

ANÁLISIS DEL PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS Y METALES PESADOS

Mary Álvarez, Lorena Atencio, Jorge Guíñez y Javier Suárez

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. E-mail: mcalvarez50@hotmail.com; jrguinez@luz.ve

Resumen. Recientemente se ha generado un incremento en la incidencia de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Esta resistencia se genera como una respuesta genética a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana, y puede estar codificada a nivel cromosómico o plasmídico. El objetivo de este trabajo consistió en determinar la ubicación de los determinantes de resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas de *S. aureus* multirresistentes. Se estudiaron 3 muestras de distintas fuentes. El protocolo utilizado para la extracción fue el de la lisis alcalina modificada, los resultados muestran la presencia de plásmidos en todas las cepas estudiadas. La eliminación de plásmidos con bromuro de etidio, permitió inferir la ubicación genética de los determinantes de resistencia, tal que, para la cepa MA7, no pudo establecerse una relación directa entre los plásmidos eliminados y la resistencia observada, sugiriendo que la resistencia puede estar codificada en un plásmido común, distribuida entre los plásmidos que no fueron curados o codificados cromosómicamente. El fenotipo de resistencia para la MA1 varió en un 100% de las colonias curadas, en relación con la resistencia a Ampicilina, Cefalotina y Tetraciclina, sugiriendo codificación plasmídica. Para la MA8, se observó la pérdida de la resistencia a Kanamicina y a Tetraciclina y la pérdida parcial de la resistencia a Estreptomicina. En todos los casos, se observa una reversión de la resistencia a Cadmio en los derivados curados, y el fenotipo de resistencia a Mercurio de los derivados curados es visiblemente diferente al de la cepa sin curar. *Recibido:* 17 Abril 2001, *aceptado:* 01 Febrero 2002.

Palabras clave: Curación, plásmidos, resistencia *Staphylococcus aureus*.

ANALYSIS OF PLASMIDIC PROFILES OF STRAINS OF *Staphylococcus aureus* MULTI-RESISTANT TO ANTIBIOTICS AND HEAVY METALS

Abstract. Recently an increment has been generated in the incidence of infections caused by *Staphylococcus aureus* multiresistant. This resistance is generated as a genetic answer to the selective pressure imposed by the antimicrobial therapy, and can be coded chromosomally or in one of several plasmids. The objective of this work consisted of determining the location of the resistance determinant to antibiotics and heavy metals in multi-resistant *S. aureus* strains. Three samples from different sources were studied. The protocol used for the extraction was that of modified alkaline lysis. The results showed plasmatic presence in all the studied strains. The plasmatic elimination with etidium bromide, permitted inference of the genetic location of the resistance determinant, such that, for the strain MA7, a direct relationship could not be shown between the plasmatic eliminate and the observed resistance, suggesting that the resistance could be coded in a common plasmatic distributed among plasmids that were not cured, or it could be coded chromosomally. The phenotype resistance for MA1 varied in 100% of the cured colonies, in connection with the resistance to Ampicillin, Cefalotin and Tetracyclin, suggesting plasmatic code. For the strain MA8 a loss of resistance to Kanamycin and Tetracyclin and a partial loss of the resistance to streptomycin was observed. In all the cases, a reversion was observed from the resistance to Cadmium in those derived cured, and the phenotype to Mercury resistance of those derived cured were visibly different to that of the strains without curing. *Received:* 17 April 2001, *accepted:* 01 February 2002.

Key words: Curing, plasmids, resistance, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

En la batalla entre el hombre y los microorganismos, en algún momento la ventaja fue, claramente, para el hombre, sin embargo, los microorganismos han contraatacado y existen ahora en el tercer milenio algunos microorganismos para los cuales ninguna droga simple es efectiva (Oullette y Kunding 1997). Igualmente muchos autores han reportado la correlación entre la resistencia a antibióti-

cos y a metales pesados, tanto en aislados clínicos como ambientales (Lyon y Skurray 1987).

Durante los últimos años, se ha generado un incremento dramático en la incidencia de infecciones asociadas a los hospitales causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiples antibióticos, lo cual ilustra la habilidad de las poblaciones microbianas de adaptarse o generar cambios que le permitan sobrevivir en este ambiente (Udo y Grubb 1990).

Esta resistencia tanto a antibióticos como a metales pesados puede estar codificada cromosómicamente o en uno o varios plásmidos (Berg *et al.* 1998).

