

Integrones clase 1 y 2 presentes en aislamientos de enterobacterias hospitalarios

Porto, A.¹; Vaccari, M. C.¹; Mendez, E.²; Di Conza, J.¹

1- Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) CC 242. Paraje "El Pozo". Ciudad Universitaria. (3000). Santa Fe, Argentina. Tel: (0342) 4575206, Fax: (0342) 4575221.

2- Cátedra de Bacteriología Clínica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) CC 242. Paraje "El Pozo". Ciudad Universitaria. (3000). Santa Fe, Argentina. Tel: (0342) 4575206, Fax: (0342) 4575221.

RESUMEN: Los integrones son elementos genéticos que incorporan y expresan casetes génicos debido a que poseen una integrasa (*IntI*), un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor que permite la expresión de los genes integrados (P_{int}). El objetivo de nuestro trabajo fue investigar la presencia de integrones clase 1, 2 y 3; caracterizar parcialmente su estructura molecular y analizar su asociación con el perfil de resistencia observado en 25 enterobacterias hospitalarias de la ciudad de Santa Fe. Se detectó la presencia de integrones de clase 1 y/o clase 2 en el 48% de las enterobacterias. No se hallaron integrones clase 3. Se observó una asociación significativa entre la presencia de estos integrones y la resistencia a los antifolatos, los aminoglicósidos, los β -lactámicos y cloranfenicol. Además se encontró una prevalencia de integrones clase 1. Los aislamientos correspondientes a *Citrobacter freundii* y *Shigella flexnerii* presentaron simultáneamente integrones clase 1 y clase 2.

Palabras claves: integrones, enterobacterias, resistencia a antibióticos.

SUMMARY: Class 1 and class 2 integrons in enterobacteria nosocomial isolates. Porto, A.¹; Vaccari, M. C.¹; Mendez, E.²; Di Conza, J.¹ Integrons are defined as genetics elements that can integrate gene cassettes by site specific recombination due to the presence in their structure of an integrase (*intI*) and an *attI* recombination site. They also have a promoter (P_{int}) that allows the expression of the integrated genes. The aim of our work was to investigate the presence of class 1, 2 and 3 integrons, to carry out the partial characterization of their molecular structure and to analyze its association with the resistance profile observed in 25 enterobacteria clinical isolates. Class 1 and/or class 2 integrons were found in 48% of the isolates. None of the isolates presented class 3 integrons. We observed a significant association between the presence of integrons and the resistance to antifolates, aminoglycosides, β -lactams and chloramphenicol. Also, we found the prevalence of class 1 integrons in these clinical isolates. The simultaneous occurrence of class 1 and class 2 integrons was detected in *Citrobacter freundii* and *Shigella flexnerii* isolates.

Keywords: integrons, enterobacteria, antibiotic resistance.

* Correspondencia:

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

Introducción

Los integrones son piezas genéticas que funcionan como sistemas de captación de genes que confieren ventajas selectivas para la bacteria. Se caracterizan por reconocer una gran variedad de secuencias de recombinación y poseer una amplia capacidad de capturar, movilizar y expresar genes, lo que permite a las bacterias una rápida adaptación a distintos nichos ecológicos (1). Así, los microorganismos que los poseen podrían equiparse con una verdadera "colección" de genes de resistencia, incrementando paulatinamente el espectro de la misma.

Básicamente, un integrón se define por poseer una recombinasa específica de sitio denominada integrasa (*intI*), un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor que permite la expresión de los genes en casete integrados (P_{ant}) (2, 3). Los casetes génicos usualmente poseen un único gen y se insertan a través de una secuencia de recombinación específica de sitio (*attC* o 59-be) que también le confiere movilidad. Los casetes integrados en el sitio *attI* forman la región variable (RV) particular de cada integrón de acuerdo al número de genes integrados (3).

Actualmente se conocen 10 clases de integrones, los cuales se distinguen por diferencias en la secuencia de *intI* (1, 3-9) (GenBank, número de acceso: AJ277063). Si bien 5 clases de integrones han sido asociados a genes en casete que codifican determinantes de resistencia a antibióticos, los integrones clase 1, 2 y 3 son los que presentan mayor relevancia clínica (3, 4).

