



1166124

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y METALES
PESADOS EN CEPAS CLINICAS DE
Staphylococcus aureus

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN MICROBIOLOGIA
P R E S E N T A
ERIC MONROY PEREZ

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. SERGIO VACA PACHECO

NOVIEMBRE 97

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al M en C. Sergio Vaca Pacheco

Por brindarme la oportunidad de haber sido el director de este trabajo, así como también por la confianza y apoyo depositadas en mí.

A la QFB. Gloria Luz Paniagua Contreras

Por las facilidades y apoyo para la realización de este proyecto.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	81

RESUMEN

Los *Staphylococcus aureus* son una causa frecuente de infecciones respiratorias en la población de pacientes que acude al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la ENEP-Iztacala. Con el propósito de aislar y caracterizar cepas de *S. aureus* productoras de β -lactamasas y resistentes a metales pesados, en particular a plomo, se determinó la susceptibilidad de 150 cepas a 12 antibióticos por el método de Bauer-Kirby; la producción de β -lactamasas por hidrólisis del β -lactámico cromogénico nitrocefín, la CMI de Ampicilina y Amoxicilina con y sin inhibidor de β -lactamasas sulbactam o ácido clavulánico; así como la CMI de plomo, cromato, arsenato, cadmio y mercurio, por dilución en placa. Los porcentajes de cepas resistentes a los antibióticos fueron; Ampicilina y Penicilina (94%), Ceftazidima (92%), Eritromicina (73%), Pefloxacina (57%), Cefotaxima (41%), Tetraciclina (40%), Dicloxacilina (36%), Trimetoprim con sulfametoxazol (32%), Gentamicina (24%), Cefuroxima (10%) y Cefalotina (7%). El 75% de las cepas fue resistente a 4-7 antibióticos. Sólo 96% de las cepas produjeron β -lactamasa y 4% fueron β -lactamasa negativas.

Las CMI₅₀ y CMI₉₀ de Ampicilina fueron 250 y 1562 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente; en tanto que el sulbactam redujo ambas CMI por un factor de 10. Las CMI₅₀ y CMI₉₀ de amoxicilina fueron 390 y 1687, respectivamente y el ácido clavulánico redujo ambos valores por un factor de 8, lo que indica que estas combinaciones pueden ser útiles en el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*. Todas las cepas fueron sensibles a cromato (CMI 375 $\mu\text{g/ml}$), el 100% fue resistente a mercurio (CMI 20-40 $\mu\text{g/ml}$) y cadmio (CMI 50-100 $\mu\text{g/ml}$); El 26% de las cepas fue sensible a arsenato (CMI 200-400 $\mu\text{g/ml}$) y el 74% resistente (CMI 800-3200 $\mu\text{g/ml}$). La CMI de plomo mostró una distribución bimodal, con 2.6% de cepas sensibles o medianamente resistentes (CMI 100-200 $\mu\text{g/ml}$) y 97.4% de cepas resistentes (CMI 800-3200 $\mu\text{g/ml}$). Se aislaron dos grupos de plásmidos de diferente tamaño molecular (16,000 y 23,130 pb), los cuales fueron responsables de la resistencia a penicilina (β -lactamasa), ampicilina, ceftazidima y arsenato, sin embargo no se pudo detectar alguno que confiriera resistencia a plomo.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

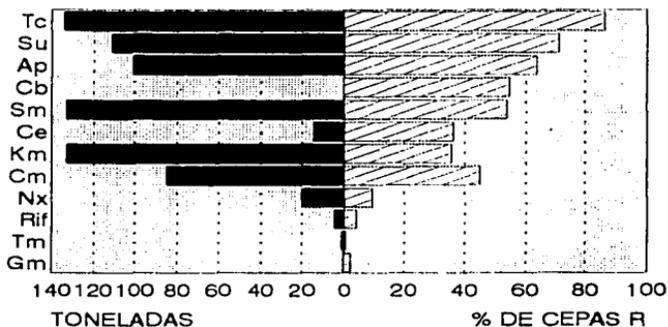
Resistencia bacteriana a los antibióticos y su relación con el consumo de antimicrobianos

En los últimos años el tratamiento de las infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus* ha sido un verdadero problema para los médicos y especialistas, debido a que estos microbios han adquirido con el tiempo resistencia a los antibióticos, situación a la que ha contribuido el hombre de manera importante, debido a la automedicación, a una prescripción inadecuada por parte de los facultativos o a el uso de los antimicrobianos como "promotores de crecimiento" en alimentos para animales domésticos (Amábile, C.F., 1988).

De esta manera la selección de cepas resistentes a los antibióticos está relacionada con el uso de estos agentes antimicrobianos. Por ejemplo, se ha reportado que el porcentaje de un grupo de cepas Gram negativas resistentes aisladas en México en el periodo de 1976 a 1979 (295 *E. coli*, 198 *Proteus mirabilis*, 63 *Proteus* indol positivos y 39 *Salmonella*) guarda una relación prácticamente paralela al consumo total de los antibióticos tanto para uso humano como veterinario y agrícola (Kuperstoch-Portnoy, Y. M., 1981); en este estudio se observó claramente que los antibióticos menos efectivos contra las bacterias fueron aquellos consumidos más ampliamente (figura 1).

FIGURA 1 RELACION ENTRE EL CONSUMO DE ANTIBIOTICOS Y LAS CEPAS RESISTENTES

ANTIBIOTICO



Adaptado de Kuperstoch-Portnoy, 1981.

- Tc = Tetraciclina
- Su = Sulfametoxazol
- Ap = Ampicilina
- Cb = Carbenicilina
- Sm = Estreptomina
- Km = Kanamicina
- Cm = Cloranfenicol
- Nx = Acido nalidixico
- Rif = Rifampicina
- Tm = Trimetoprim
- Gm = Gentamicina

Mecanismos de resistencia a los antibióticos

El amplio uso de los antibióticos seleccionan bacterias resistentes, las cuales constituyen un grave problema que se agudiza en los hospitales, siendo frecuente la aparición de cepas multirresistentes. Es común que las cepas resistentes posean plásmidos que les confieren este fenotipo (Bryan, L.E. 1980).

Los mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por plásmidos se han agrupado en cuatro categorías (tabla 1)(Amábile, C.F. 1988).

1. Destoxificación enzimática.
2. Disminución de la entrada o retención en la célula.
3. Modificación del blanco.
4. Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco.

Tabla 1. Mecanismos de acción de los antibióticos y de resistencia de las bacterias

MECANISMO DE RESISTENCIA	MECANISMO DE ACCIÓN	ANTIBIÓTICO
Destoxificación enzimática	Inhibición de la síntesis de la pared celular	β -lactámicos • Penicilina • Cefalosporinas
Destoxificación enzimática	Inhibición de la síntesis de proteínas	Aminoglucósidos • Gentamicina • Estreptomina • Neomicina
Destoxificación enzimática	Inhibición de la síntesis de proteínas	Cloranfenicol
Disminución de la entrada o retención en la célula	Inhibición de la síntesis de proteínas	Tetraciclinas
Modificación del blanco	Inhibición de la síntesis de proteínas	Macrólidos y relacionados • Eritromicina • Lincodamidas
Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco	Inhibición de la síntesis de ácido fólico	Sulfonamidas trimetoprim

Tomado de Amábile Cuevas, C.F., 1988.

Resistencia a antibióticos β -lactámicos

El mecanismo más importante de resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos es la producción de β -lactamasas (BL), estas enzimas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, originando un compuesto sin actividad antibacteriana (ácido peniciloico) (Sykes, R.B. & M. Mathew, 1976) (Figura 2).



Figura 2. Hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico.

Las β -lactamasas pueden ser codificadas por plásmidos, o como en el caso de algunas bacterias Gram negativas por el cromosoma bacteriano (es probable que la mayoría produzca cuando menos una β -lactamasa y que éstas sean específicas para género y especie) (Sykes, R.B. & M. Mathew, 1976)

Las β -lactamasas de las bacterias Gram positivas se excretan extracelularmente y destruyen el antibiótico antes que entre en contacto con la superficie de la célula, en tanto que las producidas por las Gram negativas se

sitúan en el espacio periplásmico presentando una barrera para la difusión de las cefalosporinas al interior de las células (Sykes, R.B. & M. Mathew, 1976).

A diferencia de la mayor parte de los microorganismos Gram positivos en los que la producción de β -lactamasas suele ser el único factor de resistencia, en los Gram negativos existe un mecanismo secundario de resistencia ("resistencia intrínseca"), el cual consiste en parte en una incapacidad de los antibióticos para difundir al interior de la célula microbiana, (Chopra, I. & P.R. Ball. 1982) y, en parte, a niveles bajos de β -lactamasa codificados por el cromosoma (Ohmori, H. *et al.*, 1977; Curtiss, N.A.C. *et al.*, 1981).

La resistencia a penicilina debida a la producción de β -lactamasa en *Staphylococcus aureus* se detectó por primera vez en 1950, seguida rápidamente por resistencia a otros antibióticos (macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclina). Si bien, en los últimos años ha crecido el número de microorganismos resistentes a penicilina, es muy probable, que los genes de esta resistencia estuviesen presentes en las poblaciones de estafilococos y de otras bacterias desde antes del uso masivo de los antibióticos. Por ejemplo, del 5 al 10% de las cepas de *S. aureus* almacenadas en la era pre-antibiótica son

resistentes a penicilina debido a la producción de β -lactamasas (Penicilinasas) (Novick, R. 1993).

En *S. aureus* se han descrito cuatro diferentes tipos de penicilinasas (A, B, C y D) (Richmond, M.H., 1965), que difieren en su estructura solamente en pocos aminoácidos, lo que conduce a tasas de hidrólisis distintas; por ejemplo, A y B hidrolizan rápidamente a la bencilpenicilina y la ampicilina, pero muy poco a la meticilina y cloxacilina.

Con excepción de la Penicilinasas D, cuya expresión es constitutiva (Rosedahl, V.T., 1993) todas son inducibles y la mayoría de su actividad es extracelular (Richmond, M.H. 1965)

Otro de los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias a los antibióticos β -lactámicos es debido a mutaciones cromosómicas que alteran la cantidad o afinidad de proteínas de membrana externa llamadas PBPs (por penicillin binding proteins). La introducción en 1960 de la meticilina, un compuesto derivado de la penicilina y resistente a β -lactamasas, fue seguida rápidamente por la aparición de cepas resistentes. La resistencia a meticilina se debe, probablemente, a la proteína PB2a que tiene baja afinidad por los compuestos β -lactámicos (Hartman, B. J. & A. Tomasz, 1984; Fasola, E.L. *et al.*, 1995).

En *S. aureus* se han descrito mutaciones que alteran las PBPs confiriéndole resistencia a cefradrina (Georgopapadakou, N.H. *et al.*, 1982), así como también, un transposón que codifica para una β -lactamasa. Este elemento genético móvil, designado Tn552, está constituido por 6,700 pares de bases y se encuentra tanto en plásmidos como en el cromosoma (Rowland, S.J. & K.G. Dyke, 1989).

Para combatir a las cepas productoras de β -lactamasas se han desarrollado las cefalosporinas, cuyo grado de resistencia a β -lactamasas es variable; éstas incluyen a las cefalosporinas de segunda generación (cefexitina, cefamandol y cefuroxima) y a las de tercera generación (cefotaxima, moxalactam, cefoperazome y otras).

También se han introducido antimicrobianos resistentes a la penicilinas producida por *S. aureus*, éstos incluyen a las penicilinas semisintéticas: meticilina, oxacilina, nafclicina y otras (Richmond, M.H. 1979).

Otra de las estrategias utilizadas contra cepas productoras de β -lactamasas es la combinación de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, de los que uno de ellos es un producto natural del *Streptomyces clavuligerus* (ácido clavulánico) y el otro es totalmente sintético (sulbactam) (Comber, K.R. *et al.*, 1980). Estos inhibidores de β -lactamasas poseen una

estructura química similar a los antibióticos pero con actividad antimicrobiana deficiente, sin embargo, cuando se combinan con un antibiótico β -lactámico restauran su actividad sobre microorganismos resistentes a éste. El ácido clavulánico se ha combinado con amoxicilina o ticarcilina y el sulbactam con ampicilina o cefoperazone (Comber, K.R. *et al.*, 1980).

No obstante, que la utilización de un β -lactámico más el inhibidor de β -lactamasas constituye un factor de selección a favor de bacterias productoras de β -lactamasas, aparentemente no ha ocurrido aún un incremento en la producción de β -lactamasas resistentes a inhibidores, toda vez que en una revisión de 1500 artículos publicados sobre este tópico entre 1978 y 1993 se encontró que si bien aumentó la frecuencia de cepas productoras de β -lactamasas resistentes a ampicilina y penicilina, no hay evidencia, publicada en este período de que se haya incrementado la resistencia a la combinación de amoxicilina + clavulánico (Rolinson, G.N. 1994).

Se ha reportado la utilidad del tazobactam como inhibidor de β -lactamasas producidas por cepas de estafilococos (Bonfiglio, G. & D.M. Livermore 1994). En este estudio se demostró que las cepas de *S. aureus* productoras de enzimas tipo A fueron más susceptibles a las combinaciones

piperacilina/tazobactam, amoxicilina/tazobactam e inclusive amoxicilina + clavulánico que las cepas productoras de enzimas tipo C.

Resistencia a antibióticos y metales pesados

Como ya mencionamos, el empleo de los antibióticos puede seleccionar bacterias resistentes a estos agentes (Kuperstoch-Portnoy, Y. M., 1981), siendo frecuente que esta resistencia se encuentre conferida por plásmidos (Watanabe, T. 1963; Elwell, L.P. *et al.*, 1978; Davies, E.L. 1978; O'Brien, T.F. 1980).

De igual manera que se han reportado bacterias resistentes a los antibióticos, se han descrito bacterias resistentes a uno o más metales pesados (Nakahara, H. *et al.*, 1977a; Cenci, M. *et al.*, 1982; Silver, S. 1983;) La resistencia a metales pesados en varios de los casos puede ser conferida por plásmidos o por transposones (Silver, S. 1981).

