

# Estudio de integrones clase 1 en *Salmonella* aisladas en Santa Fe, Argentina

Di Conza, José<sup>1</sup>; Mollerach, Marta<sup>2</sup>; Ayala, Juan<sup>3</sup>; Gutkind, Gabriel<sup>2</sup>

1- Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas (UNL). CC 242. Paraje "El Pozo". (3000). Santa Fe.

2- Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Junin 956 (1113). Buenos Aires.

3- Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Universidad Autónoma de Madrid. (28049). España.

**RESUMEN:** Se investigó la presencia de integrones clase 1 y su relación con el antibiograma en 25 aislamientos pediátricos de *Salmonella* spp. Se estudió la presencia de los genes *intI1*, *sulf1*, y *qacEΔ1*, mediante PCR y/o hibridación ADN-ADN. Además se analizó, por RFLP-PCR, la región variable (*rv*) de estos elementos. Pudo detectarse la presencia de integrones clase 1 en la mayoría de las cepas de *S. infantis* (12/13) y en una cepa de *S. Typhimurium* (1/4). Esta última, resistente a algunos aminoglucósidos, muestra un amplicón para *rv* de 1 kb. Las cepas de *S. infantis*, que poseen igual resistencia a aminoglucósidos pero diferentes a los β-lactámicos, presentan un amplicón idéntico de 2 kb para *rv*. Esta resistencia fue transferida por conjugación y se detectó *intI1* en los transconjugantes seleccionados. Con estos resultados podemos suponer que algunos genes de resistencia a aminoglucósidos estarían en forma de casete dentro de estos integrones, localizados en plásmidos conjugativos.

**PALABRAS CLAVES:** *Salmonella*, integrones, aminoglucósidos, β-lactámicos.

**SUMMARY:** Class 1 integrons in *salmonella* isolated in Santa Fe, Argentina. Di Conza, José<sup>1</sup>; Mollerach, Marta<sup>2</sup>; Ayala, Juan<sup>3</sup> y Gutkind, Gabriel<sup>2</sup>. The presence of class 1 integrons and its relationship with the antibiotype was investigated in 25 pediatric *Salmonella* spp. isolates. The presence of *intI1*, *sulf1*, and *qacEΔ1*, was detected by PCR and/or DNA-DNA hybridization. The variable region (*rv*) of these elements was also analyzed by RFLP-PCR. The presence of class 1 integrons could be detected in almost all the *S. infantis* strains (12/13) and in one *S. Typhimurium* (1/4). This last one, resistant to some aminoglycosides, displays an *rv* amplicon of 1 kb, while *S. infantis* strains, that retain the same resistance to aminoglycosides but to different β-lactams, have an identical *rv* amplicon of 2 kb. This resistance could be transferred by conjugation and *intI1* gene was detected in the selected transconjugants. These results suggest that some aminoglycoside resistance genes would be part of a cassette in these integrons, located in conjugative plasmids.

**KEY WORDS:** *Salmonella*, integrons, aminoglycosides, β-lactams.

## Introducción

Los integrones son elementos genéticos con capacidad para capturar y reorganizar genes en casetes móviles. Contienen los determinantes genéticos del sistema de recombinación sitio específico (1). Existen cuatro tipos de integrones, los cuales difieren fundamentalmente en el gen de la integrasa (2). Los integrones clase 1 son los encontrados con mayor frecuencia en aislamientos de origen clínico (2-4). Presentan dos segmentos conservados, el 5' (5'CS) y el 3' (3'CS), y una región interna variable donde se integran los genes en casetes que, en general, codifican resistencia a antibióticos (5).