De esta manera, la idea de que la resistencia a antibióticos sea un problema local ha sido desacreditada. La prevalencia de patógenos resistentes puede diferir de un lugar a otro, donde son observadas erupciones de situaciones endémicas de intensidad o gravedad especial (Pérez y Zigorruga 1995).

De esta situación deriva la importancia de determinar patrones de resistencia típicos de "cada país, cada lugar y cada hospital", con el fin de tener una idea clara de las alternativas que deben emplearse para una terapia efectiva, para lo cual es esencial conocer la naturaleza de los determinantes genéticos que codifican para esta resistencia, su mecanismo de acción y el mecanismo de diseminación de estos determinantes en la población microbiana (Cubillán 1999).

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la posible ubicación de los determinantes de resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas de *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

Se estudiaron 3 muestras provenientes de 2 laboratorios clínicos y fuentes distintas de la ciudad de Maracaibo, cuyo perfil de resistencia y plasmídico se muestran en la Tabla 1. Las muestras en es-

TABLA 1. Perfil Plasmídico y de Resistencia a Antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Cepa	Nº de plásmidos	Tamaño de plásmidos (Kb)	Perfil de Resistencia
MC7	5	29,4; 14,24; 4,86; 3,29; 2,69	Pe, Amp, Cro, Km, Te
MC1	4	37,59; 30,37; 23,18; 16,30	Pe, Amp; Ox, Ctr, Cro, E, Stx, Te
MC8	4	22,6; 4,92; 2,91; 2,1	Pe, Amp, Km, S, E, Te

tudio fueron la MA1, aislada del Hospital Universitario de Maracaibo y las muestras MA7 y MA8 aisladas del Laboratorio Clínico Santa Teresita.

MEDIOS UTILIZADOS

Caldo nutriente modificado (CNM) y agar nutriente modificado (ANM) (Suárez *et al.* 1999).

ELIMINACIÓN DE PLÁSMIDOS

La eliminación de plásmidos fue realizada en CNM (Suárez *et al.*) con diferentes concentraciones de bromuro de etidio (Brth), entre 50 y 15 mg/ μ L e incubado a 44°C por 20 horas (Álvarez 2000). Posteriormente se sembró una alícuota de esta suspensión en placas de ANM y las colonias viables fueron recultivadas.

EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS CRÍPTICOS

Para el aislamiento de ADN se utilizó el protocolo de Lisis Alcalina Modificada. La metodología empleada fue la siguiente: Cultivos de 24 horas en placas de ANM fueron cosechados y transferidos a un tubo eppendorf para centrifugación, el pellet obtenido se resuspendió en 500 μ L de buffer TES (0,05 M TrisHCl; 0,005 M EDTA; 0,03 M NaCl) y fue nuevamente centrifugado, el pellet obtenido se resuspendió en 50 μ L de lisostafina (0,5 mg/mL en TE –glucosa: TrisHCl 0,01M; EDTA 0,001M; glucosa 0,5M) y se le agregó

450 μ L de buffer TE-glucosa al tubo, el cual fue incubado a 37°C por 1 hora. Una vez incubado se agregó 75 μ L de buffer de lisis (SDS 10%; TrisHCl 0,05M; EDTA 0,01M -pH 8-) y mezclado suavemente por inversión, posteriormente se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se adicionó 400 μ L de acetato de potasio 5M fue nuevamente incubado en hielo por 30 minutos y centrifugado a 4°C por 20 min. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo nuevo y lavado con 600 μ L de CPI (Cloroformo-fenol-alcohol isoamílico; 25:24:1) se centrifugó por 10 minutos y la fase acuosa se combinó con etanol absoluto incubándose toda la noche a -20°C. Posterior a la incubación fue centrifugado 10 minutos y lavado con etanol 70%, centrifugado nuevamente y secado. La resuspensión del pellet se realizó en buffer TE (TrisHCl, 0,001M; EDTA, 0,001M).

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La separación y observación de los plásmidos se realizó en una cámara de electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 50 y durante 7-8 horas, en un gel de agarosa al 0,7% con 3 μ L de EtBr (10 mg/mL) para una concentración final de 0,5 μ g/mL. El DNA fue visualizado en un transiluminador UVP, Chomato-Vue (Ausubel *et al.* 1997). El tamaño de los plásmidos se determinó utilizando el programa computacional ORIGIN versión 5.0 para Windows, basado en las diferencias migratorias de las bandas de ADN obtenidas de las muestras y las bandas del marcador de PM en este caso λ digerido con *Hind III* estándar (Alvarez comunic. personal).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS GENÉTICO (PERFIL PLASMÍDICO) DE LA MUESTRA MA7 DE *S. Aureus*

La aplicación del protocolo de eliminación de plásmidos tuvo como objetivo principal determinar la existencia de alguna relación entre los plásmidos presentes en las muestra seleccionadas y su capacidad de conferir resistencia a antibióticos y a metales pesados.

