



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y METALES PESADOS EN UN GRUPO DE CEPAS CLINICAS

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA PRESENTA: MARIA EUGENIA RAMIREZ CANTU

294267

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ERIC MONROY PEREZ

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX. MAYO 18, 2001



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.

## DEDICATORIAS

DIOS MIO: Gracias por darme salud, para lograr esta dicha con mis seres más queridos. Todo lo puedo en cristo que me fortalece.

A MIS PADRES: por creer en mi y nunca dudar de mi capacidad para lograr mis objetivos. Esta licenciatura creo que es uno de los regalos más grandes que les puedo dar. Gracias por no perder la fe y apoyarme en mis momentos más difíciles muchas, muchas. Muchísimas gracias. Los amo.  
Mis viejitos.

LUIS C. Y CESARIN Z.: En mis momentos buenos y malos han traido siempre alegría y cariño a mi vida. Ustedes ocupan un lugar muy especial en mi corazón.

Gracias mis dos grandes amores.

MAGDALENA PERCHES  
TREVINO: Tu confianza es un incentivo para seguir adelante gracias por creer en mi.

IRMA CHACON: Gracias por darme su amistad, sus palabras fueron siempre para fomentar mis ideales.

Gracias a ustedes aprendí a ver la vida con paciencia y alegría y que todo llega en su momento.

## AGRADECIMIENTOS

Con admiración y respeto a mis profesores:

A mi director de tesis M en C. Eric Monroy Pérez, por su gran apoyo de compartir sus conocimientos en la elaboración de esta tesis.

A mi asesora de tesis M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras, por su amistad y enseñarme el valor de la responsabilidad y el cumplimiento de cada uno de mis objetivos a tiempo.

A la M en C. Guadalupe Oliva por su interés en este trabajo al permitir el avance de esta tesis.

A la Biol.. Susana Almazán, por su amistad y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Vaca, por su apoyo para la realización de esta tesis.

Gracias a todos por su valiosa contribución a mi formación profesional.

# INDICE

## RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
Características de <i>S. aureus</i>	2
Síndromes Clínicos	3
Resistencia a antibióticos	3
Mecanismos de acción y de resistencia bacteriana	4
Resistencia a antibióticos y metales pesados	6
Interacción de las bacterias con los metales pesados	8
Mecanismo de resistencia a metales pesados	9
JUSTIFICACION	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y METODOS	21
Resistencia a antibióticos	21
Determinación de la CMI a metales pesados	23
RESULTADOS	27
Resistencia a antibióticos	27
Resistencia a metales pesados	29
DISCUSION	37
Resistencia a antibióticos	37
Resistencia a metales pesados	39
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45

## RESUMEN

El uso indiscriminado de los antibióticos ha seleccionado bacterias resistentes tanto a antibióticos como a metales pesados. Debido a que se desconoce el mecanismo de resistencia a plomo, el objetivo de éste trabajo fue encontrar cepas clínicas resistentes y sensibles a plomo. Se utilizaron 80 cepas de *Staphylococcus aureus* donadas por el cepario de el Laboratorio Clínico de la CUSI-Iztacala. La resistencia a antibióticos se realizó por el método de Bauer-Kirby. La Concentración Mínima Inhibitoria a metales pesados se realizó por el método de dilución en placa. Los porcentajes de resistencia a antibióticos fueron: 78% penicilina, 74% ampicilina, 48% dicloxacilina, 41% eritromicina, 31% tetraciclina, 21.25% trimetoprim con sulfametoxazol, 19% cefuroxima, 15% cefotaxima y gentamicina, 12.5% ceftazidima, 11.25% cefalotina y 5% pefloxacina. El 100% de las cepas analizadas fue resistente a plomo (CMI = 1600-3200  $\mu\text{g/ml}$ ) y a mercurio (CMI = 20-40  $\mu\text{g/ml}$ ). El 100% fue sensible a cromato (CMI = 187-750  $\mu\text{g/ml}$ ). El 42.6% de las cepas fue sensible a zinc (CMI = 85-340  $\mu\text{g/ml}$ ) y el 55% resistente (CMI = 670-2720  $\mu\text{g/ml}$ ). La distribución de la CMI a arsenito fue bimodal, sensible (57.5%, CMI = 100-400  $\text{mg/ml}$ ) y resistente (35%, CMI = 800-3200  $\mu\text{g/ml}$ ). El 18.75% de las cepas de *S. aureus* fue moderadamente resistente a plata (CMI = 10-15  $\mu\text{g/ml}$ ) y el 81.25% resistente (CMI = 20-30  $\mu\text{g/ml}$ ).

En este trabajo no se encontraron bacterias sensibles a plomo, por lo que es recomendable trabajar con un mayor número de cepas de *S. aureus*, con el propósito de encontrar este grupo y tratar de esclarecer si el mecanismo de la resistencia se encuentra codificado por plásmidos o por el cromosoma bacteriano.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias forman parte de uno de los grupos de organismos más abundantes e importantes de la naturaleza, debido a la gran diversidad de géneros y a la capacidad de descomponer diferentes sustratos naturales (Alexander, 1993).

Las bacterias pueden clasificarse de acuerdo a la capacidad de crecimiento en presencia o ausencia de oxígeno, característica bioquímica que ha llevado a distinguir tres categorías distintas: aerobias, anaerobias, y anaerobias facultativas (Burgues, 1971).

Algunos géneros de bacterias tienen la capacidad de participar en algunos de los ciclos biogeoquímicos, haciendo posible que los elementos esenciales para otros tipos de organismos, como el oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, hidrógeno y carbono, se encuentren disponibles (Christon, 1991).

Por otra parte existen otros géneros de bacterias de suma importancia para los humanos, debido a que estas pueden ocasionar diferentes enfermedades en el organismo, que pueden ser desde una simple infección hasta enfermedades graves que pueden ocasionar la muerte. (Perea, 1992).

Entre las bacterias con mayor versatilidad para ocasionar infecciones en los humanos encontramos a *Staphylococcus aureus*.

## Morfología y características generales de *Staphylococcus aureus*.

Los *Staphylococcus aureus* pertenecen a la familia Micrococcaceae, son cocos Gram positivos, son esféricos y miden de 0.5-1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, son inmóviles, se pueden encontrar en cocos aislados, en pares, en tétradas, en cadenas o en racimo de uvas, no forman esporas, son aerobios facultativos. Producen durante su crecimiento catalasas, coagulasas y toxinas como: la leucocidina, toxina exfoliativa y la toxina del síndrome de choque tóxico, lo que le da su carácter patogénico. Son 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.

El *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. 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, 1993).



## Síndromes Clínicos

*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, *et al.* 1941) y a estreptomicina (Murray, *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, *et al.* 1992).

## Mecanismos de acción de los antimicrobianos y mecanismos de resistencia bacteriana.

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,1980).

Los mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por plásmidos se agrupan en 4 categorías (Amábile, 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.

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

ANTIBIÓTICOS	MECANISMOS DE ACCIÓN	BLANCO DE ACCIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA	BASE GENÉTICA
<p><math>\beta</math>-lactámicos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Penicilinas</li> <li>• Cefalosporinas</li> </ul>	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Proteínas de unión de la penicilina (PBPs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrólisis del anillo <math>\beta</math>-lactámico (<math>\beta</math>-lactamasas)</li> <li>• Alteración del blanco (PBPs).</li> </ul>	Plásmido y cromosoma
Macrólidos y lincosamidas	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metilación del material ribosomal 23s (metilasa)</li> <li>• Hidrólisis de la lactona de eritromicina (eritromicin-esterasa)</li> </ul>	Plásmido y cromosoma
Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	Modificación del antibiótico evitando su unión al ribosoma (cloranfenicol acetil transferasa )	Plásmido
<p>Aminoglucósidos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• estreptomina,</li> <li>• neomicina</li> <li>• kanamicina,</li> <li>• gentamicina.</li> </ul>	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modificación del antibiótico impidiendo su transporte (acetil transferasa, fosfatidil transferasa, adenil transferasa metilasa)</li> <li>• Modificación de la subunidad 50s del ribosoma</li> <li>• Disminución de la captación por la célula</li> </ul>	Plásmido y cromosoma  Plásmido  Cromosoma
Quinolonas y ácido nalidixico	Inhibición de la Replicación, Transcripción, Recombinación, y Superenrollamiento del ADN	ADN girasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutación sobre ADN girasa (ADN girasa )</li> <li>• Disminución de la permeabilidad</li> <li>• Eflujo</li> </ul>	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

Amabile, 1988.

