

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y METALES PESADOS Y PERFIL PLASMÍDICO EN *Escherichia coli*

Enid Narváez¹, Mary Álvarez¹, Jorge Guíñez² y Lorena Atencio^{1*}

¹Laboratorio de Genética y Biología Molecular. ²Laboratorio de Inmunología.

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo 4001-A, Venezuela.
Telf: (0261) 7981557. E-mail: lbatencio@yahoo.com

Resumen. Se caracterizó la susceptibilidad a antibióticos, a metales pesados, y el perfil plasmídico en cepas de *Escherichia coli* aisladas de clínicas en Maracaibo, Venezuela. Para evaluar la sensibilidad a antibióticos, se utilizó el método de difusión en discos, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de metal pesado, mientras que la lisis alcalina, se empleó para determinar el número y tamaño de las bandas plasmídicas presentes. Las cepas resultaron multiresistentes a las drogas, mostrando resistencia a cinco o más antibióticos. Se obtuvo una CMI máxima de 9.000mg/mL para el Cadmio, mientras que el 75% de las muestras presentaron una CMI máxima de 250 mg/mL de Mercurio. Se observó en el 75% de las cepas ensayadas, entre 1 y 4 bandas plasmídicas de tamaños variables (3,1 kb – 30,4 kb). El análisis de agrupamiento permitió visualizar dos grupos principales, sugiriendo la posible dispersión de cepas con multiresistencia en la zona Norte de la ciudad de Maracaibo, las cuales podrían participar en la transferencia y diseminación de determinantes de resistencia.

Palabras clave: Antibióticos, Cadmio, *Escherichia coli*, metales pesados, Mercurio, plásmidos, resistencia.

* Autor para correspondencia

Recibido: 19 Mayo 2003 / Aceptado: 14 Marzo 2005
Received: 19 May 2003 / Accepted: 14 March 2005

SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS AND HEAVY METALS AND THE PLASMIDIC PROFILE OF *Escherichia coli*

Abstract. We determined susceptibility to antibiotics and heavy metals, and the plasmidic profile in strains of *Escherichia coli* isolated from clinics in Maracaibo, Venezuela. The disk diffusion method was used to evaluate sensibility to antibiotics. The minimal inhibitory concentration (MIC) of heavy metal was determined, as well as the number and size of plasmid bands (by alkaline lysis protocol). All strains were multiresistant to the drugs, exhibiting resistance to five or more antibiotics. A maximum MIC of 9,000 $\mu\text{g/mL}$ was obtained for Cadmium, whereas 75% of the samples presented a maximum MIC of 250 $\mu\text{g/mL}$ for Mercury. In 75% of the strains, we observed from one to four plasmid bands with variable sizes (3,1 kb-30,4 kb). Cluster analysis showed two principal groups, suggesting the possible dispersion of multiresistant strains in the northern zone of Maracaibo city. These multiresistant strains may be starting points for the transfer and dissemination of decisive resistance.

Key words: Antibiotics, Cadmium, *Escherichia coli*, heavy metals, Mercury, plasmids, resistance.

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos ejerce una fuerte presión selectiva que contribuye a la aparición de microorganismos con resistencia a múltiples drogas (Hamilton Miller 2004). Numerosos trabajos mencionan el aislamiento de cepas de *Escherichia coli* con resistencia incrementada a la combinación de varios antibióticos, siendo muchas de ellas de origen clínico (Nascimento *et al.* 1999), lo cual dificulta la elección de la terapia antimicrobiana. Se han descrito determinantes de resistencia codificados en plásmidos conjugativos. Estos plásmidos de resistencia al fármaco codifican también cierta capacidad de las bacterias a tolerar elevados niveles de iones como el Mercurio y el Cadmio. Este fenómeno se ha descrito en *E. coli* proveniente de muestras clínicas, ambientales e incluso, alimentarias (Nascimento *et al.* 1999, Cardonha *et al.* 2004). El Cadmio se

utiliza frecuentemente en la preparación de alimentos para animales. El Mercurio es un componente frecuente de muchos antisépticos y desinfectantes. La presencia de bacterias resistentes a metales pertenecientes a la microflora normal, ha sido reportada recientemente (Edlund *et al.* 1996).