Los integrones de clase 1 (de mayor frecuencia en aislamientos clínicos) poseen una región 5' conservada (5'CS) en la cual se encuentra el gen de la integrasa (*intI1*) y el sitio de recombinación *attI1*. Estos integrones presentan una región 3' conservada (3'CS) que contiene un gen que confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternarios (*qacEΔ1*) y un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*) (10). Muchos de los integrones pertenecientes a esta clase se han localizado en elementos transponibles defectivos como el Tn5086 (11, 12).

Los integrones de clase 2 se encuentran dentro de elementos transponibles de la familia del Tn7 (6).

Estos integrones poseen en el extremo 5'CS una integrasa (*intI2*, que posee un codón de terminación interno) y el sitio *attI2*. Algunos autores postulan una región 3'CS que contiene 5 genes implicados en la transposición (*tns*) (13). La secuencia de la integrasa de clase 2 posee 40% de similitud con la de clase 1.

Los integrones de clase 3 estudiados hasta el momento poseen en el extremo 5'CS una integrasa (*intI3*) y un sitio *attI3* de recombinación. El extremo 3' de esta clase no se ha caracterizado. Se ha encontrado un porcentaje de 60% de similitud entre *intI3* e *intI1* (4, 14).

La acumulación e intercambio de genes en casete dentro de los integrones y la gran aceptación de estos últimos por parte de las bacterias permitirían incrementar paulatinamente el espectro de resistencia de las mismas. La presencia de estos elementos (y más aún, su localización plasmídica) contribuyen a la emergencia de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos multirresistentes y a su diseminación entre diferentes especies (1, 15).

Si bien existen varios reportes donde se asocian la presencia de integrones con la resistencia a distintas familias de antibióticos como β-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas (16-20), no se han informado en nuestra región resultados que vinculen estos parámetros.

El objetivo de nuestro trabajo fue investigar la presencia de integrones clase 1, 2 y 3; caracterizar parcialmente su estructura molecular y analizar su asociación con el perfil de resistencia observado en enterobacterias provenientes de aislamientos clínicos de la ciudad de Santa Fe. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían aportar información al conocimiento de la epidemiología regional de estos elementos móviles y de la resistencia asociada a los mismos.

Materiales y Métodos

Microorganismos: Se analizaron todas las enterobacterias aisladas en el Hospital J.M. Cullen de la ciudad de Santa Fe durante un período de siete días consecutivos en agosto de 2004. Se incluyó un único aislamiento perteneciente a una misma especie por paciente.

Identificación de los microorganismos: La identificación de los aislamientos se realizó mediante

pruebas bioquímicas convencionales siguiendo los esquemas apropiados (21).

Susceptibilidad a antimicrobianos: El análisis de la resistencia a antibióticos de los aislamientos se realizó por el método de difusión en disco de acuerdo a lo establecido por las normas NCCLS (22). Se ensayaron los antibióticos β -lactámicos ampicilina (AMN), (Britania, Argentina), cefalotina (CEF), cefotaxima (CTX), cefoxitina (FOX), (Britania, Argentina), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (OXOID, Inglaterra); los aminoglucósidos gentamicina (GEN) y amikacina (AMK) (Britania, Argentina); los antifolatos sulfisoxazol (SUL) (Britania, Argentina), trimetoprima (TM), trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), (OXOID, Inglaterra) y otros antibióticos como cloranfenicol (CMP), tetraciclina (TET) y ácido nalidixico (NAL) (Britania, Argentina).

Análisis de integrones: Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se investigó la presencia de integrones clase 1, 2 y 3 en todos los aislamientos, a través de la amplificación de los genes *int1*, *int2* e *int3* empleando condiciones de amplificación y oligonucleótidos específicos previamente descritos (23). El estudio de las regiones variables de los integrones de clase 1 y clase 2 se realizó mediante amplificación utilizando oligonucleótidos y condiciones estandarizadas (24, 25). En los aislamientos que presentaron integrones clase 1 se analizó la región 3'CS mediante la amplificación conjunta de los genes adyacentes *qacE Δ 1* y *sul1* (25).

Los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1% a 100 voltios/cm en buffer de corrida TAE. Los gels fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz ultravioleta.

