a inhibidores del crecimiento. Se descubrieron inicialmente en Japón, en cepas de bacterias entéricas que habían adquirido resistencia a varios antibióticos y a partir de entonces se han encontrado en todos los continentes. El plásmido R100, por ejemplo, tiene 89.300 pb. y porta genes de resistencia a las sulfonamidas, estreptomina, espectomicina, ácido fusídico, cloranfenicol y tetraciclina. Este plásmido se transfiere entre bacterias entéricas de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella* pero no se transmite a la bacteria no entérica *Pseudomonas*. Muchos de los genes de resistencia portados por el plásmido R100 se encuentran en elementos transponibles y en integrones.

ELEMENTOS TRANSPONIBLES

Los elementos transponibles fueron primeramente identificados como inserciones espontáneas en los operones bacterianos, ya que anulaban la transcripción o la traducción de los genes en los cuales se insertaban. A partir de entonces se caracterizaron diversos tipos de elementos transponibles.

Secuencias de inserción

Los transposones más simples se denominan secuencias de inserción (IS). Cada tipo lleva un prefijo IS seguido por un número que la identifica. Los elementos

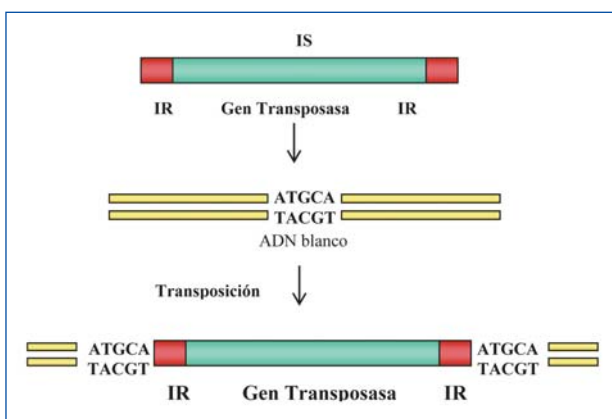


Figura 1: Secuencias de inserción y su transposición. En la transposición de una IS se duplica una secuencia del huésped en el sitio de inserción que se identifican como cortas secuencias directas que flanquean las IR.

IS son constituyentes normales del cromosoma bacteriano y de los plásmidos. Una cepa de *E. coli* lleva al menos 10 copias de los elementos IS más comunes. Los elementos IS son unidades autónomas, los cuales codifican para una proteína necesaria para la transposición: la transposasa. Además, todas las IS comparten una organización similar. En sus extremos tienen secuencias cortas repetidas e invertidas llamadas "inverted repeats" (IR). Las IS contienen una única región codificante que codifica para la transposasa y que se encuentra entre los dos IR (Figura 1). Cuando un elemento IS transpone, se duplica una secuencia del huésped en el sitio de inserción y se identifican porque son pequeñas secuencias directas que flanquean las IR.

Los transposones compuestos

Los transposones compuestos están conformados por una región central que porta el gen marcador, flanqueada a ambos lados por elementos IS, pudiendo encontrarse en la misma orientación o invertida (Figura 2). En algunos casos los módulos del transposón son idénticos como es el caso de Tn9 (repeticiones directas de IS1) y de Tn903 (repeticiones invertidas de IS903). En otros casos, los módulos están relacionados pero no son idénticos, como en el caso de Tn10 y de Tn5. Los genes marcadores son usualmente genes de resistencia a antibióticos, como en el caso de Tn9 a cloranfenicol, en Tn10 a tetraciclina y en Tn903 y Tn5 a kanamicina.

Los transposones replicativos

En la transposición replicativa, el elemento es duplicado durante la reacción, así la unidad que se transpone es una copia del elemento original. Entonces, la transposición implica un aumento del número de copias del transposón. A este grupo pertenecen los transposones relacionados a TnA. La familia TnA está compuesta por transposones grandes mayores a 5 kb, entre los que Tn3 y Tn1000 son los más caracterizados.