## Resistencia a antibióticos y metales pesados

Como ya mencionamos, el empleo de los antibióticos puede seleccionar bacterias resistentes a estos agentes (Kuperstoch-Portnoy,1981), siendo frecuente que esta resistencia se encuentre conferida por plásmidos (Watanabe, 1963; Elwell, *et al.* 1978; Davies, 1978; O'Brien, 1980).

De igual manera que se han registrado bacterias resistentes a los antibióticos, se han descrito bacterias resistentes a uno o más metales pesados (Nakahara, *et al.* 1977a; Cenci, *et al.* 1982; Silver, 1983; ).

La resistencia a metales pesados en varios de los casos puede ser conferida por plásmidos o por transposones (Silver,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,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, *et al.* 1992).

Se han mencionado 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>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina	Mercurio	Moore, 1960
	Penicilina Macrólidos	Arsénico Bismuto Cadmio Zinc Mercurio	Novick, <i>et al.</i> 1968
	Penicilina SXT Estreptomicina Kanamicina	Mercurio Cadmio Arsénico	Nakahara, <i>et al.</i> 1977a
	Macrólidos	Cadmio	Nakahima, 1990
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Estreptomicina Tetraciclina Kanamicina Gentamicina	Mercurio Cadmio Arsénico	Nakahara, <i>et al.</i> 1977b
<i>Escherichia coli</i>	Estreptomicina Tetraciclina Cloranfenicol Kanamicina Gentamicina	Cadmio Arsénico Mercurio	Nakahara, <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,1983; Cervantes, 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: $Hg^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Ag^+$ , $Pb^{2+}$ , $BiO^+$ , $SbO^+$ $AsO_2^-$ , $AsO_4^{3-}$ , $CrO_4^{2-}$ , $Cr_2O_7^{2-}$ , $TeO_3^{2-}$

(Silver,1983; Cervantes, 1994)

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 interaccionan con los grupos sulfhidrido 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, 1983; Cervantes, *et al.* 1986; Chen, *et al.* 1986).

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, 1983; Ohtake, *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, 1981; Silver, *et al.* 1984; Summers, 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, & Walderhaugh, 1992; Cervantes, & Gutiérrez-Corona 1994).

## Arsénico

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

El operón *ars* (del plásmido R773) fue clonado y secuenciado por (Chen, *et al.* 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, *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. La tercera proteína ArsC es una proteína necesaria para la resistencia a arseniato pero no a arsenito o antimonio (Chen, *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, *et al.* 1990).

En resumen, los iones tóxicos son captados inicialmente por los sistemas fisiológicos de transporte de la célula (figura 1); 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.

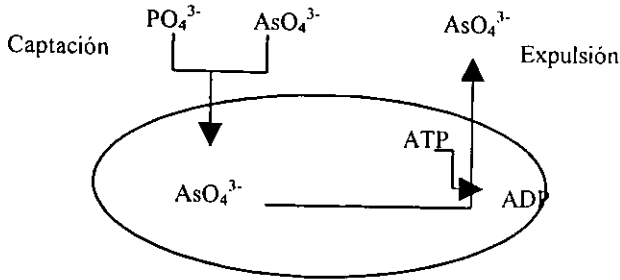


Figura 1. Mecanismo de captación de los iones tóxicos arseniato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) por la vía fisiológica de transporte de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

### Cobalto Níquel y Zinc

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

### 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, & Cooksey, 1987; Venitt, & Levy, 1974) y *E. coli* (Rouch, *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, & 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, *et al.* 1989) (fig. 2). Probablemente en los tres

procesos intervienen productos génicos codificados tanto por plásmidos como por el cromosoma (Cervantes, 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, *et al.*1987) y excreción de ácidos orgánicos u otros agentes quelantes (Harwood-Sears, & Gordon, 1990)

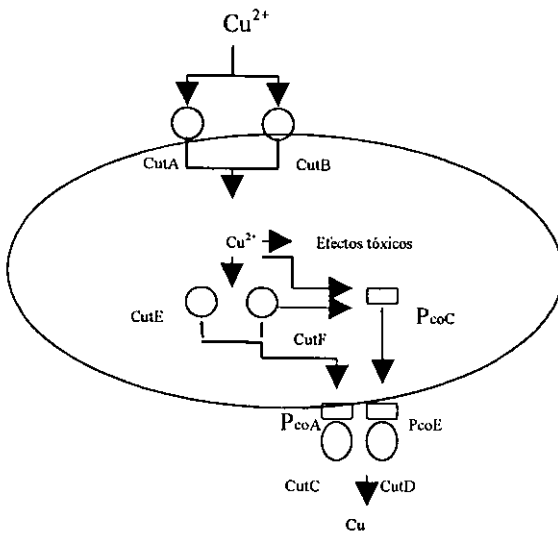


Figura 2. Cooperación de los productos génicos cromosómicos (Cut) y plasmídicos (Pco) en el mecanismo de resistencia a cobre en *Escherichia coli*.

## 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, *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, & Silver 1987; Cervantes, & Ohtake, 1988). Recientemente se han secuenciado dos determinantes de resistencia a cromato a partir de plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes, *et al.* 1990) y *A. eutrophus* (Nies, & Silver, 1990). El análisis de estas secuencias reveló una homología entre los polipéptidos hidrofóbicos, designados ChrA, codificados por ambos determinantes. 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, *et al.*, 1990)(figura 1).

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, & Ehrlich, 1988) (figura 3).

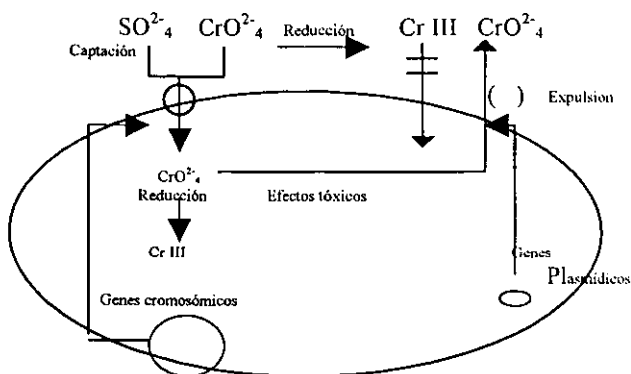


Figura 3. El cromo hexavalente penetra a las bacterias por el sistema de transporte del sulfato y puede ser reducido a cromo trivalente en el citoplasma o en el exterior de las células (genes cromosómicos). Las bacterias resistentes expulsan el cromo hexavalente mediante productos génicos codificados por plásmidos.

### Mercurio

Se ha descrito que la resistencia a mercurio se debe a una reducción de la forma inorgánica ( $\text{Hg}^{2+}$ ) a la forma metálica volátil ( $\text{Hg}^0$ ), constituyendo, de esta manera, una eficiente forma de destoxificación (Summers, & Silver 1978) (figura 4). 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, *et al.* 1986; Misra, *et al.* 1984) y el plásmido pDU1358 de *Serratia marcescens* (Griffin, *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 haya *merC*, cuyo papel en el transporte de mercurio no ha sido definido (Kusano, *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, & 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, *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, & Misra. 1988) (figura 4).