Análisis estadístico: Se calculó la significancia exacta usando el test de χ^2 entre los grupos bacterianos resistentes que presentaron o no el gen *int1*, empleando el software SPSS versión 9.0 para Windows.

Resultados y discusión

Los 25 aislamientos estudiados fueron identificados como *Escherichia coli* (n=18), *Providencia rettgeri* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1), *Serratia marcescens* (n=1), *Citrobacter freundii* (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=2) y *Shigella flexnerii* (n=1).

A cada uno de estos aislamientos se les determinó el patrón de resistencia ensayando los 13 antibióticos seleccionados. Del total de 25 enterobacterias estudiadas, 20 presentaron resistencia a más de un antibiótico. Los aislamientos restantes (todos identificados como *E. coli*) presentaron resistencia a un único antibiótico (TET) en 2 casos y sensibilidad a todos los antibióticos ensayados en los 3 casos restantes.

La presencia de integrones se investigó mediante amplificación por PCR de las integrasas *int1*, *int2* e *int3*. El 48% de las enterobacterias (12/25) contienen integrones de clase 1 y/o clase 2. Ningún aislamiento mostró la presencia de integrones clase 3. Resultados similares fueron obtenidos por el estudio realizado por White *et al* (24). La mayoría de los aislamientos portadores de integrones (9/12) mostraron resistencia a siete o más antibióticos (inclusive 2 casos resistentes a los trece antibióticos). En contraposición, 10/13 aislamientos considerados sin integrones mostraron resistencia a 3 o menos antibióticos.

En conjunto, los aislamientos *int1* positivos mostraron resistencia a un mayor número de drogas ensayadas. Como se muestra en la tabla 1 existe una asociación significativa entre la presencia de estos elementos y la resistencia a 10 antibióticos: los antifolatos (TM, SUL, TMS), los aminoglucósidos (GEN, AKM), la mayoría de los β -lactámicos (AMP, AMC, FOX, CTX) y cloranfenicol.

Tabla 1: Asociación entre la resistencia a antibióticos y la presencia de integrones en los aislamientos estudiados.

Antibióticos	% resistencia (nº total de aislamientos) en cepas <i>intI</i> positivas ^a	% resistencia (nº total de aislamientos) en cepas <i>intI</i> negativas ^b	% resistencia total (nº total de aislamientos)	Asociación con integrones ^c
Antifolatos				
Trimetoprima (TM)	83.3 (10)	23.1 (3)	52.0 (13)	<0.001
Sulfametoxazol (SUL)	91.7 (11)	38.5 (5)	64.0 (16)	0.002
Trimetoprima/Sulfametoxazol (TMS)	58.3 (7)	7.7 (1)	32.0 (8)	0.019
β-lactámicos				
Ampicilina (AMN)	91.7(11)	48.5 (5)	64.0 (16)	0.006
Amoxicilina/Ac. clavulánico (AMC)	58.3 (7)	15.4 (2)	36.0 (9)	0.025
Cefalotina (CEF)	50.0 (6)	15.4 (2)	32.0 (8)	0.064
Cefotaxima (CTX)	33.3 (4)	0 (0)	16.0 (4)	0.023
Cefoxitina (FOX)	33.3 (4)	0 (0)	16.0 (4)	0.023
Aminoglucósidos				
Gentamicina (GEN)	50.0 (6)	7.7 (1)	28.0 (7)	0.019
Amicacina (AKM)	41.7 (5)	0 (0)	20.0 (5)	0.009
Otros				
Cloranfenicol (CMP)	58.3 (7)	7.7 (1)	32.0 (8)	0.007
Tetraciclina (TET)	83.3 (10)	53.8 (6)	68.0 (16)	0.114
Ac. Nalidixico (NAL)	50.0 (6)	23.1 (3)	36.0 (9)	0.161

^aNúmero total de aislamientos *intI* positivos, 13

^bNúmero total de aislamientos *intI* negativos, 12

^cSignificancia exacta

En negrita se indican los casos en los cuales existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 2: Características de los aislamientos de enterobacterias que presentaron integrones.

