



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Integrones de Clase 1 en cepas de *Aeromonas* aisladas de carpa común
(*Cyprinus carpio* L.)**

TESIS

Que presenta

YOHANNA DEL CARMEN SARRIA GUZMÁN

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de Tesis:

Dr. Luc Julien Jerome Dendooven

México, D.F.

Marzo de 2015

Comité Tutorial

Dr. Luc Dendooven

Ecología de suelos

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

CINVESTAV

SNI III

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Biocatálisis

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

CINVESTAV

SNI I

Dr. José Fernando Esparza García

Fisiología Microbiana

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

CINVESTAV

SNI III

Dra. Rosa María Del Ángel

Virología

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV

SNI III

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Virología

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV

SNI III

Leyendas y agradecimientos al CONACYT

Hay hombres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos.

*Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los
imprescindibles.”*

Bertolt Brecht

La vida es dura y las mujeres caras

L.D

*El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo
financiero del CONACyT (número de becario 232468).*

Dedicatoria

Luego de un extenso recorrido he llegado a mi meta en el cual, al detenerme, debo mirar hacia atrás y agradecer a aquellos que me han ayudado y han hecho posible la construcción del camino hasta este grado. Esta tesis es dedicada a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar desde mi país, Colombia, y está claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios de Doctorado no hubiesen sido posible.

Gracias familia.

Agradecimientos

Al terminar esta etapa de mi vida profesional quiero agradecer a todos aquellos que de una u otra forma estuvieron ahí para darme fuerzas y empuje, para iluminarme y hacerme ver que todos los días era necesaria una pequeña lucha y un simple esfuerzo para culminar mis metas.

Quiero agradecer especialmente a las siguientes personas:

*A **Dios** por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mí camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio.*

*A **México**, país que me acogió como una más de sus hijas y me ha brindado grandes oportunidades para mi desarrollo personal, profesional y espiritual.*

*Al **CINVESTAV** que me apoyó durante todo el tiempo que duró la realización de esta investigación y quienes me ayudaron en la consecución de todos y cada uno de los elementos necesarios para ejecutar y concretar esta Tesis Doctoral.*

Agradecimientos

*Al **Dr. Luc Dendooven** le doy las gracias por mi doctorado y por sus sabios consejos.*

*A mis **Asesores** por sus palabras de dirección, su paciencia, el tiempo que me dedicaron a aclarar dudas y resolver cuestionamientos. A ellos mi gratitud eterna.*

*A mis **compañeros** del CINVESTAV por los buenos y malos momentos.*

*A **Chiapas** por permitirme vivir mi último año doctoral en el cual conocí personas maravillosas.*

*A **Henry, Atila y el Fósforo** mis grandes amigos de aventura ya que sin ellos no hubiese sido lo mismo esta gran aventura, gracias muchachos.*

*A la familia **De los Santos Sánchez** por todo su apoyo incondicional.*

ÍNDICE	Pág.
Comité Tutorial.....	ii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes	2
2.1 <i>Aeromonas</i>	2
2.2 Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	4
2.3 Antibióticos y Resistencia Bacteriana.....	4
2.4 Integrones.....	6
2.4.1 Clasificación de los integrones	7
2.5 Cassettes.....	9
3 Justificación, Hipótesis y Objetivos	11
3.1 Justificación	11
3.2 Hipótesis.....	11
3.3 Objetivo general.....	11
3.3.1 Objetivos específicos	12
4 Materiales y Métodos	13
5 Resultados y discusiones.....	16
6 Conclusiones.....	22
7 Recomendaciones.....	23
8 Bibliografía	24
9 Anexos	34

Abreviaturas

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

intl: Integrasa

5'CS: Extremo 5 Prima

3'CS: Extremo 3 Prima

MDR: Bacterias multiresistentes a los medicamentos

ARGs: Genes de resistencia a antibióticos

MGEs: Elementos genéticos móviles

AR : Resistencia a los antibióticos

SI: Superintegrón

Resumen

La presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos, en ambientes acuáticos, que pueden colonizar a humanos a través de la cadena alimentaria o el contacto directo, es considerado un problema potencial de salud pública asociado a la transferencia de genes de resistencia a la microbiota humana o patógenos humanos relacionados (Heuer et al. 2009). En las últimas décadas, se han descrito múltiples mecanismos de transferencia de material genético como plásmidos, transposones e integrones. No obstante, la contribución de estos elementos genéticos móviles en el intercambio de material genético entre la microbiota normal humana y microorganismos patógenos no ha sido completamente elucidada. Los integrones son elementos genéticos móviles capaces de captar genes de resistencia a antibióticos. En su forma más sencilla, están formados por 3 elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos denominados cassettes: uno que codifica una integrasa (*intl*), otro para un sitio de recombinación (sitio-específico) (*attI*) y un promotor (Pc) para la expresión de genes cassettes integrados. En este estudio, se aislaron cepas pertenecientes al género *Aeromonas*, a partir de muestras de pescado fresco en un medio selectivo para *Aeromonadales* y se seleccionaron mediante pruebas bioquímicas. Las cepas se tipificaron mediante ERIC-PCR y se identificaron por análisis del gen *rpoD*. La detección de elementos de integrones se hizo mediante técnicas de amplificación. Se identificaron cepas de *Aeromonas* de las especies *A. hydrophyla*, *A. veronii*, *A. salmonicida*, *A. media*, *A. sobria*, *A. allosaccharophila*, *A. caviae* y *A. punctata*. Se detectaron 11 cepas de estas *Aeromonas* con integrones completos, 3 con integrones incompletos y 4 con integrones vacíos. La incidencia y prevalencia de cepas multirresistentes de *Aeromonas* en el pescado para el consumo humano es considerado un riesgo potencial de infección. La búsqueda de elementos genéticos asociados con la resistencia a los antibióticos es por consiguiente de gran importancia.

Abstract

The presence of bacteria resistant to antimicrobials in aquatic environments, which can colonize humans through the food chain or direct contact, is considered a potential public health problem associated with the transfer of resistance genes to human microbiota or related human pathogens (Heuer et al. 2009). In recent decades, there have been described multiple mechanisms for transfer of genetic material such as plasmids, transposons and integrons. However, the contribution of these mobile genetic elements in the exchange of genetic material between normal human microbiota and pathogenic microorganisms has not been fully elucidated. Integrons mobile genetic elements capable of capturing antibiotic resistance genes. In its simplest form, consist of three elements necessary to capture and expression of exogenous genes denominated cassettes: one encoding an integrase (*intl*), another for a recombination site (site-specific) (*attI*) and a promoter (Pc) for the expression of genes integrated cassettes. in this study, strains belonging to the genus *Aeromonas* were isolated from samples of fresh fish on a selective medium for Aeromonadales and screened by biochemical tests. The strains were typed using ERIC-PCR and were identified by analysis of *rpoD* gene. Detection of integrons elements was made using amplification techniques. *Aeromonas* strains were identified to species *A. hydrophyla*, *A. veronii*, *A. salmonicida*, *A. media*, *A. sobria*, *A. allosaccharophila*, *A. caviae* y *A. punctata*. Of these species, eleven strains of *Aeromonas* with complete integrons, three incomplete integrons and four with empty integrons were detected. The incidence and prevalence of multiresistant strains of *Aeromonas* in fish for human consumption is considered a potential risk of infection. The search for genetic elements associated with resistance to antibiotics is therefore of great importance.

1 Introducción

Los antibióticos son compuestos que matan o inhiben el crecimiento de bacterias, pero su uso indiscriminado ha generado la aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos. En los últimos años se ha detectado un aumento en la resistencia a los antibióticos en cepas de *Aeromonas* spp. debido principalmente al uso irracional de medicamentos para controlar las infecciones en los peces. Lo anterior genera una presión selectiva sobre los microorganismos y por consiguiente la aparición de cepas resistentes a ciertos antibióticos. Los plásmidos, transposones e integrones pueden transportar genes de resistencia a los antibióticos transfiriéndolos horizontalmente entre los microorganismos. Debido a que los integrones pueden capturar y transferir múltiples cassettes de resistencia a los antibióticos se ha convertido en un tema muy importante de investigación. Estudios anteriores demostraron la presencia de integrones de Clase 1 en cepas de *Aeromonas* spp. con una amplia diversidad en su región variable. Los integrones de Clase 1 están formados: por un gen que codifica para una integrasa (*intl*) que corresponde al segmento 5' conservado (5'CS), una región central variable donde se encuentran cassettes, un segmento 3' conservado (3'CS) que contiene un gen de resistencia a las sulfonamidas (*Sull*) y una secuencia de resistencia a un compuesto de amonio cuaternario (*qacEΔ1*). A la fecha, dentro de los integrones se han encontrado más de 100 cassettes diferentes de genes de resistencia la gran mayoría para resistencia a los antibióticos. Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este trabajo fue identificar integrones de Clase 1 en cepas de *Aeromonas* aisladas de muestras de la carpa *Cyprinus carpio* L. ampliamente comercializada en la Ciudad de México.