Una vez obtenidas las colonias curadas en la mayor concentración (22,5 $\mu\text{g/mL}$) se realizó la extracción de plásmidos a 6 de las colonias. El resultado de esta extracción muestra que en las colonias L, N y U las bandas de 4,86 y 3,69 Kb. no son visibles, además se pudo observar ADN degradado (Figura 1).

Los resultados obtenidos del antibiograma se observan en la Tabla 2. El fenotipo de resistencia a antibióticos de las colonias L, N y U no varió, de lo cual se infiere que los plásmidos perdidos no están relacionados con la resistencia a la Penicilina, Ampicilina, Tetraciclina, Kanamicina o Ceftriazone. En este caso la resistencia puede estar codificada en el plásmido común de 29,4 Kb, distribuida entre los tres plásmidos que no fueron curados o a nivel cromosómico. En

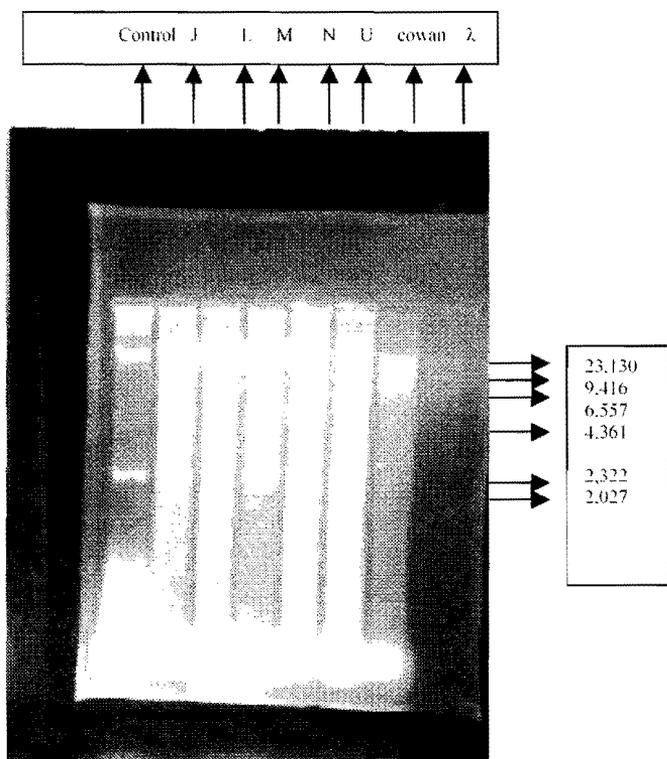


FIGURA 1. Extracción de ADN plasmídico de las colonias J,L,M,N,U y cowan de la muestra MA7.

relación a los metales, la muestra MA7 original es susceptible a 500; 250 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cadmio, sin embargo las colonias curadas fueron resistentes hasta 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de este ion, este resultado puede deberse a una mutación, producto de la exposición a bromuro de etidio. El patrón de resistencia a mercurio de las colonias curadas es distinta a la cepa MA7 sin curar, la cual es resistente a todas las concentraciones probadas de este ión; sin embargo, se observó que las colonias curadas fueron susceptible a 500, 250 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mercurio (las colonias L y N fueron resistentes a 100, 50 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mercurio, mientras que la colonia U mostró sensibilidad a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siendo resistente a 50 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Mercurio) lo cual permite inferir que la pérdida del plásmido de 4,86 Kb o el de 3,69 KB, está relacionada con la resistencia a altas concentraciones de este metal (Tabla 2).

ANÁLISIS GENÉTICO (PERFIL PLASMÍDICO) DE LA MUESTRA MA1 DE *S. aureus*

Para la cepa MA1, el número de colonias considerado óptimo para realizar la extracción se observó al someter a las células bacterianas a una concentración de 22,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brth. La extracción de ADN plasmídico se realizó a 6 colonias bacterianas y el resultado se muestra en la Figura 2.

TABLA 2. Tabla comparativa del fenotipo de resistencia a antibióticos y a metales pesados de los derivados a 22,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brth y la muestra MA7 sin curar.

Mues.	Antibióticos					Cadmio					Mercurio				
	Pe	Amp	Km	Te	Cro	500	250	100	50	10	500	250	100	50	10
MA7 sin curar	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
Col. L	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
Col. N	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
Col. U	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R

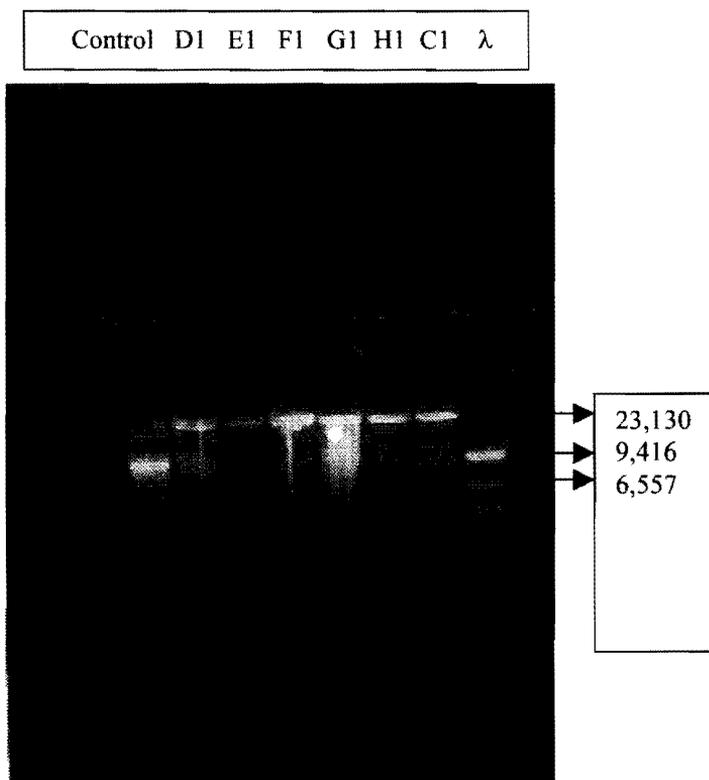


FIGURA 2. Extracción de ADN plasmídico de colonias curadas de la muestra MA1.

En la Figura 2 se observa la pérdida o eliminación de 3 de los plásmidos presentes en la cepa original sin curar, permaneciendo sólo el plásmido de 23,180 Kb.

El resultado del antibiograma se muestra en la Tabla 3 donde se observa que el fenotipo de resistencia a antibióticos varió en un 100% de las colonias curadas en relación con la resistencia a ampicilina, cefalotina y tetraciclina, de lo cual puede inferirse que están codificadas en alguno de los tres plásmidos perdidos, sin embargo este estudio no permitió determinar en cuál de estos plásmidos se encuentra codificada cada uno de estos determinantes de resistencia. También se observó una pérdida parcial de la resistencia a estreptomycinina

TABLA 3. Tabla comparativa de la resistencia a antibióticos y metales pesados de los derivados curados entre sí y con la muestra MA1 sin curar.

Muestra	Antibióticos										Metales		
	Pe	Amp	Oxa	Cro	Ctx	S	Stx	Te	E	Cadmio (500 µg/mL)	Mercurio (50 µg/mL)		
MA1 sin curar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R		
Col. D1	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R		
Col. E1	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R		
Col. F1	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R		
Col. G1	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R		
Col. H1	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R		
Col. C1	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R		

y eritromicina, lo cual puede ser producto de daños ocasionados en los determinantes que codifican para estas resistencias. Se observó la pérdida de la resistencia a Stx en dos de las colonias sometidas al proceso. En cuanto a la resistencia a metales, el fenotipo de resistencia de la cepa MA1 no varió al someter a los derivados curados a exposición con bromuro de etidio en relación con el Mercurio, lo cual indica que los plásmidos que fueron eliminados no tienen relación con esta resistencia. En cuanto al Cadmio, al igual que en el caso anterior (MA7) se observa una reversión de la resistencia siendo esta cepa originalmente susceptible a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cadmio y sus derivados curados resistentes (Tabla 3). Dado que no se observa variación fenotípica relacionada con la resistencia a Mercurio puede inferirse que los plásmidos presentes en esta cepa no están relacionados con la resistencia a este ion, y que además puede presentar copia a nivel de genoma que codifique la resistencia a bajas concentraciones del metal.

ANÁLISIS GENÉTICO (PERFIL PLASMÍDICO) DE LA MUESTRA MA8 DE *S. aureus*

Para la muestra MA8, se utilizó una concentración de Brth de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brth, dato que permite inferir una mayor resistencia al bromuro de etidio en esta cepa.

La extracción de ADN plasmídico se realizó a 7 colonias, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y los resultados se observan en la Figura 3.

La Tabla 4 muestra el perfil de resistencia a antibióticos de las colonias curadas que es al de cepa original, se observa la pérdida de la resistencia a la Kanamicina y a la Tetraciclina en todas las colonias y la pérdida parcial, al igual que en el caso anterior, de la resistencia a Estreptomicina.

También se observa una reversión de la resistencia a cadmio en los derivados curados, hecho que se evidencia en todos los ensayos y lo cual confirma que los plásmidos perdidos no tienen que ver con la resistencia al Cadmio. El fenotipo de resistencia a Mercurio

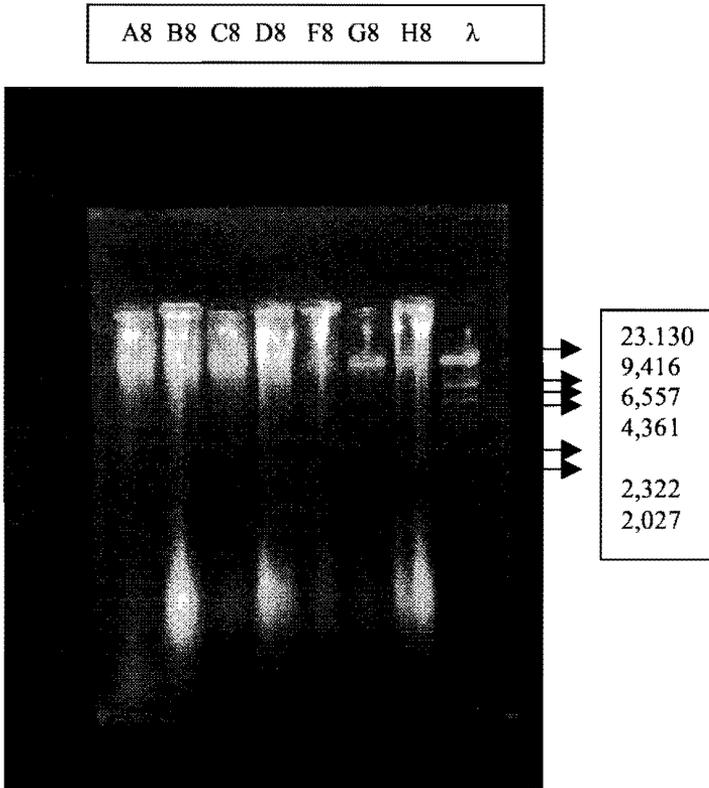


FIGURA 3. Extracción de ADN plasmídico de colonias curadas de la muestra MA8.

de los derivados curados es visiblemente diferente al de la cepa sin curar mostrando susceptibilidad en todas las concentraciones del metal (Tabla 4).

CONCLUSIONES

Si bien no se realizó un muestreo intensivo y extensivo, los resultados de esta investigación son importantes, por lo que ello significa en el momento de atacar un proceso infeccioso inducido por cepas de *S. aureus*. La correlación entre la resistencia a antibióticos y metales pesados ya ha sido estudiada a nivel mundial; sin embargo la

TABLA 4. Tabla comparativa de la resistencia a antibióticos y a metales pesados de los derivados curados entre sí y con la muestra MA8 sin curar.

Muestra	Antibióticos							Metales		
	Pe	Amp	Na	Cro	Km	S	Te	E	Cadmio (250 µg/mL)	Mercurio (250 µg/mL)
MA1 sin curar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Col. A8	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S
Col. B8	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S
Col. C8	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S
Col. D8	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S
Col. F8	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S
Col. G8	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S

diversidad que las cepas del género *Staphylococcus* presenta a nivel de especie y variedad y las reversiones y cambios que ocurren a nivel plasmídico, convierten estos resultados en aportes importantes para el control de patologías infecciosas, incrementando la actividad al momento de seleccionar los tratamientos.

Para la cepa MA7, no pudo establecerse una relación directa entre la presencia de los plásmidos de 4,86 y 3,29 Kb y la resistencia a penicilina, ampicilina, Kanamicina, Tetraciclina y Ceftriazone. Tal que la resistencia puede estar codificada en el plásmido común de 29,4 Kb, distribuida entre los tres plásmidos que no fueron curados o a nivel cromosómico.

Relacionando los resultados de los antibiogramas de las cepas MA1 y MA8 con respecto a sus perfiles plasmídicos, se pudo inferir que la resistencia a tetraciclina, puede estar codificada en elementos móviles. Este resultado sugiere que los genes que codifican para la ampicilina y la cefalotina estén ubicados en alguno de los otros tres plásmidos que se pierden al curar la cepa MA1, es decir, en el de 37,59 Kb, 30,37 kb o 16,30 Kb. Y la resistencia a Kanamicina debe estar codificada en alguno de los otros plásmidos presentes en la cepa MA8 que no se observa en la cepa MA1.

En todos los casos se observa una reversión de la resistencia a cadmio en los derivados curados, lo cual puede deberse a un cambio o mutación con el fin de garantizar la supervivencia de la bacteria al ser sometida al bromuro de etidio, y por ende no estar relacionado con las determinantes plasmídico, puede atribuírsele a los plásmidos eliminados tanto en la cepa MA1 como en la MA7 la codificación de la resistencia a mercurio y dado que en ambos se pierden un plásmido de tamaño similar (4,86 y 4,92 respectivamente) podría inferirse que la ubicación genética de los determinantes de resistencia para este metal se encuentran en plásmidos de este tamaño. Es probable que la resistencia a altas concentraciones de Mercurio esté codificada en plásmidos, sin embargo, debe suponerse la existencia de copias a nivel cromosómico de determinantes de resistencia bajas concentraciones del metal.

Este protocolo de eliminación de plásmidos no permite determinar la ubicación exacta de los determinantes de resistencia en los plásmidos ya al perderse 2 o más plásmidos a la vez no se sabe a ciencia cierta donde se encuentran estos determinantes.

La relevancia de esta investigación es consecuente con la importancia que reviste el uso de terapias con antibióticos sin conocer la sensibilidad del organismo que se pretende atacar, ocasionando las conocidas consecuencias en la flora normal y en los microorganismos causantes de la patología. Los resultados de este trabajo ofrecen un aporte al área de salud, especialmente por tratarse de cepas bacterianas relacionadas con infecciones de alta frecuencia.

LITERATURA CITADA

- AUSUBEL, F; R, BRENT; R, KINGSTONE; D, MOORE; J, SEIDMAN; J, SMITH y K, STRUHL. 1997. A Compendium of Methods from Currents Protocols in Molecular Biology. Short Protocols in Molecular Biology, third edition, John Wiley and Son edition, United States.
- BERG, T; N, FIRTH; S, APISIRIDEJ; A, HETTIARATCHI; A, LEEAPORN y R, SKURRAY. 1998. Complete Nucleotide Sequence of pSK41: Evolution of Staphylococcal Conjugative Multiresistance Plasmid. *Journal of Bacteriology*, 180 (17): 4350-4359.
- CUBILLAN, K. 1999. En Venezuela existe un Alto Consumo de Antibióticos. *Panorama, Salud*, p 4-5.
- LYON, B y R, SKURRAY. 1987. Antimicrobial Resistance on *Staphylococcus aureus*: Genetics Basis. *Microbiological Reviews*. 51 (1): 88- 134.
- OUELLETTE, M. y CH, KUNDIN. 1997. Microbial Multidrug Resistance. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents* 8: 179-187.
- PEREZ, E. y C. ZIGORRAGA. 1998. Resistance to Antimicrobial Agent as a Public Health Problem: Importance of the use of Antibiotic in Animals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 6: 59-63.
- SUAREZ, J; M, BRACHO; M, ALVAREZ; R, COLMENARES; A, GONZÁLEZ; F, GONZÁLEZ; E, NARVÁEZ; L, ATENCIO y J GUIÑEZ. 1-4 de Noviembre 1999. Determinación de la Eficiencia en

la Aceleración de la Obtención de Biomasa Bacteriana del Coqui-Broth. XXI Jornadas Venezolana de Microbiología “Dr. José Esparza”, Valencia, Venezuela.

UDO, E. y W. GRUBB. 1990. A New Class of Conjugative Plasmid in *Staphylococcus aureus*. Journal Medical Microbiology, 31: 207-212.