Aislamiento	Nombre	Especímenes / Origen ^a	Patrón de resistencia	Tamaño RV ^b (kb)
<i>intI1</i>				
<i>Escherichia coli</i>	Ec 28	Orina/A	TM AMP CMP TET	<i>intI1</i> - ^c
<i>Escherichia coli</i>	EC 2	Sangre/I	SUL TM TMS	- ^c
<i>Escherichia coli</i>	EC 3	Orina/I	SUL AMP TET	1,3
<i>Escherichia coli</i>	EC 1	Abceso/I	SUL TM TMS AMP AMC CEF TET	1,0
<i>Escherichia coli</i>	EC 7	Orina/I	SUL TM TMS AMP AMC CEF CMP TET	1,0
<i>Escherichia coli</i>	EC 16	Orina/A	SUL TM TMS AMP AMK GEN TET NAL	3,5
<i>Serratia marcescens</i>	SM 20	Orina/I	SUL TM AMP AMC CEF CTX FOX AMK GEN CMP TET NAL	1,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPN 22	Orina/I	SUL TM TMS AMP AMC CEF CTX FOX AMK GEN CMP TET NAL	1,0 1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPN 25	Orina y Sangre/I	SUL AMP AMC CEF CTX AMK GEN NAL	1,0 1,5
<i>intI2</i>				
<i>Proteus mirabilis</i>	PM 24	Orina/I	SUL TM TMS AMP GEN CMP TET NAL	<i>intI2</i> 1,6
<i>intI1 + intI2</i>				
<i>Citrobacter freundii</i>	CF 14	Orina/A	SUL TM TMS AMP AMC CEF CTX FOX AMK GEN CMP TET NAL	<i>intI1-intI2</i>
<i>Shigella flexnerii</i>	SF 27	Heces/I	SUL TM AMP AMC FOX CMP TET	3,5 - 2,5 0,5 - 1,6

^a A: Paciente Ambulatorio, I: Paciente Internado

^b RV: Región Variable

^c No se observó producto de amplificación

Las integrasas encontradas en las distintas especies de enterobacterias, el perfil de resistencia observado y los amplicones obtenidos para las respectivas regiones variables se resumen en la tabla 2.

Los integrones clase 1 fueron los predominantes puesto que se detectaron en 11 de los 12 aislamientos *intI1* positivos. Sin embargo, sólo 3 de los 12 aislamientos mostraron integrones clase 2. Como se deduce de lo antes expuesto, en 2 aislamientos se observó simultáneamente integrones clase 1 y clase 2.

La presencia o ausencia de ADN integrado dentro de la región variable de estos elementos fue estudiada por PCR. Los fragmentos amplificados mostraron un tamaño que varió entre 0,5 y 3,5 kb para los

integrones de clase 1 y entre 1,6 y 2,5 kb para los integrones clase 2. En dos de los aislamientos correspondientes a *E. coli* no se observó producto de amplificación para esta región. Se postula que en ambos aislamientos, EC2 y EC28, no existirían casetes integrados lo que se correlaciona con la resistencia a sólo tres y cuatro antibióticos respectivamente.

La presencia del segmento 3' CS característica de los integrones clase 1 fue inferida por PCR. Todos los aislamientos *intI1* positivos mostraron poseer el gen *qacEΔ1* seguido por el gen *suI1*, excepto el aislamiento EC28, el cual además no expresa resistencia fenotípica a SUL. La presencia de integrones

clase 1 carentes de *sul1* en su extremo conservado 3' CS ya ha sido destacada por otros autores (26).

La presencia de integrones clase 1 fue ampliamente descrita por diversos autores en la mayoría de las especies bacterianas de interés clínico; pero la presencia de integrones clase 2 ha sido descrita en pocas especies (23, 24, 27, 28). Cabe destacar la presencia de integrones clase 2 en el aislamiento de *Citrobacter freundii* dado que no se ha encontrado reporte de estos elementos en esta especie en la bibliografía consultada.

Finalmente se desea señalar que se han hallado dos aislamientos (CF14 y SF27) que presentan en forma simultánea integrones clase 1 y clase 2. En otros trabajos ya se han destacado este tipo de asociación (24) e inclusive híbridos de ambas clases (13). Si bien se considera a la integrasa *intl2* como no funcional (6), la presencia simultánea de integrones clase 1 y 2 permitiría que nuevos genes en casetes pueden incorporarse dentro de la región variable de integrones clase 2, ya que *Int1* es activa y funcional sobre la distintas clases de integrones (6).