El empleo de los antimicrobianos en los hospitales puede seleccionar bacterias resistentes tanto a antibióticos como a metales pesados, toda vez, que ambos determinantes de resistencia pueden encontrarse asociados en el mismo plásmido y la selección de resistencia a un antibiótico conduciría, de manera indirecta, a seleccionar resistentes al metal (Silver, S. 1988). Por ejemplo, en el año de 1970 se aislaron cepas clínicas de *E. coli* resistentes a

antibióticos y metales pesados, en las que ambas resistencias se encontraban conferidas por el mismo plásmido (Nakahara, H. *et al.*, 1982).

Se han reportado numerosos ejemplos de resistencia a antibióticos y metales pesados mediados por el mismo plásmido. En la tabla 2 se presenta un resumen de los ejemplos de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Staphylococcus aureus*, así como en otras especies bacterianas.

Tabla 2. Ejemplos de resistencia a antibióticos y metales pesados conferidos por el mismo plásmido.

BACTERIA	ANTIBIÓTICO	METAL	REFERENCIA
<i>S. aureus</i>	Penicilina	Mercurio	Moore, B. 1960
	Penicilina Macrólidos	Arsénico Bismuto Cadmio Zinc Mercurio	Novick, R.P. <i>et al.</i> , 1968
	Penicilina SXT Estreptomicina Kanamicina	Mercurio Cadmio Arsénico	Nakahara, H. <i>et al.</i> , 1977a
	Macrólidos	Cadmio	Nakahima, Y. 1990
<i>P. aeruginosa</i>	Estreptomicina Tetraciclina Kanamicina Gentamicina	Mercurio Cadmio Arsénico	Nakahara, H. <i>et al.</i> , 1977b
<i>E. coli</i>	Estreptomicina Tetraciclina Cloranfenicol Kanamicina Gentamicina	Cadmio Arsénico Mercurio	Nakahara, H. <i>et al.</i> , 1992

Interacción de las bacterias con los metales

Las bacterias poseen la capacidad de interactuar con los iones de los elementos de la tabla periódica. Estos iones pueden dividirse en tres grupos (Silver, S.1983; Cervantes, C. 1994) (tabla 3).

Tabla 3. Relación de los iones con las bacterias

Clasificación de los iones que interactúan con las bacterias
1.- Iones esenciales: Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}
2.- Iones abundantes pero comúnmente no esenciales: Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-
3.- Iones no esenciales y tóxicos: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , BiO^+ , SbO^+ AsO_2^- , AsO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , $Cr_2O_7^{2-}$, TeO_3^{2-}

En el tercer grupo se encuentran algunos de los metales pesados (por su alta densidad) más tóxicos, cuya toxicidad se basa principalmente en su interacción con las macromoléculas bacterianas. Por ejemplo, los iones mercurio, plata, cobre, zinc y arsenito interactúan con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, alterando su estructura y funciones; de esta forma algunos metales inhiben la actividad catalítica de ciertas enzimas, la transferencia de electrones por proteínas de la cadena respiratoria o el funcionamiento de los

componentes de la membrana celular (Silver, S. 1983; Cervantes, C. *et al.*, 1986; Chen, C. *et al.*, 1986).

Se ha reportado que ciertos iones como el cromo trivalente, cadmio y cobre tienen un efecto mutagénico sobre las bacterias al interactuar éstos sobre la cadena de ADN, mientras que otros como el arseniato, cromato y cadmio compiten con los iones esenciales para su transporte al interior de la célula (Silver, S. 1983; Ohtake, H. *et al.*, 1987)

Mecanismos de resistencia a metales pesados

Los determinantes de resistencia a metales pesados se encuentran a menudo localizados en plásmidos o en transposones (Silver, S. 1981; Silver, S. *et al.*, 1984; Summers, A.O. 1978).

La localización de los determinantes de resistencia a metales pesados en los últimos años ha facilitado la clonación de varios de ellos y en algunos casos se ha determinado su secuencia de nucleótidos y deducido la de los aminoácidos correspondientes (Silver, S. & Walderhaugh, M. 1992; Cervantes, C. & Gutiérrez-Corona 1994).

Arsénico

Se ha reportado que la resistencia a arsénico mediada por plásmidos incluye a los iones arseniato, arsenito y antimonio (Silver, S. *et al.*, 1981). En *Staphylococcus aureus* y en *Escherichia coli* se han descrito un grupo de genes asociados en un operón (denominado *ars*) (Silver, S. *et al.*, 1988) cuyo funcionamiento puede ser inducido por cualquiera de los iones mencionados (Silver, S. *et al.*, 1981)

El operón *ars* (del plásmido R773) fue clonado y secuenciado por Chen y col. (1986), quienes identificaron tres genes y dedujeron la secuencia de las tres proteínas correspondientes. Ars A es una proteína asociada con la membrana celular y tiene características de una ATPasa (Rosen, B.P. *et al.*, 1988). ArsB es también una proteína de membrana, funciona como canal iónico y es responsable de la expulsión de los iones de arsénico (Chen, C. *et al.*, 1986). La tercera proteína ArsC es una proteína necesaria para la resistencia a arseniato pero no a arsenito o antimonio (Chen, C. *et al.*, 1986). ArsC es probablemente una subunidad reguladora de ArsB, que modifica la especificidad por los diferentes iones. Recientemente se ha descrito un gene más, *arsR*, el cual funciona como regulador del operón (San Francisco, M. J. D. *et al.*, 1990).

En resumen, los iones tóxicos son captados inicialmente por los sistemas fisiológicos de transporte de la célula (figura 3); una vez en el citoplasma, estos iones inducen la expresión de la ATPasa (ArsA), la cual genera energía para expulsarlos de la célula a través del canal iónico de la membrana ArsB.

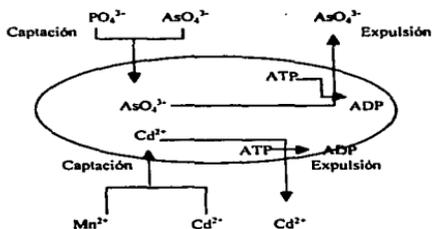


Figura 3. Mecanismo de captación de los iones tóxicos arseniato (AsO_4^{3-}) y cadmio (Cd^{2+}) por la vías fisiológicas de transporte de fosfato (PO_4^{3-}) y manganeso (Mn^{2+}), respectivamente.

Cadmio

La resistencia a cadmio constituye uno de los marcadores genéticos de resistencia más comunes en los plásmidos de los estafilococos (Smith, K. & R.P. Novick 1972). En *Staphylococcus aureus* el cadmio penetra a la célula por la vía del transporte del ión manganeso (Perry, R.D. *et al.*, 1982) (figura 3).

El mecanismo de resistencia a cadmio se ha estudiado con mayor detalle en *Staphylococcus aureus*. Los plásmidos contienen dos genes que confieren distintos niveles de resistencia tanto a cadmio como a zinc, *cadA* (nivel elevado) y *cadB* (nivel reducido) (Novick, R.P. *et al.*, 1979; Walter, E.G. *et al.*, 1989). Tynecka y col. (1981) encontraron que las células de *S. aureus* que poseen *cadA* muestran una incorporación reducida de cadmio debido a un mecanismo de eflujo que elimina el cadmio intracelular.

En los últimos años el gene *cadA* del plásmido pI258 de *S. aureus* fue clonado y secuenciado (Nucifora, G. *et al.*, 1989). El análisis de la secuencia mostró que *cadA* codifica para una proteína con homología significativa con las ATPasas del tipo E1E2 que funcionan en la translocación de cationes citoplásmicos (Nucifora, G. *et al.*, 1989). Las ATPasas E1E2 incluyen a la ATPasa de potasio de bacterias Gram positivas y Gram negativas, la ATPasa que interviene en el eflujo de protones para la generación de potencial de

membrana en eucariontes inferiores y las ATPasas de calcio del retículo sarcoplásmico (Silver, S. *et al.*, 1988).

De esta manera el mecanismo de resistencia a cadmio en *S. aureus* funciona mediante el eflujo del cadmio intracelular que es energizado por una ATPasa (figura 3)(Nucifora, G. *et al.*, 1989).

Cobalto Niquel y Zinc

Las concentraciones elevadas de estos cationes ejercen efectos tóxicos sobre los microorganismos (Cervantes, C. 1990).

Se ha reportado que la cepa de *Alcaligenes eutrophus* CH34 contiene dos plásmidos; pMOL28, que determina la resistencia a níquel y bajos niveles de cobalto (*cobA*) y pMOL30 con resistencia a zinc, cadmio y altos niveles de cobalto (*cobB*) (Mergeay, M. *et al.*, 1985).

Se ha demostrado que la resistencia es inducible y que las células resistentes inducidas en presencia de estos metales expulsan del citoplasma cualquiera de los cationes por un mecanismo aún desconocido (Nies, D.H. & S. Silver, 1989).

Cobre

El cobre se considera un micronutriente esencial para el crecimiento bacteriano, pero en concentraciones elevadas es sumamente tóxico. Los determinantes de resistencia a cobre han sido clonados a partir de plásmidos de *P. syringae* (Bender, C.L. & D.A. Cooksey, 1987; Venitt, S. & L.S. Levy, 1974) y *E. coli* (Rouch, D. *et al.*, 1989). El mecanismo de resistencia en *P. syringae* se basa en la excreción de proteínas que capturan al cobre impidiendo su efecto tóxico (Mellano, M.A. & D.A. Cooksey, 1988). Estas proteínas tienen un octapéptido que se encuentra repetido varias veces y que se postula es la región que captura al cobre.

Se ha demostrado la expulsión del cobre intracelular en cepas de *E. coli* resistentes, y se ha postulado un modelo de captación, quelación y finalmente de expulsión del ión (Rouch, D. *et al.*, 1989) (fig. 4). Probablemente en los tres procesos intervienen productos génicos codificados tanto por plásmidos como por el cromosoma (Cervantes, C. 1988)

Se han descrito otras estrategias por parte de las bacterias para resistir a los efectos tóxicos del cobre como: precipitación mediada por plásmidos (Erardi, F.X. *et al.*, 1987) y excreción de ácidos orgánicos u otros agentes quelantes (Harwood-Sears, V. & A.S. Gordon, 1990)

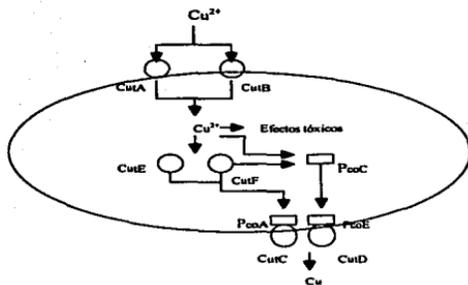


Figura 4. Cooperación de los productos génicos cromosómicos (Cut) y plasmídicos (Pco) en el mecanismo de resistencia a cobre en *Escherichia coli*.

Cromo

Los estados de oxidación del cromo juegan un papel importante en los efectos tóxicos; mientras en la forma trivalente se considera un micronutriente esencial, el cromo hexavalente (cromatos y dicromatos) es altamente tóxico (Cervantes, C. *et al.*, 1990)

Se ha descrito que la resistencia a cromato determinada por plásmidos se basa en la acumulación disminuida del ión por las células resistentes (Ohtake, H. & S. Silver 1987; Cervantes, C. & H. Ohtake, 1988). Recientemente se han secuenciado dos determinantes de resistencia a cromato

a partir de plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes, C. *et al.*, 1990) y *A. eutrophus* (Nies, A. & S. Silver, 1990). El análisis de esta secuencia reveló una homología entre los polipéptidos hidrofóbicos, designados ChrA, codificados por ambos determinantes (Cervantes, C. *et al.*, 1990). Se asume que ChrA es una proteína de membrana responsable de la traslocación de los iones de cromato, de manera similar al papel de ArsA en la expulsión de arseniato (Cervantes, C. *et al.*, 1990) (figura 3).

Se ha reportado un mecanismo de resistencia a cromo no codificado por plásmidos que se basa en la detoxificación del cromo hexavalente mediante su reducción a cromo trivalente (Bopp, L. H. & H. L. Ehrlich, 1988) (figura 5).

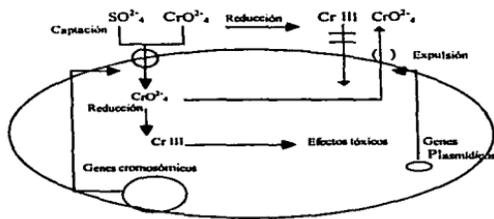


Figura 5. El cromo hexavalente penetra a las bacterias por el sistema de transporte del sulfato y puede ser reducido a cromo trivalente en el citoplasma o en el exterior de las células (genes cromosómicos). Las bacterias resistentes expulsan el cromo hexavalente mediante productos génicos codificados por plásmidos.

Mercurio

Se ha descrito que la resistencia a mercurio se debe a una reducción de la forma inorgánica (Hg^{2+}) a la forma metálica volátil (Hg^0), constituyendo, de esta manera, una eficiente forma de detoxificación (Summers, A.O. & S. Silver 1978) (figura 6). Los determinantes plasmídicos de resistencia a mercurio de bacterias Gram negativas provenientes de 3 diferentes fuentes fueron clonados y secuenciados: los transposones Tn21 de *Shigella flexneri* y Tn501 de *Pseudomonas aeruginosa* (Brown, N.L. et al., 1986; Misra, T.K. et al., 1984) y el plásmido pDU1358 de *Serratia marcescens* (Griffin, H.G., et al., 1987). Estos autores encontraron gran homología entre las proteínas deducidas de la secuencia del DNA de las 3 especies. La resistencia a mercurio se encuentra asociada al operón *mer*, el cual consta, de un gene regulador que codifica para la proteína MerR y a continuación se encuentra la región del operador-promotor a donde se une MerR y el primer gene estructural que codifica una proteína membranal, MerT, que transporta el mercurio extracelular. El siguiente gene *merP*, origina una proteína periplásmica con capacidad de unión de mercurio, que se postula como responsable de acarrear el catión unido a MerT al citoplasma. Después se halla *merC*, cuyo papel en el transporte de mercurio no ha sido definido (Kusano, T. et al., 1990). Finalmente, el gene *merA*, que contiene FAD como cofactor y cuya forma

funcional es dimérica. Los 3 polipéptidos MerT, MerP y MerA tienen en común la presencia de pares de cisteínas que se cree están involucrados en la unión del mercurio y en su transporte secuencial del exterior al espacio periplásmico y al citoplasma para su detoxificación (Silver, S. & T.K. Misra. 1988).