El 5'CS codifica para una integrasa sitio-específica (*intI1*), contiene un sitio adyacente de

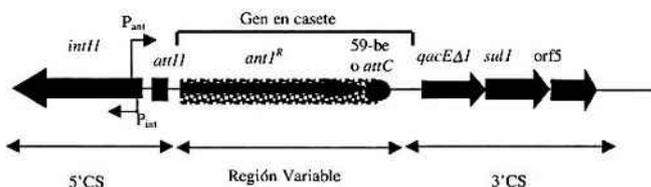
Autor de pruebas y correspondencias:

Di Conza, José. Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas (UNL). CC 242. Paraje "El Pozo". (3000). Santa Fe, Argentina. Tel: (0342) 4575206, Fax: (0342) 4575221. e-mail: jdiconza@fbc.unl.edu.ar

recombinación reconocido por la integrasa (*attI1*) y un promotor orientado convenientemente ( $P_{ant}$ ) involucrado en la expresión de los genes que codifican el/los casetes. En el 3'CS se encuentra un gen

delecionado que codifica para resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) y un gen que confiere resistencia a sulfonamida (*sul1*), y suele presentar además, al menos un marco de lectura abierto siendo el más común *orf5* (Ver Figura 1) (5,6).

**Figura 1:** Estructura de un Integrón Clase 1



Estructura tipo de un integrón clase 1. Las flechas indican la dirección de transcripción de los genes. 5'CS: segmento conservado 5', *intI1*: gen para la integrasa 1, *attI1*: sitio de recombinación adyacente,  $P_{ant}$ : promotor para la expresión de los genes en casete,  $P_{int}$ : promotor de la integrasa, *ant1<sup>R</sup>*: gen que codifica resistencia a antibiótico, 59-be o *attC*: elemento de 59 bases, 3'CS: segmento conservado 3', *qacEΔ1*: gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario, *sul1*: gen que codifica resistencia a sulfonamidas, *orf5*: marco de lectura abierto. El tamaño de la región variable depende del tipo y número de casetes presentes.

El número de genes en casetes puede variar entre cero para *In0* (7) hasta más de siete (8,9). Estos casetes contienen un gen que confiere resistencia (*ant1<sup>R</sup>*), asociado con una secuencia de recombinación, conocido como el elemento de 59 bases (59-be o *attC*). En la actualidad se conocen más de setenta casetes y, comúnmente, codifican resistencia a β-lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol y trimetoprima, y menos frecuentemente, resistencia a compuestos de amonio cuaternario, rifampicina y eritromicina (1,10).

Pocos son los estudios sobre el relevamiento de integrones y su distribución. Los realizados en enterobacterias provenientes de diferentes hospitales de Europa muestran que entre un 43-55% de las mismas presentan integrones con diferentes arreglos de casetes y patrones de resistencia (11-13).

Hasta la fecha, no existen publicaciones referidas al relevamiento de integrones en nuestro país, donde la presión selectiva intrahospitalaria seguramente es diferente. En el presente trabajo se investiga la presencia de integrones clase 1 en *Salmonella enterica*, se analiza la región variable de estos elementos y su relación con el antibiograma.

## Materiales y Métodos

**Microorganismos:** Se estudiaron 25 cepas de *Salmonella enterica*, aisladas del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" de la provincia de Santa Fe durante el período 1996-1998. Para los ensayos de conjugación se usó como cepa receptora *E. coli* CAG12177 (Dra. M. Berlyn, *E. coli* Genetic Stock Center).

**Identificación:** Se confirmó la identidad de los microorganismos por pruebas bioquímicas convencionales (14). La serovariedad de las cepas de *S. enterica* se realizó mediante técnicas de aglutinación empleando sueros para la detección de antígenos somáticos y flagelares (15).

**Susceptibilidad a Antibióticos:** Se determinó la susceptibilidad a diferentes antibióticos por los métodos de difusión y dilución en agar de acuerdo a las recomendaciones de la NCCLS (16,17).

**Extracción de plásmidos:** La extracción de plásmidos se realizó mediante lisis alcalina (18), a

partir de cultivos crecidos a 37 °C, durante 18 hs, en caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con antibiótico en función del perfil de resistencia de cada cepa; también se realizó utilizando equipos comerciales (Midi/maxi plasmid kit, QIAGEN Inc.).