2 Antecedentes

2.1 *Aeromonas*

El género *Aeromonas* (familia *Aeromonadaceae*, clase *Gammaproteobacteria*) está constituido por bacilos o cocobacilos móviles Gram-negativos, oxidasa y catalasa positivas, no formadoras de esporas y fermentadores de glucosa (Abbott et al. 2003; Martin-Carnahan y Joseph, 2005). De acuerdo con la última edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, el género comprende más de 20 especies (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

El género *Aeromonas* se divide en dos grupos psicrófilos y mesófilos (Abbott et al. 2003; Janda y Abbott, 2010). Las *Aeromonas* spp. psicrófilas han sido reportadas en animales acuáticos y terrestres, crecen especialmente a rangos de temperaturas entre 4 y 10°C. Por su parte, *Aeromonas* spp. mesófilas consideradas potencialmente peligrosas para la salud humana, crecen a temperaturas que oscilan entre 10 y 42 °C. Estas son consideradas autóctonas de ambientes acuáticos y con frecuencia están asociadas con peces (sanos y enfermos), productos alimenticios, animales, heces humanas, muestras clínicas y ambientales extra-intestinales (Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Figueras 2005; Janda y Abbott, 2010). *Aeromonas* spp., son capaces de causar enfermedades en diferentes animales y seres humanos (Gosling 1996; Gray 1984). En algunas especies de peces la infección con *Aeromonas* genera una enfermedad hemorrágica y forunculosis (Austin y Adams 1996). En seres humanos, son responsables de infecciones intestinales y extra intestinales como gastroenteritis, bacteremia, infecciones de piel, tejidos blandos y sepsis (Khajanchi et al. 2010). Originalmente, *Aeromonas* spp. han sido consideradas patógenos oportunistas en humanos inmunocomprometidos. No obstante, se ha detectado un número creciente de casos de enfermedad intestinal y extra-intestinal en todo el mundo relacionados con *Aeromonas* spp., lo que sugiere que es un patógeno humano emergente, independientemente del estado inmune del

huésped (Figueras 2005). La infección se produce a menudo después de un contacto con el patógeno o por consumo de aguas o alimentos contaminados (Janda y Abbott 2010). La gastroenteritis es generalmente autolimitada y el tratamiento con antibióticos es innecesario. Sin embargo, para las infecciones extra-intestinales, se deben conocer los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos para poner en práctica una terapia adecuada (Vila et al. 2002). Actualmente, se conoce que los miembros de *Aeromonas* desarrollan fácilmente resistencia a los antibióticos individuales o múltiples. Por lo cual la EPA lo considera como un patógeno humano emergente (Ko et al. 1996;Goñi-Urriza et al. 2000;Schmidt et al. 2001;Palú et al. 2006; Chauret et al. 2001).

Recientemente, el análisis de secuencia de genes *housekeeping* (por ejemplo, *gyrB* y *rpoD*), ha demostrado ser de gran utilidad en la identificación y estudio del género *Aeromonas* debido a que han revelado una mayor divergencia de secuencia que la secuencia del ARNr 16S (Yañez et al. 2003;Soler et al. 2004;Kupfer et al. 2006). Las ventajas de la técnica de estos genes incluyen la disponibilidad para la mayoría de los laboratorios, alta reproducibilidad, bajo costo, velocidad y libre acceso de las secuencias resultantes en bases de datos públicas (de la Haba et al. 2012;Fusté et al. 2012;Martínez-Murcia et al. 2011;Miñana-Galbis et al. 2010;Mulet et al. 2010;Stackebrandt et al. 2002;Zeigler 2003). Las secuencias de genes *rpoD*, son consideradas como un excelente marcador molecular. El *rpoD* (factor σ^{70}) es un fragmento de aproximadamente de 820 pb, que codifica para uno de los factores sigma, que confieren el inicio de la transcripción-promotor específica de la ARN polimerasa. Este fragmento podría ser empleado como un marcador filogenético adecuado en la sistemática bacteriana (Yamamoto et al. 2000).

2.2 Carpa común (*Cyprinus carpio* L.)

La carpa común (*Cyprinus carpio* L.) es un pez de agua dulce de amplia distribución y un producto alimenticio de consumo importante. Debido a su capacidad de sobrevivir y acumular contaminantes, con frecuencia es empleada en pruebas toxicológicas para determinar el nivel de toxicidad de los productos químicos en el medio ambiente acuático (Xing et al. 2012;Reynders et al. 2008).

El comercio ornamental de peces cada vez es mayor a nivel mundial (Wittington y Chong 2007). En el Reino Unido por ejemplo, más de 45 millones de peces se importan al año, en particular procedentes de Asia Sudoriental y se estima que el 14% de todos los hogares del Reino Unido tiene un acuario o, alternativamente, un estanque (OATA 2009). Recientemente, un estudio realizado en Australia sugiere una posible una relación entre la propiedad de peces ornamentales y un número limitado de casos infantiles asociados a infecciones con *Salmonella java* multiresistente (Musto et al. 2006). El uso y abuso de los antibióticos en la acuicultura conduce a una mayor resistencia a los antibióticos a través de todo el ecosistema microbiano del agua y por lo tanto también a un mayor riesgo para la transmisión de los determinantes de resistencia genética a bacterias que son patógenas para los peces (Schmidt et al. 2000;Sorum 2006).

2.3 Antibióticos y Resistencia Bacteriana.

Los antibióticos son considerados como una de las mayores contribuciones a la medicina en el siglo XX, y se han utilizado para tratar una extensa gama de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, tanto en animales como seres humanos (Wang et al. 2011, 2012;Zhao et al. 2010a, b, c, 2011;Xu et al. 2011d, 2012a, b).

Su uso indiscriminado ha conducido a la emergencia de resistencia a los mismos y plantea un dilema para el futuro tratamiento de las infecciones bacterianas, principalmente, asociadas con un número creciente de fracasos terapéuticos a nivel clínico. Este fenómeno está principalmente asociado con la aparición y propagación de genes de resistencia a los antibióticos (ARGs) en el medio ambiente. Existe una correlación significativa entre la aparición de ARGs y la concentración de antibióticos aplicada, debido a la presión selectiva que estos ejercen en los microorganismos (Gao et al. 2012a;Luo et al. 2010). El establecimiento de ARGs puede requerir un largo período de exposición a antibióticos, pero una vez establecido, los genes pueden persistir, incluso después de retirar la presión selectiva (Pei et al. 2006;Tamminen et al. 2010;Kemper 2008). Ya establecidos en bacterias ambientales los ARGs se pueden transmitir desde el medio ambiente a humanos a través de contacto directo con superficies contaminadas en ambientes externos o indirecto (Iversen et al. 2004;Kim et al. 2005;Rodríguez et al. 2006) (Church et al. 2006) .

El amplio uso de antibióticos en las explotaciones intensivas de animales como alimentos en algunos países, ha dado lugar a la aparición de resistencia en los patógenos transmitidos por estos alimentos (Marshall y Levy 2011). Dado que los antimicrobianos que se utilizan para tratar enfermedades bacterianas tanto en humanos como en animales poseen esencialmente la misma composición química, es evidente que el uso de antimicrobianos en animales es parte de este complejo escenario.

El conocimiento de los mecanismos bacterianos para la adquisición y difusión de rasgos de resistencia a antimicrobianos se ha incrementado en las últimas décadas (Boerlin y Reid-Smith 2008). Los mecanismos de transferencia horizontal de genes son diversos y ofrecen diferentes oportunidades para la transmisión intra- e inter-especies de determinantes de resistencia (White et al. 2001). La transferencia horizontal de genes a menudo se ve facilitada por elementos genéticos móviles como plásmidos de conjugación, fagos y transposones (Levy y Marshall 2004). Sin

embargo, integrones, derivados de transposones defectuosos, que se albergan comúnmente en plásmidos, han surgido con múltiples características de resistencia en las bacterias clínicas y ambientales, debido a la capacidad de movilización y expresión de cassettes de genes de resistencia a antibióticos (Cambray et al. 2010). La propagación de genes de resistencia a través de elementos genéticos móviles es ahora una creciente preocupación a nivel mundial, ya que puede conducir a la rápida aparición de bacterias multi-resistentes a los medicamentos (Tenover y Hughes 1996; Cambray et al. 2010). Estos tienen un papel bien establecido en la dinámica del genoma de bacterias contribuyendo a la evolución y la adaptación procariota. Aproximadamente el 9-17% de los genomas bacterianos secuenciados poseen integrones y estos se ha descrito poseen la misma organización y composición en aislamientos no relacionados en áreas espacial y temporalmente diferentes (Machado et al. 2008; Cambray et al. 2010).

2.4 Integrones

Los integrones son elementos genéticos móviles de DNA capaces de capturar genes de resistencia, en particular los responsables de la resistencia a los antibióticos. Estos pueden estar localizados dentro de plásmidos o transposones de conjugación y contribuir a la adquisición de nuevos genes en bacterias (Davies 1994; Mazel, 2006). Un integrón posee 2 extremos conservados (5'CS: Extremo 5 prime y 3'CS: Extremo 3 Prima) y una región variable con elementos esenciales para la inserción y la movilización de cassettes genéticos (Carattoli 2001). El extremo 5'CS contiene el gen de la integrasa (*intI*) que tiene un longitud de 1,36 kb y codifica para una proteína de 337 aminoácidos (38 kDa), encargada de catalizar la recombinación génica sitio específica. Adyacente al gen *intI* se encuentra el sitio de recombinación específico *attI*, en el que se integran los cassettes génicos 3'CS: que codifican la resistencia a los compuestos de amonio cuaternario y sulfonamida (*qacEΔ1* y *Sull*) (Gaze et al. 2011; Zhang et al. 2009a). La región variable se compone de uno o más cassettes de

genes capturados por el integrón a través del mecanismo de recombinación sitio-específica (Hall y Collis 1995).

Hasta la fecha, existen cuatro clases de integrones nombrados de acuerdo al gen de la integrasa (*intl*) (Peters et al. 2001; Partridge y Hall 2003; Yu et al. 2003; Cambray et al. 2010). Los integrones de Clase 1 son los más importantes y clínicamente relevantes, con una amplia distribución entre las especies de bacterias (Goldstein et al. 2001). No obstante, otras clases de integrones como son los de Clase 2, 3 y 4 (también llamados superintegrones) también han sido descritos con menos frecuencia en aislamientos clínicos (Correia et al. 2003).