Conclusiones

A la luz de los resultados obtenidos se puede notar que: (1) un porcentaje relevante (48%) de las enterobacterias provenientes de aislamientos hospitalarios presentan integrones, indicando una potencial capacidad de ampliar su espectro de resistencia cuando sea propicio, (2) existe una fuerte asociación entre los aislamientos *intl1*-positivos y la resistencia a distintos grupos de antibióticos (antifolatos, aminoglucósidos, β -lactámicos y cloranfenicol), (3) dentro de las enterobacterias analizadas se observa un predominio de integrones clase 1, (4) se hallaron aislamientos clínicos que presentan simultáneamente integrones clase 1 y clase 2, y (5) es oportuno destacar la presencia de un integrón de clase 2 en la especie *Citrobacter freundii*.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con subsidios de la Fundación "A. J. Roemmers" otorgado a J.D.C. Se agradece la colaboración de la Bioq. A. Nepote en la identificación bacteriana.

Bibliografía

- Hall RM, Collis CM (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15: 593-600.
- Stokes HW, Hall RM (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3: 1669-1683.
- Recchia GD, Hall RM (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol.* 141: 3015-3027.
- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M (1995) A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1612-1615.
- Clark CA, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T, Manning PA (2000) The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiol.* 146: 2605-2612.
- Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, Roy PH (2002) *Intl2* integron integrate in *Tn7*. *J. Bacteriol.* 184: 1712-1721.
- Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SH, Woodgate R, Waldor MK (2001) Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2991-3000.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* 280: 605-608.
- Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Helena-Nevalainen KM, Stokes HW (2001) Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 59-65.
- Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW (1994) Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol.* 176: 6286-6294.
- Partridge SR, Brown HJ, Stokes HW, Hall RM (2001) Transposons *Tn1696* and *Tn21* and their integrons *In4* and *In2* have independent origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1263-1270.
- Brown HJ, Stokes HW, Hall RM (1996) The Integrations *In0*, *In2*, and *In5* are defective transposon derivatives. *J. Bacteriol.* 178: 4429-4437.
- Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T (2000) Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2684-2688.
- Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Melo-Cristino J, Mendo S, Duarte A (2003) Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2838-2843.

15. Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM (1997) Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* **26**, 731-745.
16. N6grady N, Gad6 I, T6th A, Pazsti J (2005) Antibiotic resistance and class 1 integrons patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **26**, 126-132.
17. Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM, Gjernes E, Kapperud G (2004) Prevalence and characterization of integrons in blood culture *Enterobacteriaceae* and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class integron-located lincosamide resistance gene. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **3**, 1-9.
18. lvarez-Fernández M, Rodríguez-Sousa T, Brey-Fernández E, L6pez-Meléndez C, Piñeiro L (2003) Asociaci6n entre integrones clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*. *Rev. Esp. Quimioterap.* **16**, 394-397.
19. Pérez-Moreno MO, Carulla-Pont M, Pérez-Moreno M, Jardí-Baiges AM, Llovet-Lombarte MI, Tejedor-Ganduxe X, Zaragoza-L6pez J (2005) Integrones de clase 1 en aislados de *Salmonella enterica* productores de diferentes tipos de β -lactamasas recogidos en la regi6n sanitaria de Tortosa. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **23**, 259-265.
20. Fluit AC, Schmitz FJ (1999) Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 761-770.
21. Brenner DJ (1984) Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In Krieg NR and Holt JG (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams &Wilkins, Baltimore, U.S.A., Vol. 1, pp. 408-423.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - Seventh edition - M2-A7. Wayne, Pa., Vol. 20.
23. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ (2001) Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 723-726.
24. White P, McIver C, Rawlinson W (2001) Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2658-2661.
25. Di Conza J, Ayala J, Power P, Mollerach M, Gutkind G (2002) Novel class 1 integron (InS21) carrying the *bla*_{CIX-M-2} gene in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2257-2261.
26. Rosser SJ, Young HK (1999) Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 11-18.
27. Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB (1997) Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 177-181.
28. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VSC, Verhoef J, Jones ME (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.