

42

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

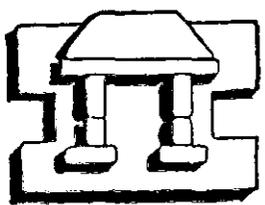


ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

RESPUESTA DE 73 CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
A 6 ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS Y A UN
INHIBIDOR DE β -LACTAMASAS,
SULBACTAM/AMPICILINA

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE MANUEL GARCIA CHAVEZ

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. GLORIA LUZ PANIAGUA C.



I Z T A C A L A

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

FEBRERO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

**Respuesta de 73 cepas de *Staphylococcus aureus* a 6 antibióticos
 β -lactámicos y a un inhibidor de β -lactamasas, sulbactam/ampicilina**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
JOSÉ MANUEL GARCÍA CHÁVEZ**

DIRECTORA DE TESIS: M en C. GLORIA LUZ PANIAGUA C.

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX. FEBRERO 2001.

DEDICATORIAS

**A MIS PADRES : MANUEL GARCIA Y CARMEN CHAVEZ
POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO EN TODO
MOMENTO APOYÁNDOME Y GUIANDOME
CON SUS CONSEJOS**

**A MIS HERMANOS: POR QUE SIEMPRE HA EXISTIDO
UNA GRAN UNION ENTRE NOSOTROS.**

**A MIS SUEGROS : POR EL APOYO MORAL Y CONFIANZA
QUE ME BRINDARON**

**A MIS TRES MUJERES : ALMA ANGELICA
ANA LAURA
ALEJANDRA.**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS : POR DARMER VIDA Y CAPACIDAD PARA LOGRAR
TODAS MIS METAS

A LA M. EN C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS POR LAS
FACILIDADES Y APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE
TRABAJO

A LOS PROFESORES :

M. EN C. ERIC MONROY PÉREZ

DR. SERGIO VACA PACHECO

BIOL. SUSANA ESTHER GONZÁLEZ ALMAZAN

BIOL. LAURA CASTAÑEDA PARTIDA

POR LA APORTACIÓN DE SUS CONOCIMIENTO Y SUS VALIOSAS
SUGERENCIAS QUE CONTRIBUYERON DIRECTAMENTE A LA
REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	6
MECANISMOS DE ACCIONDE LOS ANTIMICROBIANOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA	7
ANTECEDENTES	14
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

La selección de cepas resistentes a los antibióticos, ocasionada por el uso indiscriminado de estos agentes, tanto para uso humano, como veterinario y agrícola, ha dificultado en los últimos años el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias y principalmente por cepas de *staphylococcus aureus* por tal motivo en este trabajo se comparó la efectividad de los principales grupos de antibióticos β -lactámicos y de un inhibidor de β -lactamasas. Se utilizaron 73 cepas de *S. aureus* que fueron aisladas de las diferentes ubicaciones morfológicas de pacientes infectados que acudieron al Laboratorio Clínico de la CUSI-Iztacala. La CMI de penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefalotina, ceftriaxona, y sulbactam + ampicilina se determinó por el método de dilución en placa en agar Mueller-Hinton. La determinación de la producción de β -lactamasas se determinó por hidrólisis de una cefalosporina cromogénica, nitrocefin (BBL). El 66 % de las cepas se aisló de nasofaringe, el 33% de vías urinarias y el 1 % de infección acular.

Las CMI₅₀s para los antibióticos fueron: penicilina 217 $\mu\text{g/ml}$, ampicilina 85.20 $\mu\text{g/ml}$, dicloxacilina 120 $\mu\text{g/ml}$, cefalotina 61.70 $\mu\text{g/ml}$, cefuroxima 38.50 $\mu\text{g/ml}$, ceftriaxona 11.10 $\mu\text{g/ml}$ y sulbactam + ampicilina 8.30 $\mu\text{g/ml}$.

Las CMI₉₀s para los antibióticos fueron : penicilina 1300 $\mu\text{g/ml}$, ampicilina 380 $\mu\text{g/ml}$, dicloxacilina 1000 $\mu\text{g/ml}$, cefalotina 760 $\mu\text{g/ml}$. cefuroxima 375 $\mu\text{g/ml}$, ceftriaxona 38.50 $\mu\text{g/ml}$, y sulbactam + ampicilina 82.20 $\mu\text{g/ml}$.

El 85 % de las cepas de *S. aureus* fue productor de β -lactamasas.

Los resultados presentados aquí muestran que ha ocurrido un incremento importante en el número de cepas resistentes a los principales antibióticos β -lactámicos, debido en gran parte a la producción de β -lactamasas, puesto que se necesitaron de altas concentraciones de los antimicrobianos probados para inhibir al 90 % de las cepas de *S.aureus*.

INTRODUCCIÓN

Morfología y características generales de *Staphylococcus aureus*.

Los *Staphylococcus aureus* pertenecen a la familia *Microcaceae*, son cocos Gram positivos, que miden de 0.5-1.2 μm de diámetro, no móviles, aerobios facultativos, catalasa positivos y capaces de crecer en un medio con el 10% de cloruro de sodio, a PH (4.5 a 9) y a temperaturas entre 18 a 40° C. *Staphylococcus aureus* en los medios de cultivo forma colonias opacas, redondas, regulares, convexas y de color amarillo dorado debido a la producción de carotenoides, sin embargo se ha demostrado que este pigmento no se produce en presencia de glucosa (Novick, R.P. 1993). Bajo condiciones aeróbicas fermenta manitol, xilosa, lactosa, sucrosa, glicerol y maltosa con producción de ácido. Se ha demostrado que *Staphylococcus aureus* es la única especie del género que fermenta el manitol en condiciones anaeróbicas (Novick, R. 1993).

Factores de patogenicidad

Los *S. aureus* producen un gran número de exoproteínas y factores de superficie que se ha demostrado están implicados en la patogenicidad, por ejemplo, algunas cepas de *S. aureus* producen una cápsula a menudo compuesta de ácido glucosaminurónico, que las protege mediante inhibición de la quimiotaxis y la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares (Smith, R.M. *et al.*, 1977).

1) Proteína A

Todas las cepas de *S. aureus* poseen en su superficie una proteína de 42 Kda anclada a la capa de peptidoglucano, y que tiene afinidad por el receptor Fc de las inmunoglobulinas IG1, IG2 e IG4, con lo que evita de modo eficaz la eliminación inmunológica mediada por anticuerpos del microorganismo. La interacción Proteína A-Fc in vivo tiene una variedad de efectos inmunológicos, como: reacciones alérgicas, anafilaxis, activación del complemento, liberación de histamina y mitogenicidad para los linfocitos B humanos. También se ha descrito que la proteína A es un importante factor de virulencia (Foster, J. T. *et al.*, 1990).

2) Adhesinas

S. aureus posee en su superficie proteínas específicas (**Adhesinas**) que le facilitan la unión a proteínas de matriz (fibronectina, lamniina y

colágena), así como también a la superficie celular del hospedero, lo que le facilita la colonización de la matriz intracelular y la invasión de las células (Wadstrom, T.J. *et al.*, 1990; Lindberg, M., *et al.*, 1990).

3) Proteínas extracelulares

S. aureus produce una gran variedad de exoproteínas. Algunas son toxinas, otras contribuyen a la patogenicidad al atacar la matriz celular y otras atacan las células del hospedero directamente.

Las cepas de *S. aureus* producen 4 diferentes hemolisinas, todas ocasionan β -hemólisis, pero difieren en especificidad y en mecanismo de acción. La α -toxina es citotóxica para un gran número de células entre las que se incluyen hematíes, leucocitos, hepatocitos, plaquetas, fibroblastos diploides humanos y Células HeLa. Se ha descrito que la α -hemolisina es activa contra eritrocitos de conejo, tiene un tamaño de 34 Kda y se une con un receptor de membrana (sialoglicoproteína) que da como resultado un hexámero cilíndrico, cuya estructura es similar al complejo de ataque de la membrana celular (MAC) del complemento, que penetra la membrana (Bhakdi, S. & J. Trunum-Jensen, 1984). La β -hemólisisina también llamada esfingomielina C es una proteína de 30 Kda que sólo es producida por el 10-20% de las cepas Clínicas de *S. aureus*, es activa contra hematíes, leucocitos, macrófagos y fibroblastos. Cataliza la hidólisis de los

fosfolípidos de la membrana de las células susceptibles y la intensidad de la lisis es proporcional a la cantidad de esfingomielina expuesta en la superficie celular. La γ -hemolisina está formada por dos proteínas básicas y es capaz de lisar los hematíes de diversas especies incluyendo hombre, oveja y conejo, así como las células linfoblásticas humanas. La δ -hemolisina es producida como un péptido de 26 aminoácidos (Fitton, J.E. *et al.*, 1980), y se encuentra como un agregado heterogéneo con subunidad de 5 Kda. Actúa sobre varios tipos celulares como eritrocitos, leucocitos, células de mamífero cultivada y protoplastos bacterianos.

