

***Staphylococcus aureus*: sensibilidad a antibióticos, metales pesados y patrón plasmídico**

**Lorena Atencio-Bracho^{1*}, Mary Álvarez-González¹, Jorge Guíñez-Ortega²,
Xiomara Montiel² y Marianela Salas-Bracho¹**

¹Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, 4001-A Venezuela. ²Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A, Venezuela.

Recibido: 17-01-03 Aceptado: 15-02-05

Resumen

En la actualidad se ha reportado la existencia de cepas de *Staphylococcus aureus* endémicas de origen nosocomial, resistentes tanto a antibióticos como a metales pesados. Esta resistencia puede estar codificada en el DNA cromosomal o en uno o varios plásmidos. El objetivo de este trabajo ha sido determinar el perfil plasmídico de 21 cepas de *Staphylococcus aureus*, así como su fenotipo de sensibilidad a antibióticos de uso común, y a cadmio y mercurio presentes en el ambiente. La resistencia obtenida osciló entre 1 y 6 antibióticos. El 90,47% de las cepas fue resistente a penicilina y el 71,4% a oxacilina, siendo todas las muestras sensibles a trimetoprim-sulfametoxazol e imipenem. Se observó una CMI de 1000 µg/mL para el cadmio en un 28,57% de los aislados, y una CMI de 250 µg/mL para el mercurio en el 61,90% de los mismos. El protocolo de Lisis Alcalina Modificado permitió la caracterización del perfil plasmídico; observándose en el 95,24% de las cepas de 1 a 5 plásmidos con tamaños comprendidos entre 1,2 Kb y 88,144 Kb.

Palabras clave: Antibióticos; metales pesados; plásmido; resistencia; *Staphylococcus aureus*.

***Staphylococcus aureus*: sensibility to antibiotics, heavy metals and plasmidic profile**

Abstract

At present there has been reported the existence of strains of endemic *Staphylococcus aureus* of origin nosocomial, resistant both to antibiotics and to heavy metals. It is resistance can be codified in the DNA cromosomal or in that of one o more plasmids. The aim of this work has been characterize genetically 21 *Staphylococcus aureus* isolates, determining the profile plasmidic as well as the fenotipo of susceptibilty to antibiotics of common use, and to heavy metals present often in the environment. The obtained resistance ranged between 1 and 6 antibiotics. 90,47% of the strain it was resistant to penicillin and 71.4% to oxacillin, being all the capable samples to Trimethoprim- Sulfamethoxazole and imipenem. One was observed Minimal Inhibi-

* Autor de correspondencia. Teléfono: 0261-7981557. E-mail: lbatencio@hotmail.com; batencio@luz.edu.ve.

tory concentration (MIC) of 1000 g/mL for the cadmium in 28.57% of the isolated ones, and a MIC of 250 g/mL for the mercury in 61.90% of the same ones. The protocol of Modified Lisis Alcalina allowed the characterization of the profile plasmidic; being observed in 95.24% of the strain of 1-5 plasmid with sizes included between 1.2 Kb and 88.144 Kb.

Key words: Antibiotic; heavy metals; plasmid; resistance; *Staphylococcus aureus*.

Introducción

Actualmente la resistencia antimicrobiana se ha visto incrementada en una gran variedad de patógenos, debido principalmente a la presión selectiva a la cual son sometidos por el uso indiscriminado de estas drogas, tanto en ambientes comunitarios como hospitalarios. Dentro de estos patógenos se incluye a *Staphylococcus aureus*, patógeno endémico de origen nosocomial (1), asociándose con la alta prevalencia de genes de resistencia, y como parte importante en la diseminación de los mismos dentro de los hospitales, entre hospitales y entre países (2). Esta resistencia puede estar codificada en uno o varios plásmidos o cromosómicamente (3), encontrándose muchas veces que los genes de resistencia a antibióticos residen sobre plásmidos conjugativos que han jugado un papel importante en la dispersión de la resistencia a las drogas (4).

Igualmente han sido reportadas cepas resistentes a metales pesados, como cadmio (Cd) y mercurio (Hg), en diversos grupos de microorganismos. La correlación de la resistencia a metales pesados y a antibióticos entre aislados clínicos y ambientales es importante y ha sido muy estudiada (5). Las investigaciones experimentales indican que la exposición aumentada a estos metales altera varios parámetros del sistema inmunológico y conllevan a una susceptibilidad aumentada a las infecciones, enfermedades autoinmunes y manifestaciones alérgicas (6, 7), así como daño en el Sistema Nervioso Central (8).

Muchos autores han establecido que los genes que determinan la resistencia a la mayoría de los oxianiones y cationes tóxicos se encuentran principalmente a nivel plas-

mídico o transposones. Los mecanismos de resistencia a metales generalmente se basan en sistemas de transporte de membrana que elimina los iones tóxicos del citoplasma bacteriano (9, 11).

En base a lo expuesto anteriormente el objetivo de esta investigación ha sido determinar el patrón plasmídico de cepas de *Staphylococcus aureus*, así como el fenotipo de sensibilidad a antibióticos de uso común, y a metales pesados, como son mercurio y cadmio.

Materiales y Métodos

Población de estudio

Se estudiaron 21 muestras de *S. aureus* suministradas en tubos de agar conservación por el Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela, aisladas de individuos con diferentes patologías que acudieron a dicho centro hospitalario.

Identificación y caracterización de los aislados

Se realizó una caracterización macro y micro morfológica, así como bioquímica para cada una de las colonias bacterianas aisladas en agar Staph 110 y agar manitol salado (12).

Sensibilidad a antibióticos

Para evaluar la sensibilidad a antibióticos, se utilizó el Método de Difusión en Agar con Disco propuesto por Bauer y col. (13) utilizando placas de agar Mueller Hinton, las cuales fueron evaluadas luego de 18 horas de incubación a 37°C. Los antibióticos utilizados, manufacturados por Difco (Dis-

pens-O-Disc Susceptibility Test System) fueron los siguientes: Penicilina (10µg/mL), Oxaciclina (1µg/mL), Ceftriazone (30µg/mL), Imipenen (10µg/mL), Vancomicina (30µg/mL), Gentamicina (10µg/mL), Eritromicina (10µg/mL), Tetraciclina (30µg/mL), Ciprofloxacina (5µg/mL), Cloranfenicol (30µg/mL), Clindamicina (2µg/mL), Rifampicina (5µg/mL), Trimetoprin-Sulfametoxazol (25µg/mL), y Cefalotina (30µg/mL). Se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, 240 CECT como control.

Sensibilidad a metales pesados: Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de metal pesado utilizando placas con agar tripticasa soya y discos impregnados con el compuesto similar a los que se utilizan para los antibiogramas, según lo propuesto por Fredrickson y col. (14). Los filtros estándar, de 7 mm, contenían 25 µL de la solución con una concentración específica metal. Los metales utilizados fueron, cloruro de cadmio: CdCl₂ y cloruro de mercurio: HgCl₂ (concentraciones estándar: 10 y 10.000 µg/mL y, 10 y 1000 µg/mL respectivamente). Las placas fueron incubadas a 37°C por 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 de diámetro.

Extracción de los plásmidos crípticos: Se utilizó el protocolo de lisis alcalina modificada (15), para determinar el tamaño y número de los plásmidos presentes en las cepas bacterianas. La separación y observación de los plásmidos se realizó según especificaciones (16) por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% con EtBr (hasta una concentración final de 0,5 µg/mL) en una cámara horizontal sumergida a 50 voltios durante 7-8 horas. 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 estudio en comparación con las bandas del marcador de Peso Molecular (PM) (Lamba *HindIII*), relacionando de esta manera el PM con la movilidad de cada banda en el gel de agarosa (17).

Resultados y Discusión

Identificación morfológica y bioquímica: Las pruebas realizadas indicaron la presencia de 21 muestras de *S. aureus*.

Sensibilidad a antibióticos: Todas las cepas fueron resistentes a antibióticos, oscilando tal resistencia entre uno y 6 antibióticos, siendo la resistencia a dos antibióticos (38,95% de las cepas) el resultado más frecuente, seguido del 23,8% de resistencia a uno y a tres antibióticos. Estos resultados evidencian un fenotipo de multiresistencia en las cepas seleccionadas, al igual que los datos reportados por Álvarez y col. (18) y Pineda y col. (19).

Los antibióticos a los cuales se observó un mayor número de cepas resistentes fue a la penicilina y a la oxacilina (90,47 y 71,4%, respectivamente) (Tabla 1), lo cual han sido ampliamente reportado en cepas de *S. aureus* (18-23). De igual forma, se observó la aparición de resistencia intermedia a la ciprofloxacina, cloranfenicol y vancomicina en el 28,57%; 4,76% y 19% de las cepas respectivamente, resultados comparables con los reportados por la mayoría de los autores, los cuales señalan un bajo porcentaje de cepas resistentes a estos agentes (18-26).

Las Cefalosporinas tales como cefalotina y ceftriazone son utilizadas efectivamente en el tratamiento de la osteomielitis (27) y endocarditis estafilocócica. Esta efectividad se debe a la sensibilidad de un alto porcentaje de cepas a dichos agentes (28) lo cual es compatible con los resultados obtenidos en esta investigación (4,76% y 14,28% de muestras resistentes) (Tabla 1).

Tabla 1
Patrón de resistencia a antibióticos en 21 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras clínicas

Muestra	Resistencia	Resistencia Intermedia
PS1	Pe, Ox, Ctx, Cro, Gm, Ra	-
PS2	Pe, Ox	-
PS3	Pe, Ox	-
PS4	Pe, Ox, E, Te	-
PS5	Pe, Ox	-
PS6	Pe, Ox,	E
PS7	Pe, Ox, Te	-
PS8	Pe, Ox	-
PS9	Ox, Cc	-
PS10	Pe, Ox, Cro	-
PS11	-	Va
PS12	Pe, Ox	-
PS13	Pe, Ox	Cc, Va
PS14	Pe, Ox, Ra	Ctx, Cc, Va, E
PS15	Pe, Ox	Va
PS16	Pe	Cip, E
PS17	Pe	Ox, Cip, E
PS18	Pe	E
PS20	Pe	E, Cip
PS21	Pe, Ox, Cro	Cip, C, E, Te
PS24	Pe	Cip, Cc, E

Pe, penicilina; Ox, oxacilina; Cip, ciprofloxacina; Ctx, cefalotina; Cro, ceftriazone; C, cloranfenicol; CC, clindamicina; Va, vancomicina; Gm, gentamicina; E, eritromicina; Te, tetraciclina; Ra, rifampicina.

También se observó que para tetraciclina (9,52%), gentamicina y eritromicina y clindamicina las cepas fueron poco resistentes (4,76%), datos que concuerdan con lo reportado a nivel regional por Pineda y col. (19, 21) y Álvarez y col. (18), y mundial (20-22, 30, 31) (Tabla 1).

Por el contrario, se observó que el 100% de las muestras respecto a trimetoprim-sulfametoxazole e imipenem, antibióticos de uso común resultaron sensibles en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *S. aureus*, a pesar de los reportes de resisten-

cia a nivel regional y mundial a estos antibióticos (9,09% (18), 13,9% (22), 25,7% (32) y 45% (33).

Sensibilidad a metales pesados: Los iones inorgánicos o metales pesados tales como: cadmio, mercurio, arsenato, arsenito, plomo, antimonio, zinc y bismuto, son altamente tóxicos para la mayoría de las formas de vida presentes en el ambiente, por lo que no es sorprendente que la resistencia a los mismos haya sido desarrollada por algunas bacterias. La correlación entre la resistencia a metales pesados y la sensibilidad a antibióti-

cos ha sido comprobada tanto en aislados clínicos como en muestras ambientales (25, 26, 34). Muchos de estos iones forman parte de antisépticos y desinfectantes, muy utilizados en ambientes hospitalarios, situación que justifica la determinación de la resistencia a los mismos en nuestro entorno.

Como se observa en la Tabla 2 la sensibilidad a los distintos metales pesados probados es variable entre las cepas estudiadas, observándose CMI que oscilan entre 50 y 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el cadmio y para el mercurio entre 250 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se observó que en un 61,90% de las cepas la CMI a mercurio fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se-

guida de una CMI de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el 33, 33% de las muestras.

