

## Integrans τάξης 1 σε εντεροβακτηριακά από κτηνοτροφική μονάδα, νοσοκομειακούς και εξωνοσοκομειακούς ασθενείς

**ΣΚΟΠΟΣ** Τα integrans τάξης 1 είναι δομές DNA που έχουν τη δυνατότητα να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες αντοχής και να συντελούν στην έκφρασή τους. Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό την ανίχνευση και τη σύγκριση των integrans τάξης 1 σε εντεροβακτηριακά από κτηνοτροφική μονάδα, σε νοσοκομειακούς και εξωνοσοκομειακούς ασθενείς. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Μελετήθηκαν 200 εντεροβακτηριακά στελέχη από ασθενείς με ροίμωση ή αποικισμό, που είχαν απομονωθεί στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του «Λαϊκού» Νοσοκομείου Αθηνών στο διάστημα Μαΐου–Νοεμβρίου 2003. Εκατό μικροοργανισμοί προέρχονταν από ασθενείς με νοσηλεία > 72 ώρες, νοσοκομειακή προέλευση (ΝΠ), και 100 από εξωτερικούς ασθενείς που δεν είχαν νοσηλευτεί για τους προηγούμενους 4 μήνες, προέλευση κοινότητας (ΚΠ). Παράλληλα, μελετήθηκαν και 57 εντεροβακτηριακά στελέχη από ζώα κτηνοτροφικών μονάδων (ΚΜ). Όλοι οι μικροοργανισμοί τυποποιήθηκαν με το σύστημα API ID32E (bioMerieux) και οι ευαισθησίες τους προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους διάχυσης δίσκων Kirby-Bauer και μικροαραιώσεων σε ζωμό MIC. Η παρουσία integrans ελέγχθηκε με ενίσχυση του γονιδίου της integrase 1 και το μέγεθός τους με ενίσχυση της μεταβλητής περιοχής. Η ομοιότητα μεταξύ των μικροβίων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο του γονιδιώματός τους μετά από κατάτμηση με *Xba*I και η ομοιότητα μεταξύ των integrans μελετήθηκε με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των μεταβλητών περιοχών. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Το ποσοστό integran τάξης 1 για τα στελέχη κτηνοτροφικών μονάδων ήταν 50,8%, ενώ για τα μικρόβια από το νοσοκομείο και την κοινότητα ήταν 21% και 11%, αντίστοιχα. Το μέγεθος της μεταβλητής περιοχής των integrans ΚΜ ήταν 800–2500 bp, των ΝΠ 600–3300 bp και των ΚΠ 800–1500 bp. Η συχνότητα ανίχνευσης integran 1 για τα ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά εντεροβακτηριακά ήταν 0%, ενώ για τα πολλαυλοθετικά 53,8%. Οι μεταβλητές περιοχές τριών integrans μεγέθους 800 bp, που προήλθαν από τρία διαφορετικά στελέχη *E. coli* νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και κτηνοτροφικής προέλευσης, περιείχαν τη γονιδιακή κασέτα *aadA1* με ταυτόσημη ακολουθία βάσεων και οι μεταβλητές περιοχές τριών integrans μεγέθους 1400 bp από τρία διαφορετικά στελέχη *E. coli* νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και κτηνοτροφικής προέλευσης ήταν ταυτόσημες και περιείχαν τα γονίδια *aadA* και *dfri*. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα στελέχη ΚΜ είχαν τον υψηλότερο επιπολασμό integrans 1. Τα μεγαλύτερα μεγέθη μεταβλητών περιοχών βρέθηκαν σε στελέχη ΝΠ. Οι φαινότυποι αντοχής συσχετιζόνταν με την παρουσία integrans. Πανομοιότυπα integrans βρέθηκαν σε διαφορετικά εντεροβακτηριακά στελέχη ανθρώπων και ζώων, γεγονός που υποδηλώνει ότι γίνεται ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των προαναφερθέντων μικροβιακών πληθυσμών μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Α. Βασιλακοπούλου,<sup>1,2</sup>  
Γ.Λ. Δαΐκος,<sup>1</sup>  
Λ.Σ. Τζουβελέκης,<sup>3</sup>  
Χ. Κοσμίδης,<sup>1</sup>  
Α. Χαρβάθου,<sup>4</sup>  
Μ. Πασιώτου,<sup>5</sup>  
Α. Αυδήμη,<sup>2</sup>  
Γ. Πετρίκκος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων «Γ.Κ. Δαΐκος», Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών  
<sup>2</sup>Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, ΠΓΝΑ «Λαϊκό»  
<sup>3</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών  
<sup>4</sup>Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών  
<sup>5</sup>Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας

Class 1 integrans in *Enterobacteriaceae* from farm animals, hospitalized and non-hospitalized patients

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

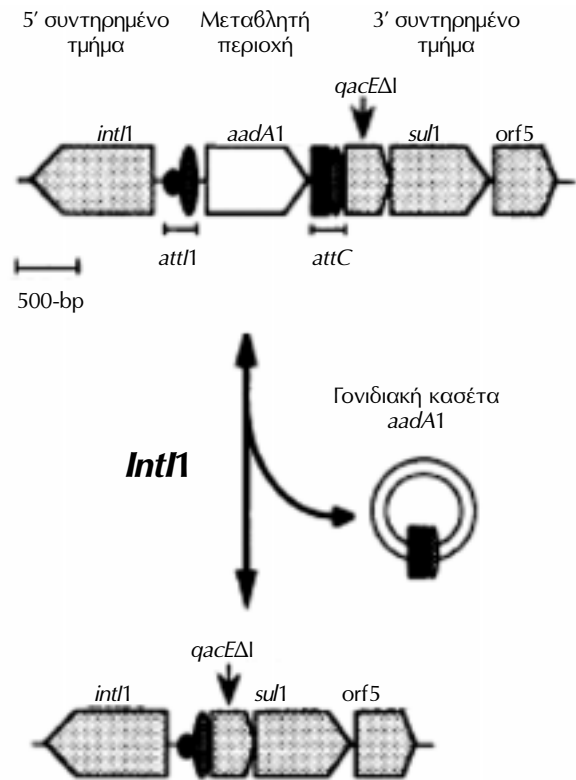
Γονίδιο αντοχής  
Εντεροβακτηριακά  
Integron τάξης 1

Α΄ Βραβείο  
Επαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης», 2005

Η ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροβίων και η ταχεία διασπορά τους στο νοσοκομειακό αλλά και στο εξωνοσοκομειακό περιβάλλον αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα, που διαρκώς επιδεινώνεται και απασχολεί την ιατρική κοινότητα παγκοσμίως. Τα τελευταία χρόνια, πολυανθεκτικά εντεροβακτηριακά στελέχη απομονώνονται συχνότερα, γεγονός που δυσχεραίνει την αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία και αυξάνει το κόστος της.<sup>1,2</sup>

Πολλά από τα γονίδια που προσδίνουν αντοχή στα αντιβιοτικά στα Gram (-) βακτηρίδια συσσωρεύονται σε integrons. Τα integrons μεταφέρονται μέσω πλασμιδίων και τρανοποζονίων και λειτουργούν ως συστήματα παγίδευσης και έκφρασης γονιδίων.<sup>3</sup> Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 8 τάξεις integrons.<sup>4</sup> Στα εντεροβακτηριακά μικρόβια επικρατεί η τάξη 1. Κάθε integron τάξης 1 αποτελείται από τρία μέρη: (α) 5' συντηρημένο τμήμα (5' Conserved Segment, CS), (β) μεταβλητή περιοχή, στην οποία ενσωματώνονται γονιδιακές κασέτες, (γ) 3' συντηρημένο τμήμα (3' Conserved Segment), που περιέχει το γονίδιο *qacEΔ1* για αντοχή στις ενώσεις του τετρασθενούς αμμωνίου, το γονίδιο *sul1* για αντοχή στις σουλφοναμίδες, και την *orf5* αλληλουχία, η λειτουργία της οποίας δεν είναι γνωστή. Στο 5' CS υπάρχει (α) το γονίδιο *int1*, που κωδικοποιεί την ιντεγκράση, ένζυμο ανασυνδυασμού, (β) η ειδική θέση ανασυνδυασμού *attI* και (γ) ο υποκινητής μεταγραφής P (εικ. 1). Η ιντεγκράση εξασφαλίζει τον ανασυνδυασμό μεταξύ της *attI* και μιας δεύτερης θέσης, που λέγεται *attC* (ή 59be) και βρίσκεται στη γονιδιακή κασέτα. Έτσι, το γονίδιο της κασέτας ενσωματώνεται στο integron και μπορεί να μεταγραφεί ξεκινώντας από τον υποκινητή P του 5' CS. Έχουν ανευρεθεί >60 γονιδιακές κασέτες, που σχετίζονται με αντοχή σε αμινογλυκοσίδες, πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, τριμεθοπρίμη, κλωραμφαινικόλη, ριφαμπικίνη, ερυθρομυκίνη, ενώσεις τετρασθενούς αμμωνίου και κινολόνες. Κάθε γονιδιακή κασέτα, πριν από την ενσωμάτωσή της, είναι ένα κινητό, κυκλικό μόριο DNA, που περιέχει την αλληλουχία *attC* και ένα γονίδιο δίχως υποκινητή μεταγραφής (σ' αυτή τη μορφή η γονιδιακή πληροφορία δεν μπορεί να εκφραστεί).<sup>5-7</sup>

Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί αρκετές μελέτες ανίχνευσης integron σε κλινικά στελέχη εντεροβακτηριακών· παρόλα αυτά, στην παρούσα βιβλιογραφία δεν υπάρχει μελέτη που να ερευνά ταυτόχρονα τα integrons σε μικρόβια νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και ζωικής προέλευσης. Η διακίνηση των ασθενών από το νοσοκομειακό στο εξωνοσοκομειακό περιβάλλον οδηγεί στην ανταλλαγή μικροβίων μεταξύ διαφορετικών πλη-



Εικόνα 1. Ενσωμάτωση γονιδιακής κασέτας σε integron 1.

θυσμών και στην ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των μικροβίων. Επιπλέον, μέσω της τροφικής αλυσίδας είναι πιθανόν να διακινούνται ανθεκτικοί μικροοργανισμοί και να διασπείρονται σε υγιή άτομα και ασθενείς. Οι αλληλεπιδράσεις αυτού του είδους μεταξύ μικροβίου/ασθενούς και μικροβίου/μικροβίου και η δυναμική της διασποράς της μικροβιακής αντοχής σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς, τόσο στο διεθνές επίπεδο όσο και στη χώρα μας. Η μελέτη διασποράς της αντοχής μέσω integrons σε διάφορους μικροβιακούς πληθυσμούς μιας αστικής περιοχής (Αττική) θα δώσει σημαντικές πληροφορίες και θα αποτελέσει τη βάση για την κατανόηση και την περαιτέρω αντιμετώπιση του προβλήματος.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Μικροοργανισμοί

Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικοί πληθυσμοί εντεροβακτηριακών. Ο πρώτος αποτελείτο από στελέχη νοσοκομειακής λοίμωξης ή αποικισμού, που συλλέχθηκαν τυχαία από ασθενείς νοσηλευόμενους στο «Λαϊκό» Νοσοκομείο Αθηνών (οι ασθενείς νοσηλεύονταν για >72 ώρες). Ο δεύτερος μικροβιακός πληθυσμός απαρτιζόταν από εντεροβακτηριακά που απο-

μονώθηκαν από εξωτερικούς ασθενείς του ίδιου νοσοκομείου (οι ασθενείς δεν είχαν νοσηλευτεί σε νοσοκομείο τους τελευταίους 4 μήνες πριν από τη λοίμωξη και δεν ήταν ανοσοκατασταλμένοι). Ο τρίτος πληθυσμός περιελάμβανε στελέχη από τυχαίες δειγματοληψίες μετά από τη σφαγή ζώων κτηνοτροφικών μονάδων πριν από τη διανομή προς κατανάλωση (πουλερικά και βοοειδή). Η συλλογή των μικροβίων έγινε την περίοδο Μαΐου–Νοεμβρίου 2003.