**Conjugación:** Los ensayos de conjugación se realizaron en medio sólido y la selección de transconjugantes en placas de agar LB suplementado con tetraciclina (20 µg/ml), y ampicilina (50 µg/ml) o cefotaxima (30 µg/ml), de acuerdo el perfil de resistencia de la cepa dadora (19).

**Amplificación por "Polymerase Chain Reaction" (PCR):** La amplificación por PCR se reali-

zó teniendo en cuenta las condiciones generales descriptas por Sambrook *et al* (19). La secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar las distintas regiones de un integrón, se presentan en la Tabla 1. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl conteniendo 10 ng de ADN plasmídico, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada oligonucleótido (Isogen), 0,5 mM de cada dNTP (Pharmacia Biotech, Suecia) y 0,5 U *Taq* DNA polimerasa (PerkinElmer, Boston, USA). Los parámetros de amplificación fueron: 6 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min de hibridación (temperatura entre 50-60 °C dependiendo en cada caso del Tm del oligonucleótido), y 1 min a 72 °C (polimerización), seguido de un período de extensión final de 10 min a 72 °C.

**Tabla1:** Oligonucleótidos empleados en la PCR.

Nombre	ADN blanco	Secuencia	Referencia
int1B	<i>int1</i>	5' ACCGCCAACTTTCAGCACAT 3'	M95287 <sup>a</sup>
int1F	<i>int1</i>	5' GCGTTCGGTCAAGGTTCTGG 3'	M95287 <sup>a</sup>
5' CS	rv <sup>b</sup>	5' GGCATCCAAGCAGCAAGC 3'	(24)
3' CS	rv <sup>b</sup>	5' AAGCAGACTTGACCTGAT 3'	(24)
qacEΔ1B	<i>qacEΔ1</i>	5' CAAGCTTTTGCCCATGAAGC 3'	(24)
qacEΔ1F	<i>qacEΔ1</i>	5' ATCGCAATAGTTGGCGAAGT 3'	(24)
Sul1B	<i>sul1</i>	5' GCAAGGCGGAAACCCGCGCC 3'	(24)
Sul1F	<i>sul1</i>	5' CTTGATGAGAGCCGGCGGC 3'	(24)

<sup>a</sup> número de acceso a la secuencia de *int1*, depositada en base de datos, a partir de la cual se diseñaron estos oligonucleótidos.

<sup>b</sup>rv: región variable.

#### **Análisis de la región variable mediante RFLP-**

**PCR:** El fragmento generado por PCR al amplificar la región variable (rv) de un integrón, se trató con distintas endonucleasas: *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI* y *SacI* (MBI Fermentas Ltd., Lituania) y los productos obtenidos se resolvieron en geles de agarosa al 1%.

#### **Detección del gen *int1* mediante hibridación**

**ADN-ADN:** Se realizó hibridación sobre colonia utilizando como sonda un fragmento de 930 bp del gen *int1* del integrón InS21 (20), obtenido por PCR y marcado con <sup>32</sup>P-dCTP (19).

Las colonias fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa las que fueron tratadas con NaCl 1,5M - NaOH 0,5M para lograr la lisis celular. El tratamiento posterior de la membrana incluyó neutralización con Tris 1M pH 8,0, seguido de NaCl 1,5M - Tris 0,5M pH 8,0 y finalmente con SSC 2X (SSC 1X es NaCl 0,15 M más citrato de sodio 0,015 M). El ADN se fijó a la membrana en estufa a 80°C durante 2 hs, la hibridación con la sonda se realizó a 65°C y luego, se efectuaron lavados con SSC 2X - SDS 0,1% y con SSC 0,1X - SDS 0,1% (termostatzado a 65°C). Finalmente, la membrana se expuso a -20 °C frente a la película radiográfica (AGFA Curix RP2) y se reveló a las 24 hs.