2.4.1 Clasificación de los integrones

Integrones de Clase 1

Aproximadamente el 9% de los genomas bacterianos secuenciados contienen integrones de esta clase siendo el más ubicuo entre los microbios clínicos y foco de numerosos estudios (Barlow 2004; Labbate et al. 2009; Xu et al. 2010, 2011c). El integrón de Clase 1 es prevalente en los plásmidos y se ha encontrado en bacterias Gram-positivas pero están especialmente distribuidos entre bacterias Gram-negativas (Mazel 2006; Fluit y Schmitz 2004). Los integrones de Clase 1 han sido reportados comúnmente en una gran variedad de microorganismos gramnegativos clínicos, que incluyen los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* y *Vibrio*. Asimismo, ocasionalmente se han detectado en algunas especies microbianas de diversos ambientes, incluyendo aguas residuales (Tennstedt et al. 2003; Taviani et al. 2008), agua de río (Mukherjee y Chakraborty 2006), y el suelo (Agero y Sandvang 2005). Los integrones Clase 1 están conformados por dos regiones conservadas de DNA situadas en los extremos 5'CS y 3'CS. El extremo 5'CS tiene una longitud de 1,36 kb y contiene el gen *intl1* que codifica para una integrasa encargada de catalizar la

recombinación génica sitio-específica. Adyacente al gen *int1* se encuentra el sitio de recombinación *attI*, en el que se integran los cassettes génicos (Stokes y Hall 1989; Collis y Hall 1992; Grava et al. 1998). *Int1* reconoce tres tipos de sitios de recombinación como son *attI1*, *attC* y sitios secundarios.

Integrones de Clase 2

Los integrones de Clase 2 tienen una organización similar a los de Clase 1, pero se asocian con la Tn7. Comparado con integrones de Clase 1, los integrones de esta clase, exhiben una baja diversidad. La presencia de un codón de paro en el aminoácido 179 de la integrasa (*intI2*) conduce a la producción de un polipéptido más corto e inactivo, incapaz de catalizar la reacción de recombinación (Barlow y Gobius 2006). Como consecuencia, se ha detectado un número reducido de cassettes genéticos diferentes en ellos. Un integrón de Clase 2 lleva 3 genes de resistencia, la dihidrofolato reductasa (*dfrA1*), estreptotricina acetiltransferasa (SAT1), y aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA1*), los cuales confieren resistencia a la trimetoprima, estreptotricina y estreptomina/espectinomicina, respectivamente. Sin embargo, desde la última década, las investigaciones sobre la variabilidad de los integrones de Clase 2 han identificado nuevos reordenamientos, así como genes de resistencia a antibióticos.

Integrones de Clase 3

Los integrones de Clase 3 contienen una estructura comparable a los de Clase 2, y ambas *Int1* y *Int3* son parte del grupo de proteobacterias del suelo y agua dulce, como de integrasas de Clase 2 dentro del grupo γ -Proteobacteria marinas. Funcionalmente similar a *int1*, *int3* cataliza la escisión de cassettes y la integración de cassettes circularizados en el sitio *attI3* integrado, pero la recombinación entre un fragmento de 59-pb y los sitios secundarios se producen a una frecuencia significativamente menor que la observada con *Int1* (Collis et al. 2002). Además, *Int3* es capaz de reconocer diferentes sitios *attC* e integrar los cassettes en el sitio *attI3* que se localiza en una región corta adyacente a *int3* (Collis et al. 2002).

Integrones de Clase 4: Superintegrón

Los integrones de Clase 4 se considera que es un tipo distinto de integrón y se le denomina superintegrón (SI), porque se encontró en el cromosoma pequeño de *Vibrio cholerae* y porque es un componente integral de muchos genomas-y proteobacteriales (Barker et al. 1994;Mazel et al. 1998;Rowe-Magnus et al. 2001). Los integrones de Clase 4 albergan cientos de cassettes de genes que codifican las adaptaciones que se extienden más allá de la resistencia a los antibióticos y a la patogenicidad, y se ha detectado, en aislamientos del siglo pasado, que su existencia data de antes de la era antibiótica (Rowe-Magnus et al. 1999). Las dos características principales que definen a los intergonos de Clase 4 son: (a) el gran número de cassettes que se incorporan, como en el caso de *V. cholerae*, el grupo de ORFs VCR-asociado representa al menos 216 genes no identificados en una serie de cassettes 179 y ocupa aproximadamente el 3% del genoma y (b) la alta homología entre los sitios *attC* de esos cassettes (Rowe-Magnus y Mazel 2001). Los integrones de Clase 4 ha sido identificados y caracterizados entre las *Vibrionaceae*, *Shewanella*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, así como otras *proteobacterias* (Clark et al. 2000;Heidelberg 2000;Nield et al. 2001;Rowe-Magnus y Mazel 2001;Rowe-Magnus et al. 2001). Las restantes clases de integrones también pueden contener cassettes de genes de resistencia a antibióticos, pero su prevalencia en todo el mundo sigue siendo baja (Hall 1993;Nield et al. 2001).

2.5 Cassettes

Los cassettes génicos consisten de un gen flanqueado por un sitio de recombinación, conocido como un elemento de 59 pb, que es reconocido por la recombinasa sitio-específica codificada por el integrón (*intI*). Los cassettes génicos pueden existir como moléculas circulares libres (Collis y Hall 1992) y sólo se transcriben cuando son capturados y se insertan en un integrón (Hall et al. 1995). Se descubren nuevos cassettes continuamente y actualmente se han identificado más de 60 cassettes que confieren resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos (Laraki et al.1999;Recchia et al.1995;White et al. 2000). Los integrones facilitan la integración y

el reordenamiento de los genes que contienen sitios de recombinación ATTC móviles (también conocidos como de 59-pb, llamados "cassettes de genes"), los cuales en su mayoría confieren resistencia a los antimicrobianos (Stokes y Hall 1989;Hall et al. 1991;Collis y Hall 1992;Stokes et al. 1997;Recchia y Hall 1995)(Hall y Stokes 1993;Collis y Hall 1995).

3 Justificación, Hipótesis y Objetivos

3.1 Justificación

En años recientes, la búsqueda de entidades genéticas responsables de la resistencia a antibióticos ha generado gran interés, principalmente debido al surgimiento de cepas multiresistentes a fármacos. De estas, los integrones son de atractivos debido al dinamismo que presentan para capturar genes de resistencia. El intercambio de material genético que codifica para genes de resistencia a antimicrobianos entre patógenos humanos y la microflora normal humana o del ambiente, es una realidad. La transmisión de componentes genéticos con capacidad de alterar la susceptibilidad a los antimicrobianos a través de los alimentos es un área que necesita ser explorada exhaustivamente, las evidencias sobre la presencia de integrones en cepas de origen acuático siguen siendo escasas. En este trabajo se explora la presencia de integrones de Clase 1 en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de muestras de la carpa *Cyprinus carpio* L.

3.2 Hipótesis

Los aislamientos de *Aeromonas* spp. a partir de pescado para consumo humano (*Cyprinus carpio* L.) presentan integrones de Clase 1 con arreglos de cassettes genéticos diferentes.

3.3 Objetivo general

Identificar y localizar integrones de Clase 1 en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de muestras de *Cyprinus carpio* L., comercializada en la ciudad de México.

3.3.1 Objetivos específicos

1. Aislar bacterias de muestras de carpa común en un medio selectivo para *Aeromonadales*.
2. Identificar los aislados mediante análisis genético de secuencia del gen 'housekeeping *rpoD*'.
3. Tipificar los aislados de *Aeromonas* spp. mediante ERIC-PCR.
4. Realizar la búsqueda de plásmidos nativos en las cepas de *Aeromonas* spp.
5. Determinar los perfiles de resistencia a antibióticos en las cepas de *Aeromonas* spp.
6. Identificar y ubicar los integrones de Clase 1 mediante PCR

4 Materiales y Métodos

En las figuras 1 y 2 se observan los pasos a seguir para dar cumplimiento al proyecto de investigación.

Figura 1 Diagrama general de trabajo (Primera parte)

