



*UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO*

ESCUELA DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

*"SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS Y METALES PESADOS EN
AISLADOS CLÍNICOS DE *Escherichia coli*"*

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUIMICO FARMACOBIOLOGO

*PRESENTA
MARIA FANI MOJICA HERNANDEZ*

*ASESOR
D.C. MA. SOLEDAD VAZQUEZ GARCIDUEÑAS*

MORELIA MICHOACÁN, JUNIO DE 2006

DEDICATORIA:

Este trabajo lo dedico a aquellas personas que durante mi vida me han brindado su ayuda incondicional, su confianza, cariño, me han dado la fuerza necesaria para seguir adelante en los momentos en que sólo veo la vida pasar, cuando eh caído y han estado ahí para ayudarme a levantarme y sobre todo por sus consejos tan acertados que sin ellos no hubiese podido terminar mi carrera. A los seres más maravillosos del mundo. MIS PAPÁS

*Sr. Rafael Baltazar Mojica León
Sra. Roselia Hernández Guillén*

AGRADEZCO:

A Dios por estás siempre conmigo, por tu presencia en los mementos de felicidad y de dolor.

A nuestro señor Jesucristo, por ser mi amigo, por darme tantas cosas buenas en mi vida, por escucharme y amarme.

A mi Papá:

Por su ayuda económica que a pesar de la difícil, y varias veces muy difícil situación, siempre eh tenido lo necesario y sobre todo por sus consejos, por animarme siempre a seguir adelante, por enseñarme que “la vida sólo es una y debo vivirla, no verla pasar”. Gracias por esas pláticas interminables en las cuales aprendí que la mejor escuela, es la vida, que no dedó tener miedo mientras usted este a mi lado y exista Dios.

Gracias por brindarme tanta confianza, por creer en mí, por el sacrificio de tantos años y que a pesar de los reproches de ciertos miembros de la familia, siempre me dijo que debía terminar mi carrera universitaria, ahora puede sentirse orgulloso por que lo eh logrado, y fue gracias a usted, nunca podré pagarle todo lo que a hecho por mí. Lo quiero mucho.

*Gracias PAPA
Sr. R. Baltazar Mojica León*

A mi Mamá:

Por la paciencia que has tenido, el sacrificio que has hecho para poder tener tus cosas y por aguantar la situación. Se que fue muy difícil aceptar que ya no estaba tan cerca para apoyarte en todo lo que necesitabas, pero en el fondo querías que tibiera una vida mejor para mi también fue difícil separarme de ti. Lo que más te agradezco es haberme enseñado todo lo que sé. Gracias por creer en mí y estar tan orgullosa de tus hijos, por tus regaños y por siempre exigirme más. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, estaré agradecida eternamente. Te quiero mucho.

*Gracias MAMÁ
Sra Roselia Hernández Guillén.*

A MIS HERMANOS Y SU FAMILIA:

Tere, gracias por tus consejos, por tu ayuda económica, y por cuidarme tanto. Fue muy difícil cuando tuviste que irte a Estados Unidos para sacar a tu hijo adelante y estar con tu esposo. A pesar de la distancia siempre te he sentido cerca. Eres un gran ejemplo para mí como ama de casa y como ser humano. Te quiero.

A mi cuñado Juan, gracias por tus buenos deseos, por tu confianza y por querer tanto a mi hermana y por considerarnos tu familia.

A mi sobrino mayor, Víctor, gracias por ayudarme a traducir, pero sobre todo por ser mi amigo y compartir experiencias universitarias, estoy orgullosa de que has logrado entrar a la Universidad de California, es un logro muy grande, sigue adelante, hasta el final.

A Robi, mi segundo sobrino, gracias por tu alegría, por hacer de un momento triste un momento agradable con tus ocurrencias y genialidades, siempre estaré orgullosa de ser tu tía y amiga. Me gustaría que tú también vallas a la Universidad, sé que te faltan algunos años pero tenlo presente.

*Gracias familia Ramos Mojica. Los quiero mucho
Juan Ramos Murguía
D. M. Teresita Mojica Hdez
J. Víctor Ramos Mojica
Roberto Ramos Mojica*

† Chon, sé que estás con Dios y desde el cielo has estado conmigo, has sido mi ángel, me pregunto ¿si estuvieras en la tierra como sería mi vida? Estoy segura que maravillosa y no tendría una parte de mi corazón vacía por tu ausencia. Tal vez un día nos encontraremos y ese día te daré todo el amor, los abrazos y besos que tengo para ti desde que te fuiste, pero sigues aquí. Te quiero con toda mi alma.

*Gracias Hermano
†J. Ascensión Mojica Hdez.*

Heriberto, te agradezco, por aquellos días en los que podíamos platicar como amigos, hace tantos años. Ahora estas muy lejos y no puedes ver mis logros pero quiero compartírtelos contigo. Gracias por todo.