Se ha encontrado un gene adicional en el determinante de *Serratia*, merB, que codifica una liasa, enzima que amplía el espectro de resistencia a compuestos organomercuriales (Griffin, H.G. et al., 1987) (tales como los antisépticos merthiolate y mercurocromo). La liasa rompe el enlace entre el carbono y el mercurio del organomercurial liberando el mercurio iónico que es posteriormente detoxificado por la reductasa (Silver, S. & T.K. Misra. 1988) (figura 6).

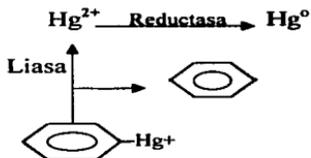


Figura 6. Detoxificación de mercurio y organomercuriales. La reductasa plasmídica transforma el ión mercúrico en la forma volátil menos tóxica (Hg^0). Algunos también codifican una liasa que actúa sobre los organometales.

No obstante que ya han sido esclarecidos los mecanismos de resistencia a algunos metales por parte de las bacterias, a la fecha, no se conoce mecanismo de resistencia alguno a plomo, ni siquiera ha quedado claro si existen bacterias resistentes a este metal. Sólo hay un reporte de Nakahara y col. (1977a) en donde la distribución de la CMI (concentración mínima inhibitoria) de plomo en una población de cepas clínicas de *S. aureus* es bimodal, distinguiéndose así, dos subpoblaciones (sensible, CMI = 3.1-6.2 µg/ml y resistente CMI = 1600-3200 µg/ml). En contraste, Vaca y col. (1995) encontraron una distribución unimodal de la CMI de plomo para una población de cepas aisladas de suelos contaminados con plomo; estos autores consideraron que todas las cepas eran resistentes debido a que el pico de la distribución ocurrió a 800-1600 µg/ml. Nakahara y col. (1977b) obtuvieron una distribución de un solo pico para plomo (1600-3200 µg/ml) en colecciones de cepas Gram negativas.

De ésta manera, la selección de cepas resistentes a antibióticos en ambientes hospitalarios o en pacientes no hospitalizados que han sido tratados con antibacterianos es fácilmente comprensible, más aún si consideramos el mal uso y abuso de los antibióticos (automedicación o prescripción del antibiótico inadecuado, a dosis erróneas, durante un lapso insuficiente; el empleo de estos compuestos como parte de la dieta de animales). Sin embargo,

la emergencia de cepas clínicas resistentes a metales pesados (que no se utilizan como desinfectantes) es más difícil de entender, sobre todo cuando las cepas son resistentes solamente a metales y no a antibióticos; ya que, por supuesto, si los determinantes de resistencia a metales y antibióticos residen en un mismo plásmido, la selección para resistencia al antibiótico en el ambiente hospitalario conduciría a la selección indirecta de la resistencia al metal. Así pues, los factores selectivos para bacterias resistentes sólo a metales no se han identificado aún. Parece poco probable que las bacterias resistentes a metales se originen al azar; quizá el factor de selección sea la contaminación ambiental por metales pesados.

JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana a metales en las últimas décadas ha recibido especial atención debido a la creciente contaminación producida por metales pesados en diferentes ecosistemas. En México existen varios ejemplos de contaminación ambiental. Por ejemplo, en el área de Lechería (Estado de México) una empresa procesadora de cromo provocó una grave contaminación que se reflejó en niveles elevados de cromo en la población (Baez, A.P. *et al.*, 1977). El empleo de bacterias para reducir Cromo hexavalente con fines de descontaminación se ha descrito (Boop, L.H. & H.L. Ehrlich, 1988) pero no se ha llevado a cabo.

Otro ejemplo de contaminación ambiental es la ocasionada por plomo (anualmente se depositan dos millones de toneladas de plomo en el aire) que puede ejercer efectos dañinos para los humanos, afectando los sistemas: hematopoyético, hepático, renal, reproductivo y nervioso central (principalmente en niños y mujeres embarazadas) (Silbergeld, E.K. 1990).

De tal manera que el presente trabajo se enfatiza en buscar cepas clínicas de *S. aureus* resistentes a metales pesados (en particular a plomo), considerando que podrían ser de gran utilidad no solo para la destoxificación de ecosistemas, sino también como una alternativa para recuperar metales valiosos

de yacimientos agotados, o como sondas para evaluar la contaminación ambiental por metales pesados.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la resistencia a antibióticos y metales pesados en un grupo de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*

PARTICULARES

- Establecer la resistencia a 12 antimicrobianos por el método de Bauer-Kirby
- Detectar la producción de β -lactamasa en las cepas resistentes a penicilina
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ampicilina y amoxicilina por el método de dilución en placa
- Cuantificar el efecto de los inhibidores de β -lactamasas sulbactam y ácido clavulánico sobre la CMI de ampicilina y amoxicilina, respectivamente, para las cepas de *S. aureus* mediante el método de dilución en placa
- Cuantificar la resistencia a plomo, cadmio, mercurio, cromato y arsénico por dilución en placa
- Determinar los patrones de multiresistencia a metales pesados y antibióticos
- Comprobar si los determinantes de resistencia (en particular a plomo) residen en plásmidos mediante su aislamiento y curación con bromuro de etidio (BrEt)

MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo de este trabajo se aislaron 150 cepas de *Staphylococcus aureus* de las diferentes localizaciones morfológicas (faringe, vagina, conjuntivas, oído, vulva vaginal, uretra, fosas nasales, piel y vías respiratorias inferiores) de pacientes infectados (todos los pacientes presentaron su orden médica de solicitud de laboratorio) pertenecientes a la comunidad de Los Reyes Iztacala, que acudieron al servicio de laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI), ubicada en la ENEP Iztacala.

Se realizaron un total de 150 cultivos (113 exudados faríngeos, 17 exudados vulvares, 7 urocultivos, 5 exudados conjuntivales, 3 exudados óticos, 1 exudado vulvar, 1 exudado uretral, 1 exudado nasal, 1 cultivo de expectoración y 1 cultivo de piel).

Obtención de las muestras y aislamiento

Exudados faríngeos

Previo aviso, los pacientes se presentaron en ayunas y sin aseo bucal. Para la toma de muestras se utilizó un abatelenguas estéril, con el cual se hizo descender la lengua, revisándose la cavidad faríngea con el fin de reconocer el eritema, inflamación o úlceras. Posteriormente se deslizó un hisopo estéril por

la faringe y amígdalas afectadas, teniendo cuidado de no tocar la lengua y paredes laterales de la boca. Una vez realizada la toma, se descargó la muestra en los medios de Agar sangre, Sabouraud y S110, los cuales se incubaron a 37° C durante 24 horas.

Exudados vaginales

Las damas se presentaron sin aseo y sin tener relaciones sexuales durante las últimas 24 horas. Se colocó a las pacientes en posición ginecológica y se introdujo un espejo estéril a fin de localizar el cuello uterino, posteriormente se fijo el espejo abriendo la vulva y se tomó la muestra de la secreción del fondo del saco posterior y del cérvix con la ayuda de un hisópo estéril. El hisópo se sembró en el medio líquido de infusión-cerebro-corazón (BHI) y se incubó a 37° C por 24 horas. Finalmente se resembró en los medios de Agar sangre, EMB (cosina azul de metileno), Sabouraud y S-110.

Para los otros sitios de muestreo (uretra, fosas nasales, conjuntiva, vulva vaginal, óido, y piel), se les indico a los pacientes que se presentaran sin aseo de la zona afectada, para posteriormente tomar la muestra de la secreción por medio de un hisópo estéril. Una vez tomadas las muestras, se siguió el mismo procedimiento de los cultivos vaginales.

Identificación bacteriana

Una vez obtenido el crecimiento óptimo se procedió a la caracterización de las cepas de *S. aureus* por morfología colonial (colonias grandes, circulares, lisas, de bordes enteros, brillantes, doradas) y microscópica utilizando la tinción de Gram (Observación de cocos Gram positivos).

Adicionalmente, a las colonias se les aplicaron las siguientes pruebas:

- a) Fermentación de glucosa y manitol. Por medio de un asa estéril se tomaron varias colonias sospechosas y se inoculó sobre agar manitol, el cambio de color de rojo a amarillo en un tiempo de 24 horas a 37° C indicó una prueba positiva.
- b) Prueba de la catalasa.- Se depositó en un portaobjetos la colonia sospechosa para posteriormente agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La formación de burbujas indicó una prueba positiva.
- c) Prueba de la coagulasa.- Se suspendió una colonia en 1 ml de plasma humano diluido 1:6 con solución salina y se incubó a 37° C. Se apreció la formación del coágulo en un tiempo de 1 a 14 horas.

Resistencia a antibióticos

Una vez caracterizadas las bacterias se utilizó la técnica de Bauer-Kirby (Bauer, *et al.*, 1966) para probar la sensibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias (de cada cepa) con un asa

estéril y se inocularon en 5 ml de caldo Mueller Hinton, se incubaron a 37° C hasta que apareció una turbidez ligera (3 horas), la turbidez se ajustó con solución salina estéril hasta que se obtuvo una densidad comparable, con un estándar de sulfato de bario. El estándar se preparó mezclando 5 ml de BaCl₂ 0.048 M (1.175% peso/volumen de BaCl₂ 2H₂O) con 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36N), que fue la mitad de la densidad del estándar No. 1 de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland), el estándar correspondió a 10⁸ microorganismos/ml. Posteriormente se procedió a inocular el agar de Mueller-Hinton por medio de hisópos estériles, los cuales se humedecieron con la suspensión (crecimiento bacteriano) y se estriaron sobre la totalidad de la superficie del agar.

Por último se tomó un sensibilizador con 12 antimicrobianos a determinar (Sanofi, diagnostics, Pasteur), con una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller-Hinton. Así el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 h a 37° C. De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo el diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte (tabla 4). La cepa control utilizada para medir la reproducibilidad de esta técnica fue *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Tabla 4. ANTIBIOTICOS UTILIZADOS CONTRA LAS CEPAS DE *S. aureus*

ANTIBIOTICOS	ABREVIATURA	FAMILIA	ACCIÓN ^a	DIAM. HALO DE INH. (mm)		
				R	I	S
Ampicilina	AMP	Amino-penicilina	1	≤ 28		≥ 29
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1ª generación	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	CTX	Cefalosporina de 3ª generación	1	≤ 14	15-22	≥ 23
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina de 3ª generación	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefuroxima	CXM	Cefalosporina de 2ª generación	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Dicloxacilina	CLOX	Penicilina	1	≤ 10	11-12	≥ 13
Eritromicina	ERI	Macrólido	3	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicina	GEN	Aminoglucósido	3	≤ 12	13-14	≥ 15
Pefloxacina	PEF	Quinolona	4	≤ 14	15-22	≥ 23
Penicilina	PEN	Penicilina	1	≤ 28		≥ 29
Tetraciclina	TET	Tetraciclina	3	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	Combinación de diaminopirimidina y sulfonamida	4	≤ 10	11-15	≥ 16

^a 1 Inhibición de la formación de la pared celular. 3 Interferencia en la síntesis de proteínas.

4 Inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos

^b R = Resistente, I = Intermedia y S = Sensible

Tomada de Giono, C.S. 1983.

Detección de β -lactamasas

Una vez determinada la susceptibilidad a los 12 antibióticos se detectó la producción de β -lactamasas, (principalmente en las cepas resistentes a ampicilina y penicilina), para lo cual se utilizaron discos impregnados con una cefalosporina cromógena nitocefín (BBL). Este compuesto cambia de color amarillo a rojo cuando el enlace amida del anillo β -lactámico es hidrolizado por la β -lactamasa.

Un disco impregnado con nitrocefín se humedeció con una gota de agua estéril y enseguida se colocó con un asa estéril una colonia aislada (crecida en agar S-110 a 37° C por 24 horas) de la cepa de *S. aureus*. Se observó la ocurrencia de cambio de color durante un periodo máximo de 1-2 minutos (O'Callaghan, C. H. *et al.*, 1972).

Determinación de la CMI de ampicilina, amoxicilina y en combinación con los inhibidores de β -lactamasas sulbactam y ácido clavulánico, respectivamente.

La concentración mínima inhibitoria de ampicilina, ampicilina + sulbactam, amoxicilina y amoxicilina + ácido clavulánico se determinó por el método de dilución en placa en agar Mueller-Hinton (MH), utilizando un sembrador múltiple, conforme a lo reportado por Vaca, *et al.*, (1995). Para lo cual se creció cada una de las 150 cepas en caldo nutritivo a 37° C con agitación constante durante 16 horas. Cada cultivo se diluyó (1:3) con caldo nutritivo en un pozo del sembrador, para posteriormente hacer las replicas en cajas de MH más diluciones dobles seriadas del antibiótico solo (ampicilina y amoxicilina) y en combinación con el inhibidor en el rango de concentración de 3.9 a 2000 μ g/ml. La CMI es la mínima concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento visible después de incubar 24 h a 37° C.

Las combinaciones de β -lactámico+ inhibidor de β -lactamasas utilizadas fueron: Clavulin (SmithKline Beecham Farmacéutica); el cual contiene amoxicilina + 25% de clavulanato de potasio y Unasyna (Pfizer); la cual contiene ampicilina y 68.8% de sulbactam.

Determinación de la CMI a metales pesados

La determinación de la CMI a los metales pesados se realizó por el método de dilución en placa en agar nutritivo (Cervantes-Vega. *et al.*, 1986), cada cepa se creció en caldo nutritivo (agitación por 16 horas a 37 °C). Cada cultivo se diluyó (1:3) en los pozos del replicador, para después hacer las replicas en las cajas de agar nutritivo más diluciones dobles seriadas de la sal de cada metal (tabla 5). Los metales en forma de sales (J.T.Baker) utilizados fueron: acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), arsenato de sodio (Na_2HAsO_4), cloruro de cadmio (CdCl_2), cloruro de mercurio (HgCl_2) y cromato de potasio(K_2CrO_4).