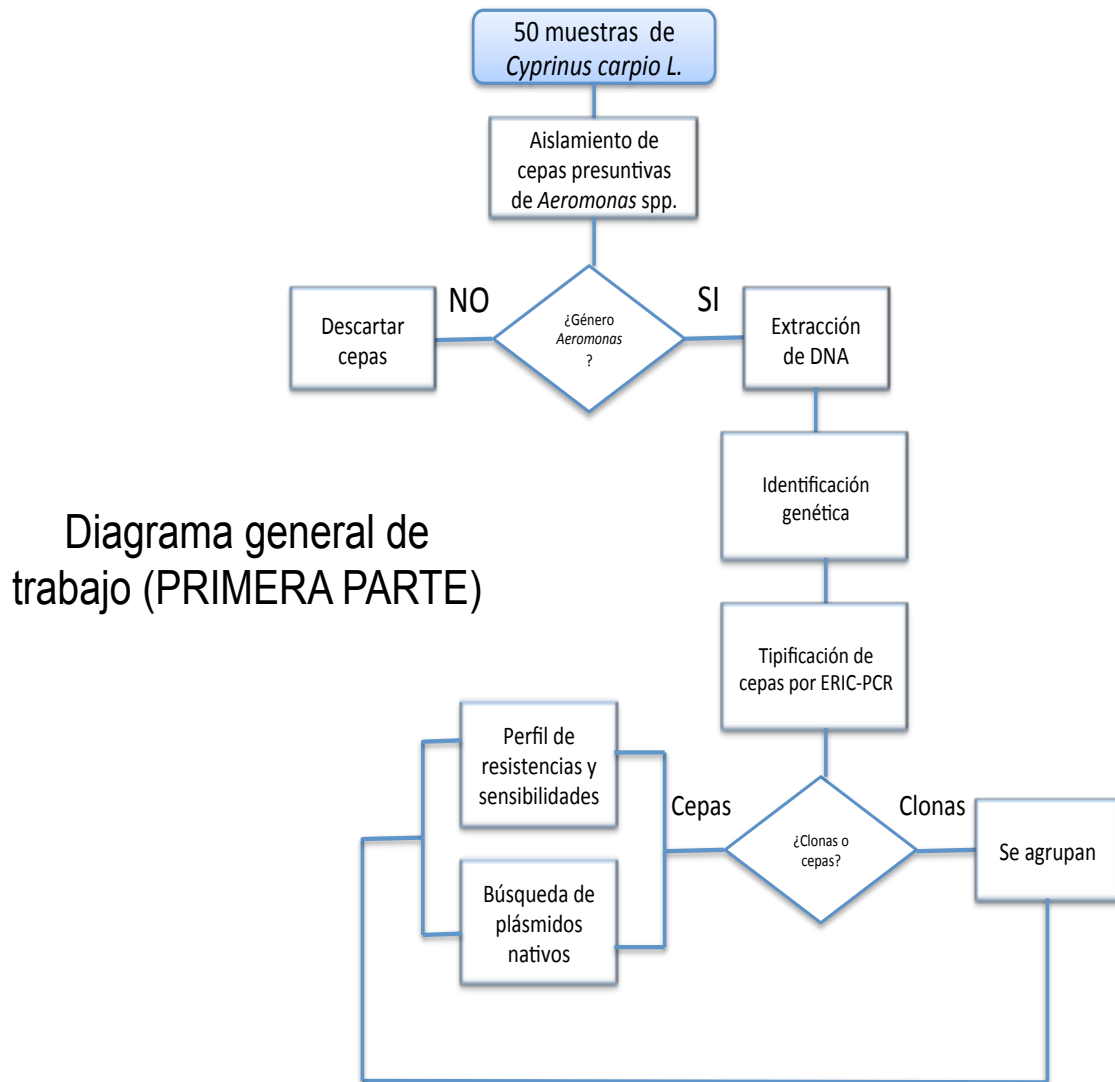
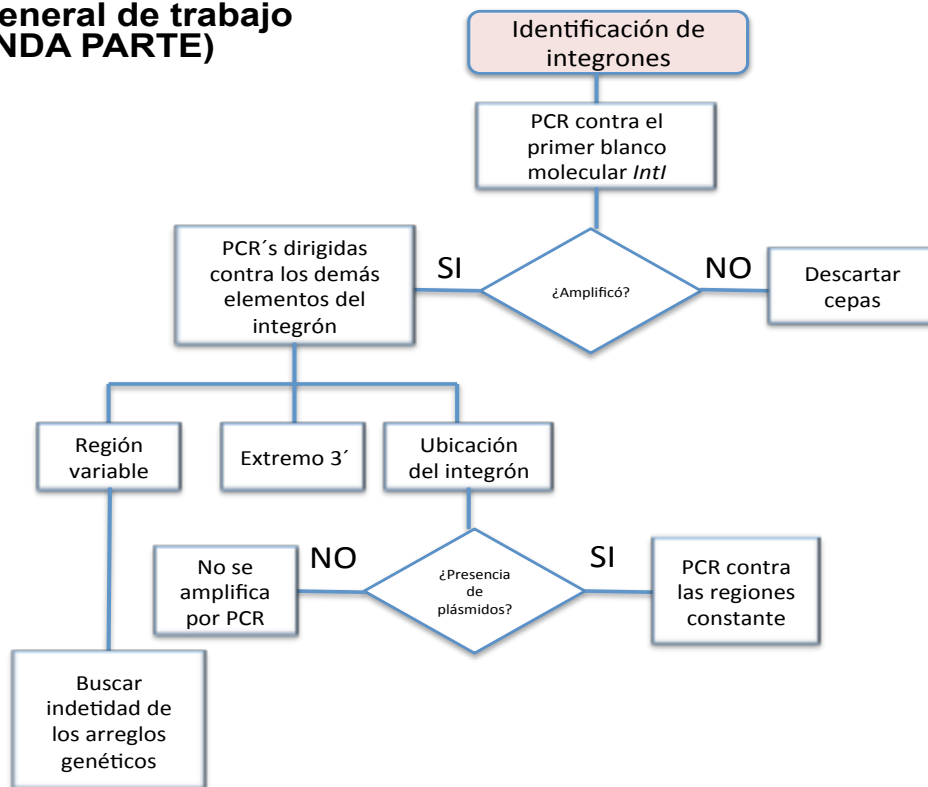


Figura 2 Diagrama general de trabajo (Segunda parte)

**Diagrama general de trabajo
(SEGUNDA PARTE)**



La identificación bioquímica del género se realizó con 5 pruebas básicas como se observa en la tabla 1.

Pruebas	Géneros				
	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacterias</i>
Oxidasa	+	+	+	+	-
Fermentación de la glucosa	+	+	+	-	+
Crecimiento en NaCl:					
3%	-	+	+/-	NA	-
6%	-	-	+	NA	V
Ácido de Inositol	+	-	+	NA	-

Tabla 1. Pruebas bioquímicas diferenciales entre géneros relacionados con las Aeromonadales.

5 Resultados y discusiones

Curr Microbiol (2014) 68:581–586
DOI 10.1007/s00284-013-0511-6

Identification of Antibiotic Resistance Cassettes in Class 1 Integrons in *Aeromonas* spp. Strains Isolated From Fresh Fish (*Cyprinus carpio* L.)

Yohanna Sarria-Guzmán · María Patricia López-Ramírez ·
Yosef Chávez-Romero · Erick Ruiz-Romero ·
Luc Dendooven · Juan Manuel Bello-López

Received: 20 September 2013 / Accepted: 8 November 2013 / Published online: 27 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Forty-six *Aeromonas* spp. strains were isolated from fresh fish and investigated for their antimicrobial susceptibility, detection of Class 1 integrons by PCR, and arrangement of gene cassettes. Selected isolates were further characterized by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. Twenty isolates were found to carry Class 1 integrons. Amplification of the variable regions of the integrons revealed diverse bands ranging in size from 150 to 1,958 pb. Sequence analysis of the variable regions revealed the presence of several gene cassettes, such as adenylyl transferases (*aadA2* and *aadA5*), dihydrofolate reductases (*dfrA17* and *dfrA1*), chloramphenicol acetyl transferase (*catB3*), β -lactamase (*oxa2*), lincosamide nucleotidil transferase (*linF*), aminoglycoside-modifying enzyme (*aphA5*), and oxacillinase (*bla_{OXA-10}*). Two open reading frames with an unknown function were identified as *orfC* and *orfD*. The *aadA2* cassette was the most common integron found in this study. Interestingly, five integrons were detected in the plasmids that might be involved in the transfer of resistance genes to other bacteria. This is a first report of cassette encoding for lincosamides (*linF*) resistance in *Aeromonas* spp. Implications on the incidence of integrons in isolates of *Aeromonas* spp. from fresh fish for human consumption, and its possible consequences to human health are discussed.

Introduction

Antibiotics are substances that kill or inhibit the growth of bacteria, but the indiscriminate use of these compounds has induced antimicrobial resistance [50]. Treatment of bacterial infection in the future will thus become ever more difficult. In recent years, an increase in antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. strains due to the irrational use of drugs to control infections in fish farms has been reported [24]. This generates selection pressure on microorganisms and consequently induces the acquisition of resistance toward antibiotics [8]. Thus, the search for genetic elements associated to antibiotic resistance in microorganisms becomes more important. Plasmids, transposons, and integrons can carry antibiotic-resistant genes and can be transferred horizontally between microorganisms [28, 40, 45]. Integrons have become very important recently as they can capture more than one antibiotic-resistant cassette. Class 1 integrons are formed by a gene coding for an integrase (*IntI*) that corresponds to the 5' conserved segment (5' CS); a variable region size where cassettes are located; a 3' conserved segment (3' CS) which contains a sulfonamide resistance gene (*sulI*); and a quaternary ammonium compound resistance sequence (*qacEΔ1*) [6, 20, 41]. More than 100 different resistance gene cassettes have been found within integrons, and most of them encode for antibiotic resistance [18, 48]. Due to their versatility, integrons can obtain antibiotic resistance cassettes [35]. In addition, they can be mobilized in association with functional transposons and/or conjugative plasmids [7, 8]. Previous studies showed the presence of Class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains with a wide diversity in its variable region [30]. The aim of this study was to identify the presence of Class 1 integrons in strains of *Aeromonas* spp. previously identified by sequencing the housekeeping *rpoD* gene isolated from fresh fish.

Y. Sarria-Guzmán · M. P. López-Ramírez · Y. Chávez-Romero ·
E. Ruiz-Romero · L. Dendooven · J. M. Bello-López (✉)
Laboratory of Soil Ecology, ABACUS, Cinvestav, Mexico,
Mexico
e-mail: juanmanuelbello81@hotmail.com

Materials and Methods

Bacterial Isolation and Genetic Identification

Forty-six strains of *Aeromonas* spp. were isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.) collected in local markets located in the east of Mexico City between February and April 2013. Twenty-five grams of each sample was weighed and placed in flasks containing 225 ml alkaline peptone water (pH 9.0) and were incubated at 28 °C for 24 h. After incubation, the samples were streaked in phenol red agar containing 50 µg/ml ampicillin plus 1 % soluble starch and incubated at 28 °C for 24 h. Yellow colonies surrounded by a halo of clearing that appeared after adding a few drops of lugol were used for identification. Presumptive colonies were selected for further identification and were grown on LB agar (SIGMA, USA) at 28 °C for 24 h. Initial bacterial classification was done by standard bacteriological tests including Gram staining, cytochrome oxidase activity, growth in the presence of 3 and 6 % NaCl, acid production from fermentation of inositol, and glucose oxidation/fermentation (O/F) test. The isolates were identified to the species level by analysis of the *rpoD* gene (Table 1). *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 718 (pRAS1) carrying a Class 1 integron [43] was used as positive control and *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 as a negative control [38].