## Resultados y Discusión

Las cepas estudiadas fueron agrupadas según la serovariedad y el perfil de resistencia (Tabla 2). La búsqueda de integrones clase 1 fue realizada median-

te la detección del gen *int11* por PCR (fragmento esperado de 930 bp), y por hibridación sobre colonias. Todas las cepas *int11* positivas presentaron los genes *qacEΔ1* y *sul1* en el análisis por PCR obteniéndose los fragmentos esperados de 228 bp y 439 bp respectivamente. Estos resultados se resumen en la Tabla 2.

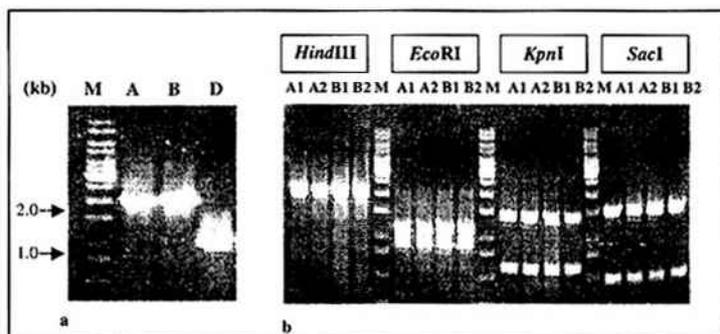
**TABLA 2:** Correlación entre Serovariedad, Perfil de Resistencia y presencia de Integron

Serovariedad (N° cepas)	Patrón (N° cepas)	Perfil de Resistencia	Genes amplificados			Amplicón rv (kb)
			<i>int11</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>sul1</i>	
S. Infantis (13)	A (6)	Ap, Pi, Ce, C, Ct, Cr, Cf, Az, Ge, Ak, Ka, To, Ne, Ni, Su	+	+	+	2.0
	B (6)	Ap, Pi, Ce, C, Ge, Ak, Ka, To, Ne, Ni, Su	+	+	+	2.0
	C (1)	Ap, Pi, Ce, C, Ni	-	-	-	-
S. Typhimurium (4)	D (1)	Ge, Ka, To, Ni, Su	+	+	+	1.0
	E (1)	Ni, Te	-	-	-	-
	F (2)	-	-	-	-	-
S. Enteritidis	G (6)	Ni	-	-	-	-
S. Agona	H (1)	-	-	-	-	-
S. Oranienburg	I (1)	-	-	-	-	-

rv: región variable. Ap, ampicilina; Pi, piperacilina; Ce, cefalotina; C, cefuroxima; Ct, cefotaxima; Az, aztreonam; Cr, ceftriaxona; Cf, cefepime; Ge, gentamicina; Ka, kanamicina; Ak, amicacina; To, tobramicina; Ne, netilmicina; Ni, nitrofurantoina; Su, sulfisoxazol, Te, tetraciclina. (+): Positivo. (-): Negativo.

De acuerdo a los resultados resumidos en la Tabla 2, se puede evidenciar que la presencia de integrones se encontró en cepas con distinto grado de resistencia y como denominador común todas mostraron resistencia a sulfisoxazol (que se relaciona con la presencia del gen *sul1* en estas estructuras), nitrofurantoina y algún aminoglucósido. La mayoría de las cepas de *S. Infantis* (12/13) presentaron integrones de clase 1, todas pertenecientes al patrón de resistencia A y B. En este serotipo, los amplicones obtenidos para la región variable fueron de aproximadamente 2.0 kb (Figura 2a), independientemente del

antibiotipo (patrón A y B). La única cepa que no amplifica para esta región, ni presenta ninguna de las otras características que definen estos integrones, es sensible a los aminoglucósidos (patrón C). Los perfiles de restricción realizados a los amplicones de la región variable (RFLP-PCR) fueron idénticos (Figura 2b), lo que haría suponer la misma disposición de casetes en ambos patrones. Sólo una de las 4 cepas de *S. Typhimurium* incluidas en este trabajo fue *int11* positiva, presentando un amplicón para la región variable de aproximadamente 1,0 kb (Figura 2a). Esta cepa es la única, dentro de este serotipo, que presenta resistencia a aminoglucósidos (patrón D).