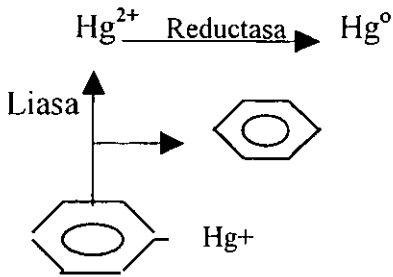


Figura 4. Destoxificación de mercurio y organomercuriales. La reductasa plasmídica transforma el ión mercúrico en la forma volátil menos tóxica ( $\text{Hg}^0$ ). Algunos también codifican una liasa que actúa sobre los organometales. (Silver, & Misra. 1988)

### Plata

El amplio uso de los derivados de plata en la industria y hospitales (como antimicrobianos en pacientes con quemaduras) ha seleccionado bacterias resistentes a éste metal. Se ha reportado que tanto las bacterias sensibles como las resistentes son capaces de reducir la plata iónica ( $\text{Ag}^+$ ) a la forma metálica, por lo que la reducción se ha eliminado como el mecanismo de resistencia. (Siver, 1996). Recientemente se ha descrito que el mecanismo de resistencia a plata se basa en el eflujo intracelular del ión hacia el exterior probablemente codificado por genes de el cromosoma bacteriano (Xian-Zhi, 1997)

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 *et al.* 1977a) en donde la distribución de la CMI (concentración mínima inhibitoria) de plomo en una población de cepas clínicas de *S. aureus* fue bimodal, distinguiéndose así, dos subpoblaciones (sensible, CMI = 3.1-6.2  $\mu\text{g/ml}$  y resistente CMI = 1600-3200  $\mu\text{g/ml}$ ). En contraste, Monroy (1997) encontró una distribución bimodal para una población de cepas de *S. aureus* (moderadamente resistente, CMI = 100-200  $\mu\text{g/ml}$  y resistente, CMI = 800-3200  $\mu\text{g/ml}$ ). Nakahara, *et al.* (1977b) obtuvieron una distribución de un solo pico para plomo (1600-3200  $\mu\text{g/ml}$ ) en colecciones de cepas Gram negativas.



## JUSTIFICACIÓN

Debido a que no se conoce el mecanismo de resistencia a plomo, la finalidad de este trabajo es encontrar cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles a plomo, considerando que podrían ayudar en la destoxificación de ecosistemas contaminados por este metal. Por otra parte es importante medir la resistencia a otros metales como plata, zinc en un sondeo 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
- Cuantificar la resistencia a plomo, cromato, zinc, mercurio, arsénico y plata por el método de dilución en placa.

## MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 80 cepas de *Staphylococcus aureus* donadas por el cepario de el laboratorio clínico.

### Resistencia a antibióticos

Para probar la sensibilidad y/o resistencia de cada cepa se utilizó la técnica de Bauer-Kirby (Bauer, *et al.* 1966), 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 preparo mezclando 5 ml de BaCl<sub>2</sub> 0.048 M (1.175% peso/volumen de BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) con 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 10<sup>8</sup> microorganismos/ml. Posteriormente se procedió a inocular sobre el agar de Mueller-Hinton por medio de hisopos 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

sensidisco con los 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 QUE SE UTILIZARAN CONTRA LAS CEPAS DE *S. aureus*

ANTIBIOTICOS	ABREVIATURAS	FAMILIA	ACCION <sup>a</sup>	DIAM. HALO DE INH. (mm) <sup>b</sup>		
				R	I	S
Ampicilina	AMP	Aminopenicilina	1	= 28		= 29
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1 <sup>a</sup> generación	1	= 14	15-17	= 18
Cefotaxima	CTX	Cefalosporina de 3 <sup>a</sup> generación	1	= 14	15-22	= 23
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina de 3 <sup>a</sup> generación	1	= 14	15-17	= 18
Cefuroxima	CXM	Cefalosporina de 2 <sup>a</sup> 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

<sup>a</sup> 1 Inhibición de la formación de la pared celular. 3 Interferencia en la síntesis de proteínas.

4 Inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos

<sup>b</sup> R = Resistente, I = Intermedia y S = Sensible

Tomada de Giono, 1983.

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a metales pesados

La determinación de la CMI a los metales pesados se realizará por el método de dilución en placa en agar nutritivo (Cervantes-Vega, *et al.* 1986), cada cepa se creará en caldo nutritivo (agitación por 16 horas a 37°C).

Posteriormente cada cultivo se diluyó (1:3) en los pozos del replicador, para después realizar 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 ( $Pb(CH_3COO)_2$ ), cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ), Cloruro de Zinc ( $ZnCl_2$ ), Nitrato de plata ( $AgNO_3$ ), cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) y arsenito de sodio ( $NaAsO_2$ ).

**Tabla 5. Concentraciones de los metales utilizados**

<b>PLOMO</b>	<b>AGAR</b>	<b>stock A</b>	<b>stock B</b>	<b>stock C</b>
µg/ml	µg/50 ml	80 mg/ml	(A= 1/10)	(B = 1/100)
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		0.06250 ml	
50	2500		0.03125 ml	
25	1250		0.01562 ml	
12.5000	625			0.007812 ml
6.2500	312.5000			0.003906 ml
3.1250	156.2500			0.001953 ml
1.5625	78.2500			0.000977 ml
		<b>stock A</b>		
<b>PLATA</b>		1.25 mg/ml		
50	2500	2 ml		
45	2250	1.8 ml		
40	2000	1.6 ml		
35	1750	1.4 ml		
30	1500	1.2 ml		
25	1250	1.0 ml		
20	1000	0.8 ml		
15	750	0.6 ml		
10	500	0.4 ml		
5	250	0.2 ml		
2.5	125	0.1 ml		
		<b>stock A</b>	<b>Stock B</b>	
<b>ARSENITO</b>		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		0.06250 ml	
50	2500		0.03125 ml	
25	1250		0.01562 ml	

		Stock A		
ZINC		34 mg/ml		
680	68000	2 ml		
340	34000	1 ml		
170	17000	0.500		
85	85000	0.250		
42.5	42500	0.125		
21.25	21250	0.062		
10.62	10620	0.031		
5.31	5310	0.015		
		Stock A		
CROMATO		75 mg/ml		
3000	150000	2 ml		
1500	75000	1 ml		
750	37500	0.5000 ml		
376	18750	0.2500 ml		
187.5000	9375	0.1250 ml		
93.5000	4687.5000	0.0625 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		0.06250 ml	
5	250		0.03125 ml	
2.5000	125		0.01562 ml	
1.2500	62.5000		0.00781 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.* 1977<sup>a</sup>), 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
Zinc	5.31-170	171-680
Plata	0-10	20-50
Arsenito	25-200	1600-3200

Nakahara,1977<sup>2</sup>; Xian-zhi,1997.