4) Toxina exfoliativa

El síndrome de la piel escaldada estafilocócica, una enfermedad caracterizada por dermatitis exfoliativa, es mediado por la acción de la toxina exfoliativa, conocida también toxina epidermolítica. Esta toxina es producida por aproximadamente el 5% de las cepas y cuyo PM es 24 Kda y se presenta como dos variantes antigénicas, ETB codificada por un plásmido y ETA de origen cromosómico (Wiley, B.B. & M. Rogosky, 1997).

5) Toxina I del Síndrome del Shock tóxico

S. aureus produce la Toxina I del síndrome del shock tóxico (TSST-1), que se caracteriza por producir en el hospedero fiebre, hipotensión y

exantema seguido por descamación. Se ha descrito que el 15% de las cepas de *S. aureus* producen TSST-1 (Novick, R. 1993).

6) Enzimas Estafilocócicas

Las cepas de *S. aureus* producen dos tipos de coagulasa: 1) la coagulasa unida a la pared celular (llamada de agrupamiento) que convierte el fibrinógeno en fibrina insoluble ocasionando que los estafilococos formen grumos y 2) coagulasa libre que provoca el mismo efecto mediante reacción con factor plasmático globulínico (FRC), para formar un factor similar a la trombina. Este factor cataliza la formación del fibrinógeno en fibrina (Pfaller, M & Herwaldt L. 1988a).

También *S. aureus* produce una estafilocinasa que disuelve el coágulo al activar la conversión de la proenzima plasminógeno a la enzima fibronolítica plasmina, el gen que codifica reside en un profago (Sako, T. *et al.*, 1983). *S. aureus* produce también una nucleasa que tiene actividad de endo y exonucleasa sobre ADN y RNA. Por otra parte *S. aureus* produce una penicilinasas (β -lactamasas) que le confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos (Novick R. 1993).

Patogenia

S. aureus es un microorganismo capaz de causar infecciones leves como: faringoamigdalitis, otitis, impétigo, foliculitis, ántrax, hasta infecciones graves como bacteriemia, endocarditis, neumonía y osteomielitis.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La resistencia a los antibióticos fue descrita por primera vez en el año de 1912 por Morgenroth y Kaufmann, posteriormente en otras partes del mundo se reportó la existencia de bacterias resistentes a penicilina (Abraham, E. P. *et al.*, 1941) y a estreptomycin (Murray, R.K. *et al.*, 1964).

Las primeras cepas *S. aureus* resistentes a antibióticos fueron aisladas poco después de la introducción de los antibióticos en el mercado. En los Estados Unidos, el porcentaje de cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) aisladas en todos los hospitales se incrementó de 2.4% en 1975 a 29% en 1991. Esta incidencia varió de acuerdo al tamaño de cada hospital, por ejemplo: en hospitales con menos de 200 camas se aisló a *S. aureus* (MRSA) en el 14.9% y en hospitales con más de 500 camas se reportó una frecuencia del 38.3% (Panililio, A.L. *et al.*, 1992).

Patogenia

S. aureus es un microorganismo capaz de causar infecciones leves como: faringoamigdalitis, otitis, impétigo, foliculitis, ántrax, hasta infecciones graves como bacteriemia, endocarditis, neumonía y osteomielitis.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La resistencia a los antibióticos fue descrita por primera vez en el año de 1912 por Morgenroth y Kaufmann, posteriormente en otras partes del mundo se reportó la existencia de bacterias resistentes a penicilina (Abraham, E. P. *et al.*, 1941) y a estreptomicina (Murray, R.K. *et al.*, 1964).

Las primeras cepas *S. aureus* resistentes a antibióticos fueron aisladas poco después de la introducción de los antibióticos en el mercado. En los Estados Unidos, el porcentaje de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) aisladas en todos los hospitales se incrementó de 2.4% en 1975 a 29% en 1991. Esta incidencia varió de acuerdo al tamaño de cada hospital, por ejemplo: en hospitales con menos de 200 camas se aisló a *S. aureus* (MRSA) en el 14.9% y en hospitales con más de 500 camas se reportó una frecuencia del 38.3% (Panililio, A.L. *et al.*, 1992).

LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

El uso indiscriminado de los antibióticos constituye un factor importante en la selección de cepas resistentes, siendo frecuente que las cepas resistentes posean plásmidos que les confiere este fenotipo (Bryan, L.E. 1980).

Los mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por plásmidos se agrupan en 4 categorías (Amábile Cuevas, C.F. 1988):

- A) Inactivación del antibiótico.
- B) Alteración del sitio blanco que actúa como receptor al antibiótico.
- C) Disminución del transporte del antimicrobiano al interior de la célula.
- D) Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco.

Los mecanismos de resistencia y los mecanismos de acción de los principales grupos de antibióticos se aprecian en la tabla 1 y figura 1, respectivamente.

Tabla 1 Mecanismos de acción y de resistencia por las bacterias.

ANTIBIÓTICOS	MECANISMOS DE ACCIÓN	BLANCO DE ACCIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA	DE BASE GENÉTICA
β lactámicos • Penicilinas • Cefalosporinas	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Proteínas de unión de la penicilina (PBPs)	<ul style="list-style-type: none"> Hidólisis del anillo β-lactámico (β-lactamasas) Alteración del blanco (PBPs) 	Plásmido cromosoma
Macrólidos lincosamidas	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> Metilación del material ribosomal 23s (metilasa) Hidólisis de la lactona de la eritromicina (eritromicin-esterasa) 	Plásmido cromosoma
Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	Modificación del antibiótico evitando su unión al ribosoma (cloranfenicol acetil transferasa)	Plásmido
Aminoglucósidos • estreptomicina, • neomicina, • kanamicina, • gentamicina	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> Modificación del antibiótico impidiendo su transporte (acetil transferasa, fosfatidil transferasa, adenil transferasa metilasa) Modificación de la subunidad 50s del ribosoma Disminución de la captación por la célula 	Plásmido cromosoma
Quinolonas y ácido nalidixico	Inhibición de la Replicación, Transcripción, Recombinación, y Superenrollamiento del ADN	ADN girasa	<ul style="list-style-type: none"> Mutación sobre ADN girasa (ADN girasa) Disminución de la permeabilidad Eflujo 	Cromosoma Cromosoma Cromosoma
Tetraciclina	Inhibición de la síntesis de proteínas	Proteína de la subunidad ribosómica 30s	Interferencia con el transporte de la droga (proteínas inducibles)	Plásmido
Sulfonamidas Trimetoprim	Inhibición de la síntesis de ácido fólico		Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco	Plásmido

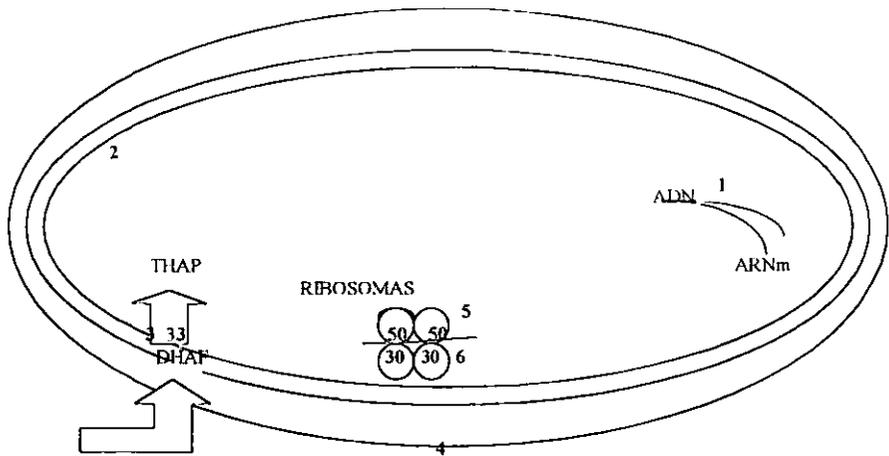


Figura 1. Mecanismos de acción de los principales grupos de antibióticos.