Tabla 5 Concentraciones de los metales utilizados

PLOMO		stock A	stock B	stock C
µg/ml	µg/50 ml	80 mg/ml	(A= 1/10)	(B = 1/10)
3200	160000	2 ml		
1600	80000	1 ml		
800	40000	0.5000		
400	20000	0.2500 ml		
200	10000	0.1250 ml		
100	5000		0.6250 ml	
50	2500		0.3125 ml	
25	1250		0.1562 ml	
12.5000	625			0.7812
6.2500	312.5000			0.3906
3.1250	156.2500			0.1953
1.5625	78.2500 00			0.0977
ARSENATO		stock A	Stock B	
µg/ml	µg/50 ml	80 mg/ml	(A= 1/10)	
3200	160000	2 ml		
1600	80000	1 ml		
800	40000	0.5000 ml		
400	20000	0.2500 ml		
200	10000	0.1250 ml		
100	5000		0.6250 ml	
50	2500		0.3125 ml	
25	1250		0.1562 ml	
MERCURIO		stock A	stock B	
µg/ml	µg/50ml	8 mg/ml	(A=1/10)	
320	16000	2 ml		
160	8000	1 ml		
80	4000	0.5000 ml		
40	2000	0.2500 ml		
20	1000	0.1250 ml		
10	500		0.6250	
5	250		0.3125	
2.5000	125		0.1562	
1.2500	62.5000		0.0781	
CADMIO		stock A	(A=1/10)	
µg/ml	µg/50ml	20 mg/ml		
800	40000	2 ml		
400	20000	1 ml		
200	10000	0.5000 ml		
100	5000	0.2500 ml		
50	2500	0.1250 ml		
25	1250		0.6250	
12.5000	625		0.3125 ml	
6.2500	312.5000		0.1562 ml	
CROMATO		stock A		
µg/ml	µg/50ml	75 mg/ml		
3000	150000	2 ml		
1500	75000	1 ml		
750	37500	0.5000 ml		
375	18750	0.2500 ml		
187.5000	9375	0.1250 ml		
93.5000	4687.5000	0.0625 ml		

Stock "A" = mg de cada metal más 10 ml de agua destilada estéril.
 Stock "B" = 1 ml del Stock "A" más 9 ml de agua destilada estéril.
 Stock "C" = 1 ml del Stock "B" más 9 ml de agua destilada estéril.

Clasificación de la resistencia a metales pesados

Las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) con base a los criterios reportados por Nakahara *et al.*, (1997a) para cepas de *S. aureus* (método de dilución en placa) (tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de las cepas de *S. aureus* a metales pesados

METAL	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	S	R
Plomo	3.1-6.2	800-3200
Cromato	1-750	751-3000
Mercurio	1.6-6.2	12.5-50
Cadmio	0.8-3.2	51-200
Arsenato	25-200	1600-3200

Procesamiento de la información para los patrones de multiresistencia

Para almacenar y ordenar los datos se utilizó una base de datos en Dbase III plus que nos permitió hacer las búsquedas necesarias, particularmente en lo que se refiere a los diferentes patrones (combinaciones de resistencia) de multiresistencia a antibióticos y a metales pesados, de los cuales hay 131072 (2^{17}) posibles, toda vez que se utilizaron 12 antibióticos y 5 metales pesados, siendo dos las posibilidades para cada uno (R o S). Las cepas con

susceptibilidad intermedia a antibióticos se clasificaron como resistentes, debido a que si se hubieran considerado estos, el número de patrones de resistencia diferentes hubiera sido 129140163 (3¹⁷), demasiado grande para realizar todas las búsquedas en la base de datos. Por esta razón decidimos considerar a las cepas con sensibilidad intermedia como resistentes, para facilitar el análisis y porque fue mejor para los pacientes infectados la administración del antibiótico al que la cepa fuese claramente sensible.

Extracción de plásmidos

Para el aislamiento de plásmidos se utilizó un método modificado de lisis alcalina (Le Gouill, C. & Jean-Luc, P. 1994) que consistió de lo siguiente:

- 1.- Se Sembró la cepa de *S. aureus* seleccionada en caldo nutritivo y se incubó en agitación constante a 37° C por 24 horas.
- 2.- Centrifugó 1.5 ml del cultivo a 15,000 rpm.
- 3.- Resuspendió la pastilla en 100 µl de la solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCL, PH 8.0), y se añadió 0.2 µl de RNAsa (5-15 minutos a temperatura ambiente).

- 4.- Agregó 200 μ l de la solución II (0.2 NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión 1 minuto, se agregó 200 μ l de cloroformo y se mezcló por inversión 1 minuto.
- 6.- Añadió 150 μ l de la solución III (acetato de potasio 5 M, 5 ml de ácido acético glacial al 5%).
- 7.- Centrifugó 2 minutos a 4° C (15,000 rpm) y se separó la fase acuosa (superior) a otro tubo eppendorf para mezclar por inversión con 2 volúmenes de etanol absoluto frío.
- 8.- Centrifugó 2 minutos a 4° C (15,000 rpm), se desechó el sobrenadante y se lavó el paquete con 1 ml de etanol al 70%
- 9.- Secó la pastilla a 60-65° C durante 5 minutos.
- 10.- Resuspendió la pastilla en 40 μ l de agua bidestilada estéril.
- 11.- El DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (camara de electroforesis horizontal) con 200 ml de buffer TBE1 1X, para lo cual se utilizó una fuente de poder Ec250-90. El corrimiento se realizó a 100 volts por 50 minutos.
- 12.- Los geles se revelaron con bromuro de etidio (5 μ g/ml) y se transluminaron con luz ultravioleta.

13.- Se fotografiaron los geles con una cámara polaroid bajo transiluminación con luz UV.

Curación de plásmidos

Para la curación de plásmidos se seleccionó a una cepa de *S. aureus* multiresistente a antibióticos y metales pesados. Se sembró la cepa en caldo nutritivo más bromuro de etidio (Bret) ($2\mu\text{g/ml}$) y se incubó a 37°C con agitación constante durante toda la noche. Al término se espatularon diluciones del cultivo sobre 10 cajas de agar nutritivo (para tener un total de 1000 colonias) conforme a lo reportado por Nakahara et al., (1977a) (en donde aproximadamente una de cada 1000 bacterias se curaron). Posterior a la incubación se picaron las 1000 colonias con palillos estériles a medios de agar nutritivo más las sales de los metales a los que la cepa fue resistente. Al término se eligieron las colonias que no crecieron en presencia de los metales y se analizó (a cada una de las colonias con el propósito de determinar la eficiencia de curación) su sensibilidad y/o resistencia a los antibióticos. Para finalizar se extrajo el DNA plasmídico (Le Gouill, C. & Jean-Luc, P. 1994) de dos de las colonias de la cepa tratada con Bret, para comprobar si se curaron de plásmidos y para determinar si la resistencia a metales pesados (en particular a plomo) y a antibióticos se encontraba asociada en plásmidos.

RESULTADOS

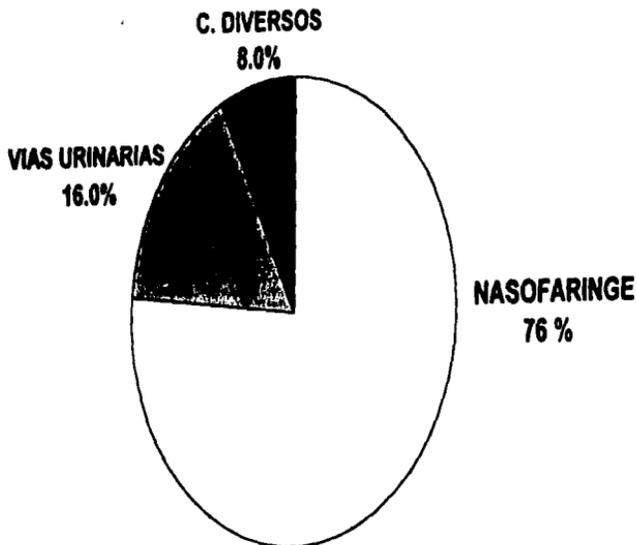
ORIGEN DE LAS CEPAS

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron 150 cepas de *Staphylococcus aureus* que fueron aisladas de las diferentes ubicaciones de 150 pacientes que acudieron al servicio de laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala.

Como se aprecia en la gráfica 1, setenta y seis por ciento de las cepas se aislaron de la nasofaringe, 16 % de vías urinarias (cultivos vaginales y urocultivos) y el 8 % de cultivos diversos (en cinco cultivos oculares 5 cepas, óticos 3, exudado vulvar 1, uretral, espectoración y cultivo de piel una cepa).

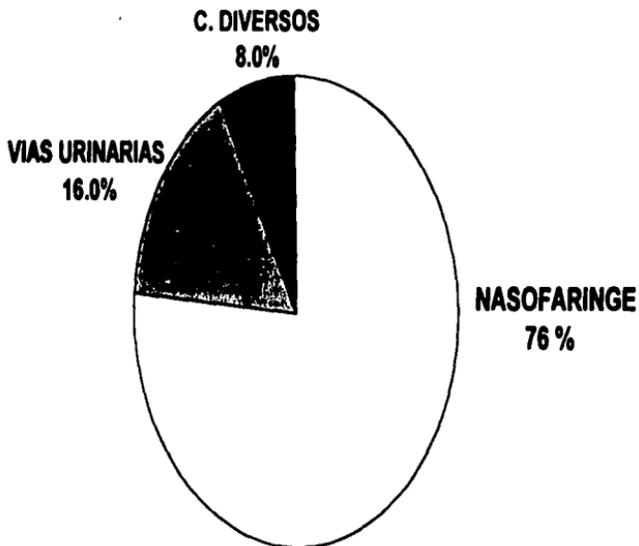
En la grafica 2 se aprecia que la mayoría de los pacientes fueron niños y adultos, el 71.9 % tienen 30 años o menos. El grupo de edad más abundante fue el de 21-30 años (28%), seguido por los grupos de 1-10 (23%) y de 11-20 años (20.6%). Los grupos minoritarios fueron: 61-70 años y 71-80 (0.6% en cada caso).

GRAFICA 1
ORIGEN DE LAS 150 CEPAS DE *Staphylococcus aureus*



C. DIVERSOS: EX. OCULAR, NASAL, VULVAR, URETRAL, PIEL y OTICO

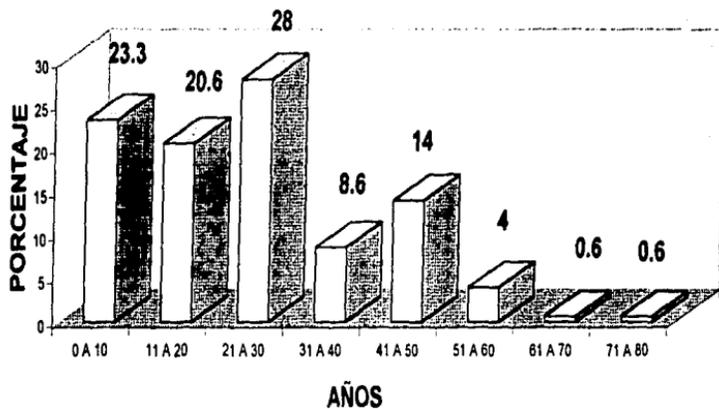
GRAFICA 1
ORIGEN DE LAS 150 CEPAS DE *Staphylococcus aureus*



C. DIVERSOS: EX. OCULAR, NASAL, VULVAR, URETRAL, PIEL y OTICO

GRAFICA 2

EDAD DE LOS PACIENTES



Resistencia a antibióticos

El 94% de las cepas analizadas fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos penicilina (Pen) y ampicilina (Am) (gráfica 3), 92% a la cefalosporina de 3ª generación ceftazidima (Caz) y 73% al macrólido eritromicina (Eri). El 57% de las cepas mostró resistencia a la quinolona pefloxacin (Pef) y aproximadamente el 40 % para la cefalosporina cefotaxima (Ctx) o a la tetraciclina (Tet). Alrededor del 36% fueron resistentes a la penicilina semisintética dicloxacilina (Dc) y el 32% al trimetoprim con sulfametoxazol (Sxt). Solo el 24% de las cepas presentó resistencia al aminoglucósido gentamicina (Ge).

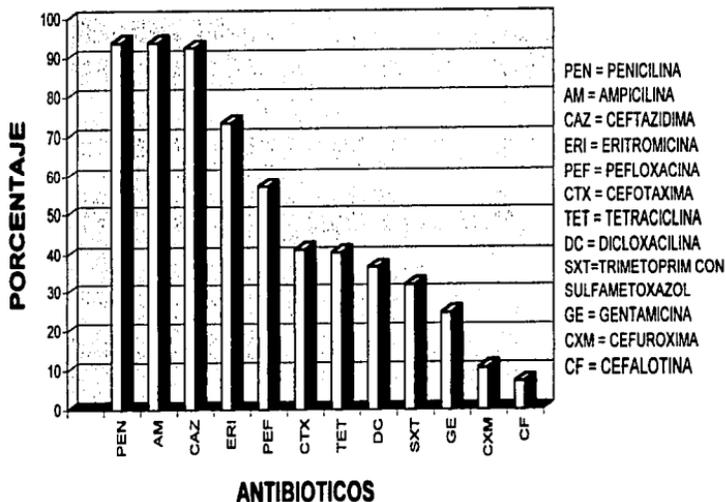
Los porcentajes más bajos de resistencia fueron para las cefalosporina cefuroxima (Cxm, 2ª generación) con un 10.6 % y para la cefalotina (Cf, 1ª generación) con un 7%.

Multiresistencia a antibióticos

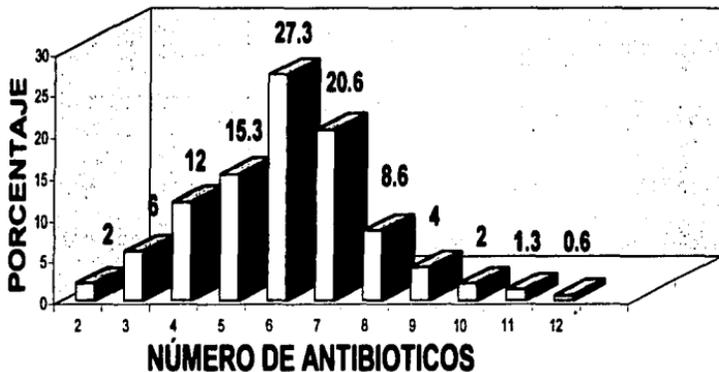
Todas las cepas probadas fueron resistentes a 2 o más antibióticos (gráfica 4), una de ellas (0.6%) mostró resistencia frente a los 12 antimicrobianos. Los mayores porcentajes de resistencia correspondieron a seis (27.3 %), siete (20.6%), cinco (15.3%) y cuatro (12%); en tanto que los menores fueron para ocho (8.6%), tres (6%) y nueve (4%). Es importante

GRAFICA 3

% DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS POR CEPAS DE *Staphylococcus aureus*



GRAFICA 4
MULTIRRESISTENCIA DE LAS CEPAS DE
***Staphylococcus aureus* A ANTIBIOTICOS**



destacar que aproximadamente el 75% de las cepas mostró resistencia en el intervalo de 4-7 antibióticos.