**Figura 2:** PCR y RFLP-PCR para la región variable de los integrones

(a) Amplicones para la región variable empleando los oligonucleótidos 5'CS y 3'CS. A, B y D son los patrones de cepas con distintos antibiogramas que presentan integrones. (b) Perfil de restricción de los amplicones para la región variable obtenida con los patrones de resistencia A y B. A1: cepa 1 del patrón A, A2: cepa 2 del patrón A, B1: cepa 1 del patrón B, B2: cepa 2 del patrón B. M: 1 kb DNA ladder (MBI Fermentas Ltd., Lituania).

La presencia de plásmidos fue detectada en todas las cepas estudiadas excepto en *S. Agona* y *S. Oranienburg*. Su movilidad se evaluó mediante ensayos de conjugación utilizando una cepa del patrón de resistencia A y otra del patrón B como dadoras. En los transconjugantes obtenidos se transfirió la resistencia a  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos; no así a nitrofurantoina. El gen *int1* también se detectó en estos transconjugantes por hibridación sobre colonias. Estos resultados indican que los integrones clase 1 descritos en *S. Infantis* están presentes en cepas multirresistentes y localizados en plásmidos conjugativos, lo que concuerda con la mayoría de los casos descritos en otras partes del mundo (12,13,21). Además, dado que la resistencia a nitrofurantoina no se transfiere por conjugación es probable que el gen que codifica para esta resistencia no esté formando parte de estos elementos; además, hasta el momento, estos genes de resistencia no fueron descritos como genes en casetes (2).

## Conclusiones

La presencia de integrones clase 1 pudo identificarse en la mayoría de las cepas de *S. Infantis* (12/13) y en 1 cepa de *S. Typhimurium* (1/4). Se encontró

que estos elementos se localizan en plásmidos y se transfieren junto con la resistencia a  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos. Dado que se obtiene un único amplicón para la región variable por cepa, se puede inferir que cada plásmido porta un único integrón o bien más de uno pero con la misma disposición de casetes.

Los integrones detectados en *S. Infantis* poseen el mismo perfil de restricción para la región variable, es decir, tienen idéntica organización genética en esta región, tanto en las cepas resistentes como en las sensibles a cefalosporinas de tercera generación, por lo tanto, este marcador no estaría formando parte de los genes en casetes incluidos en estos integrones.

Más allá de la obvia resistencia a sulfisoxazol debido a la presencia del gen *sul1* en su estructura, todas las cepas con integrones presentan como característica común resistencia a varios aminoglucósidos, lo que sugiere que algunos de los genes responsables de dicha resistencia estarían localizados dentro de estos integrones en forma de casetes. Estas cepas, además, poseen resistencia a nitrofurantoina, pero el determinante genético de dicha resistencia, no estaría localizado en el plásmido.

Los integrones clase 1 están distribuidos mundialmente, especialmente en enterobacterias recu-

peradas de muestras clínicas, inclusive en salmonelas. En Europa se han evaluado la presencia y diseminación de integrones clase 1 en distintas serovariedades no Typhi de *S. enterica*, aún en aquellos serotipos pocos frecuentes (diferente a *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*). Como en este trabajo, la presencia de estos elementos siempre se asoció con un patrón de resistencia múltiple (21-23).

La presencia de estas estructuras en plásmidos movilizables es extremadamente relevante dado que las mismas actúan como vectores de clonación y expresión *in vivo*; de esta manera se incorporan eficientemente otros mecanismos de resistencia contribuyendo a la emergencia y diseminación de cepas multirresistentes.