- 1.-Inhibición de la síntesis de DNA.
- 2.-Inhibición de la pared celular
- 3.-Inhibición de la síntesis del ácido fólico.
- 4.-Inhibición de la membrana celular
- 5.-Inhibición de la síntesis de proteínas (inhibidores 50S).
- 6.-Inhibición de la síntesis de proteínas (inhibidores 30S)

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).

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 metilicina 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 metilicina, un compuesto derivado de la penicilina y resistente a β -lactamasas, fue seguida rápidamente por la aparición de cepas resistentes.

La resistencia a metilicina 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 (cefotixina, 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).

Actualmente no se han seleccionado cepas resistentes a los inhibidores de β -lactamasas, 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.

ANTECEDENTES

El tratamiento de las infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus* en los últimos años ha sido un verdadero problema para los médicos y especialistas debido a que estos microorganismos se han seleccionado como resistentes a los antibióticos, por lo que es importante conocer los principales antecedentes de resistencia a estos agentes por *S. aureus*.

- Takenouchi y cols. (1994) demostraron la actividad in vivo de antibióticos de 1ª generación sobre 61 cepas clínicas de *S. aureus* susceptibles a la meticilina incluyendo 39 cepas productoras de β -lactamasas.
- Danzinger y cols. (1995) reportaron la evolución de la resistencia a antibióticos, los mecanismos de resistencia y la clasificación de las β -lactamasas en los últimos años.
- Aldridge (1995) comparó la actividad de la cefotaxima (3ª. Generación) in vitro y in vivo contra infecciones producidas por *S. aureus*.
- Chang (1995) demostró la actividad de inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) sobre la actividad de oxacilina contra cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA).

- Hammonnd y cols. (1995) determinaron la resistencia a penicilinas, eritromicina, y tetraciclina en cepas de *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis* y *Streptococcus pneumoniae*.
- Paniagua y cols. (1998) determinaron el efecto de los inhibidores de β -lactamasas (sulbactam y ácido clavulánico) sobre la Concentración Mínima Inhibitoria de ampicilina y amoxicilina, respectivamente, para cepas de *S. aureus*.
- Pfaller y cols. (1998a) determinaron la actividad de cefotaxima, cefepima, ceftazidima, piperacilina, piperacilina/tazobactam e imipen) sobre diferentes grupos de organismos.
- Urraza y cols. (1998) probaron la actividad de tetraciclina, eritromicina, cefuroxime, meticilina y penicilina G contra cepas de *S. aureus* incluyendo cepas resistentes a la meticilina.
- Graves y cols. (1998) comprobaron la solubilidad de la proteína de unión a la penicilina 2a (sPBP2a) con antibióticos β -lactámicos en cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina.
- Sidorenko y cols. (1998) comprobó la susceptibilidad de diferentes antibióticos en 898 cepas de *S. aureus* aisladas de centros médicos en Moscú.
- Graves y cols.(1999) demostraron la solubilidad de la proteína de unión a la penicilina 2a (sPBP2a) con el antibiótico moenomycin.

- Schimitz y cols (1999) comprobaron la prevalencia de resistencia a Macrólidos, Lincosamida y Streptogramina (MLS) en 3653 cepas clínicas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecium*) recuperadas en 20 hospitales de Europa.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el uso indiscriminado de los antibióticos ha provocado la selección de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a los antibióticos, provocando el surgimiento de nuevos y nuevas generaciones de antimicrobianos en el mercado. Debido a esto es muy importante establecer la prevalencia de la resistencia de las cepas de *S. aureus* a los principales grupos de antibióticos β -lactámicos existentes en el mercado, como un sondeo para determinar el incremento de la resistencia a estos agentes en otras partes del mundo y en particular en la población de los Reyes Iztacala.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comparar la efectividad de los principales grupos de antibióticos β -lactámicos en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefalotina, cefuroxima y ceftriaxona para las cepas de *S. aureus*.
- Determinar la producción de β -lactamasas por las cepas de *S. aureus*
- Cuantificar el efecto del inhibidor de β -lactamasas sulbactam sobre la CMI de ampicilina.

MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 73 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* obtenidas del cepario del departamento de Microbiología del Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI-I.

Determinación de la CMI de los antibióticos β -lactámicos

La concentración mínima inhibitoria de penicilina, ampicilina, oxacilina, cefalotina, cefuroxime, ceftriaxona y sulbactam más ampicilina se determinó por el método de dilución en placa en agar Mueller-Hinton (MH), utilizando un sembrador múltiple, conforme a lo reportado por Vaca, y col. (1995). Para lo cual se creció cada una de las cepas de *S. aureus* 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 en el rango de concentración de 3.9 a 2000 $\mu\text{g/ml}$. La CMI es la mínima concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento visible después de incubar 24 h a 37° C.

Detección de β -lactamasas

Para la detección de β -lactamasas se utilizaron discos impregnados con una cefalosporina cromogénica nitrocefín (BBL). Este compuesto cambió

color amarillo a rojo cuando el enlace amida del anillo β -lactámico fue hidrolizado por la β -lactamasa, para lo cual se tomó un disco impregnado con nitrocefín y 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).

Antibióticos utilizados:

- 1.- Penicilina Procaínica (Penipot) solución inyectable de 200,000 unidades.
- 2.- Ampicilina (Penbritin) ampula de 250 mg.
- 3.- Dicloxacilina (Brispen) ampula de 250 mg.
- 4.- Cefalotina (Klefin) ampula de 1 gr.
- 5.- Cefuroxima (Zinnat) ampula de 750 mg.
- 6.- Ceftriaxona (Rosephin) ampula de 500 mg.
- 7.- Sulbactam (inhibidor de β -lactamasas) + Ampicilina (Unasyna) ampollita de 500 mg de ampicilina y 250 mg de sulbactam.

RESULTADOS

ORIGEN DE LAS CEPAS

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron 73 cepas de *Staphylococcus aureus* que fueron obtenidas del cepario del departamento, de microbiología del Laboratorio Clínico, CUSI.

CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE LOS ANTIBIÓTICOS.

Como puede observarse en la figura 1 la CMI₅₀ de penicilina (concentración que inhibe al 50 % de las cepas) fue de 217 µg/ml y la CMI₉₀ fue de 1300 µg/ml.

En la figura 2 se aprecia que la CMI₅₀ de ampicilina correspondió a 70 µg/ml y la CMI₉₀ a 1000 µg/ml.

La CMI₅₀ de dicloxacilina fue de 120 µg/ml y la CMI₉₀ de 1000 µg/ml (figura 3).

En la figura 4 se observa la CMI₅₀ de cefalotina (61.7 µg/ml.) y la CMI₉₀ (760 µg/ml).

La CMI₅₀ de cefuroxima correspondió a 38.5 µg/ml y la CMI₉₀ correspondió a 375 µg/ml (figura 5).

En la figura 6 se observa la CMI₅₀ de ceftriaxona que fue de 11.1 µg/ml y la CMI₉₀ de 38.5 µg/ml.

FIGURA 1
DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA
INHIBITORIA DE PENICILINA POR CEPAS DE *Staphylococcus
aureus*

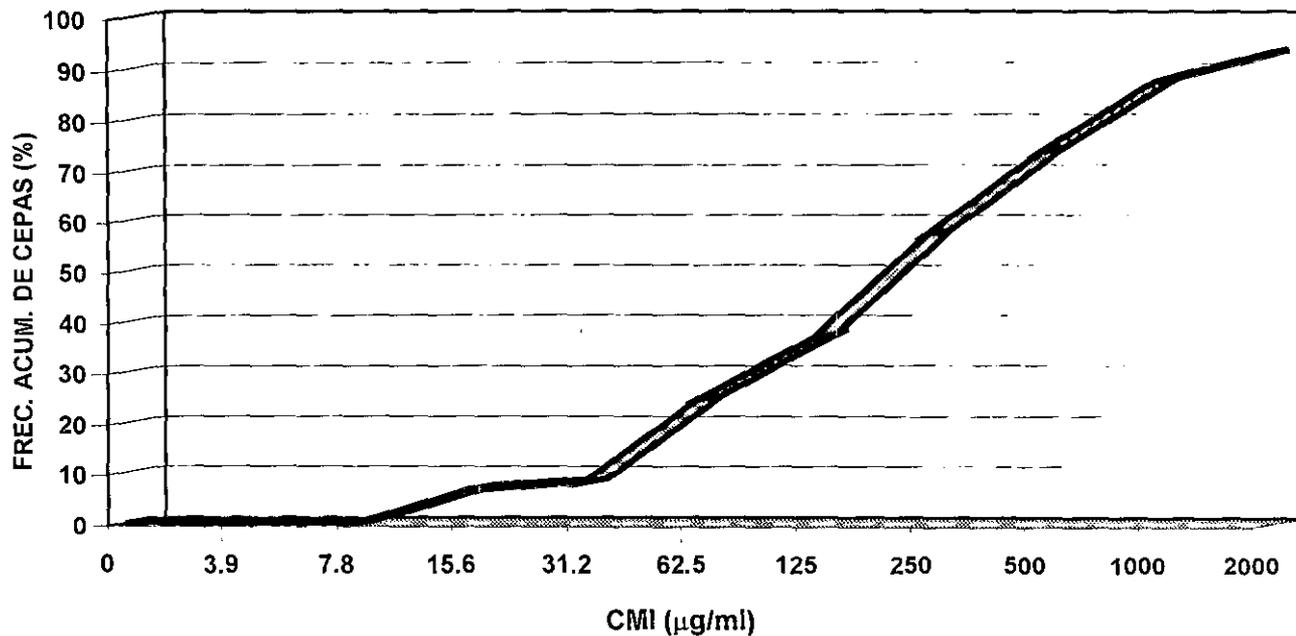


FIGURA 2
DISTRIBUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA
INHIBITORIA DE AMPICILINA POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus

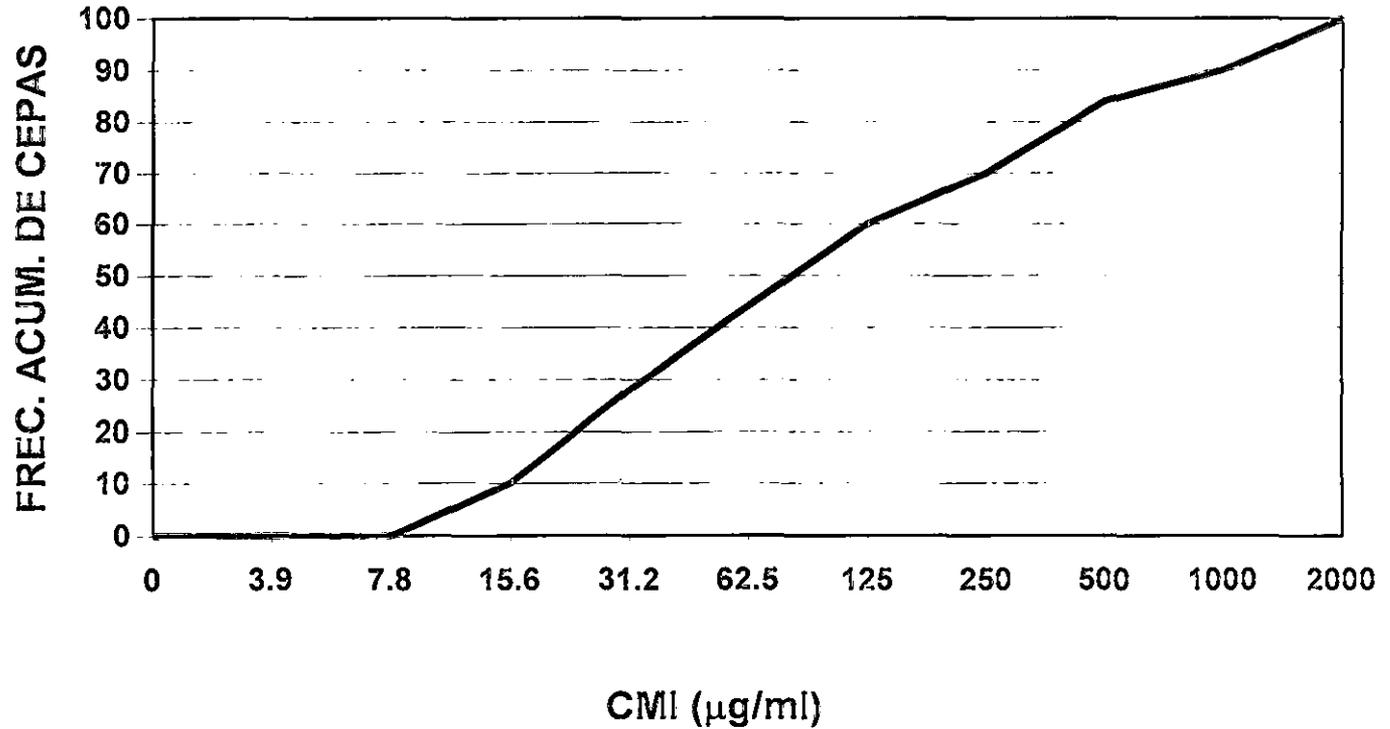


FIGURA 3
DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA
INHIBITORIA DE DICLOXACILINA POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus

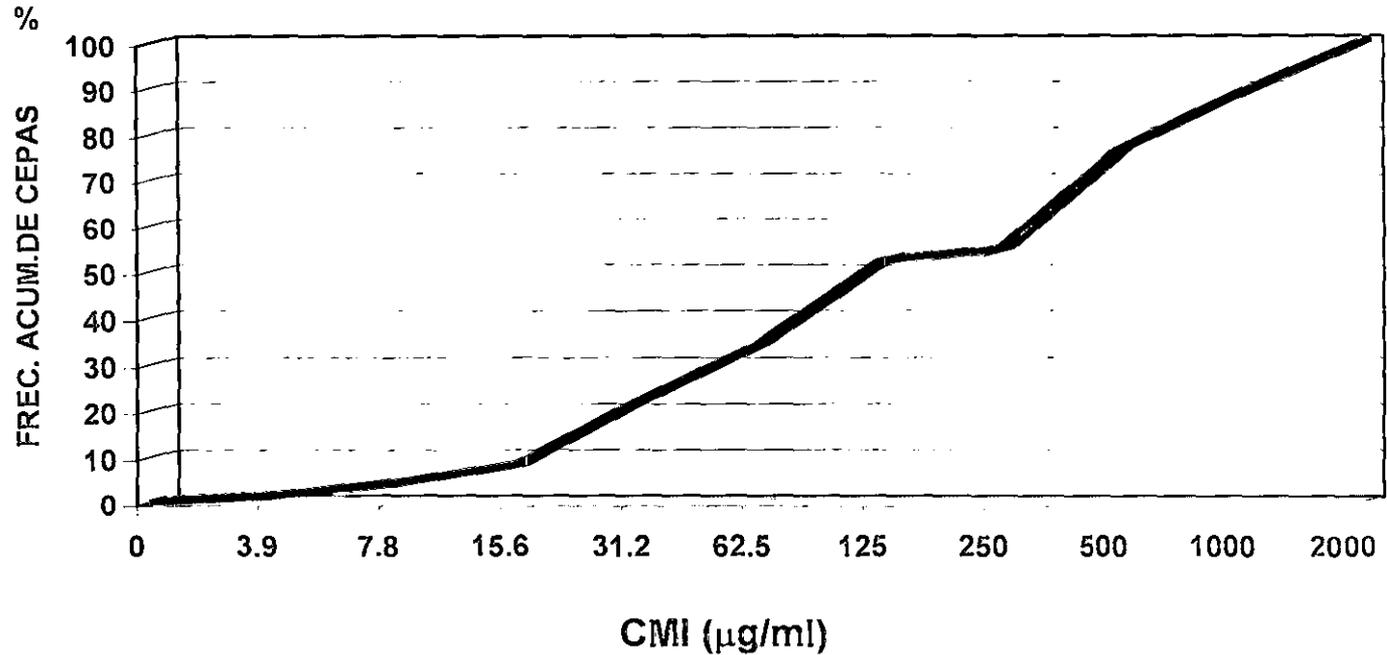


FIGURA 4
DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA
INHIBITORIA DE CEFALOTINA POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus

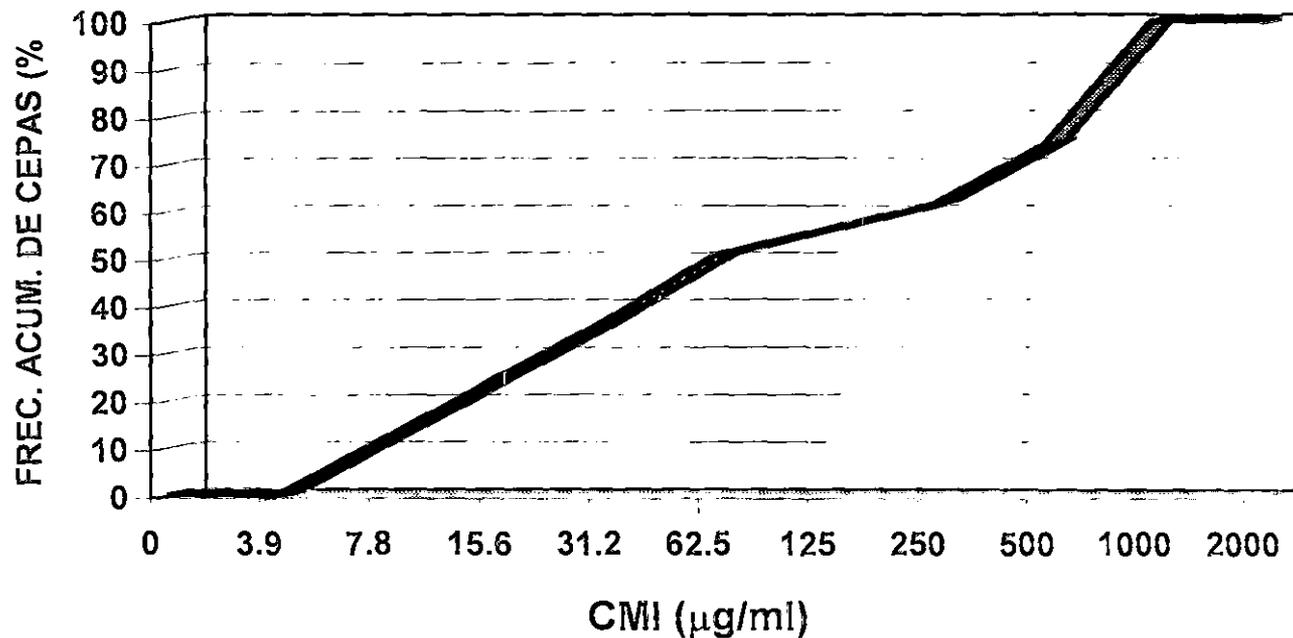


FIGURA 5
DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
DE CEFUROXIMA POR CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

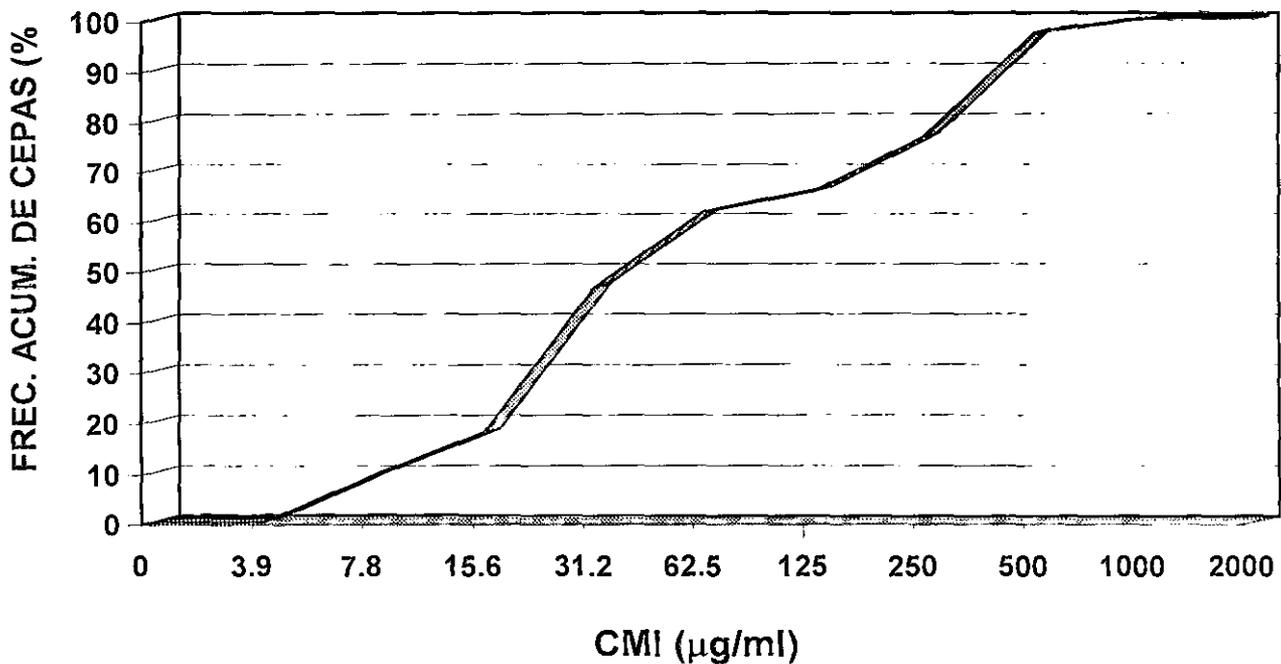
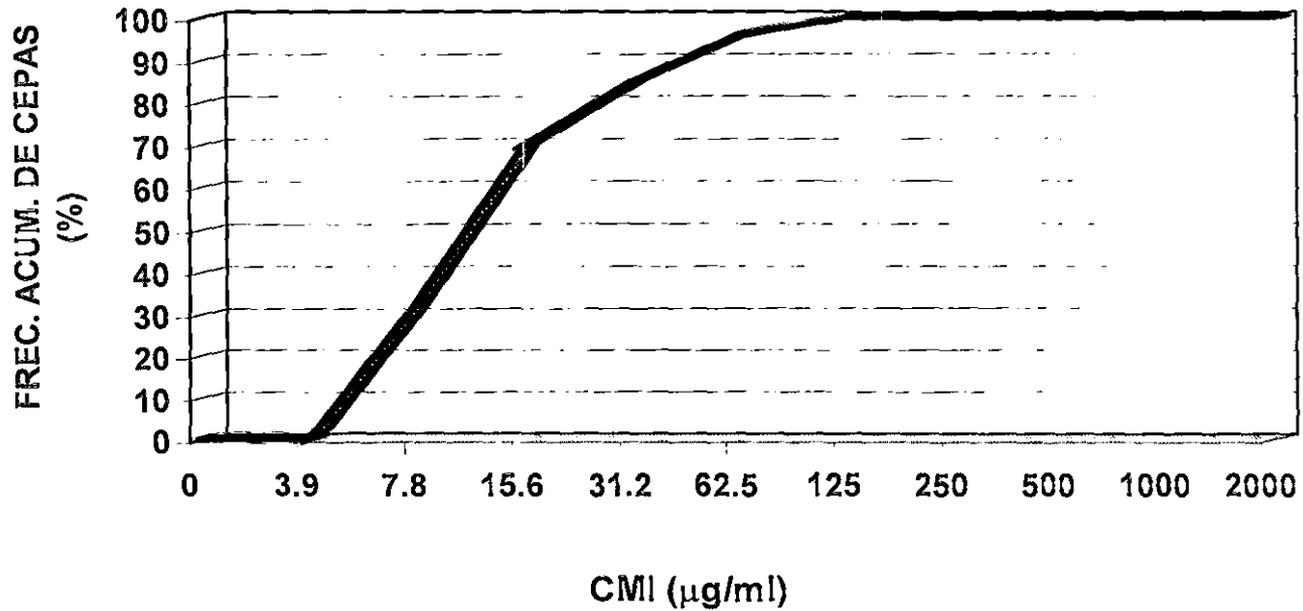


FIGURA 6
DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA
INHIBITORIA DE CEFTRIAXONA POR CEPAS DE
Staphylococcus aureus



PRODUCCIÓN DE B-LACTAMASAS

Con el propósito de determinar la producción de β -lactamasas por las cepas de *S. aureus* se determinó, cualitativamente, la capacidad de estas para hidrolizar a la cefalosporina cromogénica nitrocefín (BBL). Como se aprecia en la figura 7 el 85% de las cepas produjo β -lactamasas y el 15% no produjo β -lactamasas.