Strain Characterization

Strains previously identified and belonging to the same species were analyzed by ERIC-PCR to differentiate unique isolates of clones. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN Germany). ERIC-PCR was used for genotyping the strains using the primers ERIC1R and ERIC2 (Table 1) [46]. The reaction mixture consisted of 12.5 µl of PCR mix

[100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂ and 50 mM KCl (pH 8.3)], 100 pM of each primer, 200 µM dNTPs, 300 ng of DNA template, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase and double-distilled water to a final volume of 25 µl. Cycling conditions were as follows: predenaturation at 95 °C for 7 min, denaturation at 90 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min, with a final extension at 68 °C for 16 min at the end of 30 cycles. Genetic profiles were analyzed visually by intragel pattern comparison, and isolates representatives of each ERIC-PCR pattern were selected for subsequent analyses.

Antimicrobial Susceptibility Assay

Resistances of all strains to different antibiotics were determined using the disk diffusion method on Mueller-Hilton agar plates according to recommendations of “The clinical and laboratory standards institute” [10]. The antibiotics used were: kanamycin (30 µg), tetracycline (30 µg), amikacin (30 µg), ampicillin (30 µg), cefepime (30 µg), cefalotine (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), nalidixic acid (30 µg), levofloxacin (5 µg), and trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923 was used as control. Results were interpreted as susceptible or resistant by measuring the diameter of inhibition zone according to the criteria stipulated by the CLSI [10].

Plasmid Isolation

Plasmid DNA from isolates was purified using the QuickGene Plasmid kit S (FUJIFILM, Tokyo, Japan) according to the manufacturer’s protocol. Plasmids were separated and visualized on horizontal 0.8 % agarose gels.

Screening of Class 1 Integron Elements

PCR reactions mixtures (50 µl) contained sterile molecular-grade water, 1× reaction buffer, 1 U *Taq* DNA polymerase, 0.25 mM (dNTPs), 50 pmol of each primer, and 200 ng total DNA was added to the reaction mixture. All isolates were screened for Class 1 integron elements: integrase (*IntI*)-variable region-3’ end (*qacEΔI-sulI*) using primers described previously (Table 1) [24]. The identity of resistance genes was also determined by sequencing the resultant PCR amplicons. Sequencing was done by Macrogen Inc. (DNA Sequencing Service, Seoul, Korea). Sequences were compared with the protein sequence database (GenBank) by means of the BlastX algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5' → 3')	References
rpoD 70Fs	ACGACTGACCCGGTACGCATGTA	[42]
rpoD 70Rs	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT	[42]
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA	[46]
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC	[46]
IntI1-F	GTTCGGTCAAGTTCTG	[51]
IntI1-R	GCCAACTTCAGCACATG	[51]
in-F	GGCATCCAAGCAGCAAGC	[37]
in-B	AAGCAGACTTGACCTGAT	[37]
qacEΔI-F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	[37]
sulI-B	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	[37]

Results and Discussion

The diversity of antibiotic resistance cassettes in Class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains isolated from environmental and clinical samples has been reported before [19]. In this study, the cassette arrangements in Class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains isolated from fresh fish commercialized for human consumption (*Ciprinus carpio* L.) was investigated. In total, 46 strains of *Aeromonas* spp. were isolated and identified by conventional biochemical and morphological tests (i.e., Gram-negative, nonspore, oxidase positive, able to ferment glucose, no acid production from inositol, and growth in 3 % NaCl, but not in 6.0 % NaCl [26]. By sequencing the *rpoD* gene encoding the sigma subunit of RNA polymerase, isolates were identified to the species level as *A. veronii* ($n = 20/43.47$ %), *A. hydrophila* ($n = 7/15.21$ %), *A. salmonicida*, ($n = 6/13$ %), *A. allosaccharophila* ($n = 4/10.86$ %), *A. caviae* ($n = 3/6.52$ %), *A. punctata* ($n = 2/4.34$ %), *A. media* ($n = 2/4.34$ %), and *A. sobria* ($n = 1/2.1$ %). The genus *Aeromonas* includes more than 20 recognized species according to the last edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [1, 3, 15, 27, 29, 36]. The isolation percentage of the species identified in this study was similar to those reported previously [49]. Factors, such as the number of isolates and molecular typing methods, affect the results obtained [9, 42, 49]. The clonal relationship between isolates was analyzed using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR). This probe showed that all strains of *Aeromonas* spp. are unique and not clones as the profiles obtained were different from each other. The isolated *Aeromonas* spp. strains showed differences in susceptibility and resistance to the antimicrobials. Of the 46 aeromonads isolated, six isolates (12.7 %) were resistant to amikacin, 18 (38.2 %) to trimethoprim/sulfamethoxazole, five (10.6 %) to gentamycin, one (2.1 %) to cefotaxime, three (6.38 %) to levofloxacin, 12 (25.5 %) to nitrofurantoin, seven (14.8 %) to ceftipime, five (10.6 %) to ceftriaxone, 12 (25.5 %) to chloramphenicol, 27 (57.4 %) to cephalothin, 25 (53.1 %) to kanamycin, three (6.3 %), and three (6.3 %) to tetracycline. Heterogeneity in resistance toward antibiotics in strains of *Aeromonas* spp. isolated from fish for human consumption has been reported [19]. The PCR results revealed that the 923 base pairs amplicon of the integrase gene was identified in 20 of the 46 *Aeromonas* spp. strains probed (43.4 %). Only 16 of these *intI* positive strains yielded the 800 bp *qacEΔ1/sulI* amplification product corresponding to the 3' conserved region. Several attempts to amplify the 3' end were done on the four strains that did not show this amplicon. Strategies for searching *Tn402*-like sequences were done with integrons lacking the 3' sequences, often associated with Class 1 integrons [32].

Previous studies demonstrating the presence of incomplete integrons, lacking the 3' end, confirmed this absence by their sensitivity to sulfamethoxazole [30]. The presence of this element related to a resistance to this antibiotic in most strains, thus demonstrating the activity of the integrons identified. The DNA of *Aeromonas* spp. strains that amplified integron ends were used as template for amplification of the variable region. The PCR products amplified ranged from 150 to 1,958 bp, indicating different genetic arrangements in the variable region of the integrons found. The amplicons obtained from the variable region were purified, sequenced, and compared to those in the GenBank database. The criteria for defining the identity of the arrangements obtained were percentage match (usually >75 %), length of match (usually >100 bp), and probability of similarity. Sequencing of amplicons revealed inserted cassettes corresponding to genes coding for adenylyl transferases (*aadA2* and *aadA5*), dihydrofolate reductases (*dfrA17* and *dfrA1*), chloramphenicol acetyl transferase (*catB3*), β-lactamase (*oxa2*), lincosamide nucleotidyl transferase (*linF*), aminoglycoside-modifying enzyme (*aphA15*), and oxacillinase (*bla_{OXA-10}*). Two ORFs of unknown function were identified as *orfC* and *orfD* (Table 2). Four strains presented the unique cassette *aadA2* (SA1, SA8, SB5, and SB15). This cassette has been found in *A. veronii* [24], *A. salmonicida* [43], and *A. hydrophila* [31]. These strains were isolated from healthy and diseased fish. The SA3 strain contains the *aadA2-linF* arrangement. The *linF* cassette was first identified in a Class 1 integron of *E. coli* found in animals and people [17, 25, 45]. Until now, the gene that encodes resistance to lincosamides has not been reported in the *Aeromonas* genus. SA13, SC9, and SC13 strains presented the array *aadA5-dfrA17*, which was found in a Class 1 integron of a *Klebsiella pneumoniae* isolate [23]. The identification of the *aadA5* and *dfrA17* cassettes, in addition to many others recently described cassettes that confer antibiotic resistance; highlights the capacity of bacteria to evolve resistance mechanisms that could have further negative implications for the therapeutic use of antibiotics [47]. The cassette *dfrA1* was found in two strains (SB3 and SC1), found previously in *Vibrio cholerae* isolates from humans in India and *Salmonella enterica* isolates from humans and animals in Australia [21, 39, 44]. The cassette *catB3* found in strains SA2 and SB11 has been reported in *A. media*, *A. allosaccharophila*, *A. veronii*, and *A. encheleia* [2, 13, 30]. Only one strain (SB11) has the cassette *aphA15*, also reported in *Achromobacter xylosoxydans*, *Proteus* sp., and *P. aeruginosa* [16, 22, 33]. The cassette *bla_{OXA-10}* was present in one strain (SB13). *bla_{OXA-10}* is a class D extended-spectrum β-lactamase that has been detected previously in human pathogens. The cassette *oxa2* was found in one strain (SA6). *Aeromonas* spp. produces several β-lactamases. One example is the

Table 2 Phylogenetic affiliation and characterization of Class 1 integrons of *Aeromonas* spp. isolated of fresh fish (*Ciprinus carpio* L.)