Producción de β -lactamasas

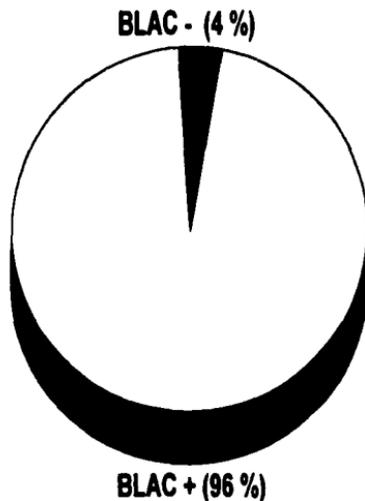
El 96% de las cepas (gráfica 5) fueron productoras de β -lactamasas y solo el 4% (6 cepas) no produjeron β -lactamasas.

Concentraciones mínimas inhibitorias de β -lactámico con y sin inhibidor de β -lactamasas

Como puede observarse en la gráfica 6, la CMI_{50} de ampicilina (concentración que inhibe al 50% de las cepas) fue 250 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI_{90} fue de 1562 $\mu\text{g/ml}$. La adición de sulbactam disminuyó 10 veces la CMI_{50} (23 $\mu\text{g/ml}$) y la CMI_{90} (164 $\mu\text{g/ml}$).

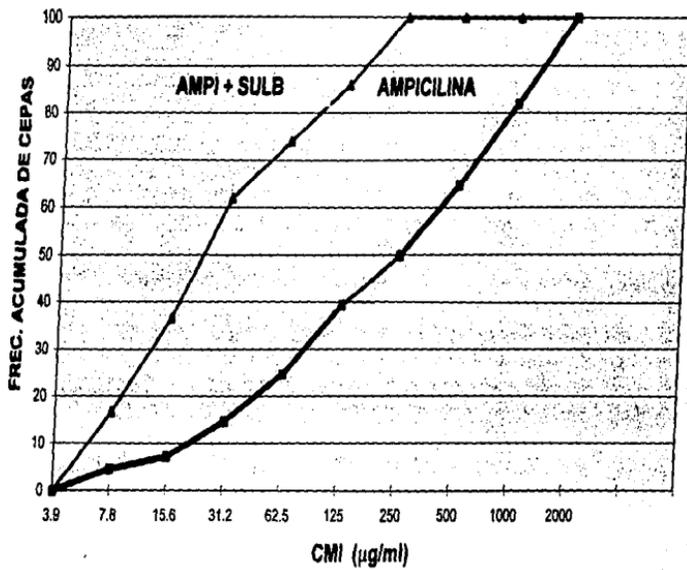
La CMI_{50} de amoxicilina correspondió a 390 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI_{90} a 1687 $\mu\text{g/ml}$ (gráfica 7). La adición del ácido clavulánico a la amoxicilina redujó 8 veces la CMI_{50} (47 $\mu\text{g/ml}$) y la CMI_{90} (207 $\mu\text{g/ml}$).

GRAFICA 5
PRODUCCION DE BETA LACTAMASAS POR LAS
CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

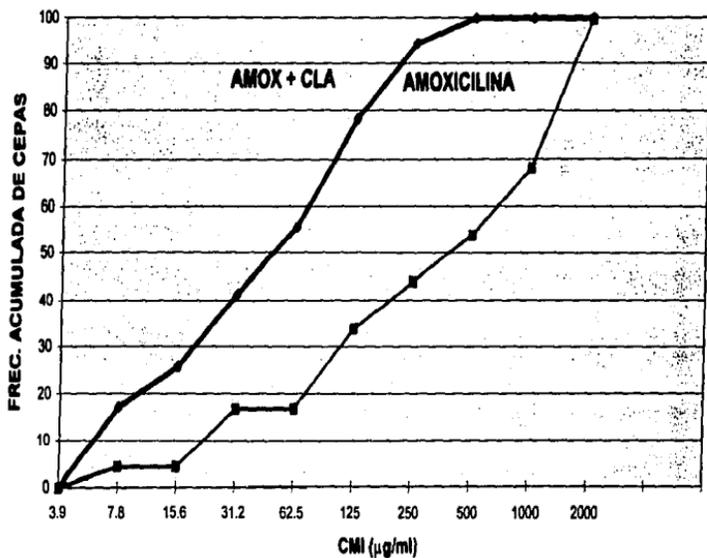


BLAC+ = β-lactamasa POSITIVA
BLAC- = β-lactamasa NEGATIVA

GRAFICA 6
CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE AMPICILINA CON Y SIN
SULBACTAM



GRAFICA 7
CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE AMOXICILINA CON Y
SIN ÁCIDO CLAVULÁNICO



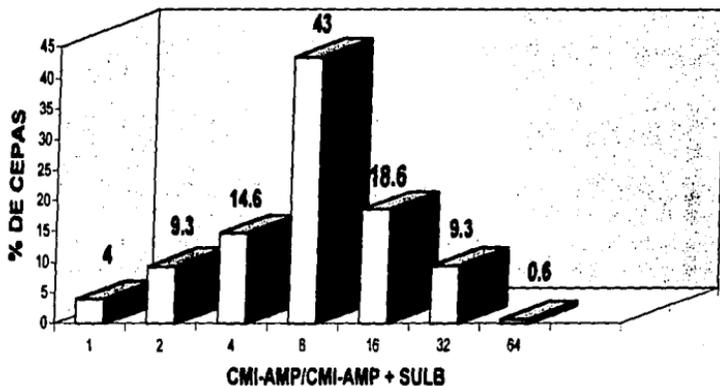
Variedad de β -lactamasas producidas por cepas de *S. aureus*

Si bien, las CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina y amoxicilina se redujeron en 10 y 8 veces por efecto del inhibidor de de β -lactamasas sulbactam o ácido clavulánico, respectivamente, al analizar el cociente CMI- β -lactámico/CMI β -lactámico+inhibidor de β -lactamasa, se aprecia que las β -lactamasas producidas por las cepas estudiadas difieren en sensibilidad al inhibidor correspondiente. En la gráfica 8 puede observarse que la disminución de la CMI de la ampicilina por el sulbactam tiene una distribución cuya media corresponde a 10.5 veces en un intervalo de 2 a 64 veces, con 6 cepas (4%) cuya CMI no cambia.

Una distribución similar se obtuvo para el cociente CMI amoxicilina/CMI-amoxicilina+ácido clavulánico, con una media de 8.3 veces en un intervalo de 2 a 32 veces y con las mismas 6 cepas cuya CMI no disminuye por efecto del clavulánico (gráfica 9).

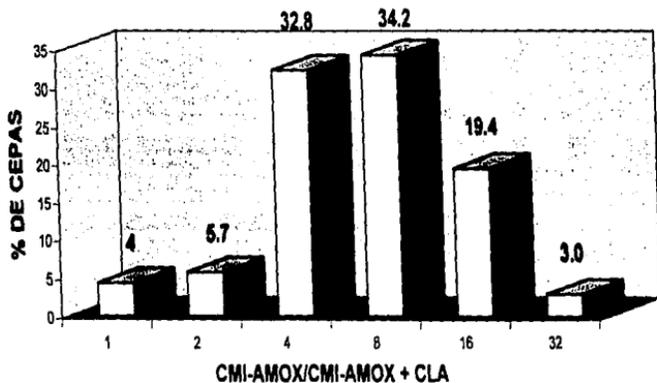
GRAFICA 8

EFFECTO DEL SULBACTAM SOBRE LA CMI DE AMPICILINA



GRAFICA 9

EFFECTO DEL ACIDO CLAVULANICO SOBRE LA CMI DE AMOXICILINA



Resistencia a metales pesados por cepas de *S. aureus*

Plomo

En la gráfica 10 puede observarse que la CMI a plomo presenta una distribución bimodal, resistente (97.4% de las cepas) en el pico de 800-3200 $\mu\text{g/ml}$ y sensible o medianamente resistente (2.6%) en el pico de 100-200 $\mu\text{g/ml}$

Cromato

La CMI del 95% de las cepas a cromato, se distribuyó unimodalmente en el pico de sensibilidad de 187-375 $\mu\text{g/ml}$ (gráfica 11).

Mercurio

En la gráfica 12 se observa que el 96% de las cepas fue resistente a mercurio, presentando una distribución de un solo pico (CMI, 20-40 $\mu\text{g/ml}$).

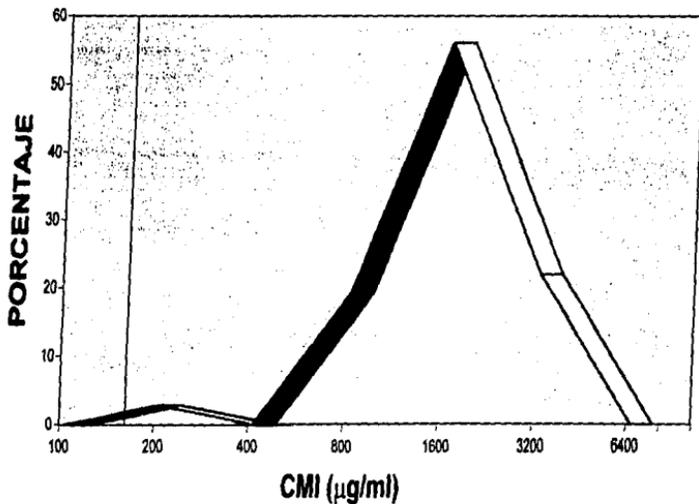
Cadmio

Se obtuvo una distribución similar para la CMI a cadmio (gráfica 13), en donde el 97% de las cepas se situó en el pico de resistencia de 50-200 $\mu\text{g/ml}$.

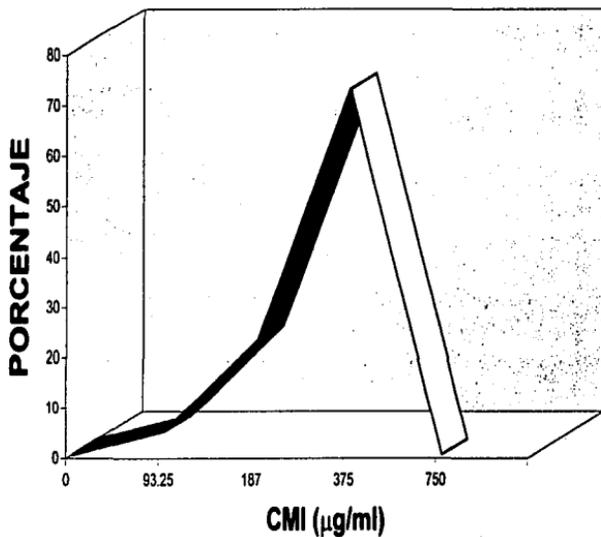
Arsenato

La distribución de la CMI a arsenato (gráfica 14) por parte de las cepas de *S. aureus* fue bimodal, siendo el 26% de las cepas sensibles en el intervalo de 200-400 $\mu\text{g/ml}$ y el 74% resistentes en el rango de 800-3200 $\mu\text{g/ml}$.

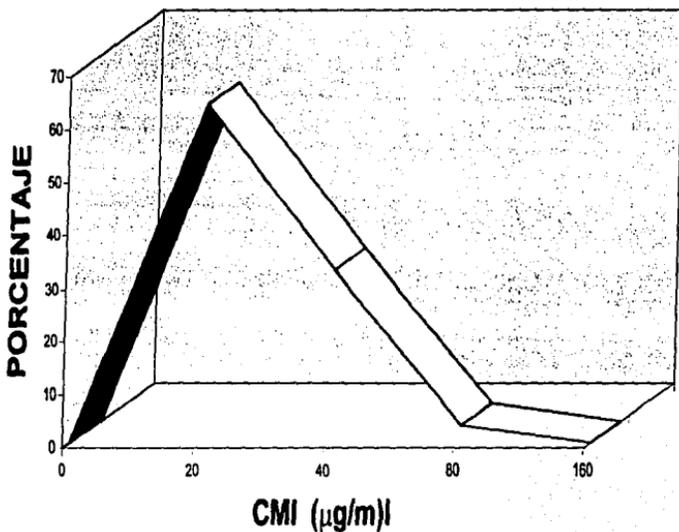
GRAFICA 10
SUSCEPTIBILIDAD A PLOMO POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus



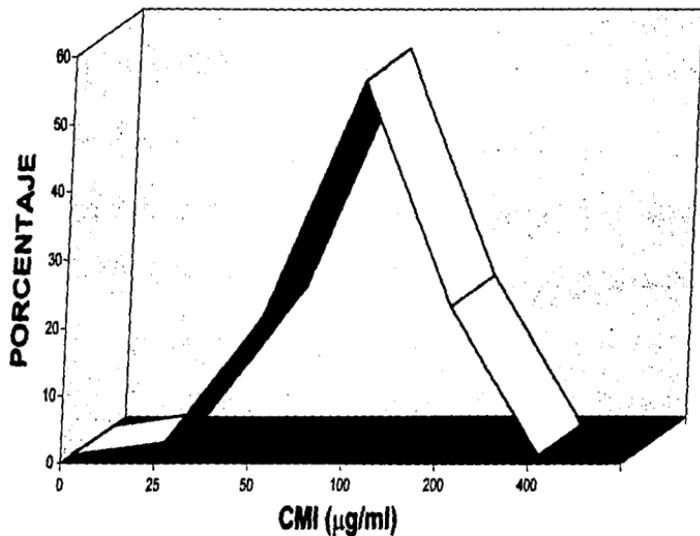
GRAFICA 11
SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus



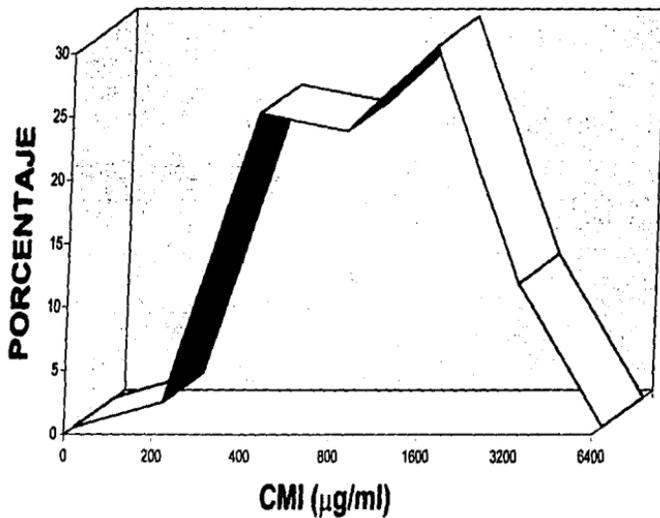
GRAFICA 12
SUSCEPTIBILIDAD A MERCURIO POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus



GRAFICA 13
SUSCEPTIBILIDAD A CADMIO POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus



GRAFICA 14
SUSCEPTIBILIDAD A ARSENATO POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus



Patrones de multirresistencia a antibióticos y metales pesados

Para obtener los diferentes patrones de resistencia a antibióticos y metales pesados se utilizó una base de datos en dbase III plus. La tabla 7 muestra el número de patrones de multirresistencia, el número de cepas en cada uno de ellos, los patrones de resistencia a antibióticos y a metales pesados y el grupo de cada patrón designado por letras (solamente en aquellos representados por un mayor número de cepas). Se observaron un total de 104 patrones distintos de multirresistencia, dentro de los cuales 81 estuvieron representados por una cepa cada uno, 17 por 2 cepas y un solo patrón por 3 cepas.