### Agradecimientos

Estamos agradecidos con la Prof. Bioq. Clara Mayoral por proveernos las cepas clínicas usadas en este estudio y a la Bioq. Andrea Nepote por su colaboración en la serotipificación de las cepas.

J.D.C. fue becario FOMEC y recibió una beca de la Comunidad Europea, programa ALFA, Proyecto ALR/B7-3011/94.04-5.0111.9.

Este trabajo fue soportado en parte por subsidios de la Universidad de Buenos Aires (TB 039); CONICET (PID 4413) y SEPCYT (PICT 0693) otorgados a G. G.; y por subsidio número PB97-1193 del ministerio de Ciencia y Tecnología, España, otorgado a J. A.

### Nota

El trabajo fue presentado parcialmente en el IX Congreso Argentino de Microbiología. Octubre de 2001. Buenos Aires, Argentina.

### Bibliografía

1- Hall, R. M. and Collis, C. M. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**: 593-600.  
 2- Fluit, A. C. and Schmitz, F. J. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 761-770.

3- White, P.; McIver, C. and Rawlinson, W. 2001. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2658-2661.  
 4- Bennett, P. M. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**: 1-4.  
 5- Hall, R. M.; Brown, H. J.; Brookes, D. E. and Stokes, H. W. 1994. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol.* **176**: 6286-6294.  
 6- Paulsen, I. T.; Littlejohn, T. G.; Radstrom, P.; Sundstrom, L.; Skold, O.; Swedberg, G. and Skurray, R. A. 1993. The 3' Conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **37**: 761-768.  
 7- Bissonnette, L. and Roy, P. H. 1992. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 1248-1257.  
 8- Levesque, C.; Piché, L.; Larose, C. and Roy, P. H. 1995. PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 185-191.  
 9- Naas, T.; Mikami, Y.; Imai, T.; Poirel, L. and Nordmann, P. 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual arrays of gene cassettes. *J. Bacteriol.* **183**: 235-249.  
 10- Recchia, G. D. and Hall, R. M. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* **141**: 3015-3027.  
 11- Jones, M. E.; Peters, E.; Weersink, A. M.; Fluit, A. and Verhoef, J. 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *The Lancet.* **349**: 1742-1743.  
 12- Martínez-Freijo, P.; Fluit, A.; Schmitz, F.; Verhoef, J. and Jones, M. 1999. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 686-689.  
 13- Martínez-Freijo, P.; Fluit, A. C.; Schmitz, F. J.; Grek, V. S. C.; Verhoef, J. and Jones, M. E. 1998. Class 1 integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 689-696.  
 14- Brenner, D. J. 1984. Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In Krieg, N. R. and Holt, J. G., eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. (U.S.A), **1**: 408-423.  
 15- Popoff, M. Y. and Le-Minor, L. 1992. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars., 6th edn. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur. (Paris).

- 16- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard fifth edition. M7-A5. (Wayne, Pa).
- 17- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - Seventh edition - M2-A7. (Wayne, Pa).
- 18- Birnboim, H. C. and Doly., J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513.
- 19- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis., T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (New York).
- 20- Di Conza, J.; Ayala, J.; Power, P.; Mollerach, M. and Gutkind., G. 2002. Novel class 1 integron (InS21) carrying the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> gene in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2257-2261.
- 21- Guerra, B.; Soto, S.; Cal, S. and Mendoza., M. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2166-2169.
- 22- Guerra, B.; Soto, S.; Arguelles, J. and Mendoza., M. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1305-1308.
- 23- Nastasi, A. and Mammina., C. 2001. Presence of class 1 integrons in multigrug-resistant, low-prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. *Em. Infect. Dis.* **7**: 455-458.
- 24- Sandvang, D.; Aarestrup, F. M. and Jensen., L. B. 1997. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Let.* **157**: 177-181