Isolate	Genetic identification	Antimicrobial resistance pattern	Organization of identified integrons			Presence of plasmid	Integron location
			5' CS	Cassette array/size (pb)	3' CS		
SA13	<i>A. veronii</i>	AM, SXT, NF, CF, NA	<i>IntI</i>	<i>aadA5-dfrA17-orfC/1958</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C
SC9	<i>A. veronii</i>	AM, CF, KAN	<i>IntI</i>	<i>aadA5-dfrA17/1261</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C
SC13	<i>A. veronii</i>	AM, CF, NA	<i>IntI</i>	<i>aadA5-dfrA17/1261</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C
SC1	<i>A. hydrophila</i>	AM, CF	<i>IntI</i>	<i>dfrA1-orfD/1099</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	Yes	C
SB3	<i>A. veronii</i>	AM, KAN	<i>IntI</i>	<i>aadA2-dfrA1/1264</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	Yes	C
SA3	<i>A. salmonicida</i>	AM, CL, CF, KAN	<i>IntI</i>	<i>aadA2-linF/1612</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C
SA6	<i>A. veronii</i>	AM, AK, SXT, GE, NF, CL, KAN	<i>IntI</i>	<i>aadA2-oxa2/1618</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	Yes	C
SB13	<i>A. hydrophila</i>	AM, LEV	<i>IntI</i>	<i>aadA2-bla_{oxa-10}/1591</i>	n.a.	No	C
SA2	<i>A. allosaccharophila</i>	AM, SXT, GE, LEV, NF, FEP, CRO, CL, CF, KAN	<i>IntI</i>	<i>aadA2-catB3/1492</i>	n.a.	No	C
SB11	<i>A. allosaccharophila</i>	AM, CF, KAN	<i>IntI</i>	<i>apha15-catB3/1426</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	Yes	C
SA1	<i>A. veronii</i>	AM, SXT, NF, CF,	<i>IntI</i>	<i>addA2/791</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	Yes	C
SA8	<i>A. hydrophila</i>	AM, NF, CF,	<i>IntI</i>	<i>aadA2/791</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C
SB5	<i>A. veronii</i>	AM, SXT,	<i>IntI</i>	<i>aadA2/791</i>	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C
SB15	<i>A. salmonicida</i>	AM, CL, CF, KAN	<i>IntI</i>	<i>aadA2/791</i>	n.a.	Yes	P
SA9	<i>A. salmonicida</i>	AM, SXT, GE, LEV, NF, CL, CF	<i>IntI</i>	Empty integron ^a /150	<i>qacEΔ1-sulI</i>	Yes	P
SA15	<i>A. sobria</i>	AM, AK, SXT, FEP, CL, KAN	<i>IntI</i>	Empty integron ^a /150	<i>qacEΔ1-sulI</i>	Yes	P
SB6	<i>A. veronii</i>	AM, SXT, CF	<i>IntI</i>	Empty integron ^a /150	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C
SB10	<i>A. hydrophila</i>	AM	<i>IntI</i>	Empty integron ^a	n.a.	Yes	P
SC4	<i>A. allosaccharophila</i>	AM, CF, KAN	<i>IntI</i>	Empty integron ^a /150	<i>qacEΔ1-sulI</i>	No	C

AM ampicillin, AK amikacin, SXT sulfamethoxazole/trimethoprim, GE gentamicin, LEV levofloxacin, NF nitrofurantoin, FEP cefepime, CRO ceftriaxone, CL chloramphenicol, CF cephalothin, KAN kanamycin, NA nalidixic acid, C chromosomal, P plasmid, n.a. not amplifiable by conventional PCR

^a Empty integron = arrangement was not detected by conventional PCR

β-lactamase encoded by *oxa2* gene. This cassette has been previously reported in *Aeromonas* spp. Isolates [18]. Identical arrangements found in phylogenetically distant organisms clearly indicate the horizontal transfer of resistance markers of the mobile genetic elements carrying this gene. To define the location of integrons in the isolates (chromosome or plasmid), plasmids were extracted and used as template for amplification of integron elements. Four of the nine strains that showed plasmid (SA9, SA15, SB10, and SB15) had integrons located in plasmids. An important aspect to note is that multidrug-resistant strains do not always have integrons. These multidrug-resistant strains without integrons might contain extrachromosomal genetic plasmids or transposons that carry antibiotic resistance genes. The tetracycline resistance, for instance, is associated generally with the presence of transposons, such as *Tn1721* and *Tn10* found in plasmids [5, 34]. In

some strains, the resistance profile is not consistent with the arrangements found in the integron. It is known that the expression of the cassettes will depend on the proximity to the promoter [12]. This might have been the case for some integrons reported in this study (SC9, SC13, SB3, and SB11 strains). Empty integrons with no integrated arrangements between 5' ends were found in strains SA9, SA15, SB6, SB10, and SC4. Amplicons of 150 pb are indicative of empty integrons [24]. This type of integrons has been reported previously in aquatic bacterial pathogens [37]. Integrons lose resistance cassettes in the absence of selection pressure exerted by antibiotics [11]. The presence of empty integrons indicates the possibility to capture cassettes resistant to antibiotics. Integrons may play an important role in mediating gene transfer between microorganisms. This versatility has contributed to the quick adaptation of bacteria to different ecological niches

[14, 35]. Over 100 different antibiotic resistance cassettes have been identified in integrons Class 1 in strains of the *Enterobacteriaceae* and *Aeromonadaceae* [4]. The emergence and dissemination of antimicrobial resistance is considered a public health problem where genetic elements, such as plasmids, transposons, and integrons, play an important role. The incidence and prevalence of multi-resistant strains of *Aeromonas* in fish for human consumption is seen as a potential risk for infection. The search for genetic elements associated with resistance to antibiotics is consequently of great importance.

Acknowledgments This study was funded by the *Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal* (Mexico) project ICyTDF/295/2009. Y. Sarria-Guzmán, M. P. López-Ramírez, Y. Chávez-Romero, E. Ruiz-Romero, and J. M. Bello-López received Grant-aided support from the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT, Mexico).

References

- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ (2010) *Aeromonas fluviatilis* ssp. nov., isolated from Spanish river. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:72–77
- Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS (2004) Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 48:838–842
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ, Romalde JL (2009) *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 32:471–479
- Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ (2013) *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* 36:371–388
- Bello-López JM, Vázquez-Ocampo NM, Fernández-Rendón E, Curiel-Quesada E (2012) Inability of some *A. hydrophila* strains to act as recipients of plasmid pRAS1 in conjugal transfer experiments. *Curr Microbiol* 64:332–337
- Box AT, Mevius DJ, Schellen P, Verhoef J, Fluit AC (2005) Integrons in *Escherichia coli* from food-producing animals in the Netherlands. *Microb Drug Resist* 11:53–57
- Cambray G, Guerout AM, Mazel D (2010) Integrons. *Annu Rev Genet* 44:141–166
- Carattoli A (2001) Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 32:243–259
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendon E, Aparicio GO, Guarro J, Chacon MR (2003) Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 84:41–49
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S16. CLSI, Wayne
- Collis CM, Hall RM (1992) Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* 6:2875–2885
- Collis CM, Hall RM (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 39:155–162
- Chang YC, Shih DY, Wang JY, Yang SS (2007) Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59:191–197
- Chen H, Shu W, Chang X, Chen JA, Guo Y, Tan Y (2010) The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing. *Environ Pollut* 158:2459–2464
- Demarta A, Kupfer M, Riegel P, Harf-Monteil C, Tonolla M, Peduzzi R, Monera A, Jose Saavedra M, Martínez-Murcia A (2008) *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol* 31:278–286
- Guo X, Xia R, Han N, Xu H (2011) Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae* strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett Appl Microbiol* 52:667–675
- 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 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 3:12
- Jacobs L, Chenia HY (2007) Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol* 114:295–306
- Kadlec K, von Czapiewski E, Kaspar H, Wallmann J, Michael GB, Steinacker U, Schwarz S (2011) Molecular basis of sulfonamide and trimethoprim resistance in fish-pathogenic *Aeromonas* isolates. *Appl Environ Microbiol* 77:7147–7150
- Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH (2001) Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J Clin Microbiol* 39:8–13
- Levings RS, Lightfoot D, Partridge SR, Hall RM, Djordjevic SP (2005) The genomic island SG11, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *J Bacteriol* 187:4401–4409
- Libisch B, Poirer L, Lepsanovic Z, Mirovic V, Balogh B, Paszti J, Hunyadi Z, Dobak A, Fuzi M, Nordmann P (2008) Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 54:330–338
- Liu H, Wang H, Huang M, Mei Y, Gu B, Wu R, Huang Y, Chen Y, Xu Y, Wang T (2013) Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. *J Thorac Dis* 5:149–155
- Lukkana M, Wongtavatchai J, Chuanchuen R (2012) Class 1 integrons in *A. hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *J Vet Med Sci* 74:435–440
- Marchanta M, Vinué L, Torres C, Moreno MA (2013) Change of integrons over time in *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pigs and chickens. *Vet Microbiol* 163:124–132
- Martínez-Murcia A, Beaz-Hidalgo R, Svec P, Saavedra MJ, Figueras MJ, Sedlacek I (2013) *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr Microbiol* 66:197–204
- Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S (2008) *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1169–1175
- Martínez JL, Baquero F (2002) Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15:647–679