### Ταυτοποίηση και προσδιορισμός ευαισθησίας

Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του mini-API (bioMérieux), σύστημα ID32E για εντεροβακτηριακά. Ο έλεγχος ποιότητας έγινε με τα πρότυπα στελέχη *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922 και *P. mirabilis* ATCC 43071. Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας σε αμπικιλίνη, αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη, αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό οξύ, πιπερακιλίνη, τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ, πιπερακιλίνη-ταζομπακτάμη, κεφοξιτίνη, κεφαλοθίνη, κεφουροξίμη, κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη, κεφοταξίμη-κλαβουλανικό οξύ, κεφταζιδίμη-κλαβουλανικό οξύ, μεροπενέμη, ιμιπενέμη, γενταμικίνη, τομπραμυκίνη, νετιλμικίνη, αμικασίνη, αζτρεονάμη, κοτριμοξαζόλη, σιπροφλοξασίνη έγινε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων κατά Kirby-Bauer και με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό MIC σύμφωνα με τις οδηγίες του NCCLS.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η εκκύλιση DNA έγινε με χρήση του QIAamp DNA Mini Kit της QIAGEN, West Sussex, UK, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανίχνευση των integrons 1 έγινε με ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *Int1*, που κωδικοποιεί την ιντεγκράση 1, GenBank No M73819.<sup>8</sup> Οι εκκινητές ήταν *Int1F* (5'-TCTCGGGTAACATCAAGG-3') και *Int1R* (5'-AGGAGATCGGAAGACCTC-3') και το προϊόν είχε μέγεθος 243 bp. Το μέγεθος των integrons προσδιορίστηκε με ενίσχυση της μεταβλητής περιοχής με τους εκκινητές PA5CS: 5'-GGCATCC AAGCAGCAAG-3' και P3CS: 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3' από τις 5' CS και 3' CS περιοχές, αντίστοιχα. Το μίγμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είχε συνολικό όγκο 50 μL (DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα AE: 5 μL). Οι συγκεντρώσεις για την PCR ήταν: dNTPs 200 μM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, εκκινητές 2 μM, Ταq polymerase Qiagen 1,25 U/50 μL. Τα δείγματα υποβλήθηκαν αρχικά σε αποδιάταξη DNA (hot start) σε 94 °C για 3 min και στη συνέχεια σε 30 κύκλους, που ο καθένας συνίστατο σε (α) αποδιάταξη σε 94 °C για 1 min, (β) υβριδισμό σε 55 °C για 1 min, (γ) επιμήκυνση σε 72 °C για 5 min. Τα προϊόντα της PCR για το γονίδιο *Int1* ηλεκτροφορήθηκαν σε 100 V για 60 min σε γέλη αгарόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο και ρυθμιστικό διάλυμα 1XTBE. Τα προϊόντα των μεταβλητών περιοχών ηλεκτροφορήθηκαν σε 80 V για 90 min σε γέλη αгарόζης 1% με βρωμιούχο αιθίδιο και ρυθμιστικό διάλυμα 1XTBE.

### Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (sequencing)

Προσδιορίστηκε η αλληλουχία νουκλεοτιδίων της μεταβλητής περιοχής 3 integrons μεγέθους 800 bp, που είχαν προέλθει από τρία στελέχη *E. coli* νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και κτηνοτροφικής προέλευσης, και 3 integrons μεγέθους 1400 bp από 3 στελέχη *E. coli* νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και κτηνοτροφικής προέλευσης. Αρχικά, καθαρίστηκε το προϊόν της PCR από τη γέλη αгарόζης με το QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, W. Sussex, UK. Το προϊόν ενσωματώθηκε με αντίδραση λιγκάσης στο φορέα κλωνοποίησης pDrive Cloning Vector (QIAGEN Cloning Kit) και έγινε μετασχηματισμός ικανών κυττάρων (*E. coli*) με τον ανασυνδυασμένο φορέα. Τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Luria-Bertani με X-Gal, IPTG και αμπικιλίνη (οι λευκές αποικίες περιείχαν το πλασμίδιο κλωνοποίησης). Στη συνέχεια, έγινε εκκύλιση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (QIAGEN Plasmid Mini Kit) και προσδιορισμός της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων της μεταβλητής περιοχής από το εργαστήριο Lark Technologies, Essex, UK. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε στη διαδικτυακή διεύθυνση [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) του European Bioinformatics Institute με τη βοήθεια του προγράμματος WU-Blast2.

### Ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE)

Έγινε ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου στο γονιδίωμα των 6 στελεχών *E. coli* που έφεραν integrons με κοινές αλληλουχίες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει σχεδιαστεί από το CDC<sup>9</sup> και περιελάμβανε τη λύση των κυττάρων *in situ* σε γέλη αгарόζης και την πέψη του γονιδιώματος από το περιοριστικό ένζυμο *Xba*I. Στη συνέχεια, έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης με το σύστημα CHEF III με συνθήκες: initial switch time 2,2 sec, final switch time 54,2 sec, συνολικό χρόνο 19 ώρες, γωνία 120°, τάση 6 V/cm, θερμοκρασία 14 °C.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν 100 εντεροβακτηριακά νοσοκομειακής προέλευσης, 100 κοινότητας και 57 κτηνοτροφικά. Στον πίνακα 1 απεικονίζονται τα είδη των στελεχών, οι θετικοί σε integrons μικροοργανισμοί και τα μεγέθη των μεταβλητών περιοχών. Από τα 100 νοσοκομειακά μικρόβια, τα 21 ήταν PCR-θετικά για το γονίδιο της ιντεγκράσης 1. Αναλυτικά, η συχνότητα ανίχνευσης *Int1* ανά είδος νοσοκομειακού μικροβίου ήταν: *E. coli* 26,4% (14/53), *K. pneumoniae* 14,3% (3/21), *P. mirabilis* 20% (2/10), *E. cloacae* 25% (2/8). Για τα εντεροβακτηριακά κοινότητας ο επιπολασμός integron 1 ήταν 11% (11/100) και για την *E. coli* κοινότητας 11,2% (10/89), ενώ για τα μικρόβια από ζώα κτηνοτροφικών μονάδων το ποσοστό *Int1*-θετικών ήταν 50,8% (29/57) και ειδικά

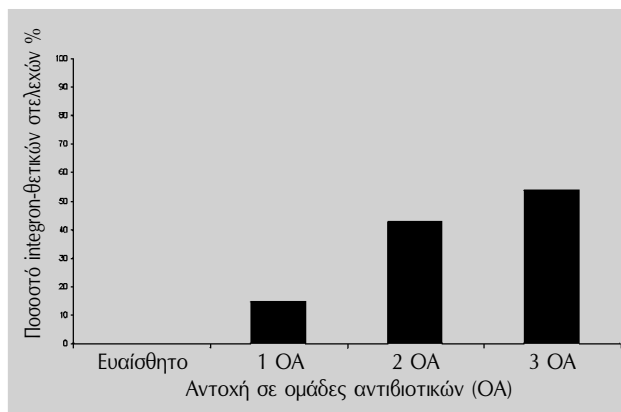
**Πίνακας 1.** Είδη μικροοργανισμών, συχνότητα ανίχνευσης integrons 1 και μεγέθη μεταβλητής περιοχής.

Είδος	Μικροοργανισμοί νοσοκομειακής προέλευσης		
	Αριθμός στελεχών	Παρουσία integrons 1 (n)	Μέγεθος μεταβλητής περιοχής (bp)
<i>E. coli</i>	53	14	600, 800, 1400, 1500, 1800
<i>K. pneumoniae</i>	21	3	800, 1400
<i>P. mirabilis</i>	10	2	1400, 3300
<i>E. cloacae</i>	8	2	800, 1400, 3300
<i>E. aerogenes</i>	4	0	-
<i>M. morgannii</i>	1	0	-
<i>K. oxytoca</i>	1	0	-
<i>C. koseri</i>	1	0	-
<i>S. marcescens</i>	1	0	-
Σύνολο	100	21	
Μικροοργανισμοί κοινότητας			
<i>E. coli</i>	89	10	800, 1400, 1500
<i>P. mirabilis</i>	6	0	-
<i>K. pneumoniae</i>	4	1*	-
<i>E. aerogenes</i>	1	0	-
Σύνολο	100	11	
Μικροοργανισμοί κτηνοτροφικών μονάδων			
<i>E. coli</i>	53	28	800, 1100, 1400, 1700, 2500
<i>P. mirabilis</i>	2	0	-
<i>Salmonella</i> sp	1	1	1400
<i>E. sakazaki</i>	1	0	-
Σύνολο	57	29	

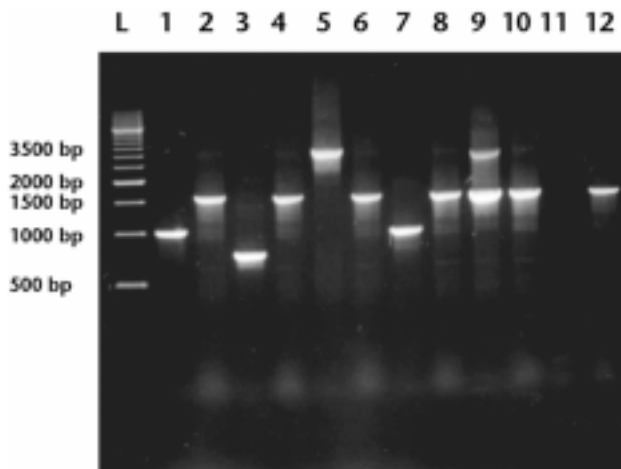
\* Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δεν ενίσχυσε τη μεταβλητή περιοχή

για την *E. coli* 52,8% (28/53). Η παρουσία *Int1* είχε ισχυρή συσχέτιση με το φαινότυπο αντοχής. Ανάμεσα στα στελέχη που ήταν ευαίσθητα και στις τέσσερις ομάδες αντιβιοτικών (β-λακταμικά, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες και κοτριμοξαζόλη) δεν ανιχνεύθηκαν integrons, ενώ στα πολυανθεκτικά (αντοχή σε >2 ομάδες αντιβιοτικών) ο επιπολασμός *Int1* ήταν 53,8% (εικ. 2). Παρομοίως, από τα 103 εντεροβακτηριακά που ήταν ανθεκτικά στην κοτριμοξαζόλη, τα 53 περιείχαν integron (51,4%), ενώ μόνο το 5,1% των στελεχών που ήταν ευαίσθητα στο αντιβιοτικό αυτό περιείχαν integrons ( $P < 0,001$ ).

Οι μεταβλητές περιοχές των νοσοκομειακών στελεχών είχαν μεγέθη από 600–3300 bp (εικ. 3). Ανάμεσα σ' αυτά υπήρχαν και 3 μικρόβια που είχαν από δύο integrons: *E. cloacae* (1400 bp, 3300 bp), *P. mirabilis*



**Εικόνα 2.** Ποσοστό ανεύρεσης integrons 1 σε εντεροβακτηριακά στελέχη σύμφωνα με την αντοχή σε ομάδες αντιβιοτικών.



**Εικόνα 3.** Ηλεκτροφόρηση μεταβλητών περιοχών integrons 1 σε γέλη αгарόζης 1%.

L: Κλίμακα (500–6000 bp). Στήλες 1–10: Μεταβλητές περιοχές νοσοκομειακών στελεχών.

11: Αρνητικός μάρτυρας. 12: Θετικός μάρτυρας.

Τα πραγματικά μεγέθη των μεταβλητών περιοχών είναι 200 bp μικρότερα από αυτά που απεικονίζονται, γιατί οι εκκινητές PA5CS και P3CS βρίσκονται στα συντηρημένα τμήματα.

(1400 bp, 3300 bp), *K. pneumoniae* (800 bp, 1400 bp). Για τα εντεροβακτηριακά κοινότητας, η ενίσχυση των μεταβλητών περιοχών είχε ως αποτέλεσμα τον υπολογισμό μεγεθών από 800–1500 bp, ενώ το μοναδικό *Int1*-θετικό στέλεχος *K. pneumoniae* κοινότητας δεν έδωσε κάποια μεταβλητή περιοχή (έγινε έλεγχος με δύο ζεύγη εκκινητών PA5CS/P3CS, *Int1F*/P3CS) και πιθανόν να έχει τροποποιημένο 3' συντηρημένο τμήμα ή ίσως να λείπει αυτό το τμήμα. Οι μεταβλητές περιοχές ανάμεσα στα στελέχη των κτηνοτροφικών μονάδων είχαν μεγέθη από 800–2500 bp, σε ένα στέλεχος *E. coli* ανιχνεύθηκαν δύο ζεύγη μεταβλητών περιοχών (800 bp, 1400

bp) και σε ένα *E. coli* τρεις μεταβλητές περιοχές (800 bp, 1100 bp, 1700 bp). Και για τις τρεις συλλογές εντεροβακτηριακών, τα πλέον συχνά μεγέθη μεταβλητών περιοχών ήταν 1400 bp και 800 bp. Μετά από προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων των μεταβλητών περιοχών τριών integrons μεγέθους 800 bp (που προέρχονταν από τρία στελέχη *E. coli* νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και κτηνοτροφικής προέλευσης), βρέθηκε και στα τρία η γονιδιακή κασέτα *aadA1* με ταυτόσημη ακολουθία. Παρομοίως, οι μεταβλητές περιοχές τριών integrons μεγέθους 1400 bp από τρία στελέχη *E. coli* νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και κτηνοτροφικής προέλευσης ήταν ταυτόσημες και περιείχαν τα γονίδια *aadA* και *dfrl*. Στον πίνακα 2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των μεταβλητών περιοχών. Η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου των γονιδιωμάτων των *E. coli* που έφεραν κοινά integrons έδειξε ότι επρόκειτο για διαφορετικά στελέχη.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την παρουσία integrons σε τρεις διαφορετικούς μικροβιακούς πληθυσμούς, νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και ζωικής προέλευσης, καθώς και για τη σημασία των δομών αυτών στη δημιουργία πολυανθεκτικών μικροβίων και την πιθανή διασπορά τους μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Η συχνότητα integron 1 στα εντεροβακτηριακά κτηνοτροφικής μονάδας ήταν πολύ υψηλότερη απ' ό,τι στο νοσοκομείο και την κοινότητα (50,8%, 21%, 11%, αντίστοιχα). Μεγαλύτερα σε μέγεθος integrons (ένδειξη

**Πίνακας 2.** Μεγέθη μεταβλητής περιοχής και γονιδιακές κασέτες integrons 1 στελεχών *E. coli*, νοσοκομειακής, εξωνοσοκομειακής και κτηνοτροφικής προέλευσης.

Προέλευση	Είδος	Μέγεθος μεταβλητής περιοχής (bp)	Γονιδιακές κασέτες
Νοσοκομείο	<i>E. coli</i>	800	<i>aadA1</i>
Κοινότητα	<i>E. coli</i>	800	<i>aadA1</i>
Κτηνοτροφική μονάδα	<i>E. coli</i>	800	<i>aadA1</i>
Νοσοκομείο	<i>E. coli</i>	1400	<i>aadA</i> , <i>dfrl</i>
Κοινότητα	<i>E. coli</i>	1400	<i>aadA</i> , <i>dfrl</i>
Κτηνοτροφική μονάδα	<i>E. coli</i>	1400	<i>aadA</i> , <i>dfrl</i>

περισσότερων γονιδιακών κασετών) βρέθηκαν σε νοσοκομειακά και κτηνοτροφικά στελέχη, πιθανόν λόγω μεγαλύτερης πίεσης επιλογής από την αυξημένη κατακάλωση αντιβιοτικών στους χώρους αυτούς. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των μεταβλητών περιοχών έδειξε ότι integrons 1 από μικροοργανισμούς κτηνοτροφικής και ανθρώπινης προέλευσης περιέχουν πανομοιότυπα γονίδια. Η ανεύρεση ταυτόσημων integrons σε φυλογενετικά διαφορετικούς μικροοργανισμούς υποδηλώνει ότι γίνεται διακίνηση γενετικού υλικού μεταξύ των προαναφερθέντων μικροβιακών πληθυσμών. Συνεπώς, οι προσπάθειες για περιορισμένη και ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών στο νοσοκομειακό περιβάλλον, για να είναι αποτελεσματικές, πρέπει να συνδυάζονται και με ανάλογη πολιτική στις κτηνοτροφικές μονάδες.

Από την παρούσα έρευνα φαίνεται ότι τα κτηνοτροφικά εντεροβακτηριακά αποτελούν δεξαμενή integrons 1 και κατ' επέκταση δεξαμενή γονιδίων αντοχής. Εάν ληφθεί υπόψη ότι οι δομές αυτές έχουν την ικανότητα να παγιδεύουν γονιδιακές κασέτες αντοχής και να τις εκφράζουν, τα μικρόβια που φέρουν integrons θα μπορούσαν κάτω από συνθήκες αντιμικροβιακής πίεσης να ενσωματώσουν ακόμη περισσότερα γονίδια αντοχής (φαινόμενο μάλλον σπάνιο).<sup>10</sup> Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα τελευταία χρόνια ανιχνεύονται διαρκώς νέες γονιδιακές κασέτες, όπως αυτές που προσδίδουν αντοχή στις κινολόνες και στα νεότερα β-λακταμικά με δυνατότητα ενσωμάτωσης σε integrons.<sup>11,12</sup> Η παρουσία integrons συσχετίζεται με τον πολυανθεκτικό φαινότυπο, όχι μόνο λόγω των γονιδιακών κασετών που εμπεριέχονται στα integrons, αλλά και λόγω του ότι οι φορείς των integrons, τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια, συμμεταφέρουν και άλλα γονίδια αντοχής. Η συμμεταφορά πολλαπλών γονιδίων αντοχής από τέτοιες κινητές νουκλεοτιδικές δομές μπορεί να οδηγήσει σε μεταβίβαση πολυαντοχής από μικρόβιο σε μικρόβιο, ακόμη και εάν η πίεση επιλογής προέρχεται από ένα αντιβιοτικό.<sup>13</sup>

Τα τελευταία χρόνια, η χαρτογράφηση του γονιδιώματος των μικροβίων έχει αποκαλύψει τη σημασία της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού. Έχει αποδειχθεί ότι έως και 20% των γονιδίων ενός στελέχους μπορεί να διαφέρουν φυλογενετικά, ένδειξη ότι αποκτήθηκαν με οριζόντια μεταφορά από άλλο γένος ή είδος μικροβίου. Οι νουκλεοτιδικές δομές που σχετίζονται με αυτό το φαινόμενο είναι πολλές (φάγοι, πλασμίδια, τρανσποζόνια, integrons, γονιδιακές νησίδες κ.λπ.).<sup>14</sup> Η μελέτη της λειτουργίας των γενετικών δομών πλάγιας μεταφοράς έχει μεγάλη σημασία, γιατί μπορεί να βοη-

θήσει στην κατανόηση των μηχανισμών διασποράς της μικροβιακής αντοχής στο περιβάλλον που ζούμε. Η γνώση των παραγόντων που συντελούν στην εξάπλωση των

γονιδίων αντοχής θα οδηγήσει στη λήψη κατάλληλων μέτρων για την αντιμετώπιση του σοβαρού αυτού προβλήματος.