En el caso del cadmio se observó que el 28,57% de las muestras presentó una CMI de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguida de un 23,80% de las muestras con una CMI de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La resistencia obtenida es menor o igual a la reportada por otros autores (CMI más altas que 32 mg/L ó 8-16 mg/L) (26, 35).

Los resultados obtenidos permiten suponer que la aparición de patrones de resistencia a antibióticos y a metales pesados, específicamente en *S. aureus*, difieren ampliamente, quizás como respuesta a la presión selectiva a la cual es sometida esta bac-

Tabla 2
Concentración Mínima inhibitoria para metales pesados en 21 cepas de *Staphylococcus aureus*

Muestra	[C M I] de Cadmio $\mu\text{g}/\text{mL}$	[C M I] de Mercurio $\mu\text{g}/\text{mL}$
PS1	3000	250
PS2	8000	500
PS3	6000	250
PS4	5000	250
PS5	4000	250
PS6	4000	250
PS7	5000	250
PS8	5000	250
PS9	7000	500
PS10	10000	250
PS11	50	250
PS12	5000	500
PS13	3000	500
PS14	5000	>1000
PS15	6000	250
PS16	1000	250
PS17	1000	500
PS18	1000	250
PS20	1000	250
PS21	1000	500
PS24	1000	500

teria. De allí se deriva la importancia de estudiar los patrones de resistencia típicos de cada ambiente con la finalidad de indicar el tratamiento más efectivo contra infecciones generadas por la misma.

Extracción y estudio de plásmidos crípticos: Se procesaron las 21 muestras de *S. aureus*, para el estudio de ADN plasmídico, obteniéndose resultados positivos en el 95,24% de las cepas (Figuras 1, 2 y 3). El nú-

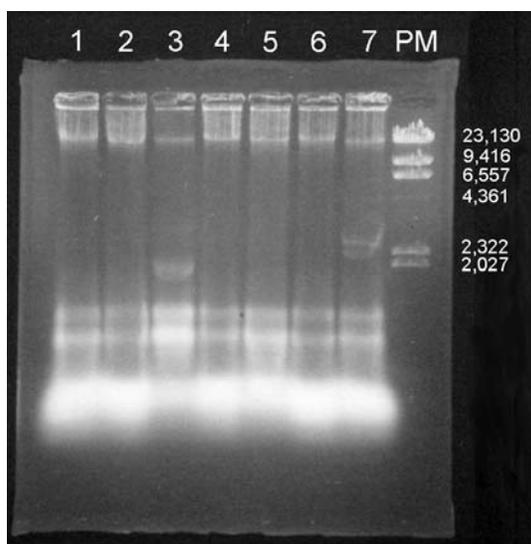


Figura 1. Perfil plasmídico de las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 de *S. aureus*.

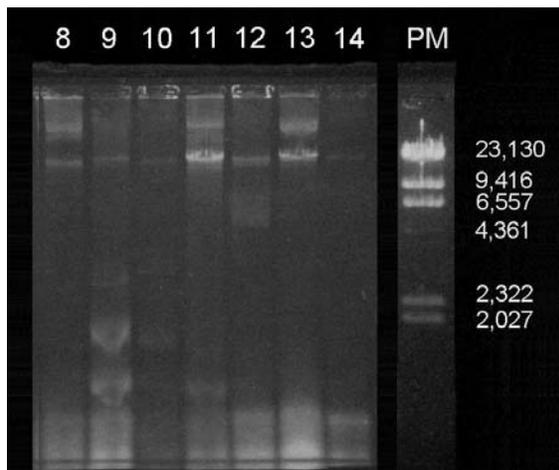


Figura 2. Perfil plasmídico de las cepas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 de *S. aureus*.



Figura 3. Perfil plasmídico de las cepas 15, 16, 17, 18, 20, 21, 24 de *S. aureus*.

mero de bandas presentes osciló entre 1 y 5 (Tabla 3), observándose la presencia de 5 bandas en el 54,54% de las muestras, el 27,27% presentaron 3 bandas y el 18,18% de las mismas presentaron 4 bandas visibles.