29. Miñana-Galbis D, Farfan M, Albarral V, Sanglas A, Loren JG, Fuste MC (2013) Reclassification of *A. hydrophila* subspecies anaerogenes. *Syst Appl Microbiol* 36:306–308
30. Moura A, Pereira C, Henriques I, Correia A (2012) Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters. *Res Microbiol* 163:92–100
31. Ndi OL, Barton MD (2011) Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J Fish Dis* 34:589–599
32. Post V, Recchia GD, Hall RM (2007) Detection of gene cassettes in Tn402-like class 1 integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3467–3468
33. Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R, Rossolini GM (2001) In70 of plasmid pAX22, a bla(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1249–1253
34. Ross JA, Ellis MJ, Hossain S, Haniford DB (2013) Hfq restructures RNA-IN and RNA-OUT and facilitates antisense pairing in the *Tn10/IS10* system. *RNA* 19:670–684
35. Rowe-Magnus DA, Mazel D (2002) The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 292: 115–125
36. Saavedra MJ, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ (2006) Updated phylogeny of the genus *A*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2481–2487
37. Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL (2001) Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol* 67:5675–5682
38. Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J, Haft D, Wu M, Ren Q, Rosovitz MJ, Madupu R, Tallon L, Kim M, Jin S, Vuong H, Stine OC, Ali A, Horneman AJ, Heidelberg JF (2006) Genome sequence of *A. hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol* 188:8272–8282
39. Shi L, Fujihara K, Sato T, Ito H, Garg P, Chakrabarty R, Ramamurthy T, Nair GB, Takeda Y, Yamasaki S (2006) Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J Med Microbiol* 55:575–583
40. Sidjabat HE, Townsend KM, Lorentzen M, Gobius KS, Fegan N, Chin JJ, Bettelheim KA, Hanson ND, Bensink JC, Trott DJ (2006) Emergence and spread of two distinct clonal groups of multidrug-resistant *Escherichia coli* in a veterinary teaching hospital in Australia. *J Med Microbiol* 55:1125–1134
41. Solberg OD, Ajiboye RM, Riley LW (2006) Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 44:1347–1351
42. Soler L, Yanez MA, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalan V, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ (2004) Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1511–1519
43. Sorum H, L’Abee-Lund TM, Solberg A, Wold A (2003) Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *A. salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1285–1290
44. Thungapathra M, Amita, Sinha KK, Chaudhuri SR, Garg P, Ramamurthy T, Nair GB, Ghosh A (2002) Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac(6’)-Ib, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2948–2955
45. Van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, Mevius D (2007) Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 59:746–750
46. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19:6823–6831
47. White PA, McIver CJ, Deng Y, Rawlinson WD (2000) Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. *FEMS Microbiol Lett* 182:265–269
48. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD (2001) Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2658–2661
49. Yi SW, You MJ, Cho HS, Lee CS, Kwon JK, Shin GW (2013) Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). *Vet Microbiol* 164:195–200
50. Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT (2003) Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol* 41:5429–5433
51. Zhang H, Shi L, Li L et al (2004) Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. *Microbiol Immunol* 48:639–645

6 Conclusiones

- ❖ Se identificaron cepas de *Aeromonas* de las especies *A. hydrophyla*, *A. veronii*, *A. salmonicida*, *A. media*, *A. sobria*, *A. allosaccharophila*, *A. caviae*, *A. punctata*.
- ❖ Se detectaron 11 cepas portadoras de integrones completos, 3 con integrones incompletos y 4 con integrones vacíos.
- ❖ Hay 14 Integrones localizados en el genoma bacteriano y 4 integrones localizados en plásmido.
- ❖ Se identificó por primera vez el cassette *linF*, codificante de una lincosamida nucleotidil transferasa.

7 Recomendaciones

Este proyecto es el principio a otros estudios que involucren la evaluación de la susceptibilidad de estas cepas a otros antibióticos, búsqueda de nuevas fuentes para la identificación de integrones y encontrar nuevos cassettes.

8 Bibliografia

- Abbott S.L., Cheung W.K., Janda J.M. (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 41: 2348–2357.
- Agerso Y., Sandvang D. (2005) Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl Environ Microbiol* 71:7941–7947.
- Austin B., Adams C. (1996) Fish pathogens,. *In* B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling, and S. W. Joseph (ed.), *The genus Aeromonas*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom. p. 197–244.
- Barker A., Clark C.A., Manning P.A. (1994). Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J. bacteriol.* 176:5450-5458.
- Barlow R.S., Desmarchelier P.M., Gobius K.S. (2004). Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:838-842.
- Barlow R.S., Gobius K.S. (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1133-1138.
- Boerlin P., Reid-Smith R.J. (2008) Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Anim. Health Res. Rev.* 9: 115–126.
- Cambray G., Guerout A.M., Mazel D (2010) Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44: 141–166.
- Carattoli A. (2001) Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 32: 243-259.
- Chauret C., Volk C., Creason R., Jarosh J., Robinson J., Warnes C. (2001) Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *Can. J. Microbiol.* 47:782–786. <http://dx.doi.org/10.1139/w01-070>.
- Church D., Elsayed S., Reid O., Winston B., Lindsay R (2006) Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev* 19: 403-434.
- Clark C.A., Purins L., Kaewrakon P., Focareta T., Manning P.A. (2000). The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology* 146(Pt10):2605-2612.
- Collis C., Hall R. (1992) Site-specific deletion and rearrangement of insert genes

catalyzed by the DNA integrase. *J Bacteriol.* 174: 1574-85.

Collis C., Hall R. (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 155-62.

Collis C.M., Hall R.M. (1992) Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol*, 6(19):2875-2885.

Collis C.M., Hall R.M. (1992) Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol*, 174(5):1574-1585.

Collis C.M., Kim M.J., Partridge S.R., Stokes H.W., Hall R.M. (2002). Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. bacteriol.* 184:3017-3026.

Correia M., Boavida F., Grosso F., Salgado M.J., Lito L.M., Cristino J.M., Mendo S., Duarte A. (2003) Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2838–2843.

Davies J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264:375-82.

Dawes F.E., Kuzevski A., Bettelheim K.A., Hornitzky M.A., Djordjevic S.P., Walker M.J. (2010) Distribution of class 1 integrons with IS26- mediated deletions in their 3⁰-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *PLoS ONE* 5 , <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012754>.

de la Haba R.R., Márquez M.C., Papke R.T., Ventosa A. (2012) Multilocus sequence analysis of the family Halomonadaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 520–538.

Figueras M.J. (2005) Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev. Med. Microbiol.* 16, 145–153.

Fluit A.C., Schmitz F.J. (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* .10:272-88.

Fusté M.C., Farfán M., Miñana-Galbis D., Albarral V., Sanglas A., Lorén J.G. (2012) Population genetics of the “*Aeromonas hydrophila* species complex”. In: Fusté, M.C. (Ed.), *Studies in Population Genetics*, InTech, Rijeka, pp. 39–54.

Gao P.P., Mao D.Q., Luo Y., Wang L.M., Xu B.J., Xu L. (2012^a) Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res*;46(7):2355–64.

Gaze W.H., Zhang L., Abdousslam N.A., Hawkey P.M., Calvo-Bado L., Royle J., et al.(2011) Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and

integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 5(8):1253–61.

Goldstein C., Lee M.D., Sanchez S., Hudson C., Phillips B., Register B., Grady M., Liebert C., Summers A.O., White D.G., Maurer J.J. (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.

Goñi-Urriza M., Pineau L., Capdepuy M., Roques C., Caumette P., Quentin C. (2000) Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J Antimicrob Chemother* 46:297–301.

Gosling P.J. (1996) *Aeromonas* species in diseases of animals, *In* B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling, and S.W. Joseph (ed.), *The genus Aeromonas*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom, p. 121–175.

Gravel A., Fournier B., Roy P. (1998) DNA complexes obtained with the integron integrate *IntI1* at the *attI1* site. *Nucleic Acids Res.* 26: 4347-55.

Gray S.J. (1984) *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. *J. Hyg.* 92:365–375.

Hall R. (1993) Stokes H. Integrons. Novel DNA elements which capture genes by site-specific recombinations. *Genetic.* 90: 115-32.

Hall R.M. (1993). Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90:115-132.

Hall R.M., Brookes D.E., Stokes H.W (1991) Site-specific insertion of genes into integrons - role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol*, 5(8):1941-1959.

Hall R.M., Collis C.M. (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15:593–600.

Heidelberg J.F., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477-483.

Heuer O.E., Kruse H., Grave K., Collignon P., Karunasagar I., Angulo F.J. (2009) Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.* 49:1248–1253.

Iversen A., Kühn I., Rahman M., Franklin A., Burman L.G., Olsson- Liljequist B., Torell E., Möllby R. (2004) Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environ Microbiol* 6:55–59.

Janda J.M., Abbott S.L. (2010) The genus *Aeromonas*: taxonomy pathogenicity and

infection. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 35–73.

Joseph S.W., Carnahan A.M. (1994) The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4:315– 343.

Kemper N. (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8:1–13. doi:10.1016/j.ecolind.2007. 06.002.

Khajanchi B.K., Fadl A.A., Borchardt M.A., Berg R.L., Horneman A.J., Stemper M.E., Joseph S.W., Moyer N.P., Sha J., Chopra A.K. (2010) Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 2313–2325.

Khajanchi B.K., Fadl A.A., Borchardt M.A., Berg R.L., Horneman A.J., Stemper M.E., Joseph S.W., Moyer N.P., Sha J., Chopra A.K. (2010) Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 2313–2325.

Kim S.H., Wei C.I., Tzou Y.M., An H.J. (2005) Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. *J Food Prot* 68:2022–2029.

Ko W.C, Yu K.W., Liu C.Y., Huang C.T., Leu H.S., Chuang Y.C. (1996) Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1260–1262.

Kupfer M., Kuhnert P., Korczak B.M., Peduzzi R., Demarta A. (2006) Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2743–2751.

Labbate M., Case R.J., Stokes H.W. (2009). The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* 532:103-125.

Labuschagne C.D.J., Weldhagen G.F., Ehlers M.M., Dove M.G. (2008) Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5- like extended-spectrum-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents* 31:527–530

Laraki N., Galleni M., Thamm I., Riccio M.L., Amicosante G., Frere J.M., Rossolini G.M. (1999) Structure of In31, a *bla*IMP-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:890–901.