## ABSTRACT

### Class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* from farm animals, hospitalized and non-hospitalized patients

A. VASILAKOPOULOU,<sup>1,2</sup> G.L. DAIKOS,<sup>1</sup> L.S. TZOUVELEKIS,<sup>3</sup> C. KOSMIDIS,<sup>1</sup> E. CHARVALOS,<sup>4</sup> M. PASIOTOU,<sup>5</sup> A. AVLAMIS,<sup>2</sup> G. PETRIKKOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>“G.K. Daikos” Infectious Diseases Research Laboratory, 1st Department of Propedeutic Medicine, Medical School of Athens, Athens, <sup>2</sup>Department of Clinical Microbiology, “Laikon” General Hospital, Athens, <sup>3</sup>Department of Microbiology, Medical School of Athens, <sup>4</sup>Technological Institution of Athens, <sup>5</sup>Veterinary Laboratory of Chalkida, Chalkida, Greece

*Archives of Hellenic Medicine* 2006, 23(1):45–51

**OBJECTIVE** Class 1 integrons are DNA structures that recognize and capture mobile gene cassettes. A considerable portion of the genes encoding antibiotic resistance is integrated into these DNA elements. This study aimed to detect and compare class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* from farm animals and hospitalized and non-hospitalized patients. **METHOD** Two hundred clinical isolates of *Enterobacteriaceae* causing human infection or colonization were collected between May and November 2003, 100 from patients hospitalized for more than 72 hours (hospital acquired, HA) and 100 from outpatients with no prior hospitalization in the preceding 4 months (community acquired, CA). Fifty-seven *Enterobacteriaceae* isolates were collected from farm animals (FA) during the same period. The microorganisms were identified using a standardized identification system and their susceptibilities to commonly used antibiotics were determined by the Kirby-Bauer and broth microdilution MIC methods according to NCCLS guidelines. The presence of class 1 integrons was detected by amplifying the integrase 1 gene, and their size was calculated by amplifying the variable regions. Similarities between the microorganisms were identified by pulsed field gel electrophoresis of their genomes after digestion by *Xba*I and similarities between the integrons were studied after sequencing of the variable regions. **RESULTS** The rate of integron 1 carriage was 50.8% for FA *Enterobacteriaceae*, 21% for HA and 11% for CA. The size range of the variable region was 600–3300 bp, 800–2500 bp, and 800–1500 bp for HA, FA and CA integrons, respectively. The 800 bp variable regions of three integrons detected in three different *E. coli* isolates of hospital, community and animal origin carried an identical gene cassette (*aadA1*) and the 1400 bp variable regions of three different *E. coli* isolates of hospital, community and animal origin were identical, carrying the genes *aadA* and *dfxI*. The prevalence of class 1 integrons in multiresistant *Enterobacteriaceae* was 53.8% while no integron was detected among the sensitive isolates. **CONCLUSIONS** The highest prevalence of class 1 integrons was detected among FA *Enterobacteriaceae*. The HA integrons harboured the longest variable regions. Identical integrons were found in human and animal microorganisms. The antibiotic resistance profile is associated with the presence of integrons.

**Key words:** Class 1 integron, *Enterobacteriaceae*, Resistance gene

## Βιβλιογραφία

1. DAVIES J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 1994, 264:375–382
2. HOLMBERG SD, SOLOMON SL, BLAKE PA. Health and economic impacts of anti-microbial resistance. *Rev Infect Dis* 1987, 9:1065–1078
3. STOKES HW, HALL RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: Integrons. *Mol Microbiol* 1989, 3:1669–1683
4. NIELD BS, HOLMES AJ, GILLINGS MR, RECCHIA GD, MABBUTT BC, STOKES HW ET AL. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett* 2001, 195:59–65

5. PLOY MC, LAMBERT T, COUTY JP, DENIS F. Integrons: An antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med* 2000, 38:483–487
6. FLUIT AC, SCHMITZ FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999, 18:761–770
7. FLUIT AC, SCHMITZ FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 2004, 10:272–288
8. BISSONNETTE L, ROY PH. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1992, 174:1248–1257
9. FOODBORNE AND DIARRHOEAL DISEASES BRANCH, DIVISION OF BACTERIAL AND MYCOTIC DISEASES, NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Standardised molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis: A training manual. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga, 1996
10. COLLIS CM, HALL RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalysed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 1992, 174:1574–1585
11. TRAN JH, JACOBY GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:5638–5642
12. LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R ET AL. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:1584–1590
13. ENNE VI, LIVERMORE DM, STEPHENS P, HALL LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 2001, 357:1325–1328
14. DAVISON J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 1999, 42:73–91

*Corresponding author:*

A. Vasilakopoulou, 8 Klitou street, GR-157 71 Athens, Greece  
e-mail: avassil@hol.gr

.....