Las bandas observadas en el gel de electroforesis de cada una de las muestras procesadas oscilaron entre 1,2Kb y 88,144Kb al comparar la migración en los geles de agarosa y el marcador de peso molecular (Tabla 3), no obstante, es imperioso realizar digestión con enzimas de restricción de cada una de ellas para poder estimar el tamaño real de cada plásmido. Los patrones plasmídicos obtenidos se encuentran entre los rangos de tamaños reportados para *S. aureus* a nivel mundial (18, 34, 36-38).

Conclusiones

1. La mayoría de las muestras fueron multiresistentes a los antibióticos estudiados.
2. Las cepas estudiadas presentaron resistencia a las distintas concentraciones de cadmio y de mercurio seleccionadas, lo cual representa una situación alarmante desde el punto de vista epidemiológico.

Tabla 3
Patrón plasmídico de cepas de *Staphylococcus aureus*

Muestra	Tamaños (pb)	Total de plásmidos
PS1	23.127; 1.550; 1.240	3
PS2	23.127; 1.550; 1.240	3
PS3	23.127; 2.021; 1.550; 1.240	4
PS4	23.127; 1.550; 1.240	3
PS5	23.127; 1.550; 1.240	3
PS6	23.127; 1.550; 1.240	3
PS7	23.127; 2.641; 2.244; 1.550; 1.240	5
PS8	41.031; 37.857; 26.111	3
PS9	47.202; 26.111; 3.968; 2.857; 1.746	5
PS10	23.174; 4.603; 2.222; 1.428	4
PS11	44.027; 26.111; 1.746; 1.428	4
PS12	23.174; 7.619; 4.603; 1.428	4
PS13	37.857; 26.111; 1.428	3
PS14	47.202; 28.888; 9.539	3
PS15	-	-
PS16	50.446; 42.906; 23.373; 1.765; 1.607	5
PS17	66.319; 42.906; 23.373; 1.825; 1.607	5
PS18	23.373; 3.720; 1.825; 1.607	4
PS20	23.373; 1.765; 1.607	3
PS21	88.144; 44.825; 23.373	3
PS24	23.373; 1.765; 1.607	3

3. El protocolo seleccionado para el aislamiento de DNA plasmídico fue óptimo, obteniéndose que un alto porcentaje de las muestras estudiadas presentaron bandas plasmídicas variadas.

Agradecimientos

Los autores dan un respetuoso agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por el financiamiento de esta investigación (Proyecto 1798-00).

Referencias Bibliográficas

1. GOETZA, YU V. *Current opinion in Infectious Diseases* 10: 319-323, 1997.
2. LELIÉVRE H., LINA G., JONES M., OLIVE C., FOREY F., ROUSSEL-DELVALLEZ M., NICOLAS-CHANOINE M., BÉBÉAR C., JARLIER V., ANDREMONT A., VANDESNECH F., ETIENNE J. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3452-3457, 1999.
3. BERG T., FIRTH N., APISIRIDEJ S., HETTIARATCHI A., LEEAPORN A., SKURRAY R. *Journal of Bacteriology* 180: 4350-4359, 1998.