- Levy S.B., Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, S122–S129.
- Li X.H., Shi L., Yang W.Q., Li L., Yamasaki S. (2006) New array of *aacA4-catB3-dftA1* gene cassettes and a noncoding cassette from a class-1-integron-positive clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2278–2279.
- Luo Y., Mao D.Q., Rysz M., Zhou Q., Zhang H., Xu L. (2010) Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ Sci Technol* 44(19):7220–5.
- Machado E., Coque T.M., Cantón R., Sousa J.C., Peixe L. (2008) Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 62:296-302.
- Marshall B.M., Levy S.B. (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24: 718–733.
- Martin-Carnahan A., Joseph S.W. (2005) Order XII. Aeromonadales ord. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2, 2nd edn. Springer, New York, pp 556–578.
- Martínez-Murcia A.J., Monera A., Saavedra M.J., Oncina R., López-Alvárez M., Lara E., Figueras M.J. (2011) Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 189–199.
- Mazel D. (2006) Integron: agent of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4:608-20.
- Mendes R.E., Castanheira M., Toleman M.A., Sader H.S., Jones R.N., Walsh T.R. (2007) Characterization of an integron carrying *bla* (IMP-1) and a new aminoglycoside resistance gene, *aac*(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2611–2614.
- Miñana-Galbis D., Farfán M., Lorén J.G., Fusté M.C. (2010) The reference strain *Aeromonas hydrophila* CIP 57.50 should be reclassified as *Aeromonas salmonicida* CIP 57.50. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 715–717.
- Mukherjee S., Chakraborty R. (2006) Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India. *Res Microbiol* 157:220–226.
- Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12: 1513–1530.

Musto J., Kirk M., Lightfoot D., Combs M.L. (2006) Multi drug resistant *Salmonella java* infections acquired from tropical ornamental fish aquarium, Australia, 2003-04. *Commun Dis Intell* 30: 222–227.

Nield B.S., Holmes A.J., Gillings M.R., Recchia G.D., Mabbutt B.C., Nevalainen K.M., Stokes H.W. (2001) Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:59-65

OATA website <http://www.ornamentalfish.org/aquanautmarket/market.php> (6 October 2009 Last accessed).

Palú A.P., Gomes L.M., Miguel M.A., Balassiano I.T., Queiroz M.L., Freitas- Almeida A.C., de Oliveira S.S. (2006) Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiol* 23:504–509.

Partridge S.R., Hall R.M. (2003) In34, a complex In5 class I family containing orf513 and dfrA10. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:342–9.

Pei R., Kim S.C., Carlson K.H., Pruden A. (2006) Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res* 40(12):2427–35.

Peters E.D.J., Leverstein-Van Hall M.A., Box A.T.A., Verhoef J., Fluit A.C. (2001) Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:2961–4.

Recchia G.D., Hall R.M. (1995) Gene cassettes—a new class of mobile element. *Microbiology* 141:3015–3027.

Reynders H., Bervoets I., Gelders M., de Coen W.M., Blust R. (2008). Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient in Flanders, Belgium. – *Science of the Total Environment*, 391: 82–95.

Rodríguez C., Lang L., Wang A., Altendorf K., García F., Lipski A. (2006) Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline- and gentamicin-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72:5870– 5876.

Rowe-Magnus D.A., Guerout A.M., Mazel D. (1999) Super-integrans. *Res. Microbiol.* 150:641-651.

Rowe-Magnus D.A., Guerout A.M., Ploncard P., Dychinco B., Davies J., Mazel D. (2001) The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:652-657.

Rowe-Magnus D.A., Mazel D. (2001). Integrans: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:565-569.

- Schmidt A.S., Brunn M.S., Dalsgaard I., Pedersen K., Larsen J.L. (2000) Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4908–4915.
- Schmidt A.S., Bruun M.S., Dalsgaard I., Larsen J.L. (2001) Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol* 67:5675–5682.
- Smith P. (2008) Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 27: 243–264.
- Soler L., Yañez M.A., Chacon M.R., Aguilera-Arreola M.G., Catalán V., Figueras M.J., Martínez-Murcia A.J. (2004) Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1511–1519.
- Sorum H. (2006) Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Aarestrup, F.M. (Ed.), *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. ASM Press, Washington, D.C.
- Souli M., Galani I., Giamarellou H. (2008) Emergence of extensively drug-resistant and pan-drug resistant gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance* 13: 1–11.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rosselló-Móra R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043–1047.
- Stokes H., Hall R. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* 3: 1669-83.
- Stokes H.W., Hall R.M.(1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions - integrons. *Mol Microbiol*, 3(12):1669-1683.
- Stokes H.W., O'Gorman D.B., Recchia G.D., Parsekhian M., Hall R.M. (1997) Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol*, 26(4):731-745.
- Tamminen M., Karkman A., Löhmus A., Muziasari W.I., Takasu H., Wada S. (2010) Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environ Sci Technol* 45(2):386–91.

- Taviani E., Ceccarelli D., Lazaro N., Bani S., Cappuccinelli P., Colwell R.R., Colombo M.M. (2008) Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. *FEMS Microbiol Ecol* 64:45–54
- Tennstedt T., Szczepanowski R., Braun S., Pühler A., Schlüter A. (2003) Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 45:239–252.
- Tenover F.C., Hughes J.M. (1996) The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA* 275:300–304.
- Vila J., Marco F., Soler L., Chacon M., Figueras M.J. (2002) In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *J Antimicrob Chemother* 49:701–702.
- Wang L., Li Y., Chu J., Xu Z., Zhong Q. (2012) Development and application of a simple LAMP method on rapid detection of *L. monocytogenes* strains. *Mol. Biol. Reports* 39:445–449.
- Wang L., Zhao X., Chu J., Li Y., Li C., Xu Z., Zhong Q. (2011) Application of an improved loop-mediated isothermal amplification detection of *Vibrio parahaemolyticus* from various seafood samples. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5(31):5765–5771.
- White P., Mclver A.C.J., Deng Y.M., Rawlinson W.D. (2000) Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. *FEMS Microbiol. Lett.* 182:265–269.
- Wittington R.J., Chong R. (2007) Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. *Prev Vet Med* 81: 92–116.
- Xing H.j., Li S., Wang Z.L., Gao X.J., Xu S.W., Wang X.L.(2012) Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere* 88:377–383.
- Xu Z., Gui Z., Zhao X., Zhang Y., He X., Li W., Yang L. (2012b). Expression and purification of gp41-gp36 fusion protein and application in serological screening assay of HIV-1 and HIV-2. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(33):6295–6299.
- Xu Z., Li L., Chu J., Peters B., Harris M., Li B., Shi B., Shirliff M. (2012a). Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains. *Food Res. Int.* 47:166–173.

- Xu Z., Li L., Shi L., Shirliff M. (2011c). Class 1 integron in Staphylococci. *Mol. Biol. Rep.* 38:5261-5279.
- Xu Z., Li L., Shirliff M.E., Peters B.M., Peng Y., Alam M.J., Yamasaki S., Shi L. (2010) First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* 68:315-317.
- Xu Z., Li L., Zhao X., Chu J., Li B., Shi L., Su J., Shirliff M. (2011d) Development and application of a novel multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid detection of various types of staphylococci strains. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:1869-1873.
- Yamamoto S., Kasai H., Arnold D.L., Jackson R.W., Vivian A., Harayama S. (2000) Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146: 2385–2394.
- Yañez M.A., Catalàn V., Apria D., Figures M.J., Martínez-Murcia A.J. (2003) Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 875–883.
- Yu H.S., Lee J.C., Kang H.Y., Ro D.W., Chung J.Y., Jeong Y.S., et al. (2003) Changes in genes cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol.* 41:5429–33.
- Zeigler D. (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1893–1900.
- Zhang X.X., Zhang T., Fang H.H.P. (2009) Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:397–414. doi:10.1007/s00253-008-1829-z.
- Zhao X., Wang L., Chu J., Li Y., Xu Z., Li L., XHe, Liu Y., Wang J., Yang J. (2010b) Development and Application of a Rapid and Simple Loop-mediated Isothermal Amplification Method for Food-borne *Salmonella* Detection. *Food. Sci. Biotechnol.* 19:1655-1659.
- Zhao X., Wang L., Chu J., Li Y., Xu Z., Li L., XHe, Liu Y., Wang J., Yang J. (2010c) Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains and virulent factors by loop-mediated isothermal amplification assays. *Food. Sci. Biotechnol.* 19:1191-1197.
- Zhao X., Wang L., Chu J., Li Y., Xu Z., Li L., XHe, Liu Y., Wang J., Yang J. (2011) Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* strains. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27(1):181-184

Zhao X., Wang L., Chu J., Li Y., Xu Z., Li L., XHe, Liu Y., Wang J., Yang J. (2010a) Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. Mol. Biol. Rep. 37:2183-2188.



XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología

Dr. Yohanna Sarría Guzmán ¹, Dr. María Patricia López Ramírez, Dr. Yosef Chávez Romero, Dr. Erick Ruiz Romero, Dr. Luc Dendooven, Dr. Juan Manuel Bello López

CERTIFICAN QUE

PARTICIPARON CON EL TRABAJO TITULADO:

IDENTIFICACIÓN DE INTEGRONES EN CEPAS DE AEROMONAS SPP. AISLADAS DE
PESCADO(CYPRINUS CARPIO L.)

EN CATEGORÍA POSTER

HOWARD JUNCA
Presidente

Asociación Colombiana de Microbiología y
Asociación Latinoamericana de Microbiología

Cartagena, Colombia
Noviembre 5 al 8 de 2014

LILIANA MARCELA OCHOA GALEANO
Directora

Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia