

## CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL PLASMÍDICO Y DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y METALES DE CEPAS DE LA BACTERIA *Staphylococcus aureus*

Mary Álvarez<sup>1</sup>, Lorena Atencio<sup>1</sup>, Jorge Guíñez<sup>2</sup> y Javier Suárez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela. Telf: (0261) 7424340-7981557. E-mail: mcalvarez50@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo 4001-A, Venezuela. Telf: (0261) 7424340-7981557. E-mail: jrguinez@luz.ve

**Resumen.** La bacteria *Staphylococcus aureus* es un importante patógeno en ambientes comunitarios y hospitalarios, pudiendo ser resistente a múltiples antibióticos y a metales pesados, generando serias limitaciones terapéuticas. Esta resistencia puede estar codificada plasmídica o cromosómicamente. De esta situación deriva la importancia de determinar los patrones de resistencia a drogas terapéuticas y a metales pesados, y el perfil plasmídico de muestras de *Staphylococcus aureus* estableciendo la relación o identidad entre ellas. Se estudiaron 11 muestras provenientes de 3 laboratorios de la ciudad de Maracaibo. Los antibiogramas se realizaron utilizando la metodología de Bauer *et al.* (1966) denominada Método de Difusión en Agar con Disco y la de Fredrickson *et al.* (1988). El aislamiento del ADN plasmídico se realizó mediante el protocolo de lisis alcalina para bacterias gram positivas modificado y el resultado fue verificado por electroforesis en gel de agarosa. Se aplicó multivarianza mediante el análisis de agrupamientos (cluster) utilizando el programa computacional STATISCA versión 4.1 para Windows. Se encontraron los siguientes patrones de resistencia a antibióticos: Penicilina, Ampicilina y Tetraciclina 100%; Kanamicina 90%; Eritromicina 45,45%; Cloranfenicol 27,27%; todas las cepas fueron susceptibles a Norfloxacin, Ciprofloxacina, Gentamicina, Clindamicina, Rifampicina y Vancomicina. Los porcentajes de resistencia a las concentraciones de Mercurio fueron los siguientes:

a 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100%; a 100 y 250  $\mu\text{g/mL}$  90,91%; y a 500  $\mu\text{g/mL}$  27,77%. Se determinaron entre 3 y 5 plásmidos en todas las cepas estudiadas con tamaños similares que oscilan entre 37,59 y 2,69 Kb. El análisis de agrupamientos permitió determinar la relación o identidad entre las muestras estudiadas, observándose cinco grupos distintos, lo cual indicó que los mismos son representantes de distintas cepas bacterianas. *Recibido:* 12 Febrero 2001, *aceptado:* 13 Mayo 2001.

**Palabras clave:** antibióticos, metales, plásmidos, resistencia, *Staphylococcus aureus*.

## CHARACTERIZATION OF THE PLASMIDIC PROFILE AND RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AND METALS OF STRAINS OF THE BACTERIA *Staphylococcus aureus*

**Abstract.** The bacteria *Staphylococcus aureus* is an important pathogenic bacteria in community and hospital atmospheres, is resistant to multiple antibiotics and heavy metals, and generates serious therapeutic limitations. This resistance can be coded plasmidically or chromosomally. Due to this situation it becomes important to determine their resistance patterns to therapeutic drugs and heavy metals, and their plasmidic profiles in samples of *Staphylococcus aureus*, in order to establish the relationships or identities among them. 11 samples coming from 3 laboratories in Maracaibo city were studied. Antibiograms were carried out using the methodology of Bauer *et al.* (1966) denominated Method by Diffusion in Agar with Disk, and by that of Fredrickson *et al.* (1988). The isolation of the plasmidic DNA was carried out by means of the alkaline lysis protocol modified for gram positive bacteria and the result was verified by electrophoresis in agar gel. Multivariate Cluster analysis was carried out using the computational program STATISCA version 4.1 for Windows. The following antibiotic resistance patterns were found: penicillin, ampicilin and tetracycline 100%; Kanamycin 90%; Erythromicin 45.45%; chloranphenicol 27.27%; all strains were susceptible to norfloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, clindamycin, rifampin and vancomycin. The resistance percentages to the different concentrations of mercury were the following: to 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100%; to 100 and 250  $\mu\text{g/mL}$  90.91%; and to 500  $\mu\text{g/mL}$  27.77%. Between 3 and 5 plasmids were determined in all the strains studied with similar sizes that oscillated between 37.59 and 2.69 Kb. Cluster analysis permitted the determina-

tion of identity or relation among the samples studied, and five different groups were observed, which means that they are representatives of different bacterial strains. *Received*: 12 February 2001, *accepted*: 13 May 2001.

**Key words:** antibiotics, metals, plasmids, resistance, *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUCCIÓN

La bacteria *Staphylococcus aureus* es un importante patógeno en ambientes comunitarios y hospitalarios, pudiendo ser un organismo resistente a múltiples agentes antimicrobianos, y metales pesados utilizados como desinfectantes, lo cual genera serias limitaciones terapéuticas (Koneman *et al.* 1992).

Esta resistencia puede estar codificada cromosómicamente o en uno o varios plásmidos (Berg *et al.* 1998). Se ha encontrado que los genes de resistencia a antibióticos muchas veces residen sobre plásmidos conjugativos que han jugado un papel básico en la diseminación de la resistencia a drogas (Oullette y Kundin 1997).

De esta manera, la idea de que la resistencia a antibióticos e incluso a metales pesados sea un problema local ha sido desacreditada. La prevalencia de patógenos resistentes puede diferir de un lugar a otro, entre regiones geográficas específicas. Este es un problema que se incrementa y que sugiere que estamos frente a un futuro incierto en el cual las bacterias que usualmente fueron susceptibles a drogas de primera elección se han vuelto resistentes, y capaces de transmitir sus genes de resistencia a otras bacterias susceptibles (Pérez y Zigorraga 1998).

De esta situación deriva la importancia de la determinación de patrones de resistencia típicos de cada región proponiendo alternativas para una terapia efectiva.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar los patrones de resistencia a drogas terapéuticas y el perfil plasmídico de 11 cepas de *Staphylococcus aureus*, estableciendo la relación o identidad entre las muestras estudiadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 11 muestras provenientes de 3 laboratorios clínicos de la ciudad de Maracaibo. Las muestras se identificaron como MA1, MA2, MA3, MA4, MA5, MA6, MA7, MA8, MA11, MA12 y MA13.

La identificación de las cepas se basó en observaciones de las características morfológicas y bioquímicas de la especie. Morfológicamente se observaron como células esféricas gram positivas, distribuidas en cúmulos irregulares a manera de racimo de uvas de aproximadamente 1 m de diámetro, no móviles, no formadores de esporas y generalmente capsulados (Koneman *et al.* 1992).

Las colonias observadas en Agar Staphylococcus 110, fueron opacas y convexas, con consistencia cremosa y de color blanquecino (Koneman *et al.* 1992).

Se determinó la producción de ácido a partir de glucosa tanto aeróbica como anaeróbicamente, fueron susceptibles a la Lisostafina y a Furazolidona y oxidasa modificada positivos (Koneman *et al.* 1992).

El reconocimiento de especie se realizó utilizando pruebas adicionales, tales como: prueba de la coagulasa y fermentación del manitol, además de la prueba de la desoxirribonucleasa (DNAsa) y la nucleasa termoestable, todas positivas para *S. aureus* (Koneman 1992).

### SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Para determinar la susceptibilidad a antibióticos, se utilizó el Método de Difusión de Agar con Disco propuesto por Bauer *et al.* (1966). Los antibióticos utilizados, manufacturados por Difco (Dispens-O-Disc Suceptibility Test System) fueron los siguientes: Ampicilina (10  $\mu$ /mL), Penicilina (10  $\mu$ /mL), Cefotaxima (30  $\mu$ g/mL), Oxaciclina (1  $\mu$ g/mL), Ceftrazone (30  $\mu$ g/mL), Noboviocina (10  $\mu$ g/mL), Imipenen (10  $\mu$ g/mL), Vancomicina (30  $\mu$ g/mL), Gentamicina (10  $\mu$ g/mL), Kanamicina (30  $\mu$ g/mL), Estreptomycin (10  $\mu$ g/mL), Eritromicina (10  $\mu$ g/mL), Tetraciclina (30  $\mu$ g/mL), Ci-

profloxina (5 µg/mL), Acido Nalidixico (30 µg/mL), Norfloxacin (10 µg/mL), Cloranfenicol (30 µg/mL), Clindamicina (2 µg/mL), Rifampicina (5 µg/mL), Trimetoprin-Sulfametoxazol (25 µg/mL), Lomefloxacin (10 µg/mL).