El conocimiento de los patrones de resistencia son esenciales para establecer estrategias de tratamiento y control efectivas, tanto en áreas de la salud, como ambientales (Ouellette y Kunding 1997). Dada la importancia y actualidad del tema para la salud de la población, esta investigación aporta información sobre la susceptibilidad de *Escherichia coli*, a antibióticos y metales pesados en aislados clínicos y la caracterización de su perfil plasmídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Se procesaron 25 muestras fecales provenientes de dos laboratorios clínicos privados en Maracaibo, Venezuela. Estas se recolectaron en recipientes especiales y se anexaron datos referentes a su apariencia visual como color y textura, así como también el nombre del laboratorio, procedencia, la edad y el sexo del donante. Se sembraron alícuotas de diluciones de las muestras (1:10) en solución salina al 0,85% y se aislaron, por agotamiento, en medios de cultivo específicos para enterobacterias (Agar Eosina Azul de Metileno (EAM) y agar Mc Conkey. Posteriormente se utilizaron pruebas bioquímicas presuntivas y confirmativas para su identificación, con la finalidad de obtener cepas puras de *Escherichia coli* de origen clínico (Harrigan y Cance 1996).

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

La susceptibilidad, de las cepas aisladas, se determinó por el método de difusión en agar con disco propuesto por Bauer *et al.* (1966), utilizando agar Mueller Hinton. Los antibióticos utilizados, manufacturados por Difco (Dispens-O-Disc Susceptibility Test System) (Tabla 1), son representativos de los distintos grupos de antimicrobianos clasifica-

TABLA 1. Antibióticos seleccionados para el estudio de susceptibilidad en *Escherichia coli*.

Nombre	Concentración (µg/mL)	Nombre	Concentración (µg/mL)
Ácido Nalidíxico	30	Estreptomicina	10
Ampicilina	10	Imipenem	10
Ampicilina Sulbactam	20	Kanamicina	30
Aztreonam	30	Lomefloxacina	10
Carbenicillina	100	Nitrofurantoina	300
Cefalotina	30	Norfloxacina	10
Cefazolina	30	Penicilina	10
Cefoperazona	75	Piperacilina	100
Cefuroxima	30	Rifampicina	5
Ceftriazone	30	Tetraciclina	30
Ciprofloxacina	5	Tobramicina	10
Eritromicina	15	Trimetoprin	5

Manufacturados por Disco (Dispens-O-Disc Susceptibility Test Systems).

dos según su blanco de acción. Algunos, de estos agentes, no son específicos para el tratamiento de *E. coli* pero evidencian la capacidad que tiene este organismo como reservorio de genes de resistencia.

SUSCEPTIBILIDAD A METALES PESADOS

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los metales pesados, Mercurio y Cadmio (CdCl_2 y HgCl_2), en cada una de las cepas estudiadas utilizando placas que contenían agar Mueller Hinton y discos impregnados del metal, según lo propuesto por Fredrickson *et al.* (1988).

Los filtros estándar (7 mm) se prepararon aplicando 25 mL de la solución con una concentración específica del metal y secados al aire posteriormente. Las concentraciones estándar de los metales fueron:

10, 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ por disco, y la máxima concentración utilizada para el Cadmio fue de 10.000 $\mu\text{g/mL}$.

Las placas se incubaron a 37°C por un lapso de 24 a 48 horas, procediendo luego a la medición de los diámetros de las zonas de inhibición. La CMI se determinó como la cantidad de metal mínima requerida para producir una zona de inhibición de 10 mm según lo calculado a partir de la ecuación de regresión propuesta por Fredrickson *et al.* (1988).

EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CRÍPTICOS

Se utilizó el protocolo propuesto por Kado y Liu (1981), para la determinación del número y el tamaño de las bandas plasmídicas 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 y durante 7 a 8 horas, en geles de agarosa al 0,8% con Bromuro de Etidio (0,5 $\mu\text{g/mL}$).

El ADN se visualizó en un transiluminador UVP, Chomato-Vue, y el tamaño de los plásmidos se determinó a través de un programa computacional ORIGIN versión 5,0 para Windows, basado en la migración de las bandas de ADN de la muestra en comparación con las bandas del marcador de PM (Lambda digerido con *HindIII*); relacionando de esta manera el peso molecular con la movilidad de cada banda en el gel (Ausubel *et al.* 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron e identificaron, morfológica y bioquímicamente, 8 cepas de *Escherichia coli*. Las cepas EN3 y EN11 se obtuvieron de muestras provenientes de un Laboratorio Clínico privado 1, mientras que las cepas EN5, EN7, EN11, EN13, EN14 y EN17 se extrajeron de muestras fecales de un Laboratorio Clínico privado 2, de Maracaibo, estado Zulia.

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

El 100% de las cepas presentaron multiresistencia a 5 o más de los antibióticos ensayados (Tabla 2). Todas las cepas fueron resistentes a los medicamentos Eritromicina y Penicilina (Tabla 3), antibióticos de excesivo consumo dentro de la población mundial considerados los más antiguos dentro de los macrólidos y los β lactámicos respectivamente (Bywater *et al.* 2004).

Los valores relativamente altos de resistencia a la Rifampicina (87,5%), Estreptomicina (75%), a la Tetraciclina (62,5%) y Cefalotina (62,5%) son comparables a los reportados por otros autores (Atencio *et al.* 2003, Sato *et al.* 2005). Sin embargo, el valor correspondiente a la Ampicilina es menor que los reportados por Pineda *et al.* (2002) (59% y 69%). Por otra parte, la totalidad de las muestras presentó susceptibilidad (0% de resistencia) a 11 antibióticos utilizados comúnmente en el control de infecciones producidas por *E. coli* (Tabla 3). La susceptibilidad a la combinación Ampicilina/Sulbactam, al Aztreonam, Piperacilina, Trimetoprim y Tobramicina, no coinciden con las observaciones

TABLA 2. Patrón de resistencia a los antibióticos en las cepas de *Escherichia coli*.

Cepa	Antibióticos a los cuales fue resistente	Cepa	Antibióticos a los cuales fue resistente
EN5	Amp, Cmx, E, Pc, Rf	EN14	Cr, Cmx, Cro, E, Sm, Pc, Rf
EN13	E, Sm, Km, Pc, Rf	EN7	Amp, Cb, Cr, Cmx, E, Sm, Rf, Tet, Pc
EN9	Cb, Cr, Cmx, E, Pc, Te	EN17	Cr, Cmx, Cro, E, Sm, Km, Pc, Rf, Te
EN11	Cmx, E, Sm, Pc, Rf, Te	EN3	Amp, Cr, Cz, Cmx, E, Sm, Pc, Rf, Te, Tmp

Amp: Ampicilina. Cmx: Cefuroxima. E: Eritromicina. Pc: Penicilina.
 Rf: Rifampicina. Sm: Estreptomicina. Km: Kanamicina. Cb: Carbenicilina.
 Cr: Cefalotina. Cro: Ceftriazone. Te: Tetraciclina. Cz: Cefazolina.
 Tmp: Trimetoprin.

TABLA 3. Comportamiento general de las cepas de *Escherichia coli* frente a los antibióticos ensayados.

Antibióticos	Nº total de cepas resistentes	Porcentaje de resistencia (%) ^a
Eritromicina/Penicilina	8	100,0
Rifampicina/Cefuroxima	7	87,5
Estreptomicina	6	75,0
Cefalotina/ Tetraciclina	5	62,5
Ampicilina	3	37,5
Carbenicilina/ Kanamicina/ Ceftriazone	2	25,0
Timetoprin/ Cefazolina	1	12,5
Ampicilina Sulbactam/ Piperilina/ Imipenem/ Aztreonam/ Cefoperazona/ Tobramicina/ Ac. Nalidíxico/ Ciprofloxacina/ Lomefloxacina/ Norfloxacina / Nitrofurantoína	0	0

a: en función del número total de cepas.

de otros autores (Koeck *et al.* 1996); sin embargo, la sensibilidad de *E. coli* a la Cefoperazona y a la Nitrofurantoina ha sido reportada por Pine-da *et al.* (2002) y Sannes *et al.* (2004).

SUSCEPTIBILIDAD A METALES PESADOS

La exposición bacteriana al Cadmio arrojó los siguientes resultados: el 50% mostró una CMI de 6.000 µg/mL, el 25% de 7.000 µg/mL mientras que el restante 25% se dividió en, un 12,5% que mostró una CMI de 9.000 µg/mL y un 12,5% de 750 µg/mL. Este resultado coincide con lo reportado por López *et al.* (1997). Sin embargo, se observó que la CMI para las muestras estudiadas es mucho más alta que la reportada por Bhattacharyya *et al.* (1989) para cepas sensibles (entre 0,8 y 5 mg/mL).