## RESULTADOS

### Origen de las cepas.

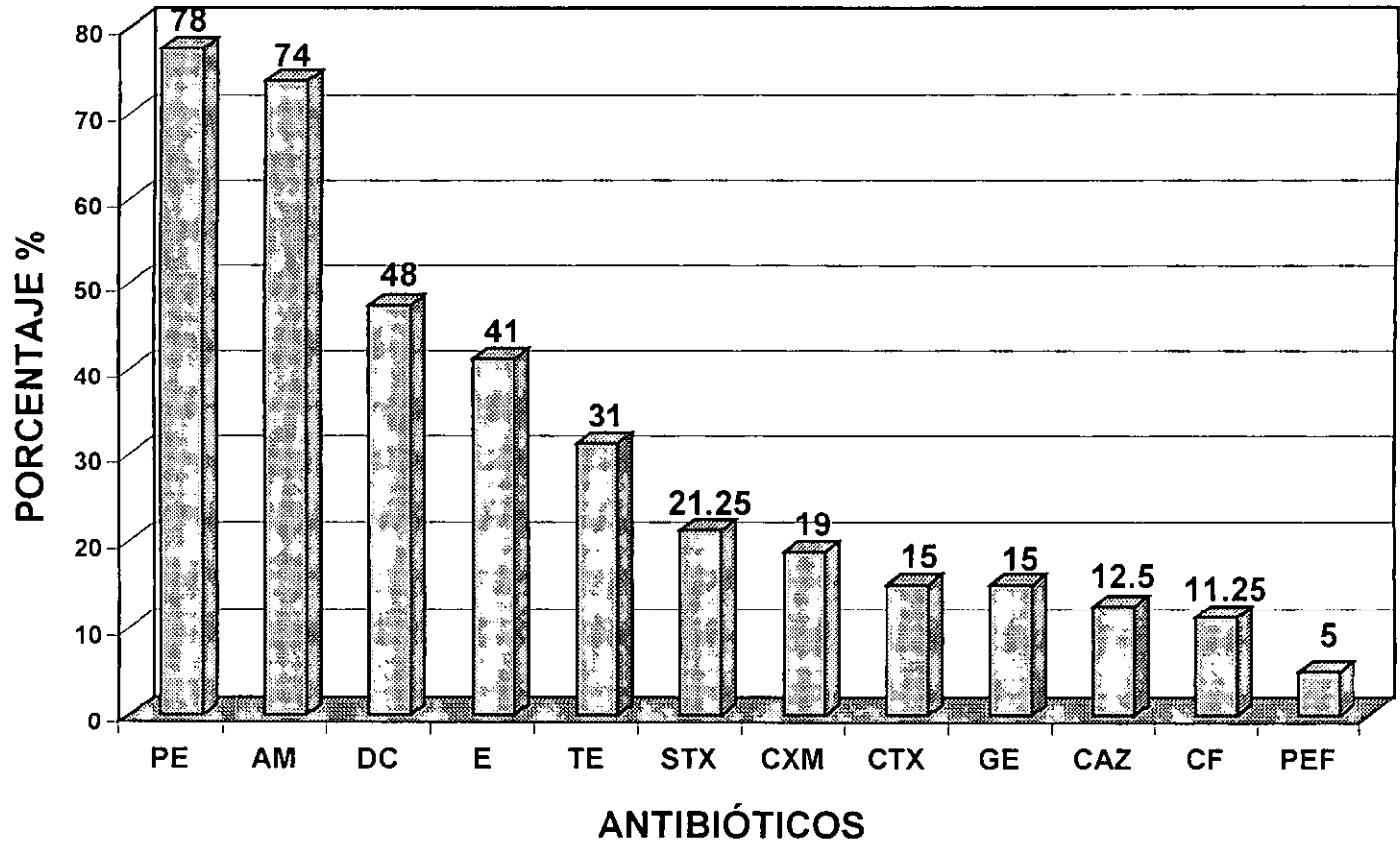
Para el desarrollo de este trabajo se analizaron un total de 80 cepas de *Staphylococcus aureus* que fueron donadas por el cepario del laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala

### Resistencia a antibióticos

El 78% de las cepas fue resistente a Penicilina (Pe) y el 74% a ampicilina (Am) (figura 1). Alrededor del 48% mostró resistencia frente a la penicilina semisintética dicloxacilina (Dc) y el 41% al macrólido eritromicina (E). Aproximadamente el 31% fue resistente a tetraciclina (Te) y el 21.25% al Trimetoprim con sulfametoxazol (Sxt). El 19% mostró resistencia a la cefalosporina cefuroxima (Cxm, 2ª generación) y el 15% a Cefotaxima (Ctx, 3ª generación) y gentamicina (Ge), respectivamente.

Los porcentajes más bajos de resistencia fueron para la cefalosporina de 3ª generación ceftazimida (Caz) con un 12.5%, para la cefalotina (Cf, 1ª generación) con un 11.25% y finalmente un 5% de las cepas mostró resistencia a la quinolona pefloxacina (Pef).

**FIGURA 1**  
**RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE**  
*Staphylococcus aureus*



## Resistencia a metales pesados por cepas de *Staphylococcus aureus*.

### PLOMO

En la Figura 2 se observa que la distribución de la CMI a plomo del total de las cepas analizadas se encontró en el intervalo de resistencia de 1600-3200  $\mu\text{g/ml}$ .

### CROMATO

La CMI del 100% de las cepas a cromato, se distribuyó en el pico de sensibilidad de 187-750  $\mu\text{g/ml}$  (figura 3)

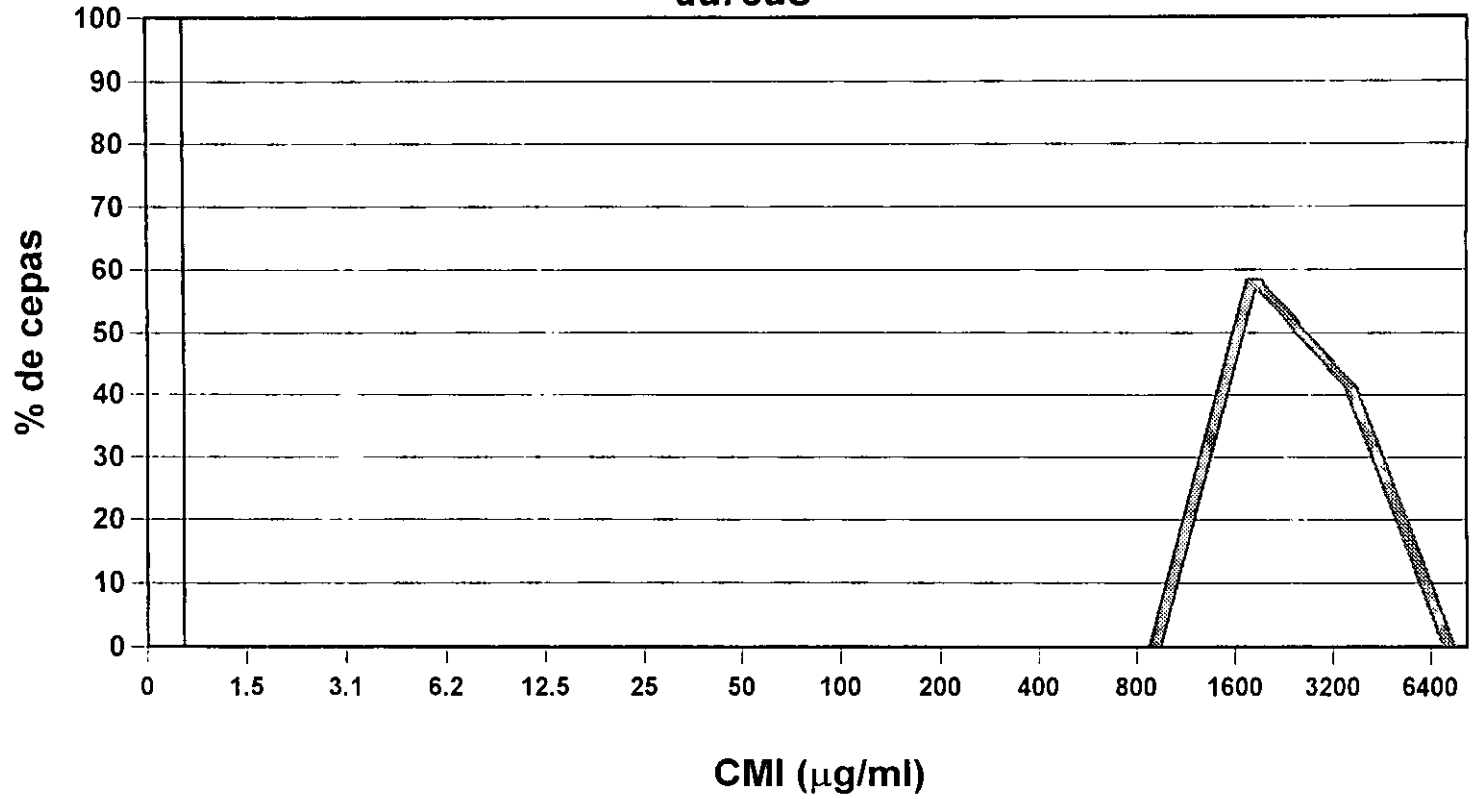
### ZINC

En la figura 4 se aprecia que la distribución de la CMI a Zinc fue bimodal, siendo el 42.6% de las cepas sensibles en el intervalo de 85-340  $\mu\text{g/ml}$  y el 55% resistente en el rango de 670-2720  $\mu\text{g-ml}$ .