### SUSCEPTIBILIDAD A METALES PESADOS

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de metal pesado en cada una de las cepas estudiadas utilizando placas con agar tripticosa soya y discos impregnados con el compuesto similares a los que se utilizan para los antibiogramas, según lo propuesto por Fredrickson *et al.* (1998), Los filtros estándar, de 7mm, fueron preparados aplicando 25 µL de la solución con una concentración específica del metal y secados al aire posteriormente. Las concentraciones estándar probadas de los metales fueron: 10, 50, 100, 250 y 500 µg por disco. Las placas fueron incubadas a 37°C por un espacio de 24 a 48 horas, procediendo luego a la medición de los diámetros de las zonas de inhibición. La CMI a los metales se determinó como la cantidad de metal requerido para producir una zona de inhibición de 10 mm. Los metales utilizados para esta prueba fueron, Cadmio y Mercurio, en forma de cloruros (Cloruro de Cadmio: CdCl y Cloruro de Mercurio: HgCl).

### EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CRÍPTICOS

Se utilizó el protocolo denominado lisis alcalina modificada (Macrina *et al.* 1980), para determinar el número y tamaño de los plásmidos presentes en las cepas bacterianas. La separación y observación de los plásmidos se realizó según lo propuesto por Ausubel *et al.* (1997), en una cámara de electroforesis horizontal sumergida a 50 voltios durante 7-8 horas, en un gel de agarosa al 0,7% con EtBr (10 mg/mL) para una concentración final de 0,5 g/mL. El DNA fue visualizado en un transiluminador UVP, Chomato-Vue. El tamaño de los plásmidos se determinó utilizando el programa computacional ORIGIN versión 5.0 para Windows, basado en la migración de las bandas de DNA de la muestra en comparación con las bandas del marcador de PM (digerido con Hind III), relacionando de esta mane-

ra el peso molecular con la movilidad de cada banda en el gel (Manniatis *et al.* 1984).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la relación o identidad entre las muestras estudiadas, y estimar una relación epidemiológica, se aplicó análisis de varianza mediante agrupamientos (cluster), utilizando el programa computacional STATISCA para Windows versión 4.1, introduciendo todas las variables estudiadas en este trabajo (Álvarez, comunicación personal 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

En las Tablas 1 y 2, se observa el patrón de resistencia a antibióticos y metales pesados, respectivamente para cada una de las cepas

TABLA 1. Patrón de resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus*.

MUESTRA	TOTAL DE RESISTENCIA	RESISTENCIA A:
MA1	8	Pc, Amp Ox, Ctx, Cro, E, Stx, Te
MA2	6	Pc, Amp, C, Km, E, Te
MA3	5	Pc, Amp, Km, E, Te
MA4	5	Pc, Amp, C, Km, Te
MA5	5	Pc, Amp, Na, Km, Te
MA6	4	Pc, Amp, Km, Te
MA7	4	Pc, Amp, Km, Te
MA8	6	Pc, Amp, K,m, S, E, Te
MA11	4	Pc, Amp, Km, Te
MA12	7	Pc, Amp, C, Km, S, E, Te
MA13	5	Pc, Amp, Nor, Km, Te

TABLA 2. Concentración Mínima inhibitoria de metales pesados para el crecimiento de las de cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas.

MUESTRA	[C M I] DE CADMIO µg/mL	[C M I] DE MERCURIO µg/mL
MA1	250	50
MA2	250	250
MA3	250	250
MA4	250	500
MA5	250	250
MA6	50	250
MA7	50	500
MA8	250	250
MA11	10	250
MA12	10	500
MA13	250	250

estudiadas. Todas las muestras en estudio fueron resistentes a cuatro o más de los antibióticos seleccionados, lo cual evidenció multirresistencia. El 100% las muestras fueron resistentes a Penicilina, Ampicilina y Tetraciclina (Tabla 3), estos porcentajes de resistencia coinciden con los datos reportados por otros autores (Lyon *et al.* 1983, Leski *et al.* 1998, Pineda *et al.* 1997, Pineda *et al.* 1998) (Tabla 3), resultado que es de esperarse dado el amplio uso clínico e indiscriminado de estas drogas.