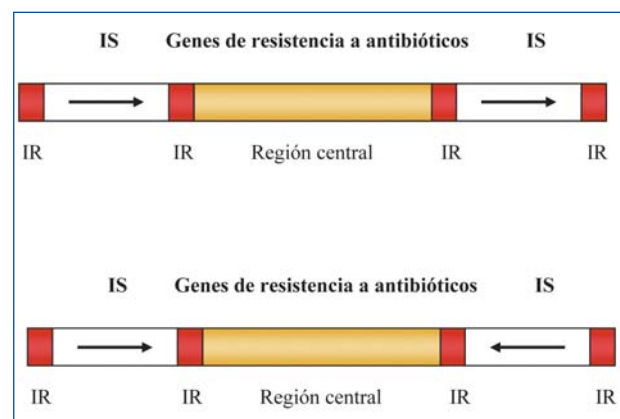


Figura 2: Transposones compuestos.

Arriba: transposón compuesto con dos IS en la misma orientación, en la región central se encuentran los genes de resistencia a antibióticos. Abajo: transposón compuesto con dos IS en orientación invertida.

Los transposones se componen de los genes para la transposición *tnpA* y *tnpR*, que codifican para la transposasa y la resolvasa respectivamente y por los extremos IR, de alrededor de 38 pb. Usualmente poseen genes como los de resistencia a antibióticos (Figura 3).

Los transposones no replicativos

Los transposones no replicativos son aquellos que se mueven como una entidad física directamente de un sitio a otro, en forma conservada. Es el caso del fago *Mu*, que cuando infecta una célula se integra a su genoma por transposición no replicativa mientras que en el ciclo lítico el número de copias se amplifica por una transposición replicativa.

INTEGRONES

Historia de los integrones

Al poco tiempo de la introducción de la terapia antibiótica, se encontraron bacterias patógenas resistentes a diversas familias de antibióticos. Evidentemente, la mayoría de los genes de resistencia no habían evolucionado a partir del advenimiento del uso de antibióticos ni habían evolucionado de *novo* en los microorganismos resistentes, sino que adquirieron la resistencia a partir de la transferencia horizontal de genes.

Estudios con enzimas de restricción y técnicas de hibridación evidenciaron que diferentes genes de resistencia a antibióticos se encontraban en la misma ubicación en plásmidos relacionados como R388 y pSa¹ o transposones como Tn21, Tn2603 y Tn2424. El desarrollo de la técnica de secuenciación de ADN mostró que muchos de los genes de resistencia en bacterias Gram negativas se encontraban en un contexto genético similar como *dhfrII* del plásmido R388, *aadA2* de pSa y *aadA1* de Tn21^{2,3}. En particular, las secuencias flanqueantes eran idénticas o similares sugiriendo que existía un mecanismo específico para la diseminación de estos genes. Esto dio lugar al descubrimiento de un sistema de recombinación sitio-específica independiente de RecA (mecanismo de recombinación homóloga en bacterias), codificado en

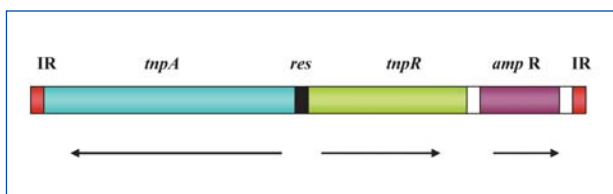


Figura 3: Transposones replicativos: esquema del transposón TnA. Los transposones de la familia de TnA tienen secuencias IR en sus extremos, un sitio *res* interno y tres genes conocidos: *tnpA*, *tnpR* y el gen de resistencia a ampicilina *bla_{TEM-1}*. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

elementos genéticos que se denominaron integrones⁴. El integrón más pequeño consiste en un gen, *intI*, que codifica para una recombinasa sitio-específica denominada integrasa³ y un sitio adyacente de recombinación *attI*. Los integrones también pueden contener uno o más cassettes integrados en el sitio *attI*. Los cassettes consisten en un gen y un sitio de recombinación, los cuales pueden ensamblarse en arreglos en tandem y diseminarse a través de la población bacteriana por mecanismos de transferencia horizontal⁵.

Los integrones y los cassettes se encuentran ampliamente distribuidos en las bacterias Gram negativas. Fueron encontrados en más de doce géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, en algunos miembros de la familia *Vibrionaceae*⁶, *Pseudomonads*⁷, *Acinetobacter*⁸ y *Xanthomonads*⁹. Aunque los integrones no están restringidos a bacterias Gram negativas y proteobacterias ya que se encontraron integrones en bacterias Gram positivas como *Corynebacterium glutamicum* y *Mycobacterium fortuitum*^{10,11}.

Genes en cassettes

Los genes en estructura de cassette normalmente incluyen dos componentes funcionales: el gen y el sitio de recombinación *attC* o elemento de 59 bases (59-be), localizado en el extremo 3' del gen¹² (Figura 4).

Los cassettes en general se identifican por el nombre del gen que codifican y se los denomina con una letra a aquellos que contienen marcos de lectura abierta de función desconocida.

El número de genes identificados en estructura de cassette crece día a día. Se describieron más de 80 cassettes que portan genes de resistencia a antibióticos como aminoglucósidos, β -lactámicos, trimetoprima, sulfamidas, cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, rifampicina y además desinfectantes y antisépticos^{13,14}. Para algunas familias de antibióticos, la mayoría de los genes se encuentran en cassettes como las β -lactamasas de clase D, las DHFR de la familia 1 y las cloranfenicol acetyl-transferasas de clase B¹⁵. Las β -lactamasas codificadas en cassettes son de tres distintas familias: clase A (*bla_p*), clase B metalo- β -lactamasas (*bla_{IMP}*) y clase D (*oxa*). Las dihidrofolato reductasas

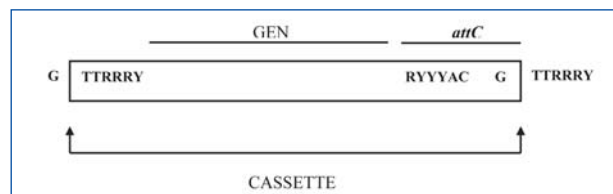


Figura 4: Estructura de un gen con estructura de cassette. El cassette está formado por el gen y el sitio de recombinación *attC*. Las flechas señalan el inicio y el final del cassette, denotando los sitios por donde se realiza la recombinación sitio-específica para la movilización del mismo.

que confieren resistencia a la trimetoprima son de dos familias no relacionadas (*dhfrA* y *dhfrB*).

El hecho de que la mayoría de los genes identificados en cassettes corresponda a genes de resistencia a antibióticos no es más que la consecuencia de que la mayoría de los estudios están dirigidos al análisis de aislamientos clínicos. Sin embargo, las funciones de los genes en cassettes no se limitan a resistencia a antibióticos y el rol de los integrones no consiste en la adquisición y diseminación de los genes de resistencia. Existen otros cassettes que codifican para toxinas, sistemas de modificación y restricción, lipoproteínas y determinantes de patogenicidad¹⁶.

Los sitios de recombinación asociados a los cassettes se denominan *attC* o elementos de 59 bases y se localizan en el extremo 3' del cassette.

Cada cassette posee un único sitio *attC*, cuyo largo y la secuencia de los mismos varía entre los diferentes cassettes³.

Los integrones se clasifican de acuerdo a la secuencia de su integrasa. Cada gen *intI* está asociado con un sitio único *attI*. El integrón más frecuente y más estudiado es el de clase 1, el cual codifica para *IntI1* y contiene el sitio de recombinación *attI1*. Los integrones de esta clase están ampliamente distribuidos entre los aislamientos clínicos y se encuentran localizados en transposones y plásmidos. El integrón de clase 2 codifica para una *IntI2* y para un sitio *attI2* y se encuentra en el integrón Tn7 y los transposones relacionados. Los integrones de clase 3, se encontraron, hasta el momento, en aislamientos clínicos de Japón¹⁷. El integrón de clase 4 o integrón *Vch*, es un superintegrón cromosomal que contiene más de 179 cassettes encontrado en el genoma de *Vibrio cholerae*.