Tabla 7. Patrones de resistencia a antibióticos y metales pesados por cepas de *S. aureus*

No. Patrones diferentes	No. Cepas por patrón	Patrones de resistencia a antibióticos	Patrones de resistencia a metales	Grupo
81	1			
17	2			
1	3	E, AM, SXT, CTX, PEF, PE, CAZ	Pb, Hg, As, Cd	A
1	4	AM, CTX, PEF, PE, CAZ	Pb, Hg, As, Cd	B
1	4	E, AM, CTX, PEF, PE, CAZ, DC	Pb, Hg, As, Cd	C
1	6	E, AM, SXT, CXM, PEF, CAZ, TE	Pb, Hg, As, Cd	D
1	6	E, AM, PE, CAZ, GE	Pb, Hg, As, Cd	E
1	12	E, AM, CTX, PEF, PE, CAZ	Pb, Hg, As, Cd	F

TOTAL 104 15

Dos combinaciones de resistencia distintos entre si (grupo B y C), estuvieron representados por cuatro cepas cada uno; estos dos patrones comparten en común la resistencia a ampicilina, cefotaxima, pefloxacina, penicilina, plomo, mercurio arsenato y cadmio

Los siguientes dos patrones de resistencia, (D y E) diferentes uno del otro, estuvieron representados por seis cepas cada uno, compartiendo la resistencia a eritromicina, ampicilina, ceftazidima, plomo, mercurio, arsenato y cadmio. El patrón con un número mayor de cepas (12) fue el perteneciente al grupo F con resistencia para: E, AM, CTX, PEF, PE, CAZ, Pb, Hg, As, y Cd.

Los últimos seis patrones de resistencia (grupos A, B, C, D, E y F) comparten en común la resistencia a ampicilina, ceftazidima, así, como a plomo, mercurio, arsenato y cadmio.

Es importante mencionar que dentro de las 150 cepas de *S. aureus* distribuidas en los 104 patrones distintos de multiresistencia se encontraron 4 cepas sensibles o moderadamente resistentes a plomo. Estas 4 cepas además de ser sensibles a plomo, comparten en común la resistencia a mercurio, arsénico, cadmio, cromato y al antibiótico dicloxacilina

Aislamiento de plásmidos

La extracción del DNA plasmídico se realizó por un método modificado de lisis alcalina (Le Guuill, C. 1994), para lo cual se escogió a una cepa representativa, de cada grupo de resistencia (A, B, C, D, E y F) (debido a que estos grupos presentaron el mayor número de cepas). En la figura 2 se observa la existencia de varias bandas plasmídicas de diferentes pesos moleculares. En el carril 1 (grupo E) se observó un plásmido con un tamaño aproximado de 16,000 pb. En el carril 5 (grupo F) se distinguieron dos bandas, una de un tamaño mayor a los 23,000 pb y otra de un tamaño similar a la banda correspondiente a la cepa del grupo E (16,000 pb). El carril 7 (grupo C) presentó una banda plasmídica intermedia con un tamaño aproximado de 23,130 pb.

No se observaron bandas plasmídicas para las cepas correspondientes a los grupos de resistencia A (carril 2), D (carril 3) y B (carril 6).

Curación de plásmidos

Para la curación de plásmidos, se seleccionó a la cepa representativa del grupo de resistencia F (toda vez, que esta cepa presentó dos bandas plasmídicas). En la tabla 8 pueden observarse los patrones de resistencia a antibióticos y metales pesados de la cepa correspondiente al grupo de

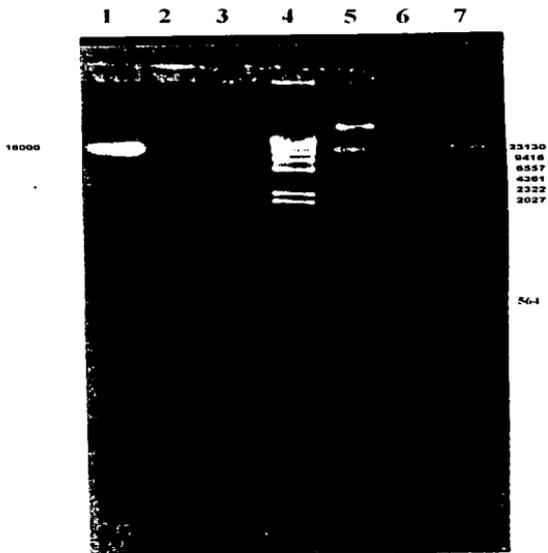


Figura 2. Bandas plasmídicas de cepas representativas de los patrones de multirresistencia. La extracción se realizó por un método modificado de lisis alcalina como se describe en la metodología, el corrimiento electroforético se realizó a 100 v por 50 minutos (gel de agarosa al 0,8%) y para el revelado se utilizó Bret.

Carell 1: grupo E

" 2: grupo A

" 3: grupo D

" 4: DNA *EcoRI* digerido con *Hind III*

" 5: grupo F

" 6: grupo B

" 7: grupo C

resistencia F. Se aprecia que después de la curación, la cepa perdió los fenotipos de resistencia a: Ampicilina, Penicilina, Cefatzidima, Arsenato, así como, también la producción de β -lactamasa.

Cepa original	Cepa tratada con BrEt	Fenotipos perdidos	Eficiencia de curación para antibióticos y metales pesados (%)
E, AM, CTX, PEF, PE, CAZ, Pb, Hg, As, Cd	E, CTX, PEF, Pb, Hg, Cd	AM, PE, CAZ, As y Producción de β -lactamasa	AM = 10 PE = 10 CAZ = 10 As = 10

Tabla 8. Patrones de resistencia de la cepa de *S. aureus* (grupo F), antes y después de la curación con Bromuro de etidio (BrEt). E=Eritromicina, AM=Ampicilina, CTX=Cefotaxima, Pef=Pefloxacina, PE=Penicilina, CAZ= Cefazidima, Pb=Plomo, Hg=Mercurio, As=Arsenato y Cd=Camio

Es importante destacar que la eficiencia de curación para cada marcador correspondió a un 10% (se curaron 100 de cada 1000 mil bacterias).

Con el propósito de determinar si la cepa de *S. aureus* representativa del grupo de resistencia F, poseía aún los plásmidos (16,000 y > 23,000 pb) después de ser tratada con bromuro de etidio, se procedió a su identificación por el mismo método (Le Gouill, C. 1994). En la figura 3 puede apreciarse que la cepa (grupo F) se curó de los plásmidos (16,000 y > 23,130), toda vez, que no se identificó ninguno de los dos.

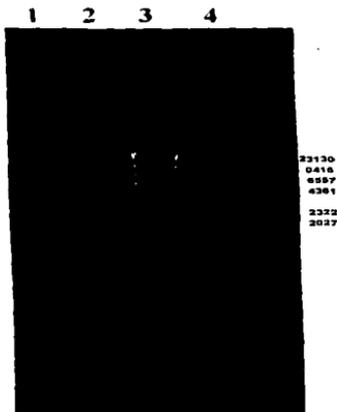


Figura 3. Bandas plasmídicas de la cepa tratada con Bret (grupo F). La extracci3n se realiz3 por un m3todo modificado de lisis alcalina como se describe en la metodol3gía, el corriento electrofor3tico se realiz3 a 100 v por 50 minutos (gel de agarosa al 0.8%) y para el revelado se utiliz3 Bret.

Carril 1: grupo F

" 2: grupo F

" 3: DNA fago F digerido con Hind III

" 4: Cepa F original

DISCUSIÓN

Origen de las cepas

En el 76% de los aislamientos de nasofaringe se identificó a *Staphylococcus aureus*, lo que coloca a esta especie como la causa principal más probable de de las infecciones del tracto respiratorio superior en los pacientes estudiados. Estos datos concuerdan con lo reportado en un estudio previo amplio (Jiménez, E., 1996) en el que se analizaron 1454 cepas bacterianas aisladas de pacientes de la CUSI-I durante un periodo de 7 años dentro de las cuales 816 (55.7%) se aislaron de la nasofaringe y de éstas 618 (75.7%) correspondieron a *S. aureus*. De las 651 cepas totales de *S. aureus* estudiadas por Jiménez (1996), el 92.6% (603 cepas) se aislaron de la nasofaringe.

La mayoría de las cepas reportadas aquí se aislaron de niños menores a los 10 años de edad (23%) y jóvenes (48.6% para el grupo de 11-30 años), y un porcentaje muy bajo (1.2%) de ancianos (61-80 años).

Si bien, los infantes son los más susceptibles a las infecciones respiratorias (por su inmadurez anatómica e inmunológica), el hecho de encontrar un porcentaje bajo en personas de la tercera edad (que también son susceptibles a infecciones de este tipo), refleja solamente que este grupo fue el menos abundante en la población de pacientes que acudieron a la CUSI-I.

Resistencia a antibióticos

El 94% de las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas en este trabajo fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos penicilina y ampicilina, respectivamente (gráfica 3), porcentaje que rebasa al 80% reportado hasta ahora en otras partes del mundo (O'Brien, T. F. 1986). La alta frecuencia de resistencia a estos antibióticos puede deberse al hecho de que son utilizados con relativa frecuencia por ser considerados de 1ª elección por los médicos de la zona, además de la propia automedicación de la comunidad a la que pertenecen los pacientes estudiados, en cuyo caso, la población bacteriana se va seleccionando resistente, debido en gran parte a la producción de β -lactamasas.

Los porcentajes de resistencia a antibióticos obtenidos en este trabajo contrastan también con un estudio realizado en un hospital de la Universidad Federal de Paraíba, Brasil (Santos, F. *et al.*, 1992), en donde se estudiaron 64 cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de secreciones de la piel, heridas quirúrgicas y manos del personal. La susceptibilidad a 10 antimicrobianos se determinó por el método de Bauer-Kirby. En dicho estudio se encontró el 87.5% de las cepas resistentes a penicilina y 29.7% a cloxacilina; no se determinó la resistencia a ampicilina. De esta manera los porcentajes de resistencia coinciden con los datos encontrados por nosotros, no solo para

estos antimicrobianos sino también para gentamicina. Para este último antibiótico las cepas de *S. aureus* aisladas por nosotros mostraron un porcentaje de resistencia de 24%, en tanto que en las cepas brasileñas este valor fue de 17.2%. Para eritromicina y tetraciclina se encontraron porcentajes diferentes, siendo, de 73.3% y 40.6% para nuestras cepas y 40.6 y 62.5% para las de Brasil. Otra diferencia entre los *S. aureus* aislados por nosotros y los Brasileños se observó en la resistencia a sulfametoxazol con trimetoprim , siendo el 32% para los primeros y 18.8% para los segundos.

Por otra parte la resistencia a algunos antibióticos “insensibles a β -lactamasas “ también fue elevada; 92% y 41.3% de las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas de 3ª generación ceftazidima y cefotaxima, repectivamente, 10.6% a cefuroxime (2ª generación) y 7.1% a la cefalosporina de 1ª generación cefalotina. Estas diferencias notables en resistencia a cefalosporinas nuevas y sensibilidad frente a las viejas cefalosporinas indican claramente que la fecha de introducción de un antibiótico al mercado no es, por sí misma, ninguna garantía de su efectividad, ya que en el fenómeno de selección de cepas resistentes influyen gradualmente el mal uso y abuso de los antimicrobianos. De esta manera nuestros datos demuestran nuevamente que ya no es posible considerar, a priori, antibiótico alguno como de “primera elección”.

Todas las cepas estudiadas en este trabajo fueron resistentes a 2 o más antibióticos, siendo la frecuencia más alta para las resistentes a 6 (27.3%, gráfica 4), lo que demuestra la importancia de aislar el agente patógeno en las infecciones, para aplicar la prueba de susceptibilidad a los antibióticos, a fin, de administrar el antimicrobiano más eficaz.

Efecto de los inhibidores de β -lactamasas sobre la CMI de β -lactámicos

En este trabajo se reportó que el 96% de las cepas de *S. aureus* produjeron β -lactamasas, y que los inhibidores de β -lactamasas; sulbactam y ácido clavulánico, disminuyeron en 10 y 8 veces, respectivamente, la CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina y amoxicilina sobre la población de cepas de *S. aureus* estudiadas (gráfica 6 y 7). Sin embargo, en un estudio realizado en la Universidad de Edinburgo en Inglaterra, sobre un grupo de cepas de *Escherichia coli* provenientes de pacientes, en donde se determinó el efecto del ácido clavulánico sobre la CMI de amoxicilina (no se determinó el efecto del sulbactam sobre la CMI de ampicilina), se encontró que la CMI₅₀ y la CMI₉₀ de amoxicilina se redujeron en 64 veces por efecto del ácido clavulánico (Thomson, C.J. *et al.*, 1995).

Por otra parte no obstante, que el sulbactam y ácido clavulánico disminuyeron en 10 y 8 veces la CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina y amoxicilina, el

análisis más detallado permite distinguir seis (gráfica 8) y cinco (gráfica 9) subpoblaciones, que probablemente corresponden a cepas productoras de β -lactamasas con distinta sensibilidad al inhibidor o, a enzimas producidas en concentración diferente.