El porcentaje de resistencia a Fluoroquinolonas fue bajo siendo sólo el 9,09% de las muestras resistentes al Ácido Nalidíxico y 100% susceptibles a Norfloxacin y Ciprofloxacina. Estos resultados son comparables con los reportados por la mayoría de los autores que señalan un bajo porcentaje de cepas resistentes a estos agentes (Leski *et al.* 1998, Pineda *et al.* 1997, Pineda *et al.* 1998) (Tabla 3). Esto también permite inferir que las muestras estudiadas no presentan

TABLA 3. Tabla comparativa de los porcentajes de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* reportados por diversos autores.

ANTIBIÓTICO	MUESTRAS	PINEDA <i>et al.</i> (1997)	PINEDA <i>et al.</i> (1998)	LYON <i>et al.</i> (1983)	LESKI <i>et al.</i> (1992-1996)
Penicilina	100%	88,37%	95,15%	100%	100%
Ampicilina	100%	88,89%	95,15%	-	-
Tetraciclina	100%	8,16%	14,61%	100%	70,83%
Acido nalidíxico	9,09%	-	-	-	-
Norfloxacina	0%	-	-	6.3%	-
Ciprofloxacina	0%	1,25%	0%	-	4,17
Cloranfenicol	27,27%	4,26%	1,30%	37%	0%
Kanamicina	90,9%	1,29%	1,16%	79%	-
Gentamicina	0%	1,29%	1,16%	79%	37,5%
Clinadamicina	0%	0%	1,05%	89%	-
Trimetoprin-Sulfametoaxol	9,09%	0%	2,13%	-	-
Rifampicina	0%	0%	2,11%	-	-
Eritromicina	45,45%	13,16%	10,20%	89%	50%
Vancomicina	0%	0%	0%	0%	4,17%



mutaciones a nivel cromosomal (*gyr A*) que confieran resistencia a estas quinolonas.

Las Cefalosporinas tales como Cefalotina (primera generación) y Ceftriazone (tercera generación) son utilizadas efectivamente en el tratamiento de la ostiomelitis (Guglielmo *et al.* 2000) y endocarditis estafilocócica, esta efectividad se debe a la susceptibilidad de un alto porcentaje de cepas a dichos agentes lo cual es semejante a los resultados obtenidos (9,09 % de muestras resistentes) (Tabla 3). Por lo general, estos agentes se recetan siempre en combinación con otras drogas como la Gentamicina y el imipenen dado el alto porcentaje de cepas susceptibles (Demin y Drobyhesva 1998), lo que también es comparable con los datos obtenidos (Tabla 3).

El porcentaje de cepas resistentes a Cloranfenicol, Kanamicina y Tetraciclina no coincide con los reportes regionales realizados entre 1997-1998 por el Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, donde se muestran porcentajes bastante bajos en comparación con los obtenidos al realizar los ensayos de susceptibilidad pertinentes a las muestra estudiadas (Pineda *et al.* 1997, Pineda *et al.* 1998), sin embargo, son comparables con los reportados por otros autores a nivel mundial (Lyon *et al.* 1983, Leski *et al.* 1998, Udo y Grubb 1990) (Tabla 3).

La resistencia observada a Clindamicina y Gentamicina es semejante a la reportada a nivel regional, pero difiere enormemente de la reportada por autores como Lyon *et al.* (1983) y Leski *et al.* entre 1992 y 1996 (Tabla3).

Específicamente en el caso de la Gentamicina, se observó que el 100% de las muestras son susceptibles a dicho antibiótico, lo cual coincide con los datos reportados a nivel regional por Pineda *et al.* en 1997 y 1998, pero difieren en gran medida con lo observado por Lesky y Lyon (1988 y 1983 respectivamente) que han reportado porcentajes de hasta 79% de cepas resistentes, igualmente se ha reportado un alto porcentaje de cepas resistentes, aisladas de infecciones nosocomiales neonatales en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (50% de aislados clínicos y 100 % de portadores)

(Velazco *et al.* 1999) donde el tratamiento inmediato en neonatos implica terapia con Gentamicina, estos resultados podrían deberse al uso de estos agentes de forma indiscriminada y demuestran, al ser comparados con los resultados obtenidos en este trabajo y lo reportado a nivel regional que los patrones de resistencia-susceptibilidad a antibióticos difieren de un lugar a otro de acuerdo al uso y abuso de estos agentes; sin embargo la efectividad de la Gentamicina en combinación con las Cefalosporinas de última generación es bastante alta en el tratamiento de ciertas patologías infecciosas (Pineda *et al.* 1997, Pineda *et al.* 1998, Demin y Drobysheva 1998).