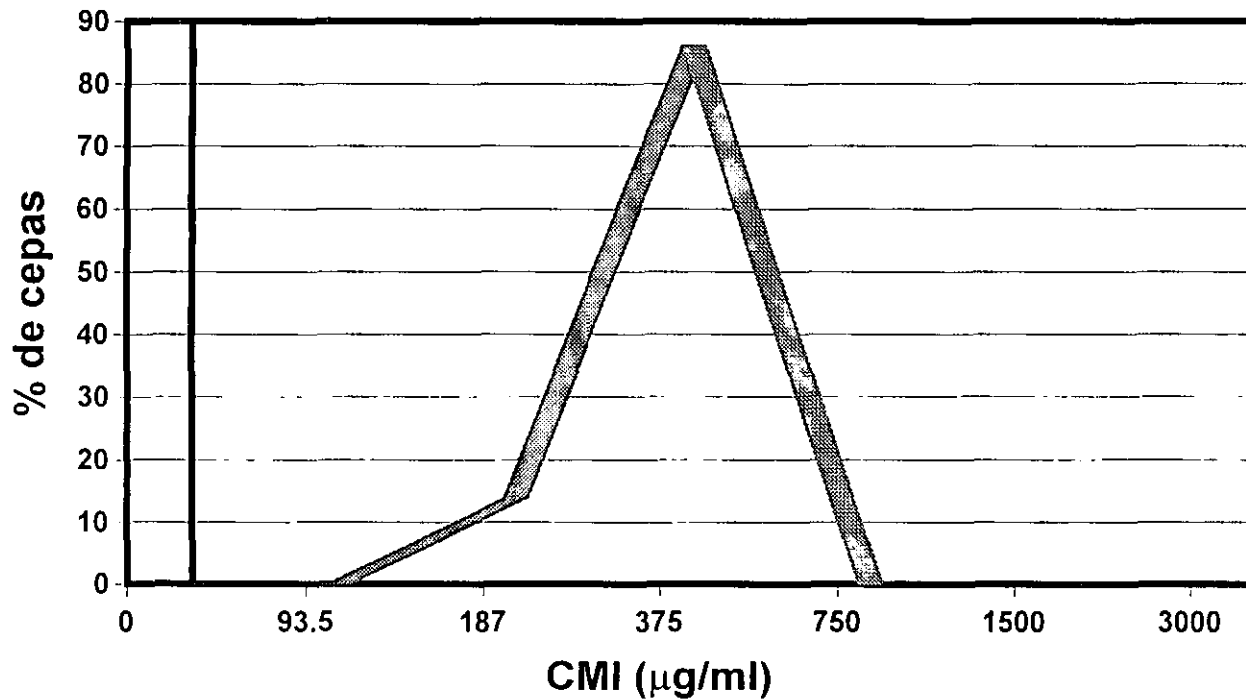
### MERCURIO

En las Figura 5 se observa que la CMI de el 100% de las cepas se encontró en el intervalo de resistencia de 20-40  $\mu\text{g/ml}$ .

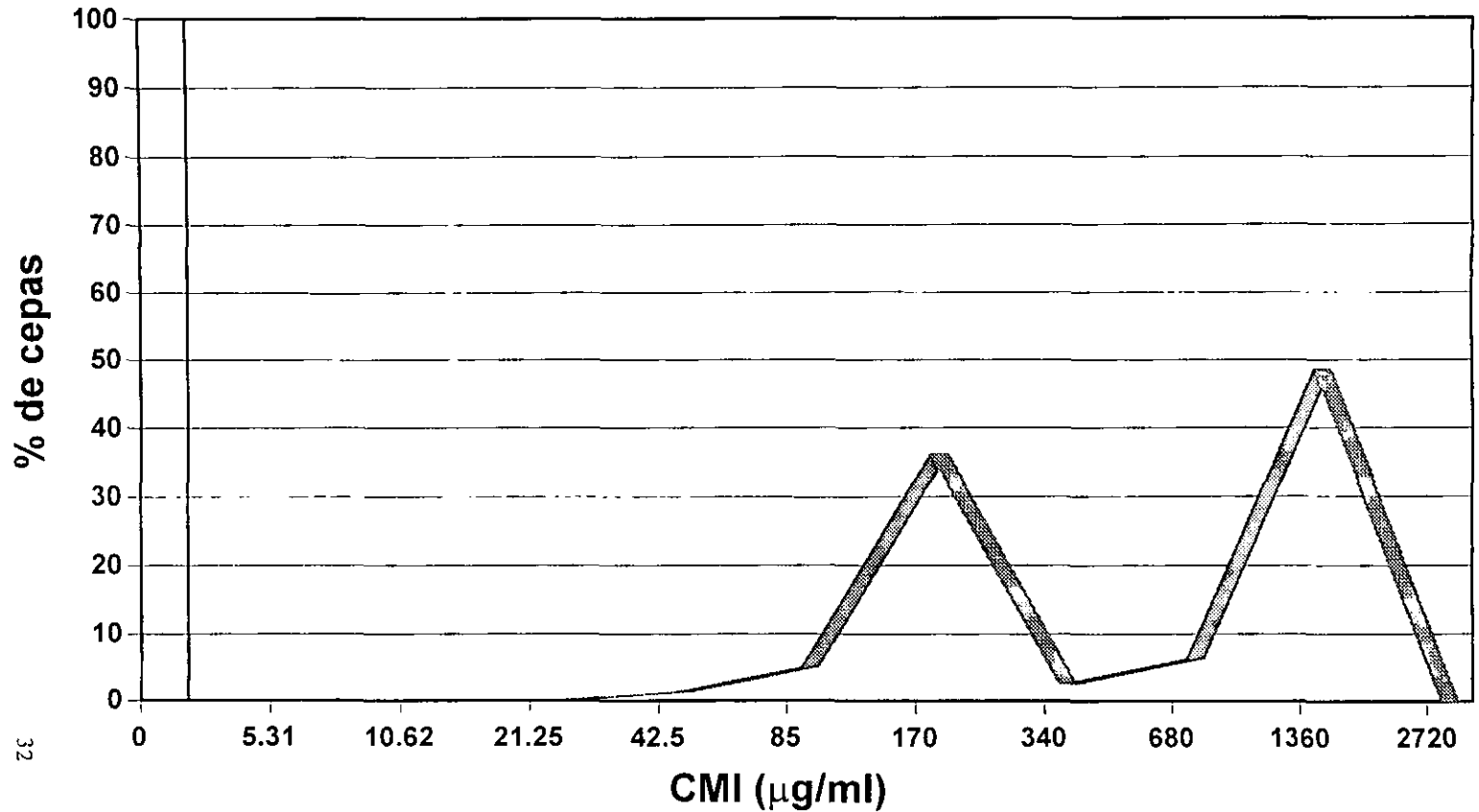
**FIGURA 2**  
**DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA**  
**INHIBITORIA A PLOMO EN CEPAS DE *Staphylococcus***  
***aureus***