Erick, mi tercer sobrino, gracias por tu cariño, confianza, por dejarme ser parte de tu niñez y tus juegos, ahora inicias una nueva etapa en tu vida, tal vez la más difícil. Deseo que tu mayor sueño se haga realidad..

Christian, el cuarto de mis sobrinos, desde bebé fuiste muy cariñoso, ojalá sigas así, gracias por los momentos en los que he hecho sentir que soy muy importante para ti y quieres que te cuente todas las leyendas, historias y cuentos que existen en el mundo.

Jordi B. el pequeño sobrino quiero decirte que has llenado mi vida de felicidad, alegría, amor, paz y todas las cosas buenas del mundo. A tus cuatro años de edad has logrado que mis papás, mi hermana y yo, seamos muy felices cuando estás con nosotros. Gracias

Yadira, gracias por ser la madre de estos maravillosos niños.

Gracias familia Mojica Hdez. Los quiero mucho

Heriberto Mojica Hdez
Yadira Hdez Tejeda
Erick Mojica Hdez
Cristina Mojica Hdez
Jordi B. Mojica Hdez

Pily (Yuliana). Mi hermana menor, a ti quiero agradecerte por estar siempre con migo, y aunque pocas veces coincidimos en opinión, tenemos buenos momentos, con tus locuras, y querer vivir tan aprisa, pero tienes un gran corazón. Sabes que te quiero mucho y lo que más deseo en el mundo es verte feliz y que encuentres el rumbo de tu vida. Te quiero mucho

Gracias hemana
.Yuliana Mojica Hdez

A mis tíos (as)

A todos ustedes gracias por su apoyo y consejos:

Luisa Hdez, Everardo y Rosario Hdez, Juventino y Elisa Hdez, †Ismael y †Elisa Hdez, Guadalupe Hdez, Ma de Jesús Hdez, especialmente a mis tíos Ángel Y Gloria Hdez, gracias por todo el cariño que me han brindado, su apoyo económico y espiritual. Gracias.

†Ma. de Jesús Mojica, Martha y Francisco Camarena, Jorge y Ana Mojica, José y Sofía Mojica, especialmente a Gustavo y Verónica Mojica, gracias por permitirme vivir en su casa por tanto tiempo y apoyarme. A mi tía Martha por sus consejos. Gracias.

A mis primos (as)

Ustedes han sido parte de mi vida, en diferentes etapas y de todos los que menciono, tengo grandes recuerdos y momentos muy felices, algunos están lejos, pero aun así me han brindado su cariño y, no pierdo la esperanza de algún día reunirnos todos. Los quiero. A mis primos maternos gracias por consentirme tanto.

Alex, Ana, Angelica, Argelia, Armando, Arnoldo, Aurelio, Balta, Carmen, Celeste, Chave, Chela, Chon, Chonito Q, Cristobal, Dalila, Delí, Delia, Efraín Elvia, Evangelina, Fabricio, Fer, Gosefina, Guillermina, Gustavo, Hubenci, Humberto, Ismael, Jacqueline, Jilo, Jilo G, Leonor, Lino, Lucero, Magdalena, María, Mariano II, Mariano III, Mariano IV, Mariela, Marielena, Martha, Millo, Mireilla, Nancy, Olga, Omar, Onelia, Paulina, Renato, Rogelio, Rosa, Roxana, Roman, Sergio, Sonia, Sugely, Virgilio, Yesica, Yohana, Yolanda, Willy.

A mis amigas (os)

Sin duda una parte fundamental en mi vida, ya que la amistad es el regalo mas grande de la vida. A ustedes les agradezco por formar parte de mi vida, por escucharme y compartir sus problemas, alegrías y desamores, estoy orgullosa de ser su amiga y poder compartir con ustedes esta etapa en mi vida. Los nombre por orden alfabético para que no se sientan mal...

Ana Laura, gracias por escucharme y por quedarte con migo hasta tarde en el laboratorio; **Anael**, amiga te fuiste muy lejos pero sé que nuestra amistad seguirá por siempre, gracias por tus consejos, tu ayuda en todo momento; **Andrei**, eres una gran persona, bueno un poco loco, gracias por todo ahí y no hagas ojos de gallina; **César**, no me gusta verte siempre triste, espero que esa tristeza se transforme en alegría para que