El porcentaje de resistencia al Trimetoprin/Sulfametoaxol y Rifampicina, fue de 9,09% y 0% de muestras resistentes respectivamente lo cual es similar a lo reportado en la literatura (Pineda *et al.* 1997, Pineda *et al.* 1998) (Tabla 3) lo que permite sugerir su uso en el tratamiento de infecciones ocasionadas por esta bacteria.

En relación a la Eritromicina el porcentaje obtenido (45,45%), no coincide con lo reportado por Pineda *et al.* en 1997, sin embargo, Lyon *et al.* (1983), reporta un porcentaje de cepas resistentes a este agente del 89% y Leski *et al.* en 1996 reporta un 50 % de cepas resistentes a este antibiótico (Tabla 3), el resultado reportado por ambos autores es consistente con lo obtenido en este trabajo.

Uno de los agentes antimicrobianos ampliamente utilizados y efectivos en el tratamiento de infecciones estafilocócicas es la Vancomicina, no detectandose aún un gran número de cepas resistentes (Brown *et al.* 1993) hecho que se evidencia tanto en los datos obtenidos durante el presente estudio como en la revisión bibliográfica realizada (Tabla 3).

De los resultados obtenidos puede suponerse que la aparición de patrones de resistencia, específicamente en *S. aureus*, difieren de un lugar a otro, inclusive dentro del mismo país o región de acuerdo al uso adecuado o no de los agentes antimicrobianos, como respuesta a la presión selectiva a la cual son sometidos. De allí la importancia de la determinación y estudio de los patrones de resistencia típicos con el fin de indicar el tratamiento más efectivo según el caso.

## SUSCEPTIBILIDAD A METALES PESADOS

La resistencia a iones inorgánicos tales como Mercurio y Cadmio ha sido descrita en diversos grupos de microorganismos aislados de muestras clínicas y ambientales, y su correlación con la resistencia a antibióticos ha sido comprobada. Algunos de estos agentes son ampliamente utilizados en ambientes hospitalarios como antisépticos y desinfectantes, hecho por el cual la determinación de la resistencia o tolerancia a los mismos se considera muy importante en la actualidad (Lyon y Skurray 1987).

Como se observa en la Tabla 2 la resistencia a Mercurio es bastante variable entre las muestras, siendo las cepas más resistentes a altas concentraciones de Mercurio, sin embargo todas las muestras fueron susceptibles a la mayor concentración probada de Cadmio, esta resistencia puede deberse a la fácil diseminación de estos genes, ya que hasta el momento *S. aureus* es el único organismo en el cual se ha demostrado que la resistencia al Cadmio está codificada a nivel plasmídico (Tynecka *et al.* 1981) y asociado con la resistencia a antibióticos-lactámicos (Lyon *et al.* 1983, Foster 1983, Udo y Grubb 1990, Crupper *et al.* 1999), lo cual coincide con los resultados obtenidos en relación con la resistencia a la Ampicilina y a la Penicilina. Esta resistencia está dada por al menos dos mecanismos distintos, mediados por los determinantes *cadA* (incrementa la resistencia al Cadmio debido a un sistema de flujo a través de la membrana que previene la acumulación interna de los iones cadmio) y *cadB* (el producto del gen *cadB* puede ser un enlazador de los iones cadmio o zinc a la membrana) respectivamente (Tynecka *et al.* 1981). Igualmente la resistencia a Mercurio y compuestos organomercuriales está comúnmente codificada a nivel plasmídico en *S. aureus* y la resistencia o tolerancia al mismo puede deberse a la utilización de estos compuestos terapéuticamente o como desinfectantes en hospitales (Porter *et al.* 1982), el mecanismo de resistencia involucra la acción de la enzima "Mercurio reductasa" la cual reduce los iones  $Hg^{2+}$  al ion metálico  $Hg^0$ , forma mucho menos volátil y tóxica (Lyon y Skurray 1987).