La resistencia al Mercurio fue variable entre las cepas. EN5 presentó una CMI máxima de 500 $\mu\text{g/mL}$, la más alta probada, mientras que EN3, EN9, EN13, EN14 y EN17 (75%) alcanzaron una CMI de 250 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, EN7 y EN9 fueron resistentes a una CMI de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Cardonha *et al.* 2004).

Estos valores podrían ser una consecuencia de la exposición relativamente alta de la población zuliana a estos metales, ocasionando la diseminación de cepas bacterianas resistentes al Mercurio. Es importante estudiar los patrones de resistencia a metales pesados ya que la mayoría de los antisépticos y desinfectantes de uso clínico contienen agentes organomercuriales. El potencial incremento de la tolerancia del microorganismo a estos antisépticos y desinfectantes, podría conducir a una desinfección inadecuada de los ambientes intrahospitalarios (Álvarez *et al.* 2001).

EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DEL PERFIL PLASMÍDICO

En la Tabla 4 y la Figura 1 se muestra el perfil plasmídico de las bacterias estudiadas, determinándose en 6 de éstas la presencia de bandas plasmídicas (EN3, EN7, EN11, EN13, EN14 y EN17). Se apreciaron entre 1 y 4 bandas por microorganismo, con tamaños

Tabla 4. Perfil de bandas plasmídicas de *Escherichia coli* aisladas de muestras clínicas.

Cepa	No. de plásmidos	Tamaños aproximados (kb)
EN3	3	16,8/ 5,9/ 4,5
EN5	-	-
EN7	1	30,4
EN9	-	-
EN11	4	16,9/ 7,0/ 5,1/ 3,1
EN13	1	15,0
EN14	2	14,03/ 7,1
EN17	3	14,04/ 7,1/ 4,5

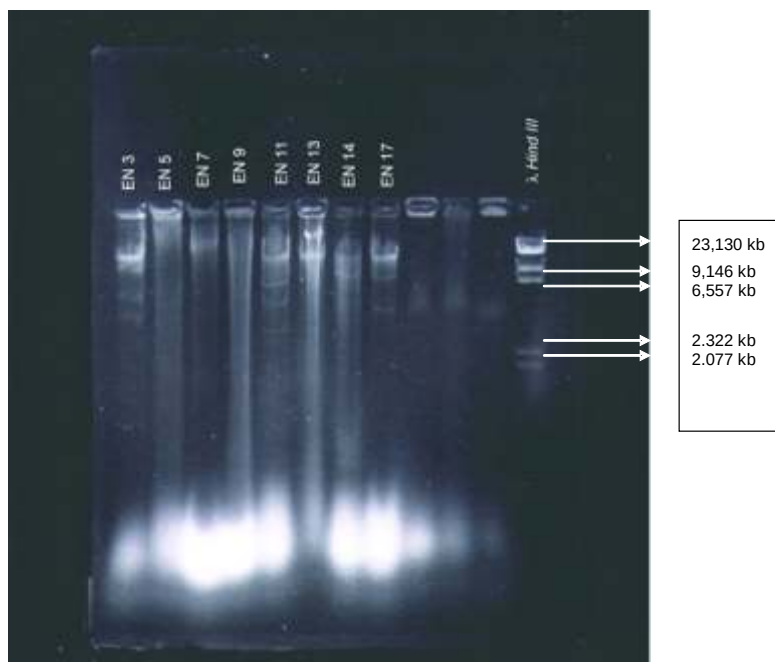


FIGURA 1. Extracción de ADN plasmídico de cepas multiresistentes de *Escherichia coli*.

comprendidos entre 3,1 kb y 30,4 kb (Tabla 4). No obstante, se debe considerar que sin someter a estos elementos extracromosomales a digestión con enzimas de restricción es imposible indicar un tamaño preciso de cada uno de ellos (Ausubel *et al.* 1997). Todas las cepas presentan un perfil de bandeo distinto. Sin embargo, se pudo observar que existen tamaños aproximados comunes entre algunas de las cepas, como son las bandas de 16 kb, 14 kb, 7 kb, y 4 kb. Esto se podría relacionar con el comportamiento heterogéneo, pero coincidente, en los perfiles de resistencia a antibióticos mostrado entre las muestras analizadas.

CONCLUSIONES

La aparición de multiresistencia a antimicrobianos es frecuente en la población bacteriana estudiada. Se encontró una resistencia im-

portante de este microorganismo a elevados niveles de mercurio y cadmio. Las cepas seleccionadas presentaron perfiles de bandas plasmídicas variados.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de los laboratorios privados que permitieron la toma de las muestras, y del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, por facilitar la infraestructura para la realización de la fase experimental de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- ÁLVAREZ M. C., L. ATENCIO, J. GUIÑEZ y J. SUÁREZ. 2001. Caracterización del perfil plasmídico y de resistencia a antibióticos y metales pesados de cepas de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Bol. Centro Invest. Biol. 37(2): 24-140.
- ATENCIO L., M. SALAS, E. NARVÁEZ, J. SUÁREZ y J. GUIÑEZ. 2003. Incidencia y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* en individuos sanos y enfermos en Maracaibo-Venezuela. Bol. Centro Invest. Biol. 37(2): 118-133.
- 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 current protocols in molecular biology. John Wiley y Son, Inc., USA. 250 pp.
- BAUER A., M. KIRBY, J. SHORRIS y C. TURK. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standarized single disc methods. Am. J. Pathology 45: 493-496.
- BHATTACHARYYA G., J. CHAUDHURI, S. BHAKTA y A. MANDAL. 1989. Cadmium resistance in some members of Enterobacteriaceae. Indian J. Exp. Biol. 27(6): 574-575.
- BYWATER R., H. DELUYKER, E. DEROOVER, A. DE JONG, H. MARION, M. MCCONVILLE, T. ROWAN, T. SHRYOCK, D. SHUSTER, V. THOMAS, M. VALLE y J. WALTERS. 2004. A European survey of antimicrobial sus-

ceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(4): 744-754.

CARDONHA A., R. VIEIRA, D. RODRIGUES, A. MACRAE, G. PEIRANO y G. TEOFILO. 2004. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Int. Microbiol.* 7(3): 213-218.

EDLUND C., L. BJORKMAN, J. EKSTRAND, G. SANDBORGH ENGLUND y C. NORD. 1996. Resistance of normal human microflora to mercury and antimicrobials after exposure to mercury from dental amalgam fillings. *Clin. Infect. Dis.* 22(6): 944-950.

FREDRICKSON J., R. HICKS, S. W. LI y F. BROCKMAN. 1988. Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(12): 2916-2923.

HAMILTON MILLER J. M. 2004. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *International J. Antimicrobial Agents* 23: 209-212.

HARRIGAN W. y CANCE MAC. 1996. Métodos de laboratorio en microbiología. Editorial Academia, España. pp. 10, 22, 23 y 67.

KADO C. y S. LIU. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol.* 145(3): 1365-1373.

KOECK J., J. CAVALLO, R. FABRE, M. MEYRAN y R. ROUE. 1996. Antibiotic sensitivity of aerobic gram negative bacilli isolated from severe infections in 1992, results of a French multicenter study. Groupe d'infections a bacilles a gram negative (GEIGN). *Presse-Med.* 25(30): 1363-1366.

LÓPEZ R, J. VIVES y J. GARCIA. 1997. Exogenous isolation of Hgr plasmids from coastal Mediterranean waters and their effect on growth and survival of *Escherichia coli* in sea water. *Microbios* 92(371): 109-122.

NASCIMENTO A., C. CAMPOS, E. CAMPOS, J. AZEVEDO y E. CHARTONE SOUZA. 1999. Re-evaluation of antibiotic and mercury resistance in *Escherichia coli* populations isolates in 1978 from Amazonian rubber tree Tappers and Indians. *Res. Microbiol.* 150(6): 407-411.

OUELLETTE M. y C. KUNDING. 1997. Microbial multidrug resistance. *Internacional J. Antimicrobial Agents* 8: 179-187.

- PINEDA M., X. BONILLA y J. VARGAS. 2002. Boletín sobre etiología y resistencia bacteriana (5 ed.). Centro de Referencia Bacteriológica, S. A. H. U. M. 192 pp.
- SANNES M., M. KUSKOWSKI y J. JOHNSON. 2004. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urine of women with cystitis or pyelonephritis and feces of dogs and healthy humans. J. Am. Vet. Med. Assoc. 225(3): 368-373.
- SATO K, P. BARTLETT y M. SAEED. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. J. Am. Vet. Med. Assoc. 226(4): 589-594.