Las seis cepas no productoras de β -lactamasas (4 %) mostraron una CMI idéntica ante el β -lactámico con y sin inhibidor de β -lactamasas, de modo que el cociente (CMI β -lactámico / CMI β -lactámico + inhibidor) de ambas cepas fue igual a 1 (gráficas 8 y 9). A pesar de que estas seis cepas no produjeron β -lactamasa, fueron resistentes a penicilina y ampicilina. Estos datos sugieren fuertemente que la resistencia a ambos β -lactámicos se debe a la alteración de las PBPs.

Resistencia a metales pesados

En este estudio reportamos que la CMI a plomo por cepas de *Staphylococcus aureus* mostró una distribución bimodal (gráfica 10), considerando resistente al 97.4% de las cepas situadas en el intervalo de 800-3200 $\mu\text{g/ml}$ y sensible o medianamente resistente al 2.6% de las cepas con una CMI de 100-200 $\mu\text{g/ml}$. Una distribución similar fue encontrada por Nakahara *et al.* (1977a) para una colección de cepas de *S. aureus* (método de

dilución en placa), distinguiéndose dos picos, resistente (90.3% de las cepas) en el rango de 800-3200 $\mu\text{g/ml}$ y sensible (9.0%) en el intervalo de 3.1-6.2 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, que el pico de las cepas resistentes encontradas por nosotros coincide con el de estos investigadores (CMI 800-3200 $\mu\text{g/ml}$ en ambos casos), las cepas reportadas como sensibles (CMI 100-200 $\mu\text{g/ml}$) o moderadamente resistentes, discrepan de las encontradas por estos autores, cuyo pico de sensibilidad ocurrió en el rango de 3.1-6.2 $\mu\text{g/ml}$. Los procesos que han sido considerados como responsables de la resistencia bacteriana al plomo es la precipitación como sulfuro de plomo o como plomo metilado (Summers, A.O. & S. Silver 1988), sin embargo, el mecanismo no ha sido aún descrito.

Respecto al cromo la distribución de la CMI se distribuyó en un solo pico de sensibilidad (CMI 187-750 $\mu\text{g/ml}$). Campos y col. (1995) y Vaca y col. (1995) trabajando con cepas aisladas de zonas contaminadas de las ciudades de México y León han reportado una distribución bimodal con picos menores de 750 $\mu\text{g/ml}$ para la población sensible y mayores para la resistente. Se ha reportado que la resistencia al cromo está determinada por una alteración del transporte del sulfato dado que el cromo es incorporado por esta vía, así

como también por una captación disminuida por parte de las células resistentes (Ohtake, H. *et al.*, 1987).

El comportamiento de la población de *S. aureus* con respecto al mercurio la agrupa en torno a un pico de resistencia en el intervalo de 20-40 $\mu\text{g/ml}$. Se ha descrito para cepas de *S. aureus* una distribución bimodal (Nakahara, H. *et al.*, 1977a), sensible en el rango de 1.6-6.25 $\mu\text{g/ml}$ y resistente entre 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$.

La distribución de la CMI a cadmio por las cepas de *S. aureus*, ocurrió en un solo pico de resistencia (50-200 $\mu\text{g/ml}$). Nakahara *et al.* (1977a) reportó una distribución para cadmio trimodal; sensible (CMI 1.6 $\mu\text{g/ml}$), moderadamente resistente (CMI 12.5 $\mu\text{g/ml}$) y resistente (CMI 100-200 $\mu\text{g/ml}$), según Silver y Walderhaug (1992) estos resultados probablemente se deban a la existencia de mecanismos de resistencia altamente eficientes presentados por las bacterias al cadmio, los que se basan en el eflujo intracelular de iones tóxicos (Silver, S. *et al.*, 1989; Cervantes, C. *et al.*, 1994; Higham, D.P. *et al.*, 1984). Por otro lado Cervantes y col. (1986) y Vaca y col. (1995), analizando cepas de distinto origen, reportaron poblaciones moderadamente resistentes al cadmio las cuales presentaron una CMI distribuida entre 25 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Se detectó una distribución bimodal para la CMI a arsenato, sensible (CMI 200-400 $\mu\text{g/ml}$) y resistente (CMI 800-3200 $\mu\text{g/ml}$). Estos datos son similares a los encontrados por Vaca y col. (1995) para un grupo de cepas Gram positivas aisladas de suelos contaminados con plomo, en donde el pico de sensibilidad ocurrió entre (CMI 100-200 $\mu\text{g/ml}$) y el de resistente entre (CMI 1600-3200 $\mu\text{g/ml}$).

La alta resistencia a metales pesados por las cepas de *S. aureus* reportadas en este trabajo refleja que, probablemente, estas resistencias podrían deberse a la contaminación ambiental por estos metales (ejercen efectos inhibitorios sobre los microorganismos pero, por otro lado, pueden seleccionar variantes resistentes a los efectos tóxicos). La presencia de metales pesados en el ambiente es un problema que debe preocuparnos, toda vez, que metales como el plomo (que es un contaminante cuyas fuentes de origen son la industria, la gasolina y la pintura plomada) puede ejercer efectos dañinos para los humanos, afectando los sistemas: hematopoyético, hepático, renal, reproductivo y nervioso central (principalmente en mujeres embarazadas y niños) (Silbergeld, E.K. 1990). En un estudio realizado en la ciudad de México (Jiménez, C. *et al.*, 1993) en donde se les midieron las concentraciones sanguíneas de plomo a 113 infantes (3-7 años) que asistieron al hospital American British Cowdray (ABC), entre mayo de 1991 y octubre de 1992, se

encontró que el 76% presentaron concentraciones de plomo mayores a los 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$, revasando la cifra permitida ($< 10 \mu\text{g}/\text{dl}$).

Una de las principales causas de contaminación por plomo en la ciudad de México es la ocasionada por los automóviles, por ejemplo se ha descrito que los 3 millones de vehículos que circulan diariamente, consumen 16 millones de litros de gasolina por día, depositando anualmente dos millones de toneladas de plomo en el aire (Romicu, I. *et al.*, 1992).

Por otra parte se ha reportado que existen otros metales pesados considerados como contaminantes ambientales que pueden causar efectos sobre las personas, tal es el caso del arsénico (bronquitis; cáncer de esófago, laringe, pulmón y vejiga; hepatotoxicidad y enfermedades vasculares), cadmio (bronquitis, enfisema, nefrotoxicidad, infertilidad, cáncer de próstata, alteraciones neurológicas, hipertensión y enfermedades vasculares), cromo (nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y cáncer de pulmón) y mercurio (alteraciones neurológicas y afecciones del sistema respiratorio) (Silbergeld, E.K. 1990).

De esta manera la presencia de bacterias resistentes a metales pesados podrían ser de gran utilidad no solo como sondas para evaluar la contaminación ambiental por metales, sino también como una alternativa en la destoxificación de ecosistemas contaminados por estos agentes (Cervantes, C. & Gutiérrez -Corona F. 1994)

Patrones de multirresistencia a antibióticos y metales pesados

Las cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes se distribuyeron en 104 patrones distintos (Tabla 7). Todos los patrones de multirresistencia (principalmente A, B, C y D) incluyeron penicilina, ceftriaxona, así como, plomo, mercurio, arsenato y cadmio (estando un patrón en particular representado por 12 cepas).

Parece muy probable que algunos patrones de multirresistencia estén conferidos por plásmidos. De este modo si la resistencia a 4 o 5 antibióticos (por ejemplo) está ligada a uno o dos metales pesados (es decir, si los genes responsables de cada una de las resistencias se localizan en un solo plásmido), la administración de un solo antibiótico de esos 4 o 5 permitirá la selección de la cepa resistente a todos los antibióticos, incluyendo a los metales.

Es posible también que una cepa resistente a 10 antibióticos y 4 metales pesados, por ejemplo, posea más de un plásmido; por ejemplo 2, y que ambos contengan un gen común de resistencia a uno de los antibióticos, en tanto que los determinantes de resistencia a los antibióticos y metales restantes pudieran estar distribuidos en uno u otro plásmido. De esta manera, la selección para la resistencia dictada por el gen presente en ambos plásmidos permitiría la selección indirecta para resistencia a todos los demás antibióticos y metales.

Identificación y Curación de plásmidos

En este trabajo mencionamos que se aislaron tres cepas con plásmidos de diferente tamaño molecular, una cepa (grupo E) con un plásmido de un tamaño aproximado de 16,000 pb, otra cepa (grupo F) con dos plásmidos (16,000 y > 23,130 pb) y la última (grupo C) con un plásmido de 23,130 pb (figura 2). Estos datos son similares a los reportados por Novick (1979) para cepas de *S. aureus*, en donde los plásmidos de tamaño molecular situados entre 15,000 a 30,000 pb pueden portar genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos (β -lactamasa), macrólidos y a metales pesados como arsénico, cadmio y mercurio.

Una cepa de *S. aureus* correspondiente al grupo F (Figura 2), presentó dos bandas plasmídicas (16,000 y mayor de 23,130 pb), sin embargo, un análisis más detallado nos hace pensar que, probablemente lo que se aprecia como dos diferentes bandas plasmídicas pudieran tratarse del mismo plásmido en configuraciones estructurales diferentes (círculo covalentemente cerrado y círculo abierto). De este modo el plásmido de menor tamaño (16,000 pb) podría encontrarse estructuralmente en la forma de círculo abierto y el de mayor tamaño (>23,130 pb) en la forma cerrada.

No se aislaron plásmidos en las cepas representativas de los grupos de multirresistencia A, D y B (figura 2), lo cual probablemente se deba a que estas

resistencias no se encuentran conferidas por plásmidos o que quizá éstos sean de un tamaño muy grande. Si bien, se ha reportado que *S. aureus* (Novick, R.P. *et al.*, 1979) puede portar plásmidos de tres diferentes clases: clase I (1,000 -5,000 pb, con resistencia para tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, kanamicina y eritromicina), clase II (15,000-30,000 pb, con resistencia para penicilina, cadmio, mercurio, arsenato y bismuto) y clase III (30,000-60,000 pb, con genes que confieren resistencia a gentamicina, y trimetoprim con sulfametoxazol), no se descarta la probabilidad de que las cepas de *S. aureus* (grupos A, D y B), sean portadoras de plásmidos gigantes, toda vez, que el método de extracción utilizado por nosotros (Le Gouil, C. & Jean-Luc, P. 1994) nos permitió aislar plásmidos en el rango de 1,000 - 70,000 pb.

La curación de la cepa de *S. aureus* (grupo de resistencia F) con bromuro de etidio (figura 3), demostró que los determinantes de resistencia a ampicilina (β -lactamasa), penicilina, ceftazidima y arsenato (frecuencia de curación = 10% para cada marcador) se encuentran conferidas por los plásmidos (16,000 y > 23,130 pb, si se trarara de dos diferentes), toda vez, que no se observaron estos plásmidos después de la curación con bromuro de etidio (figura 3). Estos determinantes de resistencia son similares a los conferidos por el plásmido penicilinase (PCase) descrito por Novick (1968) para cepas de *S.*

aureus, en donde éste confiere resistencia a penicilina, macrólidos, arsénico, bismuto, cadmio, zinc y mercurio.

En este trabajo se reportó un porcentaje (2.6%, grafica 10) de cepas de *S. aureus* sensibles o moderadamente resistentes a plomo corroborando el único reporte a la fecha (Nakahara, H *et al.* 1977a), sin embargo, no se logró establecer si los determinantes de resistencia a plomo pudieran encontrarse en plásmidos (en caso de que la resistencia estuviera conferida por plásmidos de un tamaño mayor a 70,000 pb) o en el cromosoma bacteriano. Recientemente se ha descrito un nuevo método de detección y de estimación de megaplásmidos (Barton, B.M. *et al.*, 1995) en el cual se ha detectado en *Staphylococcus aureus* la presencia de plásmidos de alto peso molecular situados entre 102,000 y 316,000 pb, por lo que no se descarta la probabilidad de que la resistencia a plomo pudiera encontrarse codificada en alguno de estos plásmidos. De tal manera que sería de gran interés utilizar métodos de detección de éste tipo a fin de determinar si la resistencia a plomo se encuentra codificada por plásmidos o por el cromosoma bacteriano, para de este modo tratar de determinar el mecanismo de resistencia.

CONCLUSIONES

1.- *Staphylococcus aureus* se constituyó como el agente más frecuentemente aislado de las vías respiratorias superiores en pacientes que acudieron al servicio de Laboratorio Clínico de la CUSI-Iztacala

2.- El setenta y dos por ciento de los pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico con algún tipo de afección fueron niños y adultos.

3.- La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas fueron resistentes a los antibióticos ampicilina y penicilina considerados como “de primera elección”, lo que refleja probablemente que estos antibióticos han sido administrados con mayor frecuencia y por tiempos más prolongados a los pacientes de la comunidad estudiada, dando pie a la selección de bacterias resistentes, debido, mayoritariamente a la producción de β -lactamasas.

4.- Todas las cepas de *S. aureus* analizadas en este estudio fueron resistentes a 2 o más antibióticos, siendo el setenta y cinco por ciento resistentes en el intervalo de los 4 - 7 antibióticos, constituyendo de esta manera un desafío para

los médicos que enfrentan la problemática del tratamiento de los pacientes infectados.

5.- Los inhibidores de β -lactamasas, sulbactam y ácido clavulánico, redujeron en 10 y 8 veces la CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina y amoxicilina, respectivamente, sobre la población de cepas de *S. aureus*. De tal manera que estas combinaciones podrían ser una alternativa en el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de β -lactamasas.

6.- Todas las cepas fueron sensibles a cromato (CMI 375 $\mu\text{g/ml}$) y el cien por ciento presentó resistencia a mercurio (CMI 20-40 $\mu\text{g/ml}$) y a cadmio (CMI 50-200 $\mu\text{g/ml}$).

7.- El 26% de las cepas de *S. aureus* fue sensible a arsenato (CMI= 200-400 $\mu\text{g/ml}$) y el 53 % resistente (CMI = 800-1600 $\mu\text{g/ml}$).

8.- La CMI a plomo mostró una distribución bimodal, con 2.6 % de las cepas sensibles o medianamente resistentes (CMI = 100-200 $\mu\text{g/ml}$) y 97.4 % de cepas resistentes (CMI = 800-3200 $\mu\text{g/ml}$).