La Tabla 4 muestra la obtención de un mayor porcentaje de muestras resistentes al Mercurio, esta situación es alarmante si se

TABLA 4. Porcentaje de muestras de *Staphylococcus aureus* resistentes a metales pesados.

METAL	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	500	250	100	50	10
Cadmio	0%	63,64%	63,64%	81,82%	100%
Mercurio	27,27%	90,91%	90,91%	100%	100%

considera que muchos desinfectantes de uso clínico presentan elementos organomercuriales, por lo que no estarían siendo eficientes para la limpieza óptima de las salas de operaciones y otros ambientes donde se emplean estos compuestos.

#### EXTRACCIÓN Y ESTUDIO DE PLÁSMIDOS CRÍPTICOS

Se procesaron las 11 muestras de *S. aureus*, mediante el protocolo de lisis alcalina modificada, que permitió el estudio de ADN plasmídico, obteniéndose resultados positivos en todos los casos (Figuras 1 y 2). El número de plásmidos osciló entre 3 y 5 por muestra

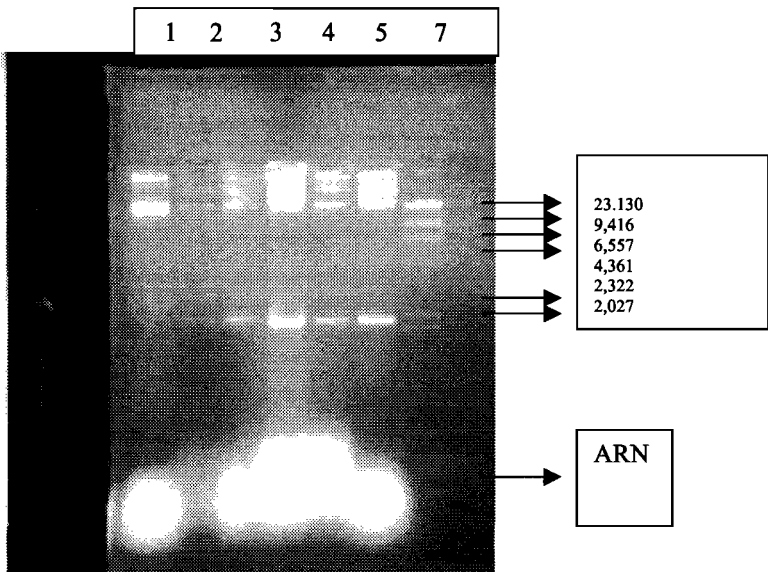


FIGURA 1. Extracción de ADN plasmídico Cepas 1,2,3,4,5 y 7.

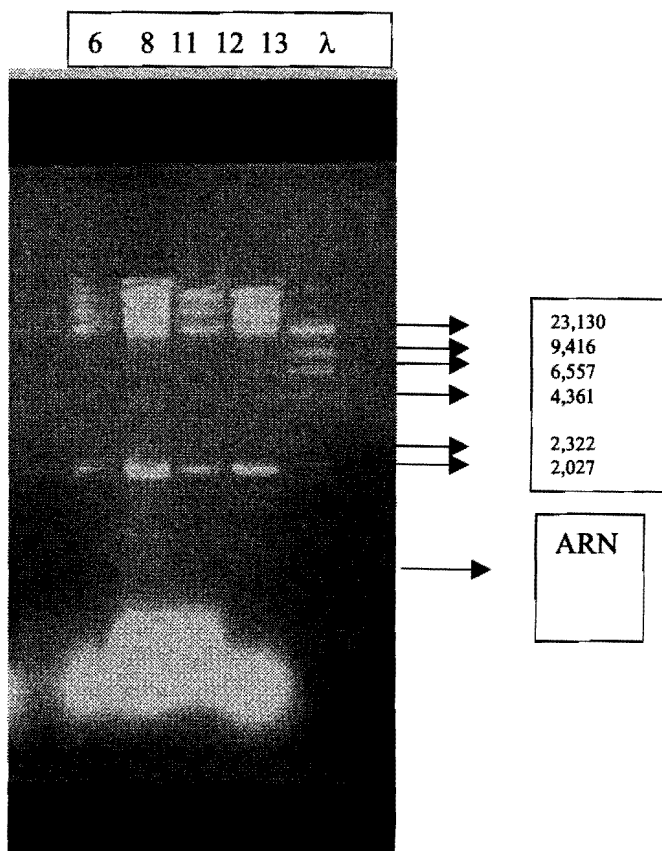


FIGURA 2. Extracción de ADN plasmídico Cepas 6, 8, 11, 12, 13.