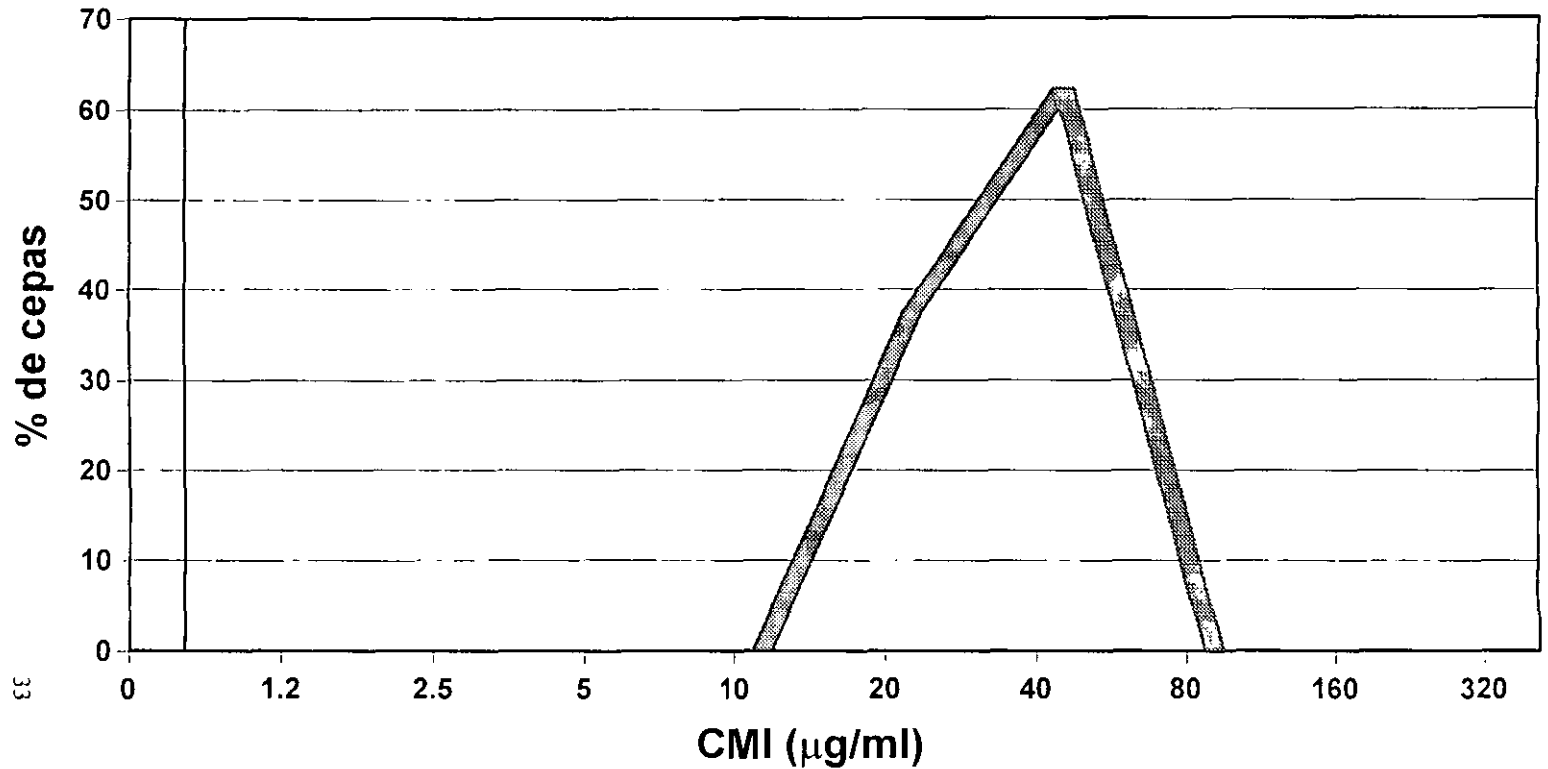
**FIGURA 3**  
**DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA**  
**INHIBITORIA A CROMO EN CEPAS DE *Staphylococcus***  
***aureus***



**FIGURA 4**  
**DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA**  
**INHIBITORIA A ZINC EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus***



**FIGURA 5**  
**DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA**  
**INHIBITORIA A MERCURIO EN CEPAS DE *Staphylococcus***  
***aureus***



## ARSENITO

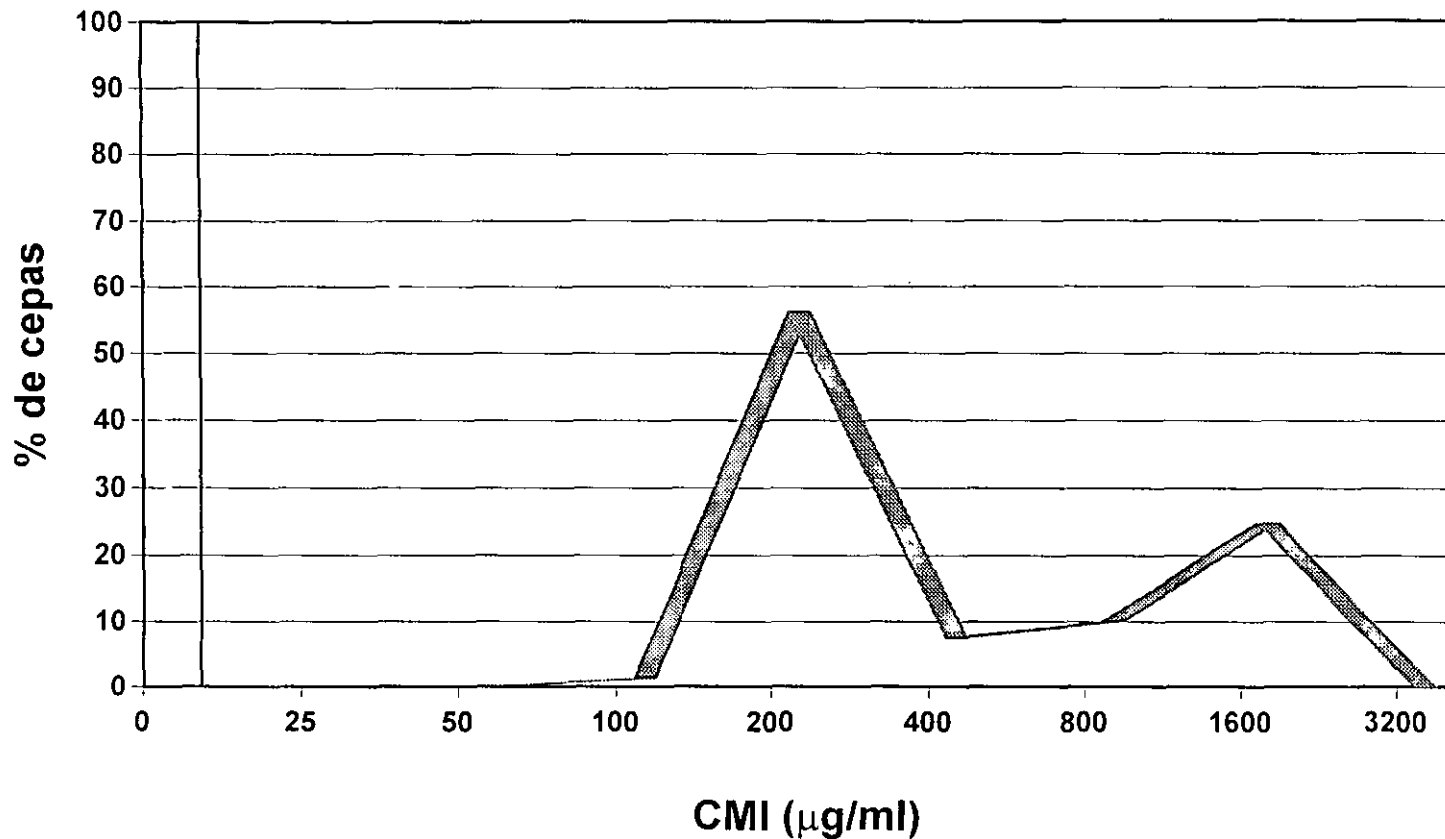
La distribución de la CMI a arsenito por parte de las cepas de *S.aureus* fue bimodal (figura 6), siendo el 57.5% de las cepas sensibles en el intervalo de 100-400  $\mu\text{g/ml}$  y el 35% resistentes en el rango de 800-3200  $\mu\text{g/ml}$ .