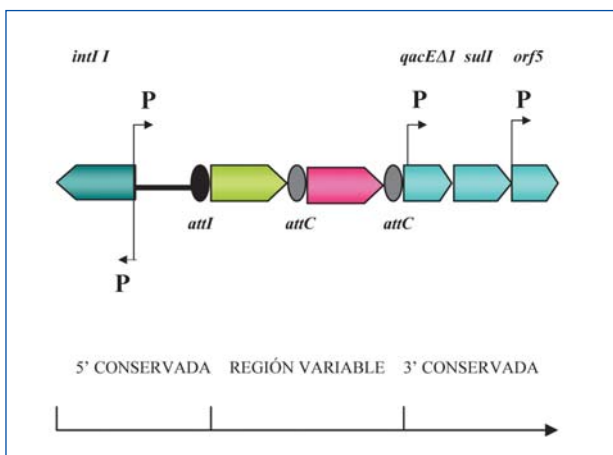


Figura 5: Estructura general de los integrones de clase 1.

En la región 5' conservada se encuentra el gen de la integrasa *intI*, los promotores *P* y el sitio *attI* (óvalo negro). En la región variable se insertan los cassettes por un mecanismo de recombinación sitio-específico. En la región 3' conservada se encuentran los genes *qacEΔ1*, gen de resistencia a antisépticos; *sull*, gen de resistencia a sulfonamidas y el *orf5* de función desconocida.

Las cuatro integrasas *IntI* comparten una identidad de 42 a 58% en la secuencia aminoacídica y tienen tamaño similar, 317 a 340 aminoácidos.

Estructura de un integrón

Los integrones de clase 1 están compuestos por tres regiones: dos segmentos conservados y una región variable que incluye los genes con estructura de cassettes.

La región 5' conservada codifica para la integrasa, que es la recombinasa de ADN sitio-específica involucrada en la escisión e integración de los genes en cassettes. Este segmento contiene también una región promotora y un sitio de recombinación (*attI*) ubicado en los últimos 40-70 pares de bases¹⁸.

La región 3' conservada incluye un gen de resistencia a antisépticos, *qacEΔ1*; un gen de resistencia a sulfonamidas, *sull* y un marco de lectura abierta de función desconocida, *orf5*. La región variable se encuentra entre las dos regiones conservadas. Uno o más genes se encuentran en la región variable, pero cada gen conforma su cassette, aunque existen pocos casos de dos genes en un mismo cassette¹⁹ (Figura 5).

Los cassettes son elementos móviles que no codifican para los genes involucrados en su propio movimiento. Su movimiento, o sea su integración y escisión depende de la integrasa, la cual interacciona con los sitios de recombinación: *attI* y el sitio *attC* localizado en el extremo 3' del cassette.

Los integrones de clase 2, que se encuentran en Tn7 y derivados, portan en el extremo 3' conservado los genes *tns*, los cuales codifican para su transposición. Estos integrones portan el gen *sat* que otorga resistencia a estreptotricina, un antibiótico producido por *Streptomyces lavendulae* conformado por un anillo estreptolidina unido a una cadena lateral de polilisisina. Este antibiótico se utiliza en veterinaria y en la industria de alimentos y no en la clínica humana (Figura 6).

Movilización de los integrones

La integración de un cassette en un integrón involucra una recombinación sitio-específica mediado por la integrasa entre el sitio *attI* ubicado en el integrón y el sitio *attC* en un cassette circular libre en el citoplasma. La escisión de los cassettes es la inversa de la integración. Cassettes circulares simples o compuestos se regeneran por medio de la escisión, siendo importantes intermediarios en el proceso de movilización²⁰ (Figura 7).

La recombinación entre un sitio *attI* y el sitio *attC* y entre dos sitios *attC* es la reacción biológica más importante para la integración y escisión de cassettes. En experimentos de integración *in vivo*, la recombinación *attI* x *attC* ocurre a una frecuencia más alta que la recombinación *attC* x *attC*. Así, un cassette se integraría, en un integrón que posee cassettes inmediatamente adyacente al sitio *attI*, asegurando una máxima expresión a partir del promotor.