(Tabla 5), observándose la presencia de 5 plásmidos en el 54,54 % de las muestras, un 27,27% de las mismas presentaron 3 plásmidos y el 18,18 % de las muestras presentaron 4 plásmidos visibles.

Los tamaños observados de plásmidos de cada una de las muestras procesadas oscilaron entre 2,1Kb y 37,59 Kb, como se muestra en la Tabla 5 y tomando en cuenta los pesos moleculares característicos de cada una de las bandas del marcador (Álvarez, comunicación personal 2000). Los perfiles plasmídicos obtenidos de las muestras estudiadas son bastante parecidos, excepto el de las muestras MA1 y MA8, las cuales presentan distintos tamaños de plásmidos no comparables con las demás muestras.

TABLA 5. Perfil plasmídico de 11 muestras de *Staphylococcus aureus*.

MUESTRA	TOTAL DE PLÁSMIDOS	TAMAÑOS (Kpb)
MA1	4	37,59; 30,37; 23,18; 16,30.
MA2	3	29,4; 14,24; 2,69.
MA3	3	29,4; 14,24; 2,69.
MA4	5	29,4; 14,24; 4,86; 3,29; 2,69.
MA5	5	29,4; 14,24; 4,86; 3,29; 2,69.
MA6	3	29,4; 14,24; 2,69.
MA7	5	29,4; 14,24; 4,86; 3,29; 2,69.
MA8	4	22,6; 4,92; 2,91; 2,1.
MA11	5	29,4; 14,24; 4,86; 3,29; 2,69.
MA12	5	29,4; 14,24; 4,86; 3,29; 2,69.
MA13	5	29,4; 14,24; 4,86; 3,29; 2,69.

### ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de agrupamiento realizado se muestra en la Figura 3. En este análisis puede observarse que las muestras MA2, MA3 y MA6 están estrechamente relacionadas; representando el primer grupo de bacterias. El segundo grupo de bacterias está representado por las muestras MA4, MA7, MA11, MA5 y MA13. La muestra MA12, aunque presentó características similares al grupo 2, dada sus notables diferencias pudo ubicarse en un grupo aparte, siendo la única representante del grupo 3. Las muestras MA8 y MA1 representan por su parte a los grupos 4 y 5 respectivamente.

En base a las variable utilizadas se pudo inferir que estos grupos son representativos de cepas bacterianas distintas, y pueden observarse diferencias entre las muestras provenientes de distintos laboratorios clínicos, este hecho evidencia la presencia de cepas con patrones de resistencia característicos en cada lugar, lo cual tiene una repercusión epidemiológica alarmante si se considera la posible diseminación e intercambio de determinantes de resistencia.

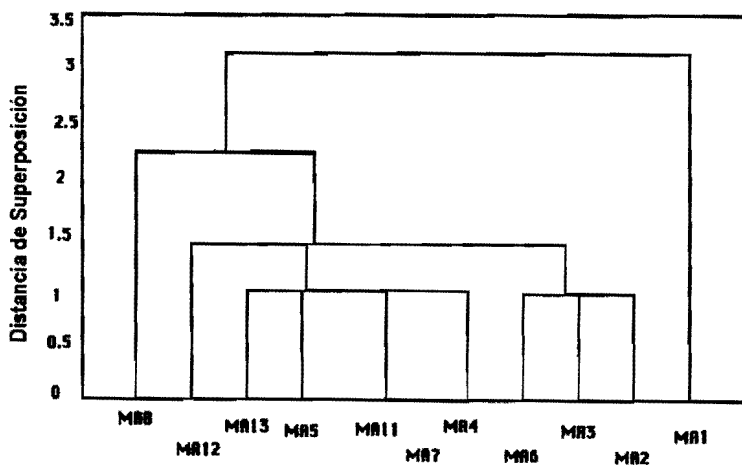


FIGURA 3. Análisis de agrupamiento (cluster) de las muestras estudiadas.