9.- Las cepas multirresistentes se distribuyeron dentro de 104 patrones diferentes, compartiendo en común la mayoría de ellos la resistencia a penicilina, ceftazidima, así como, a plomo, mercurio, arsenato y cadmio.

10.-En una cepa (grupo F) se aislaron dos grupos de plásmidos de diferente tamaño molecular, (16,000 y >23,130 pb), los cuales fueron los responsables de la resistencia a penicilina (β -lactamasa), ampicilina, ceftazidima y arsenato.

11. En este trabajo no se estableció si la resistencia a plomo se encuentra asociada en plásmidos o en el cromosoma bacteriano.

12.- Sería muy importante analizar los plásmidos de las cepas resistentes a plomo para tratar de caracterizar el sitio de codificación de la resistencia, e iniciar el posible mecanismo de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amábile Cuevas, C.F. 1988. La resistencia bacteriana a los antibióticos. Ciencia y Desarrollo. Núm. 80. CONACyT. año XIV:57-68
2. Baez, A.P.; I.P. Rosas; R.D. Belmont; O.G. González & E.B. Gómez. 1977. Determinación de cromo en dos poblaciones humanas no ocupacionalmente expuestas. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. Méx. 48:77-93.
3. Barton, B.M.; Harding, G.P. & Zuccarelli, A.J. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal Biochem. 226:235-240.
4. Bauer, A. W.; W.M. Kirby; J.C. Sherris & M. Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
5. Bender, C.L. & D.A. Cooksey. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. J. Bacteriol. 169:470-474.
6. Bonfiglio, G. & Livermore, D.M. 1994. β -lactamase types amongst *Staphylococcus aureus* isolates in relation to susceptibility to beta-lactamase inhibitor combinations. J. Antimicrob. Chemother. 33:465-481.
7. Boop, L.H. & H.L. Ehrlich, 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* LB300 Arc. Microbiol. 150:426-431.
8. Brown, N.L.; T.K. Misra; J.N. Winnic; A. Schmidt; M. Seiff & S. Silver. 1986. The nucleotide sequence of the mercury resistance operons of plasmid

- R100 and transposon Tn501: further evidence for *mer* genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen Genet.* **201**:143-151.
9. Bryan, L.E. 1980. Mechanisms of Plasmid mediated Drug Resistance. En: Stuttard, C. and K.R. Rozee (eds.) "Plasmids and Transposons: Environmental effects and Maintenance Mechanisms". Academic Press, New York. pp. 57-81.
10. Campos, J. Martínez-Pacheco, M & Cervantes, C., 1995. Hexavalent-Chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus sp.* Strain. *Antonie van Leeuwenhoek* **00**:1-6.
11. Cenci C. morozzi G. Scazzocchio F. & Morosi A. 1982. Antibiotic and metal resistance of *Escherichia coli* isolates from different environmental sources. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3*: 440-449.
12. Cervantes, C.; H. Ohtake; L. Chu; T. K. Misra & S. Silver. 1990. Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid PUM505. *J. Bacteriol.* **172**: 287-291.
13. Cervantes, C. & Gutiérrez-Corona F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**:121-138
14. Cervantes, C. & H. Ohtake. 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 173-176.

15. Cervantes-Vega, C.; J. Chavez; N.A. Cordova; P. de la Mora & J. Velasco. 1986. Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* **48**:159-163.
16. Chen, C., T. K. Misra, S. Silver and B. P. Rosen. 1986. Nucleotide Sequence of the Structural Genes for an Anion Pump. The Plasmid-Encoded Arsenical Resistance Operon. *J. Biol. Chem.*, **261**:15030-15038.
17. Chopra, I. & P.R. Ball. 1982. Transport of antibiotics into bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **23**:183-240.
18. Curtiss, N.A.C.; D. Orr, M.G. Boulton & G.W. Ross, 1981. Penicillin binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. Comparison of two strains differing in their resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **7**:127-136.
19. Comber, K.R. 1980. Activity of amoxicillin/clavulanic acid (2:1) BEL 25000 augmetin *in vitro* *in vivo*, current chemotherapy and infectious disease. *Proceedings 19th ICAAC.* **1**:343
20. Davies, E.L. 1978. Plasmid-determined antimicrobial agents. *Ann Rev. Biochem.* **32**:469.
21. Elwell, L.P.; Inamine, J.M. & Minshew, B. H. 1978. Common plasmid specifying tobramycin resistance in two enteric bacteria isolated from burn patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**:312-317.

22. Erardi, F.X.; M.L. Failla & J.O. Falkinham III. 1987. Plasmid-encoded copper resistance and precipitation by *Mycobacterium scrofulaceum*. Appl. Environ. Microbiol. **53**:1951-1954.
23. Fasola, E.L., C.F. Fasching & L.R. Peterson. 1995. Molecular correlation between in vitro and in vivo activity of beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combinations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Lab. Clin. Med. **125**:200-211.
24. Georgopapadakou, N.H.; S.A. Smith & D. P. Bonner. 1982. Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. **22**:172-175.
25. Giono, C.S. 1983. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. Infectologia III. **7**:325
26. Griffin, H.G.; T.J. Foster; S. Silver & T.K. Misra. 1987. Cloning and DNA sequence of the mercuric and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**:3112-3116.
27. Hartman, B.J. & A. Tomasz. 1984. Low-affinity penicillin binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **158**:513-516.

28. Harwood-Sears, V. & A.S. Gordon. 1990. Copper-introduced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1327-1232.
29. Higman, D.P.; P.J. Sadler & M.D. Scawen. 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* **225**:1043-1046.
30. Jiménez, C.; I. Romieu; E. Palazuelos; I. Muñoz; M. Cortés; A. Rivero & Jaime Catalan. 1993. Factores de exposición ambiental y concentraciones de plomo en sangre en niños de la ciudad de México. *Salud Pública de México.* **35**:1-9.
31. Jiménez, E. 1996. Patrones de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de pacientes de la Clínica Universitaria Iztacala durante 7 años. Tesis de licenciatura, ENEP-Iztacala. UNAM.
32. Kuperstoch-Portnoy, Y.M. 1981. Antibiotic Resistance of Gram negative bacteria in Mexico: Relationship to drug consumption. En. Leavy, S. B., R. C. Clowes and E. L. Koenig (eds). *Molecular Biology, pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids*; pp. 529-537. Plenum Press. New York.
33. Kusano, T.; G. Ji; C. Inoue & S. Silver. 1990. Constitutive synthesis of a transport function encoded by the *Thiobacillus ferrooxidans* mer C gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:2688-2692.

34. Le Guill, C.; J.L. Parent; M.R Pleszczynski. & J. Stankova. 1994. Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry*. **219**:164
35. Mellano, M.A. & D.A. Cooksey. 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. *J. Bacteriol.* **170**:2879-2883.
36. Mergeay, M.; D. Nies; H.G. Schlegel; J. Gerits; P. Charles & F. Van Gusegem. 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* **162**:328-324.
37. More, B. 1960. A new screem test and Selective medium for the rapid detection of epidemic strain of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **2**:453-458.
38. Misra, T.K.; N.L. Brown; D.C. Fritzinger; R.D. Pridmore; W.M. Barnes; L. Haberstroh & S. Silver. 1984. Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the begining of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**:5975-5979.
39. Nakahara H., Ishikawa T., Sarai Y. & Kondo I. 1977a. Distributions of Resistances to metals and antibiotics of Staphylococcal strains in Japan. *Zbl.Bakt.Hyg. I. Abt. Orig. A* **237**:470-476

40. Nakahara H., Ishikawa T., Sarai Y., Kondo I., Kozukue H. & Silver, S. 1977b. Linkage of mercury, cadmium, and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:975-976.
41. Nakahara, H. & Konzukue, H. 1992. Volatilization of mercury determined by plasmids in *E. coli* isolate from a on aquatic environment. In *Drug resistance in bacteria: Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology*, De. S. Mitsuhashi. pp. 337-40. Tokio: Jpn. Sci. Soc.
42. Nakahima, Y. & Hashimoto, H. 1990. Characterization of Plasmids that confer inducible resistance to 14 membered macrolide and Streptogramin tipe B antibiotics in *S. aureus*. *Microbiol. Immuno.* Vol. 34 pp. 723-735.
43. Nies, D.H. & S. Silver. 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171**:896-900.
44. Nies, A.; D.H. Nies & S. Silver. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* **265**:5648-5653.
45. Novick, R. P., & C. Roth. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic Salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **95**; 1342-1355.

46. Novick, R.P.; E. Murphy; T.J. Gryczan; E. Baron & I. Edelman. 1979. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: restriction-deletion maps. *Plasmid*. 2:109-129
47. Novick, R.P. 1993. Staphylococcus. In: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick (eds), *Bacillus subtilis* y other Gram-Positive bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, USA. pp. 17-33
48. Nucifora, G.; L. Chu; T.K. Misra & S. Silver. 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid p1258 *cad A* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:3544-3548.
49. O'Brien, T. F., Ross, D. G., Guzmán, M. A., Medeiros, A. A., Hedges, R. W., & D. Botstein. 1980. Disemination of an antibiotic resistance plasmid in hospital patient flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:537-543.
50. O'Brien, T. F. The International Survey of Antibiotic Resistance Group. 1986. Resistance to antibiotics at medical centers in different parts of the world. *J. Antimicrob. Chemother* 18 (suppl. C): 243-253.
51. O'Callaghan C.H.; A. Morris; S.M. Kirby & S.H. Shingler. 1972. Novel method for detection of beta-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother*; 1:283-288.

52. Ohmori, H., A. Azuma, Y. Zozuki & Y. Hashimoto. 1977. Factors involved in beta-lactam antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**: 537-539.
53. Ohtake, H.; C. Cervantes & S. Silver. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **169**:3853-3856.
54. Perry, R.D. & S. Silver. 1982. Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **150**:973-976.
55. Richmond, M.H. 1965. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **94**:584-593.
56. Richmond, M.H. 1979. β -lactam antibiotics and β -lactamases: two sides of continuing story. *Rev. Infect. Dis.* **1**:30-36.
57. Rolinson, G.N. 1994. A review of the microbiology of amoxicillin/clavulanic acid over the 15 year period 1978-1993. *J. Chemother.* **6**:283-318.
58. Romieu, I.; E. Palazuelos; C. Rios; H. Muñoz & Jimenez C. Sources of lead exposure in Mexico city. *Environmental Health Perspectives*. En prensa.
59. Rosedahl, V.T. 1973. Naturally occurring constitutive β -lactamase of novel serotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **77**:229-231.

60. Rosen, B.P.; U. Weigel; C. Karkaria & P. Gangola. 1988. Molecular Characterization of an anion pump. The ArsA gene product is an arsenite (antimonate) stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* **263**:3067-3070.
61. Rouch, D.; B. T. O. Lee & J. Camakaris. 1989. Genetic and molecular basis of copper resistance in *Escherichia coli*. En: Hamer, D. & D. Winge (eds.) *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*. Alan R. Liss, New York. p. 439-466
62. Rowland, S.J. & K.G. Dyke. 1989. Characterization of the staphylococcal β -lactamase transposon Tn552. *EMBO J.* **8**:2761-2773.
63. Sykes, R.B. & M. Mathew. 1976. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**:115-157.
64. San Francisco, M.J.D., C. L. Hope, J. B. Owolabi, L. S. Tisa and B. P. Rosen. 1990. Identification of true Metalloregulatory Element of the Plasmid-encoded Arsenical Resistance Operon. *Nucl. Acid. Res.* **9**:619-624.
65. Santos, Filho, I., F.I. De Souza Freitas & J. Pinto De Siqueira JR. 1992. Antimicrobial drug-resistant *Staphylococcus aureus* in a Brazilian University Hospital. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **34**:171-173.

66. Silbergeld, E.K. 1990. Implications of new data on lead toxicity for managing and preventing exposure. *Environ Health Perspect.* **89**:49-59,
67. Silver, S. 1983. Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad. In: Westbroek, P. & E. W. De Jong (eds.) *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation*. D. Reidel. Dordrecht. pp. 439-457
68. Silver, S.; K. Budd; K.M. Leahy; W.V. Shaw; D. Hammond.; R.P. Novick, G.R. Willsky; M.H. Malamy & H. Rosenberg. 1981. Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **146**:983-96.
69. Silver, S. 1981. Mechanisms of plasmid-determined heavy metal resistances. In: Levy, S. B.; R. C. Clowes & E. L. Koenig (eds.) *Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids*, Plenum Press. New York. pp. 179-189
70. Silver S. & T.K Misra. 1984. Bacterial transformations of and resistance to heavy metals. In Ommen, G. S. d. A. Holl. (ed). *Genetic Control of Environmental Pollutants*, New York: Plenum. pp. 23-46
71. Silver, S. & T. K. Misra. 1988. Plasmid-Mediated Heavy Metal Resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:717-743.
72. Silver, S. & M. Walderhaugh. 1992. Regulation of chromosomal and plasmid cation and anion transport systems. *Microbiol. Rev.* **56**: 1-33.

73. Silver, S.; G. Nucifora; L. Chu & T.K. Misra. 1989. Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. Trends Biochem. Sci. **14**:76-80.
74. Smith, K. & R.P. Novick. 1972. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **112**:761-762.
75. Summers, A. O. & S. Silver. 1978. Microbial transformations of metals. Ann. Rev. Microbiol. **32**:637-672.
76. Thomson, C.J. & G.B. Sebastian. 1995. Susceptibility Testing with Clavulanic Acid: Fixed Concentration versus Fixed Ratio. Antimicrob. Agents and Chemotherapy. **39**: 2591-2592.
77. Tynecka, Z.; Z. Gos & J. Zajac. 1981. Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **147**:313-319.
78. Vaca, S., R. Miranda & C. Cervantes, 1995. Inorganic-ion resistance by bacteria isolated from a Mexico City freeway. Antonie van Leeuwenhoek. **67**:333-337.
79. Venitt, S. & L.S. Levy. 1974. Mutagenicity of chromate in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. Nature **250**:493-495.

80. Walter, E.G. & D.E. Taylor. 1989. Comparison of tellurite resistance determinants from the IncPa plasmid RP4Ter and the IncHIII plasmid pHH1508a. *J. Bacteriol.* **171**:2160-2165.
81. Watanabe, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **227**: 87-115.