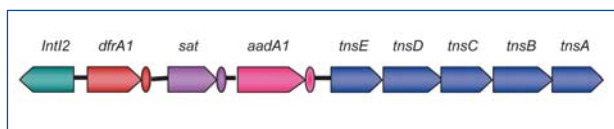


Figura 6: Esquema de un integrón de clase 2, el Tn7. El integrón está compuesto por la integrasa de tipo 2 y los genes *dfrA1*, *sat* y *aadA1* que codifican para la resistencia a trimetoprima, estreptotricina y estreptomycin-espectinomicina. En el extremo 3' conservado se encuentran los genes *tnsE*, *D*, *C*, *B* y *A*, necesarios para la transposición.

Eventos de recombinación entre dos sitios *attI* ocurren, pero a una frecuencia más baja. Además de la recombinación entre los sitios *attI* y *attC*, *IntI I* puede también recombinar con baja eficiencia los sitios *attI* y *attC*, con sitios secundarios. Se secuenciaron más de 50 secuencias con recombinaciones en sitios secundarios, entre los que se encontró el consenso GNT (Gt/aT, Ga/tTNa/t)^{21,22}. La recombinación entre un sitio-específico y un sitio secundario da lugar a la adquisición de cassettes por genomas que no poseen integrones. La mayoría de las inserciones fuera del contexto de los cassettes son estables debido a que las secuencias flanqueantes son inactivas. La expresión de estos cassettes sólo se observará en el caso en que el cassette se inserte en la orientación correcta con respecto a un promotor preexistente.

La movilización de genes en cassettes es el sistema de recombinación sitio-específico conocido más promiscuo. Incluye un rango de sitios de recombinación específica de diferentes secuencias, incluyendo cientos de cassettes asociados a sitios *attC*, también al menos 4 sitios *attI* y cientos de potenciales sitios secundarios que son reconocidos por al menos cuatro recombinasas.

Super-integrone

Recientemente se describió un nuevo tipo de integrón: el super-integrón. Este consiste en un arreglo cromosomal de un gran número de genes en estructura de cassettes, móviles por medio de una integrasa sitio-específica codificada en el integrón¹⁶. Esta estructura se describió en *Vibrio cholerae* por primera vez, contiene 179 cassettes y tiene 126 Kb. de largo^{6,9}. Los sitios *attC* se denominan en este caso, VCR por “*Vibrio cholerae repeats*”. Los VCR asociados con los cassettes están muy relacionados entre sí y comparten una homología de 95-97%. Se localizaron genes de resistencia en estructura de cassette entre el super-integrón de *Vibrio cholerae* como es el caso de CARB-7²³. Este hallazgo sugiere que el conjunto de cassettes disponible se superpone para los integrones y los super-integrone. Los 179 cassettes encontrados en *Vibrio cholerae* no se expresan a partir de un sólo promotor, especialmente cuando no todos se encuentran orientados en la misma dirección²⁴. En *Vibrio cholerae*

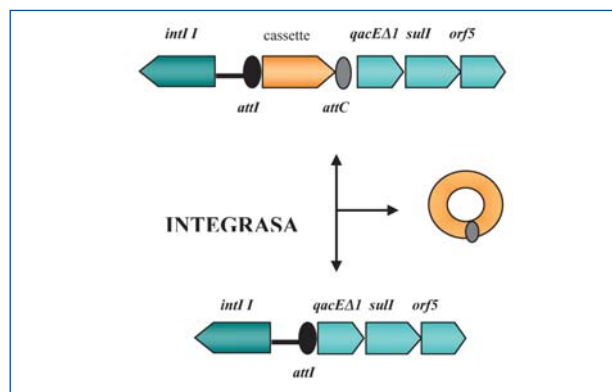


Figura 7: Integración y escisión de cassettes en integrones de clase 1. La integración y escisión de los cassettes circulares en integrones de clase 1 es realizada por la integrasa producto del gen *intI I*.

serogrupos O1 y O139 y en otra especie de *Vibrio* como es el caso de *Vibrio mimicus* también se encontraron super-integrone^{25, 26}.

Se propuso que el super-integrón podría funcionar como un grupo de genes vinculados a la patogenicidad y también en la captura de genes con otras funciones bioquímicas, especialmente aquellas que responden a una variedad de señales ambientales²⁷.