## PLATA

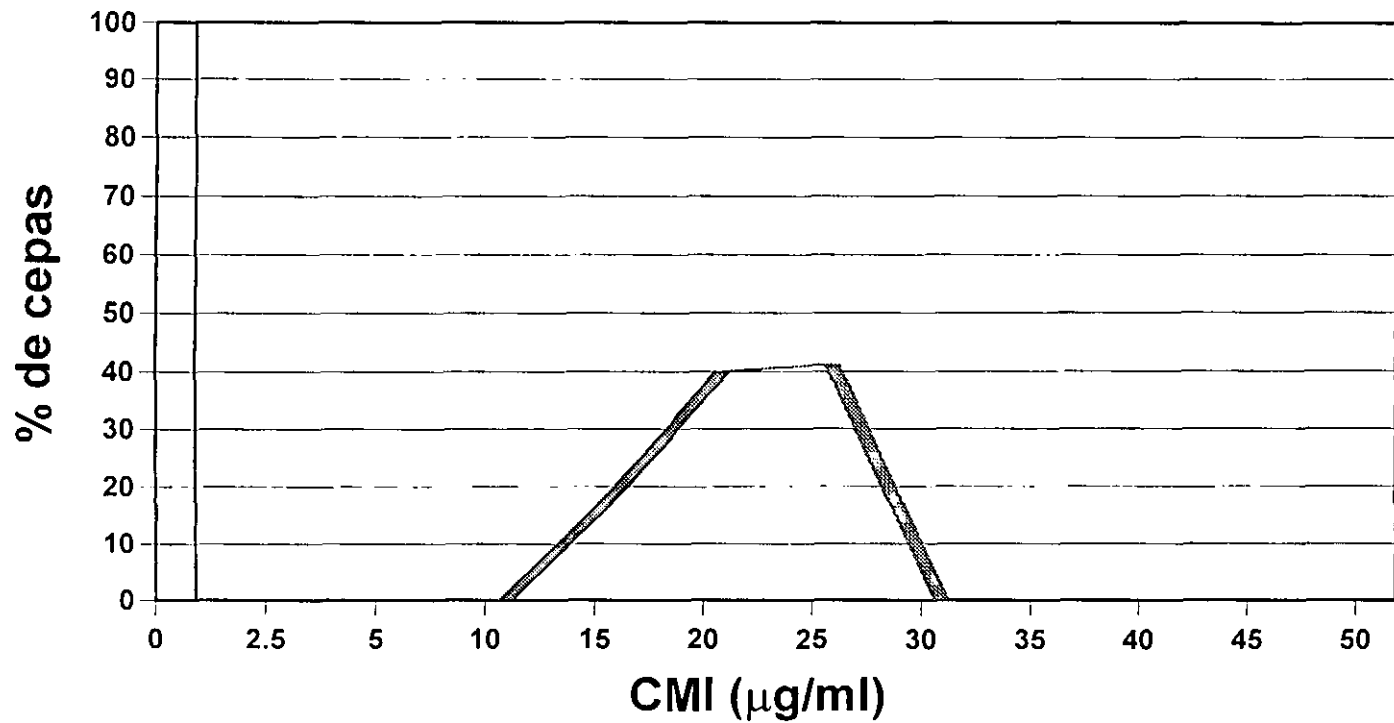
En la Figura 7 puede apreciarse que el 18.75% de las cepas de *S. aureus* fue moderadamente resistente a plata en el rango de 10-15  $\mu\text{g/ml}$  y el 81.25% resistente en el intervalo de 20-30  $\mu\text{g/ml}$ .



**FIGURA 6**  
**DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA**  
**INHIBITORIA A ARSENITO EN CEPAS DE *Staphylococcus***  
***aureus***



**FIGURA 7**  
**DISTRIBUCION DE LA CONCENTRACION MINIMA**  
**INHIBITORIA A PLATA EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus***



## DISCUSIÓN

### Resistencia a antibióticos.

El 78% y 74% de las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas en este trabajo fueron resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos penicilina y ampicilina, respectivamente (figura 1). Estos porcentajes tan elevados de resistencia puede deberse al hecho de que estos agentes 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 seleccionado resistente, debido probablemente a la producción de  $\beta$ -lactamasas.

Nuestros porcentajes de resistencia a antibióticos obtenidos en este trabajo parecidos a los reportados por Santos *et al.* (1992) en un estudio realizado sobre 64 cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de secreción de piel, heridas quirúrgicas y manos del personal en un hospital de la Universidad Federal de Paraíba, Brasil. 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 si no también para gentamicina. Para este último antibiótico las cepas de *S. aureus* donadas por el laboratorio de análisis clinicos, mostraron un porcentaje de resistencia de 15%, en tanto que en las cepas brasileñas su valor fue de 17.2%. Para eritromicina y tetraciclina se encontraron porcentajes diferentes, siendo de 41.25% y 31.25% para nuestras cepas, un 40.6% y 62.5% para las de Brasil. Otra diferencia entre los *S. aureus* de nosotros y los brasileños se observó en la resistencia a trimetoprim con sulfametoxazol, siendo el 21.25% para nuestras cepas y 18.8% para las brasileñas.

Por otra parte el 12.5% y 15% de las cepas de *S. aureus* analizadas mostró resistencia frente a las cefalosporinas de 3ª generación ceftazidima y cefotaxima, respectivamente. El 19% a cefuroxima (2ª generación) y 11.25% a la cefalosporina de 1ª generación cefalotina (gráfica 1). Estas diferencias de porcentajes de resistencia entre la penicilina y ampicilina con relación a las cefalosporinas, pone de manifiesto el incremento de la selección de bacterias resistentes a estos antibióticos de de 1ª elección, por lo que es muy conveniente el uso de otros grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por ejemplo las cefalosporinas, para el tratamiento de infecciones ocasionadas por este tipo de microorganismo. De esta manera nuestros datos demuestran nuevamente

que ya no es posible considerar, a priori, antibiótico alguno como de “primera elección”.

### Resistencia a metales pesados.

En este trabajo reportamos que la distribución de la CMI a plomo por las cepas de *S. aureus* mostró una distribución de un solo pico (figura 2), considerando resistente al 100% de las cepas situadas en el intervalo de 1600-3200  $\mu\text{g/ml}$ . Nakahara, *et al.* (1977<sup>a</sup>) ha reportado que las cepas resistentes a plomo se encuentran en el intervalo de CMI = 800-3200  $\mu\text{g/ml}$ , por lo que la distribución de la CMI de nuestras cepas coinciden con las de estos autores, sin embargo en nuestro estudio no encontramos bacterias sensibles a plomo, por lo que es recomendable trabajar con un mayor número de cepas a fin de encontrar este grupo.

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, 1988), sin embargo, el mecanismo no ha sido aún descrito.

Respecto al cromo (figura 3) la CMI se distribuyó en un solo pico de sensibilidad CMI 187-750  $\mu\text{g/ml}$ . Campos *et al.* (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 esta 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, 1987).

En este trabajo mencionamos que la a distribución de la CMI a Zinc fue bimodal, siendo el 42.6% de las cepas sensibles en el intervalo de 85-340  $\mu\text{g/ml}$  y el 55% resistente en el rango de 670-2720  $\mu\text{g/ml}$  (figura 4). Se ha descrito que la resistencia a zinc se encuentra conferida en el plásmido pMOL30 de *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Mergeay, *et al.* 1985) y se ha demostrado que esta resistencia es inducible y que las células resistentes inducidas en presencia de zinc expulsan del citoplasma los cationes por un mecanismo aún desconocido (Nies, & Silver, 1990).

En lo referente a mercurio reportamos que la resistencia de el 100% de las cepas de *S. aureus* se encontró en el intervalo de 20-40  $\mu\text{g/ml}$  (figura 5).

Se ha descrito para cepas de *S. aureus* una distribución bimodal, sensible en el rango de 1.6-6.25  $\mu\text{g/ml}$  y resistente entre 12.5-50  $\mu\text{g/ml}$  (Nakahara, 1977<sup>a</sup>).

Se detectó una distribución bimodal para la CMI a arsenito (figura 6), sensible (CMI 100-400  $\mu\text{g/ml}$ ) y resistente (CMI 800-3200  $\mu\text{g/ml}$ ). Nuestros porcentajes son similares a los encontrados por (Vaca, 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 $\mu\text{g/ml}$ ). Es importante mencionar que para este estudio nosotros utilizamos arsenito de sodio y estos autores utilizaron arsenato de sodio.

En la figura 7 puede apreciarse que el 18.75% de las cepas de *S. aureus* fue moderadamente resistente a plata en el rango de 10-15  $\mu\text{g/ml}$  y el 81.25% resistente en el intervalo de 20-30  $\mu\text{g/ml}$ . Se ha reportado que tanto las bacterias sensibles como las resistentes son capaces de reducir la plata iónica ( $\text{Ag}^+$ ) a la forma metálica, por lo que la reducción se ha eliminado como el mecanismo de resistencia. (Silver, 1996). Recientemente se ha descrito que el mecanismo de resistencia a plata se basa en el eflujo intracelular del ión hacia el exterior probablemente codificado por genes de el cromosoma bacteriano (Xian-Zhi, 1997)

La alta resistencia a metales pesados por la cepas de *S. aureus* citadas 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 con 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, 1990). En un estudio realizado en la ciudad de México (Jiménez,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 mg/dl, rebasando la cifra permitida ( 10 mg/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 (Romieu, 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), cromo (nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y cáncer de pulmón), mercurio (alteraciones neurológicas y afecciones del sistema respiratorio) y plata (sirve como agente antimicrobiano en pacientes con quemaduras (Silbergerld, 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, si no también como una alternativa en la destoxificación de ecosistemas contaminados por estos agentes (Cervantes, 1994).

## CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas fue resistente a los antibióticos ampicilina y penicilina considerados como “de primera elección”.
2. En este estudio se encontró que la totalidad de las cepas de *S. aureus* estudiadas fue resistente a zinc, mercurio, arsenito y plata, lo que refleja probablemente la contaminación de estos metales en el ambiente.
3. Durante el desarrollo de este trabajo no se encontraron bacterias sensibles a plomo, por lo que es recomendable trabajar con un mayor número de cepas de *S. aureus*, con el propósito de encontrar este grupo, y tratar de esclarecer si el mecanismo de la resistencia se encuentra codificada por plásmidos o por el cromosoma bacteriano.

## BIBLIOGRAFIA

- Abraham, E.P.; E. Chain; C.M, Fletcher; H.W, Florey; A.D. Gardener; N.G. Heatley, & M.A. Jennings, 1941. Further observations on penicillin. Lancet 2: 177-188.
- Amábile Cuevas, C.F. 1988. La resistencia bacteriana a los antibióticos. Ciencia y Desarrollo. Núm. 80. CONACyT. Año XIV:57-68.
- Alexander, M., (1993), Microbiología del suelo, Ed. AGT. 2ª ed. México, D.F. pág. 27-46.
- 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.
- Bender, C.L. & D.A. Cooksey. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. J. Bacteriol. 169:470-474.
- Boop, L.H. & H.L. Ehrlich, 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* LB300 Arc. Microbiol. 150:426-431.

- Brown, N.L.; T.K. Misra; J.N. Winnie; 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.
- 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.
- Burgues, A. (1971). Biología del suelo. Ed. Omega, Barcelona España. Pág. 28-57.
- Campos, J.; Martínez-Pacheco, M & Cervantes, C. 1995. Hexavalent-Chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus sp.* Strain. Antonie van Leeuwenhoek **00**:1-6.
- Cenci C.; G Morozzi.; F Scazzocchio. & A. Morosi 1982. Antibiotic and metal resistance of *Escherichia coli* isolates from different environmental sources. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. **C3**: 440-449.

- Cervantes, C. & Gutiérrez-Corona F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiol. Rev. **14**:121-138
- Cervantes, C. & H. Ohtake. 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. **56**: 173-176.
- 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.
- 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.
- Chen, C.; T. K. Misra; S. Silver & 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.
- Christon, S. Hurst (1991), Modeling the enviromental fate of Microorganism, ASM, Washington, USA. Pág. 3-14.
- Davies, E.L. 1978. Plasmid-determined antimicrobial agents. Ann Rev. Biochem. **32**:469.

- 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.
- 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.
- Giono Cerezo Silvia: Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. Infectología III (7): 325, 1983.
- 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.
- 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.
- Jiménez,C.; I.Romieu; E. Palazuelos; I.Muñoz; M.Cortés A. Rivero. 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Misra, T.K.; N.L. Brown; D.C. Fritzingler; 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.

- 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).
- Monroy, P.E. 1997. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*" Tesis de maestría, FES-Cuautitlán, UNAM.
- Moore, B. 1960. A new screem test and Selective medium for the rapid detection of epidemic strain of *Staphylococcus aureus*. Lancet 2:453-458.
- 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.
- 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.
- 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



- Nakahara, H. & Konzukue, H. 1992. Volatilization of mercury determined by plasmids in *E. coli* isolate from an aquatic environment. In Drug resistance in bacteria: Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology, De. S. Mitsuhashi. pp. 337-40. Tokyo: Jpn. Sci. Soc.
- Nakahima, Y. & Hashimoto, H. 1990. Characterization of plasmids that confer inducible resistance to 14 membered macrolide and streptogramin type B antibiotics in *S. aureus*. Microbiol. Immuno. Vol. 34 pp. 723-735.
- 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.
- Novick, R. P. & C. Roth. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic Salts in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 95; 1342-1355.
- 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.
- O'Brien, T. F; D. G. Ross; M. A; Guzmán, A. A. Medeiros; Hedges, R. W. & D. Botstein. 1980. Dissemination of an antibiotic resistance

- plasmid in hospital patient flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**:537-543.
- Ohtake, H.; C. Cervantes & S. Silver. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **169**:3853-3856.
  - 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.
  - Perea, P.E., 1992. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Ed. Doyma. Barcelona, España pág. 575.
  - Romieu, I.; E. Palazuelos; C. Ríos; H. Muñoz & Jiménez C. 1992. Sources of lead exposure in México City . *Environmental Health Perspectives*. En prensa.
  - 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.
  - 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

- Santos, F.I.; F.I. De Souza, F. & J. Pinto De Siqueira JR. 1992. Antimicrobial drug-resistant *Staphylococcus aureus* in a Brazilian University Hospital. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 34: 171-173.
- San Francisco, M.J.D.; C. L. Hope; J. B. Owolabi; L. S. Tisa & B. P. Rosen. 1990. Identification of true Metalloregulatory Element of the Plasmid-encoded Arsenical Resistance Operon. *Nucl. Acid. Res.* 9:619-624.
- Silbergeld, E.K. 1990. Implications of new data on lead toxicity for managing and preventing exposure. *Environ health Perspect.* 89: 49-59.
- 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
- Silver,S. 1981. Mechanisms of plasmid-determined heavy metal resistances. En: 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
- Silver, S. & M. Walderhaugh. 1992. Regulation of chromosomal and plasmid cation and anion transport systems. *Microbiol. Rev.* 56: 1-33.

- Silver, S. & T. K. Misra. 1988. Plasmid-Mediated Heavy Metal Resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:717-743.
- Silver, S. 1983. Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad. In: Westbroek, P. & E. W. De Jong (eds.) *Biomining and Biological Metal Accumulation*. D. Reidel. Dordrecht. pp. 439-457
- Silver, S.; Le T. Phung. 1996. Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789.
- Silver, S.; K. Budd; K.M. Leahy; W.V. Shaw; D. Hammond.; R.P. Novick, G.R. Willsky; M.H. Malmay & H. Rosenberg. 1981. Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **146**:983-96.
- Summers, A. O. & S. Silver. 1978. Microbial transformations of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**:637-672.
- Vaca, S.; R. Miranda & C. Cervantes, 1995. Inorganic-ion resistance by bacteria isolated from a Mexico City freeway. *Antonie van Leeuwenhoek.* **67**:333-337.
- Venit, S. & L.S. Levy. 1974. Mutagenicity of chromate in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature.* **250**:493-495.

- Watanabe, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **27**: 87-115.
- Xian-Zhi Li, Hiroshi Nikaido & Kurt E. Williams, 1997. Silver-resistant Mutans of *Escherichia coli* Display Active efflux of Ag<sup>+</sup> and are Deficient in porins. *J. Bacteriol.* **179**: 6127-6132.