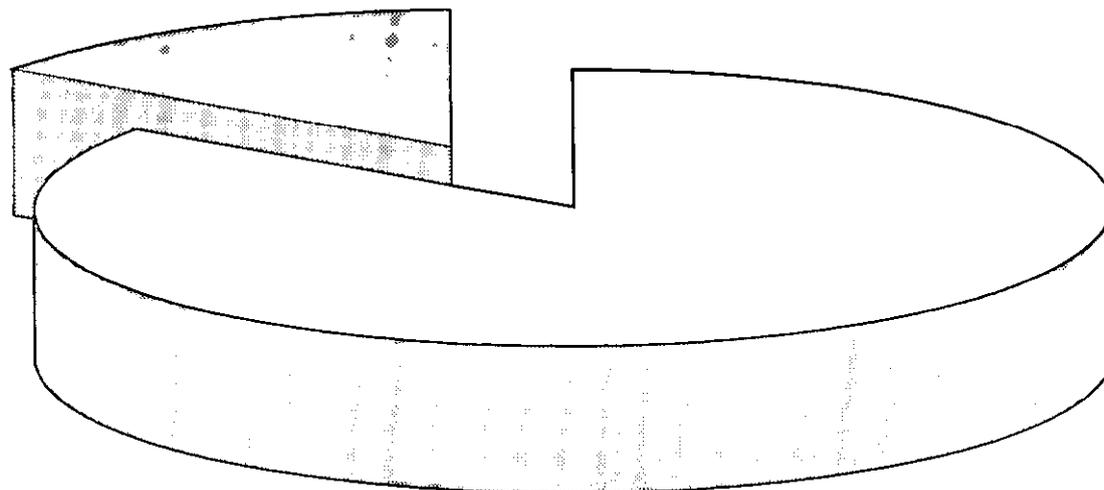
Inhibidor de β -lactamasas

En la figura 8 se observa que la CMI_{50} de ampicilina fue de 70 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI_{90} de 1000 $\mu\text{g/ml}$. La adición del sulbactam a la ampicilina disminuyó 8.4 veces la CMI_{50} (8.3 $\mu\text{g/ml}$) y 11 veces la CMI_{90} (85.2 $\mu\text{g/ml}$).

En la gráfica 9 se aprecian las CMI_{50} y CMI_{90} de los diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos. Los antibióticos más efectivos contra las cepas de *S. aureus* fueron la ceftriaxona y el sulbactam más ampicilina, debido a que se necesitaron de bajas concentraciones para inhibir al 90% de las cepas.

FIGURA 7
PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS POR LAS CEPAS DE
Staphylococcus aureus

15% NEGATIVAS



85% POSITIVAS

FIGURA 8
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA Y
AMPICILINA + SULBACTAM POR CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

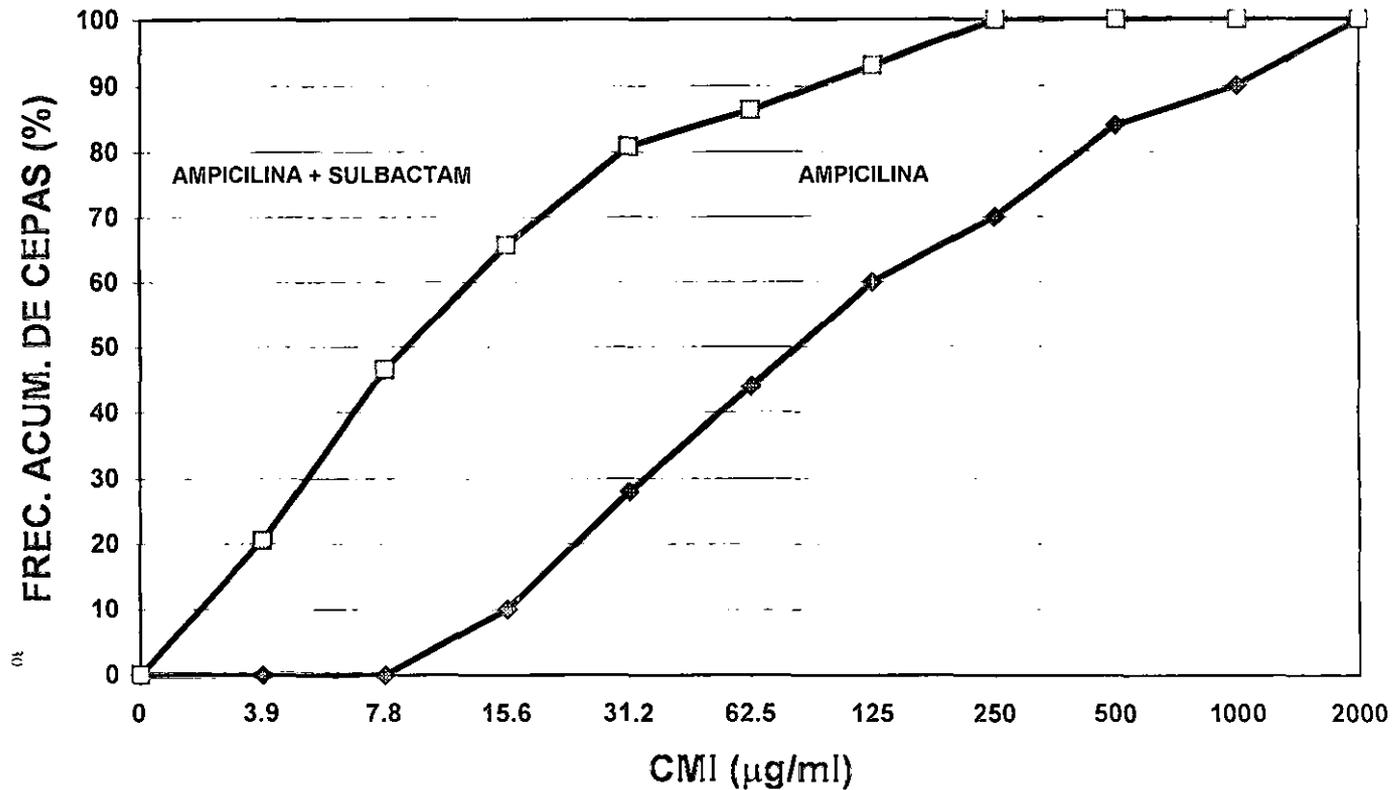
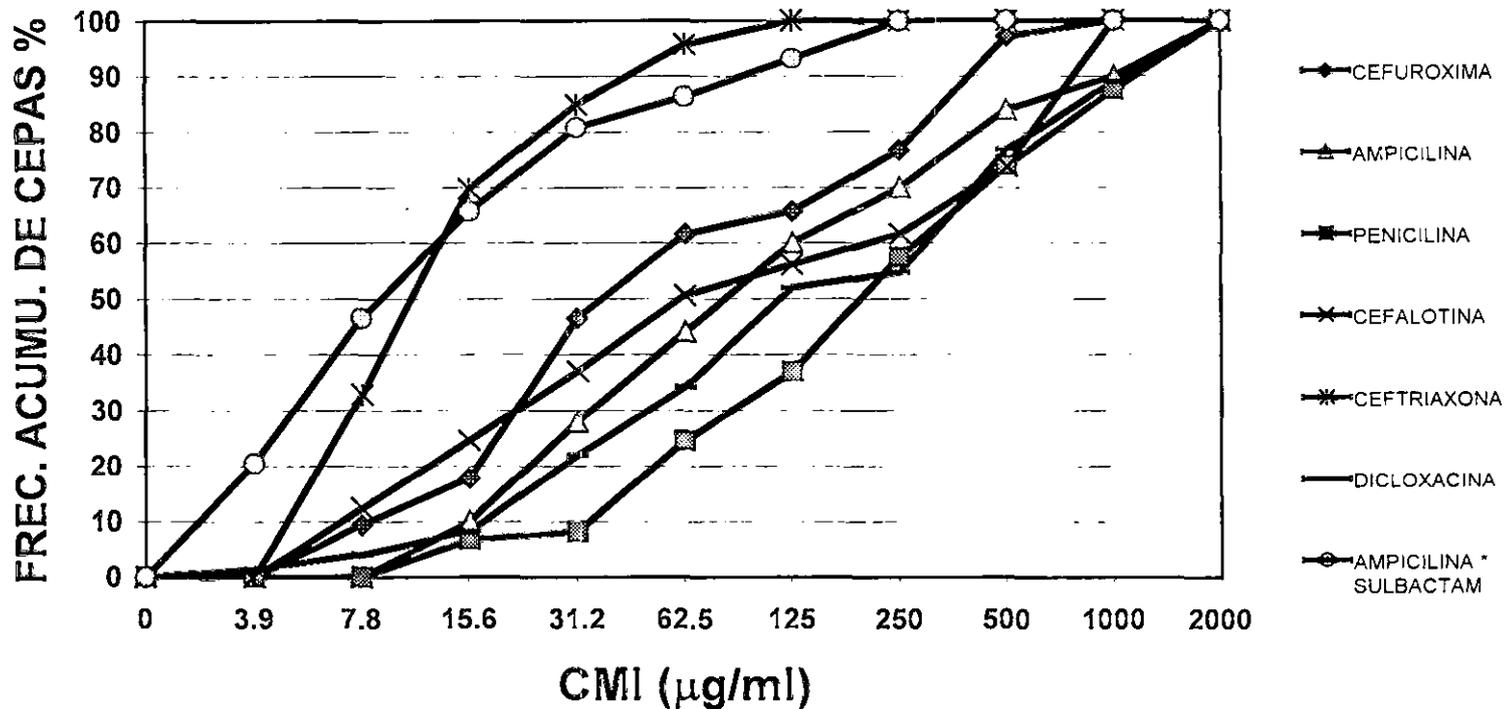