En los últimos años se describió un super-integrón en *Pseudomonas alcaligenes*⁷. Este es cinco veces menor que el super-integrón de *Vibrio cholerae*. Los sitios *attC* se denominan, en este caso, PAR “*Pseudomonas alcaligenes repeats*” y muestran una homología de 90% entre ellos y poseen entre 76 y 90 pb. Se encontraron secuencias PAR en cuatro especies del género *Pseudomonas*: *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. stutzeri* y *Pseudomonas spp.* En otras especies aisladas del ambiente se describieron integrone como en *Treponema denticola*, *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*. La homología entre las integrasas de estas especies con la *IntI I* es de entre 50 y 60%²⁶.

Los cassettes encontrados no tienen homología con proteínas conocidas pero algunos contienen motivos que se asocian con la pared celular y el uso de codones difiere entre los distintos cassettes. Todas estas características sugieren que el rol de esta estructura en la interacción con el ambiente, considerando que el hábitat, el suelo (*Pseudomonas*) y el agua (*Vibrio*) podrían estimular el intercambio, a partir de estructuras de integrone de organismos divergentes filogenéticamente.

CONCLUSIONES

- La principal causa del fracaso terapéutico es el notable aumento de la resistencia bacteriana debida principalmente al **abuso y mal uso** de los antimicrobianos. Esto puede deberse a tratamientos antibióticos inadecuados tanto por suministro de dosis o en intervalos

inapropiados o por un tiempo insuficiente y también por el incumplimiento del paciente a las indicaciones del profesional.

- El aumento de la resistencia se debe a la selección de genes de resistencia a antibióticos y a su diseminación. Este fenómeno permite que dentro de una misma estructura se seleccione más de un gen de resistencia incrementando aún más el riesgo del fracaso terapéutico.

- El éxito de los integrones y de los *cassettes* de ingresar en diversas poblaciones bacterianas es atribuible a la variedad de mecanismos que utilizan para su movilización y transferencia. Los *cassettes* pueden ser intercambiados dentro del mismo integrón y entre integrones a través de recombinaciones sitio-específicas. A su vez, algunos integrones están localizados en transposones, los que se encuentran en plásmidos conjugativos. Como ejemplo se puede considerar a Tn21 y los transposones relacionados. Tn21 es un transposón compuesto, ampliamente distribuido en la clínica, que porta *cassettes* de resistencia a antibióticos dentro de un integrón. Tn21 se ubica dentro del transposón compuesto Tn9-like, que se encuentra en el plásmido conjugativo NR1. Así, por recombinación sitio-específica se ensamblan arreglos de *cassettes* dentro de los integrones que, por transposición y conjugación, se transfieren en forma horizontal (Figura 8).