4. OUELLETTE M., KUNDIN CH. *International Journal of Antimicrobial Agents* 8: 179-187, 1997.
5. LYON B., SKURRAY R. *Microbiological Reviews* 51: 88-134, 1987.
6. BIGAZZI PE. *Lupus* 3: 449-453, 1994.
7. BERNIER J., BROUSSEAU P., KRZYSTYNIAK K., TRYPHONAS H., FOURNIER M. *Environmental Health Perspect* 103: 23-34, 1995.
8. ROELEVELD N., ZIELHUIS G., GABREELS F. *Br J Ind Med* 47: 580-588, 1990.
9. CERVANTES C., CHAVEZ J., VACA S. *Review Lat-americana Microbiology* 33: 61-70, 1991.
10. SILVER S., JI G. *Environmental Health Perspectives* 102: 107-113, 1994.
11. NIES D., SILVER S. *Journal Ind Microbiology* 14: 186-199, 1995.
12. HARRIGAN W., CANCE MAC. *Métodos de laboratorio en Microbiología*. Editorial Academia. España, pp. 67, 1996.
13. BAUER A., KIRBY M., SHORRIS J., TURK C. *American Journal Pathology* 45: 493-496, 1996.
14. FREDRICKSON J., HICKS R., BROCKMAN F. *Applied Environmental Microbiology* 54: 2916-2922, 1998.
15. MACRINA F., WOOD P., JONES K. *Application Environ Microbiol* 39:1070-1073, 1980.
16. AUSUBEL F., BRENT R., KINGSTONE R., MOORE D., SEIDMAN J., SMITH J., STRUHL K. *Short Protocols in Molecular Biology*. A Compendium of Methods from Currents Protocols in Molecular Biology, 1997.
17. MANIATIS T., FRITSCH E., SAMBROOK J. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, pp. 120, 1984.
18. ALVAREZ M., ATENCIO L., GUIÑEZ J., SUÁREZ J. *Bol Centro Invest Biol* 35: 124-140, 2001.
19. PINEDA M., BONILLA X., VARGAS J. *Centro de Referencia Bacteriológica*. 5ta edición. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo-Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social. pp. 68, 2002.
20. LESKI T., GNIADKOWSKI T., HRYNIEWICZ W. *Zentrablatt fur Bakteriologie* 287: 363-373, 1998.
21. PINEDA M. *Centro de Referencia Bacteriológica*, Myers Squibb de Venezuela. pp. 20, 1998.
22. KARKI T., TRUUSALU K., VAINUMAE I., MIKELSAAR M. *Scand J Infect Dis* 33: 333-338, 2001.
23. CHAN-TACK K.M. *South Med J* 94:619-620, 2001.
24. AL-HADDAD A.M., UDO E.E., MOKADAS E.M., SANYAL S.C., GRUBB W.B. *J Med Microbiol* 50:558-564, 2001.
25. CAFISO V., MESSINA C., SANTAGATI M., CAMPANILE F., BONFIGLIO G., STEFANI S. *Drugs Exp Clin Res* 27:107-111, 2001.
26. ALARCON T., SANZ J.C., BLANCO F., DOMINGO D., LOPEZ-BREA M. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:877-889, 1998.
27. GUGLIELMO B., LUBERA., PALETTA J. R., JACOBS R. *Clinical Infectology Disease* 30: 205-207, 2000.
28. VAZQUEZ F., FIDALGO S., MENDEZ F., MENDOZA M. *J Chemother* 1: 233-239, 1989.
29. DEMIN A., DROBYSHEVA V. *Antibiotic Khimioterapy* 43: 12-15, 1998.
30. QUENTIN C., GROBOST F., FISCHER I., DUTILH B., BROCHET J., JULLIN J., LAGRANGE I., NOURY P., LARRIBET G., ANDRE C., DUPOUEY S., BOISSINOT D. *Pathol Biol* 49: 33-40, 2001.
31. KOCHMAN M., FORDYMACKI P., LAWRYNOWICZ-PACIOREK M., KALUZEWSKI S., MESZAROS J., POLOWNIAK-PRACKA H., MAGDZIAK A., SZTANDAR-SZTANDERSKA M. *Med Dosw Mikrobiol* 52: 341-352, 2000.
32. PANIAGUA G., MONROY E., GARCIA., VACA S. *Rev Latinoam Microbiol* 40: 128-134, 1998.
33. SANTOS SANCHES I., MATO R., de LENCASTRE H., TOMASZ A. *Microb Drug Resist* 6: 199-211, 2000.

-
34. MLYNARCZYK A., MLYNARCZYK G., JEL-JASZEWICZ J. **Med Dosw Mikrobiol** 51:1-8, 1999.
35. POSTON S., LI SAW HEE F. **J Med Microbiol** 34: 193-201, 1991.
36. SKURRAY R., ROUCH D., LYON B., GILLESPIE M., TENNENT J., BYRNE M., MESSEROTTI L., MAY J. **J Antimicrob Chemother** 21: 19-39, 1988.
37. MLYNARCZYK A., MLYNARCZYK G., JEL-JASZEWICZ J **Zentralblatt fur Bakteriologie** 287: 277-314, 1998.
38. WERCKENTHIN C., SCHWARZ S., ROBERTS M.C. **Antimicrob Agents Chemother** 40: 2542-4, 1996.