FIGURA 9
 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA A ANTIBIÓTICOS
 POR *Staphylococcus aureus*



DISCUSIÓN

Efecto de los antibióticos β -lactámicos sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Penicilina

En este trabajo reportamos que la mayoría de las cepas de *S. aureus* fue resistente a la penicilina (figura 1) debido a que se necesitaron de altas concentraciones para inhibir al 50% (CMI₅₀ = 217 μ g/ml) y al 90% de las cepas (CMI₉₀ = 1300 μ g/ml). Estos resultados no nos sorprenden, toda vez, que siendo la penicilina uno de los antibióticos de 1ª elección para infecciones producidas por *S. aureus*, es muy común que los médicos prescriban con relativa frecuencia este agente, además de la propia automedicación de los pacientes, en cuyo caso, las bacterias se seleccionan como resistentes. Nuestros resultados corroboran lo reportado por Hammond (1995), en donde describió que el 91.25% de las 375 cepas de *S. aureus* aisladas de la faringe de infantes pertenecientes a 117 Guarderías en Melbourne y 42 suburbios en Sidney entre mayo y julio de 1991-1993, fue resistente a la penicilina. En otro estudio realizado sobre 64 cepas de *S. aureus* aisladas de secreciones de la piel, heridas quirúrgicas y manos del personal en un hospital de la Universidad Federal de Paraíba, Brasil, se

encontró al 85% de las cepas resistente a penicilina (Santos, F et al., 1992)

Ampicilina

En este estudio encontramos que la CMI₅₀ y la CMI₉₀ de ampicilina para las cepas de *S. aureus* fue de 70 µg/ml y 1000 µg/ml, respectivamente, (figura 2). Nuestros valores son semejantes a los reportados en un estudio realizado en el Edo. de México (Paniagua y col. 1996) para un grupo de cepas clínicas de *S. aureus* aisladas a partir de diversos procesos infecciosos de pacientes (CMI₅₀ = 250 µg/ml y CMI₉₀ = 1520 µg/ml). La resistencia a ampicilina por las cepas de *S. aureus* encontrada en nuestro estudio, corrobora lo reportado en otras partes del mundo, en donde el porcentaje de resistencia a ampicilina rebasa al 80% (O'Brien, T.F. 1986). En otro estudio realizado sobre 150 cepas Clínicas de *S. aureus* (Monroy, P.E. 1997) aisladas de diferentes ubicaciones morfológicas de pacientes infectados se encontró que el 94 % de las cepas fue resistente a ampicilina.

La elevada resistencia de cepas de *S. aureus* a penicilina y ampicilina en México y en otras partes del mundo pone de manifiesto que ya no es conveniente utilizar estos antibióticos en infecciones ocasionadas por *S. aureus*, toda vez, que en un estudio realizado por Jiménez (1994) sobre 1465 cepas bacterianas aisladas en pacientes ambulatorios que acudieron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala durante el periodo comprendido entre 1988-1994, se detectó que el 89.2% y el

78% de las 651 cepas de *S. aureus* aisladas en este periodo, fue resistente a penicilina y ampicilina, respectivamente.

Dicloxacilina

En este estudio reportamos que la CMI₅₀ y la CMI₉₀ de la dicloxacilina para las cepas de *S. aureus* estudiadas fue de 120 µg/ml y de 1000 µg/ml, respectivamente (figura 3). Estos resultados reflejan que la gran parte de las cepas de *S. aureus* estudiadas fue resistente a este antimicrobiano, debido, a que se ha reportado que la CMI promedio para *S. aureus* es de 1.15 µg/ml (González, S. N. & Saltigeral, S.P. 1990). Nuestros resultados también contrastan con los reportados por Chang y cols. (1995) en un estudio realizado en un Hospital de la Universidad de Taiwán, en donde la CMI de oxacilina para 46 cepas de *S. aureus* fue de 8 µg/ml. Por otra parte Jiménez (1996) en su estudio realizado sobre 651 cepas de *S. aureus* describe que la resistencia a dicloxacilina fue del 60.4%.

Cefalotina

En este estudio reportamos que la CMI₅₀ y CMI₉₀ de la cefalosporina de 1ª generación cefalotina para las cepas fue de 61.70 µg/ml y 760 µg/ml, respectivamente (figura 4). Nuestros Resultados muestran que si bien se requirieron de 760 µg/ml de antibiótico para inhibir al 90% de las

cepas de *S. aureus*, a la fecha no existe evidencia de que haya ocurrido un incremento de la resistencia a este agente, ya que, en el estudio realizado por Jiménez (1996) sobre 651 cepas de *S. aureus*, se detectó que la resistencia a cefalotina fue del 10%. En el estudio realizado por Monroy (1997) sobre 150 cepas de *S. aureus* de origen clínico describió que la resistencia para este antimicrobiano fue del 7%.

Cefuroxima

En este trabajo reportamos que la CMI₉₀ de la cefalosporina de 2ª generación cefuroxima para las cepas fue de 375 µg/ml (gráfica 5). Este valor refleja que este antimicrobiano continua siendo efectivo contra infecciones producidas por *S. aureus*. Nuestros datos corroboran a los encontrados por Obi. y col. (1996) en un estudio realizado en la Universidad de Lagos en Nigeria sobre 200 cepas clínicas de *S. aureus*. En este estudio estos autores encontraron que solamente el 2% de las cepas analizadas fue resistente a cefuroxima. En otro trabajo realizado en un Hospital de Paris sobre 210 cepas aisladas de infantes con otitis media, se describió que se necesitaron de muy bajas concentraciones para inhibir al 90% de las cepas analizadas (Simonet, M. et al., 1990).

Ceftriaxona

En este estudio reportamos que la cefalosporina de 3^a generación ceftriaxona fue el antibiótico más eficaz contra las cepas de *S. aureus*, debido a que se requirieron de muy bajas concentraciones para inhibir al 50% (CMI₅₀ = 11.10 µg/ml) y al 90% (CMI = 38.50 µg/ml) de las cepas (figura 6). Estos resultados ponen de manifiesto que éste antibiótico continúa siendo uno de los más eficaces para el tratamiento contra infecciones producidas por este organismo, siendo corroborado esto, por un estudio realizado en el departamento de farmacia de la Universidad de California sobre 22 pacientes con osteomeolitis estafilocócica, en donde se encontró que la totalidad de los pacientes tratados con este antimicrobiano, se curaron, no así, los tratados (9 pacientes) con otros agentes (Guglielmo, B.J. et al., 2000). Por otro lado Obi (1996) en su estudio realizado sobre 200 cepas de *S. aureus* en la Universidad de Lagos, Nigeria, reportó que únicamente el 4% de las cepas fue resistente a ceftriaxona.

Efecto del Inhibidor de β-lactamasas sulbactam sobre la CMI de ampicilina

En este estudio reportamos que el 85% de las cepas produjo β-lactamasas (gráfica 7) y que el inhibidor de β-lactamasas sulbactam redujo en 8.4 y 11 veces la CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina, respectivamente, (figura 8). Estos resultados son semejantes a los reportados en un estudio realizado

sobre 70 cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes procesos infecciosos, en donde se determinó la CMI de ampicilina y ampicilina + sulbactam (Paníagua, C.G.L. *et al.*, 1998). Estos autores reportaron que la adición del sulbactam a la ampicilina, disminuyó en 8 veces la CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina. Estos resultados muestran que el uso de inhibidores de β -lactamasas como, el sulbactam o el ácido clavulánico, en combinación con un β -lactámico, podrían ser de gran utilidad para el tratamiento de infecciones ocasionadas por microorganismos productores de β -lactamasas.

Por otro lado el 15% de las cepas que no produjeron β -lactamasas y de las cuales algunas de ellas presentaron resistencia a los antibióticos, nos hace suponer que probablemente el mecanismo de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos pueda ser debido a la alteración de las PBPs.

CONCLUSIONES

- 1.- La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas en este estudio fue resistente a la penicilina y ampicilina.
- 2.- El antibiótico dicloxacilina que es considerado de 1ª elección contra infecciones por *Staphylococcus aureus* mostró baja efectividad.
3. Las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, cefuroxima y ceftriaxona, respectivamente, continúan siendo los antibióticos más efectivos contra las infecciones ocasionadas por cepas de *Staphylococcus aureus*.
- 4.- El 85% de las cepas de *S. aureus* fue productor de β -lactamasas, lo que pone de manifiesto la elevada resistencia de las cepas a los principales grupos de antibióticos β -lactámicos.
- 5.- La combinación del inhibidor de β -lactamasas sulbactam + ampicilina mostró alta eficacia para inhibir al 90% de las cepas, lo que releja que su uso podría ser una alternativa para el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de β -lactamasas.

BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, E.P.; Chain, E.; Fletcher, C.M.; Florey, H.W.; Gardener, A.D.; Heatley, N.G. & Jennings, M.A. 1941. Further observations on penicillin. *Lancet* **2**: 177-188.
2. Aldridge K.E. 1995. Cefotaxime in the treatment of staphylococcal infections. Comparison of in vitro and in vivo studies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **22**: 195-201.
3. Amábile Cuevas, C.F. 1988. La resistencia bacteriana a los antibióticos. *Ciencia y Desarrollo.* Núm. **80**. CONACyT. año XIV:57-68
4. Bhakdi, S. & J. Tranum-Jensen, 1984. citado en Novick, R. 1993. *Staphylococcus*, p. 17-33. En: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch & R. Losick (eds.) *Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*, American Society for Microbiology, USA.
5. 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.
6. 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.
7. Chang S.C Hsieh W.C & Luh K.T. 1995. Influence of beta-lactamase inhibitors on the activity of oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **21**: 81-84.
 8. 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
 9. Danziger L. H & Pendland S.L. 1995. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *A m J Health syst pharm.* **52**:3-8.
 10. 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.
 11. Fitton, J.E.; A. Dell & W.V. Shaw, 1980. The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **115**:209-212.
 12. Foster, T.J.; M. O'Reilly, P. Phonimdaeng, J. Cooney, A.H. Patel & A.J. Bramley, 1990. Genetic studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Properties of S. aureus infection*, p. 403-420. En Novick, R.P. (ed.), *Molecular biology of Staphylococci*. VCH: Publishers, New York.

13. Georgopapadakou, N.H.; S A. Smith & D P. Bonner 1982 Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**:172-175.
14. González, S.N. & Saltigerla S.P. 1990. Guía de Antimicrobianos, Antivirales, Antiparasitarios y Antimicóticos. Ed. Interamericana, Méx. D.F. p.14-18.
15. Graves Woodward K. & Pratt R.F. 1998. Reaction of soluble penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* with beta-lactams and acyclic substrates: kinetics in homogeneous solution. *Biochem J.* **332**: 755-761.
16. Graves, Woodward K . & Pratt R.F. 1999. Interactions of soluble penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* with moenomycin. *Biochemistry.* **38**: 10533-10542.
17. Gguglielmo, B.J.; Luber, A.D.; Paletta, Jr. D. & Jacobs R.A. 2000. Ceftriaxone therapy for Staphylococcal osteomyelitis. *Clin. Infect. Dis.* **30**:205-207.
18. Hammond M.L & Norriss M.S. 1995. Antibiotic resistance among respiratory pathogens in preschool children. *Med J Aust.* **163**: 239-242.
19. Hartman, B.J. & A. Tomasz. 1984. Low-affinity penicillin binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **158**:513-516.

- 20 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.
- 21 Linberg, M.; K. Jonsson; H. Muller, H.; Jonsson; C. Signas; M. Hook; R. Raja; G. Raucchi & G.M. Anantharamaiah, 1990. Fibronectin-Binding proteins in *S. aureus*, p. 327-356. En: Novick, R.P. (ed.) Molecular biology of the Staphylococci. VCH: Publishers, New. York.
- 22 Monroy, P.E. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Tesis de Maestría, FES-Cuautitlán, UNAM.
23. Morgenroth; J. & Kaufmann, M. 1912. Z. Inmunitaetsforsch. 15:610 (citado en Mitsuhashi, S. 1971. Epidemiology of bacterial Drug resistance En: "Transferable Drug Resistance factor R", S. Mitsuhashi, ed. University Park Press. Baltimore).
24. Murray, R.; Kilham, L.; Wilcox, C. & Finland, M. 1964. Development of streptomycin resistance of Gram-negative bacilli in vitro and during treatment. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 63:470-474.
25. 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.

- 26.Obi, C.L.; Iyegbunwe, A.E.; Olukoya, D.K.; Babalola, C., Igumbor, E.O. & Okonta A.A. Antibigrams and plasmids of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from different clinical sources. 1996. Cent. Afr. J. Med. 42:258-261.
- 27.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.
- 28.O'Brien, T. F.; Ross, D. G.; Guzmán, M. A.; Medeiros, A. A.; Hedges, R. W. & D. Botstein. 1980. Dissemination of an antibiotic resistance plasmid in hospital patient flora. Antimicrob. Agents Chemother. 17:537-543.
- 29.Paniagua, C.G.L.; Monroy, P.F.; García G. Octavio & Vaca, P.S. 1998. Effect of beta-lactamase inhibitors on minimum inhibitory concentration of ampicillin and amoxicillin for *Staphylococcus aureus* strains. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 40:128-134.
- 30.Panililio, A.L.; Culver, D.H. & Garne, R.P.1992. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 13:582-86.
- 31.Pfaller, M & Herwaldt, L. 1988. Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci, Clin Microbiolo. Rev. 1;281-299.

32. Pfaller M. A.; Jones R.N. & Doern G.V. 1998b. Multicenter evaluation of the antimicrobial activity for six broad-spectrum beta-lactams in Venezuela using the Etest method. The Venezuela Antimicrobial Resistance Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **30**:45-52.
33. Richmond, M.H. 1965. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **94**:584-593.
34. Richmond, M.H. 1979. β -lactam antibiotics and β -lactamases: two sides of continuing story. *Rev. Infect. Dis.* **1**:30-36.
35. 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.
36. Rosedahl, V.T. 1993. Naturally occurring constitutive β -lactamase of novel serotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **77**:229-231.
37. Rowland, S.J. & K.G. Dyke. 1989. Characterization of the staphylococcal β -lactamase transposon Tn552. *EMBO J.* **8**:2761-2773.
38. Santos, F.L.; F.I. de Souza, F. & Pinto de Siquiera Jr. 1992. Antimicrobial drug-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazilian University Hospital. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **34**:171-173.
39. Sako, T.; S. Sawaki; T. Sakurai; S. Ito; Y. Yoshizawa & I. Kondo. 1983. Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.* **190**:227-277.

- 40 Schmitz, F.J., Verhoef, J. & Fluit, A.C. 1999. Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. SENTRY participants group. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**: 783-792.
41. Smith, R.M.; Parisi, J.T.; Vical, L. & Baldwin, J.N. 1977. Nature of the genetic determinant controlling encapsulation in *Staphylococcus aureus*. *Smith. Infect. Immunol.* **17**:231-234.
42. Sidorenko, S.V.; Rezvan, S.P.; Grudinina, S.A.; Krotova, L.A. & Sterkhova, G.V. 1998. Multicenter study of staphylococcus susceptibility to antibiotics in Moscow and St. Petersburg. *Antibiot. Khimioter.* **43**: 15-25.
43. Simonet, M.; Hermann, J.L. & Veron, M. 1990. Activity of cefuroxime against bacterial strains isolated from acute otitis media. *Pathol. Biol.* **38**:355-357.
44. Sykes, R.B. & Mathew, M. 1976. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**:115-157.
45. Takenouchi, T.; Utsui, Y.; Ohya, S. & Nishino, T. 1994. Role of β -lactamase of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in resistance to first-generation oral cephalosporins both in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 909-920.

46. Urassa, W.K.; Haule, E.A.; Kagoma, C. & Langeland, N. 1999. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains at Muhimbili Medical Centre, Tanzania. *East Afr Med J.* **76**: 693-695.
47. Vaca, S.; R. Miranda & C. Cervantes. 1995. Inorganic-ion resistance by bacteria isolated from a Mexico City freeway. *Antonie van Leeuwenhoek.* **67**:333-337.
48. Wadstrom, T.; J. Erdei & M. Paulsson & A.S. Naidu. 1990. Binding of collagen and vitronectin to *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (CNS), p. 357-371. En: Novick, R.P. (ed.) *Molecular biology of the Staphylococci*. VCH: Publishers, New York.
49. Wiley, B.B. & M. Rogolsky, 1977. Molecular and serological differentiation of staphylococcal exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control. *Infect. Immun.* **18**:487-494.