### CONCLUSIONES

Todas las muestras evidencian multirresistencia a los distintos antibióticos seleccionados y a distintas concentraciones tanto de Cadmio como de Mercurio, lo cual es alarmante desde el punto de vista epidemiológico.

Todas las muestras estudiadas presentaron plásmidos observándose un perfil plasmídico semejante en la mayoría de las mismas.

El análisis de agrupamiento permitió determinar grupos bacterianos distintos, observándose 5 grupos epidemiológicamente distintos.

La aparición de patrones de resistencia de *S. aureus*, difieren de un lugar a otro, inclusive dentro del mismo país o región de acuerdo al uso adecuado o no de los agentes antimicrobianos, como respuesta a la presión selectiva a la cual son sometidos.

**LITERATURA CITADA**

- AUSUBEL, F., R. BRENT, R. KINGSTONE, D. MOORE, J. SEIDMAN, J. SMITH y K. STRUHL. 1997. Short Protocols in Molecular Biology. A Compendium of Methods from Currents Protocols in Molecular Biology.
- BAUER, A., M. KIRBY, J. SHORRIS y C. TURK. 1996. American Journal Pathology. 45: 493-496.
- BERG, T., N. FIRTH, S. APISIRIDEJ, A. HETTIARATCHI, A. LEEAPORN y R. SKURRAY. 1998. Journal of Bacteriology, 180 (17): 4350-4359.
- BROWN, C., K. MC CANGHAN y P. WARREN. 1993. American Society for Microbiology 38 (2): 445-449.
- CRUPPER, S., V. WORRELL, G. STEWART y J. IANDOLO. 1999. Journal Bacteriology. 181 (13): 4071-5.
- DEMIN, A., y V. DROBYSHEVA. 1998. Antibiotic Khimioterapy. 43 (6): 12-5.
- FOSTER, T. 1983. Microbiological Reviews 47: 361-4.
- FREDRICKSON, J., R. HICKS y F. BROCKMAN. 1998. Applied Enviromental Microbiology, 54 (12): 2916-292.
- GUGLIELMO, B., A. LUBER, JR. PALETTA y R. JACOBS. 2000. Clinical Infec-tology Disease. 30 (1): 205-7.
- KONEMAN, E., S. ALLEN, V. DOWELL, W. JANDA, H. SOMMERS y W. WINN. 1992. Diagnóstico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana 3ª edición.
- LESKI, T., T. GNIADKOWSKI y W. HRYNIEWICZ. 1998. Zentrablatt fur Bakte-riologie. 287,363-373.
- LYON, B., J. MAY y R. SKURRAY. 1983. Antimicrobial Agent Chemother 23: 817-826.
- LYON, B y R. SKURRAY. 1987. Microbiological Reviews. 51 (1): 88- 134.
- MACRINA, F., P. WOOD, y JONES, K. 1980. Academic Science Hung. 24: 107-113.
- MANIATIS, T., E. FRITSCH y J. SAMBROOK. 1984. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 120 pp.



- OUELLETTE, M. y CH. KUNDIN. 1997. *International Journal of Antimicrobial Agents* 8: 179-187.
- PEREZ TRALLERO, E. y C. ZIGORRAGA. 1998. *International Journal of Antimicrobial Agents* 6: 59-63.
- PINEDA, M., X. BONILLA y J. VARGAS. 1997. Centro de Referencia Bacteriológica, Myers Squibb, Venezuela. 16 pp.
- PINEDA, M. 1998. Centro de Referencia Bacteriológica, Myers Squibb de Venezuela. 20 pp.
- PORTER, F., C. SILVER y H. NAKAHARA. 1982. *Antimicrobial Agents Chemother* 22: 852-858.
- TYNECKA, Z., Z. GOS y J. ZAJAC. 1981. *Journal Bacteriology* 133: 699-707.
- UDO, E. y W. GRUBB. 1990. *Journal Medical Microbiology*, 31: 207-212.
- VELAZCO, E., B. NIEVES, B. GUTIERREZ y M. SUAREZ. 1999. XXVI Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr. José Esparza". 68 pp.