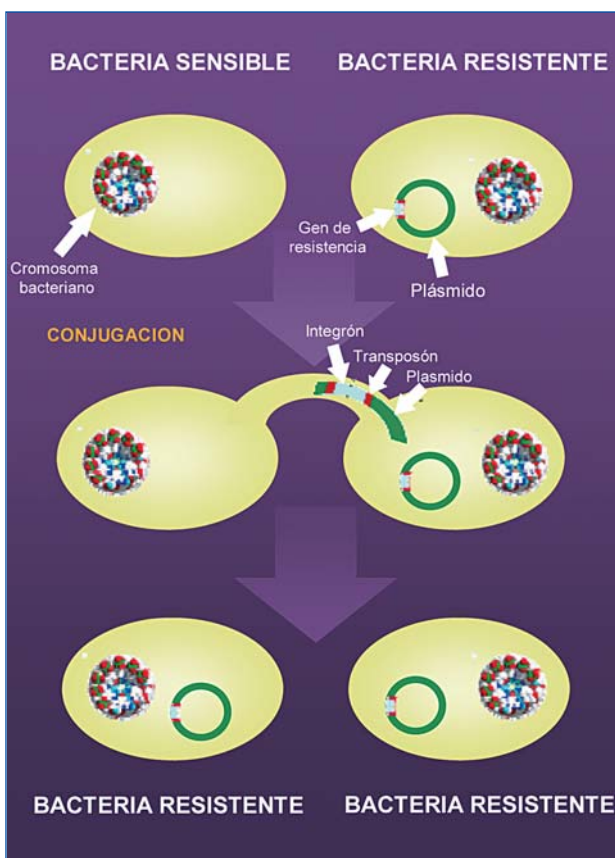


Figura 8: Conjugación entre bacterias. En el plásmido conjugativo se transfiere un integrón portando un gen de resistencia a antibiótico ubicado dentro de un transposón ubicado en el plásmido.

Es fundamental reconsiderar al profesional de la salud como el principal actor para evitar la diseminación de la resistencia bacteriana a través de la actualización permanente de la epidemiología de las infecciones y la farmacología de los antibióticos en uso para las terapias antibióticas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ward JM and Grinstead J. Analysis of the Inc P-1 group plasmids R906 and R751 and their relationship to RP1. *Plasmid*. 8: 244-252,1982.
- 2) Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP and Hall RM. Nucleotide sequence of the AAD(2^o) aminoglycoside adenylyl-transferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucl. Acids Res*. 14: 8625-8635, 1986.
- 3) Oulette M, Bissonnette L and Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7378-7382, 1987.
- 4) Stokes HW, Tomaras C, Parsons Y and Hall RM. The partial 3' conserved segment duplications in the integron In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid* 30: 39-50, 1993.
- 5) Collis, CM and Hall, RM. Genes cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol*. 6:2875-2885, 1992.
- 6) Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML and Dobson RJ. DNA sequence of both Chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477-483, 2000.
- 7) Vaisvila R, Morgan RD, Posfai J. and Raleigh EA. Discovery and distribution of super-integrons among *Pseudomonads*. *Molecular Microbiology* 42:587-601, 2001.
- 8) Segal H and Elisha BG. 1997. Identification and characterization of an *aadB* gene cassette at a secondary site in a plasmid from *Acinetobacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:321-326.
- 9) Rowe-Magnus DA, Guerout AM and Mazel D. Super-integrons. *Res. Microbiol*. 150: 641-651, 1999.
- 10) Nesvera J, Hochmannova J. and Patek M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* 169:391-395, 1998.
- 11) Martin C, Timm J, Rauzier J, Gomez-Lus R, Davies, J. and Gicquel B. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature*. 345:739-743, 1990.
- 12) Hall RM, Brookes DE and Stokes HW. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol*. 5:1941-1959, 1991.
- 13) White PA, McIver CJ and Rawlinson CJ. Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:2658-2661, 2001.
- 14) Ploy MC, Courvalin P and Lambert T. 1998. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a Class 1 Integron with Two New Gene Cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 2557-2563, 1998.
- 15) Rosser SJ and Young HK. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother*. 44:11-18, 1999.
- 16) Mazel D, Dychinco B, Webb VA and Davies J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280:605-608, 1988.
- 17) Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N and Ohta M. A novel integron-like element

- carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1612-1615, 1995.
- 18) Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW and Hall RM. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiology.* 146:2855-2864, 2000.
- 19) Bunny KL, Hall RM and Stokes HW. 1995. New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and a chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:686-693, 1995.
- 20) Hall RM and Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 15:593-600, 1995.
- 21) Segal H, Francia MV, Lobo JM and Elisha G. Reconstruction of an active integron recombination site after integration of a gene cassette at a secondary site. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:2538-2541, 1999.
- 22) Recchia GD, Stokes HW and Hall RM. Characterization of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* 22 :2071-2078, 1994.
- 23) Melano R, Corso A, Petroni A, Centron D, Orman B, Pereyra A, Moreno N. and Galas M. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother.* 52:36-42, 2003.
- 24) Barker A, Clark CA and Manning PA. 1994. Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J. Bacteriol* 176:5450-5458, 1994.
- 25) Clark CA, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T and Manning PA. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology.* 146:2605-2612, 2000.
- 26) Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KM and Stokes HW. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 195:59-65, 2001.
- 27) Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J and Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:652-657, 2001.