seas feliz, tienes un gran corazón; **Chuy**, gracias por haber sido una parte tan importante en mi vida; **Denisse**, gracias por brindarme tu amistad y cariño, desde mi llegada a Morelia; **Gabi**, gracias por brindarme un poco de tu tiempo cada vez que lo eh necesitado, y por conservar nuestra amistad de tantos años; **Humberto**, el mas alegre de mis amigos, gracias por tu amistad, tuvimos que pasar muchas pruebas para reafirmarla y al final puedo decir que ya recupere mi amigo de la infancia; **Ilíana**, tengo poco tiempo de conocerte pero ya te considero mi amiga, porque eres una gran persona, gracias por prestarnos tu casa para comer; **Jaqui**, mi casi tocaya, a ti tengo mucho que agradecerte, ya que si tu no me hubieses animado a seguir estudiando, no estaría aquí dándote las gracias por tu apoyo, ayuda y sobre todo amistad, eres genial; **Linda**, sabes que te admiro por lo que eres, por tus logros tan grandes, y por luchar incansablemente y defender tus ideales, gracias por ser mi amiga; **Magi**, gracias por la confianza y compartir tu vida con migo; **Nohemí**, te agradezco mucho, tu ayuda y orientación me que diste cuando llegué al laboratorio, gracias por tu paciencia para enseñar y estar siempre atenta para que no cometiera errores, gracias por tu tiempo; **Olga**, gracias por escucharme y aconsejarme cada vez que lo pido, sobre todo por no darme la razón si no la tengo y mantenerte neutral cuando así debe ser, gracias por todo; **Pilisa**, gracias por tu amistad, **Yuri**, mi chaparrita, a ti tengo mucho que agradecerte, por tantos años de amistad, por esos momentos tan felices que pasamos juntas y al lado de Anael, fueron momentos inolvidables, tal vez las circunstancias de la vida nos separen pero si nuestra amistad es verdadera permanecerá por siempre a pesar de la distancia y el tiempo, aprendí mucho de ti y le doy gracias a Dios por haberte encontrado, gracias por todo te quiero mucho.

A mi asesora

A usted tengo mucho que agradecerle, principalmente por la confianza que ah depositado en mí para realizar este trabajo, el apoyo constante y transmitirme sus conocimiento siempre con gran disposición y amabilidad y esa alegría que la caracteriza. Le agradezco infinitamente por permitirme realizar mi sueño, estoy eternamente agradecida con usted.

Gracias

D en C. Ma Soledad Vázquez García

A mis revisores

Gracias por el tiempo prestado para la revisión de este trabajo.

Gracias

D. en C. Carlos Cortés Penagos

Q.F.B. Blanca Nateras Marín

D.en C. Gerardo Vázquez Marrufo

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la división de estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “DR IGNACIO CHÁVEZ” Pertenecientes a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D en C. Ma. Soledad Vazquez Garcidueñas.

INDICE GENERAL

	PAGINA
INDICE DE ABREVIATURAS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
INDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	V
I. INTRODUCCION.....	1
I.1 Género <i>Escherichia</i>	1
I.1.1 Generalidades de <i>Escherichia</i>	1
I.1.2 <i>Escherichia coli</i>	1
I.1.3 Mecanismos de infección (transmisión).....	1
I.2 Antibióticos.....	3
I.2.1 Clasificación de los antibióticos.	3
a) Bactericidas.....	4
b) Bacteriostáticos.....	6
I.2.2 Características de antibióticos utilizados en el trabajo.....	7
I.2.3 Resistencia a Antibióticos.....	14
I.2.4 Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	16
a) Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos.....	16
b) Origen de los plásmidos de resistencia.....	18
I.3 Metales Pesados.....	18
I.3.1 Características de Metales Pesados utilizados en el trabajo.....	19
a) Plomo.....	19
b) Cobre.....	20
c) Plata.....	20
I.3.2 Resistencia a Metales Pesados.....	21
I.3.2.1 Toxicidad, tolerancia y resistencia a Metales Pesados.....	21
I.3.3 Mecanismos de resistencia a Metales Pesados.....	23
a) Resistencia a plomo.....	24
b) Resistencia, Transporte y homeostasis del cobre.....	26
c) Resistencia a Plata.....	28

I.4 Asociación de la resistencia metales pesados-antibióticos.....	30
II. Objetivos.....	32
III. Estrategia Experimental.....	33
IV. Materiales y métodos.....	34
IV.1 Material biológico.....	34
IV.2 Medios de cultivo.....	34
IV.2.1 Agar nutritivo.....	34
IV.2.3 Agar francés o Stab agar.....	34
IV.3 Ensayo de sensibilidad a antibióticos.....	35
IV.3.1 Técnica para determinar sensibilidad a antibióticos.....	35
IV.4 Ensayo de sensibilidad Metales pesados.....	36
IV.4.1 Preparación se soluciones Stock.....	36
IV.4.2 Determinación de resistencia a Metales Pesados.....	36
V Resultados.....	38
V.1 Recolección de muestras.....	38
V.2 Descripción de la población estudiada.....	38
V.3 Ensayo de sensibilidad a antibióticos.....	40
V.4 Ensayo de sensibilidad a Metales Pesados.....	42
V.4.1 Sensibilidad presentada por aislados de <i>E.coli</i> a cobre.....	42
V.4.2 Sensibilidad presentada por aislados de <i>E.coli</i> a plomo.....	44
V.4.3 Sensibilidad presentada por aislados de <i>E.coli</i> a plata.....	46
V.4.4 Relación Metales Pesados- Antibióticos.....	48
VI Discusión.....	50
VII Conclusiones.....	54
VIII Bibliografía.....	55

INDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
EC	<i>Escherichia coli</i>
g	gramos
Kb	Kilobases
M	Molar
MCI	concentración mínima inhibitoria
ml	mililitros
mM	milimolar
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios

INDICE DE FIGURAS

	PAG.
1 Patogénesis de la enfermedad diarreica	2
2 Conjunto de membranas asociadas a captación, eflujo, reducción y oxidación de iones de metales pesados	24
3 Genes que confieren resistencia al plomo para un microorganismo específico, <i>R. metallidurans</i> de tipo CH34.	24
4 Actual opinión del transporte y resistencia de cobre en <i>E. coli</i>	27
5 Representación esquemática de la estrategia experimental	31
6 Distribución del porcentaje de muestras recolectadas por mes	35
7 Distribución del género de los pacientes	35
8 Distribución de la edad de pacientes masculinos	36
9 Distribución de la edad de pacientes femeninos	36
10 Distribución general de resistencia y sensibilidad presentada por aislados de <i>E. coli</i> a antibióticos.	38
11 Fotografía de los antibiogramas con aislados de <i>E. coli</i> .	38
12 Representación de la inhibición del crecimiento bacteriano por Cu	40
13 Fotografías de la resistencia con aislados de <i>E.coli</i> a cobre.	40
14 Fotografías de Resistencia y sensibilidad presentada por un aislado de <i>E.coli</i> a plomo.	42
15 Representación de la inhibición del crecimiento bacteriano por PI	43
16 Fotografías de Resistencia y sensibilidad presentada por un aislado de <i>E.coli</i> a plata.	43
17 Distribución de la resistencia cobre-antibióticos aislados de <i>E. coli</i>	45
18 Distribución de resistencia plomo-antibiótico en aislados de <i>E. coli</i> .	45
19 Distribución de resistencia Pb- Cu en aislados de <i>E.coli</i> .	45
20 Distribución de resistencia Pb-Cu-Antibiótico en aislados de <i>E.coli</i>	46

INDICE DE TABLAS

		PAG.
I	Mecanismos de resistencia de <i>E. coli</i> a antibióticos	16
II	Familia de proteínas importantes para el transporte de metales pesados	22
III	Concentración mínima inhibitoria a la cual los iones de metales pesados son tóxicos	22
IV	Mecanismos y sistemas de resistencia bacteriana a metales pesados	30
V	Antibióticos y concentraciones utilizadas para el estudio	34
VI	Diagnóstico de pacientes	36
VII	Resultado de antibiogramas	37
VIII	Frecuencia de resistencia en aislados de <i>E. coli</i> al cobre	38
IX	Frecuencia de resistencia en aislados de <i>E. coli</i> al plomo	39
X	Representación porcentual de la sensibilidad a cobre	40
XI	Frecuencia de resistencia en aislados de <i>E. coli</i> a plomo	44
XII	Representación porcentual de la sensibilidad a plomo	45
XIII	Concentración Máxima de crecimiento.	47

RESUMEN

Se realizó un estudio sobre la sensibilidad a antibióticos y a metales pesados, a partir de 40 aislados de *E. coli* en pacientes no diarreicos, con diagnósticos clínicos variados, de ambos sexos y edades de entre 9 a 74 años en femeninos y de 8 a 62 en pacientes masculinos, atendidos en un hospital público de la ciudad de Morelia, Michoacán.

En cada aislado se realizó pruebas con 12 antibióticos, el 95% de los aislados presentó resistencia múltiple, sólo el 5% fue sensible a todos los antibióticos. La múltiple resistencia se presentó principalmente en ampicilina y gentamicina con un 57% cada una, seguida de tmp-sxt 55%, carbenicilina 52%, netilmicina 50%, los restantes obtuvieron menos del 50%. La sensibilidad se presentó en mayor grado para cloranfenicol con 82%, nitrofurantoina 67%, ceftriaxona 59%.

La prueba para resistencia a metales, se realizó con tres metales, plomo, cobre y plata. La mayor resistencia se presentó en cobre, el 10% de los aislados presentó resistencia hasta una concentración de 700µg/ml, en plomo el 10% fue resistente a 40mM; el 100% de los aislados fue resistente a 0.100mM, pero sensibles a 0.250mM.

La correlación entre la resistencia a cobre y a antibióticos registró un 57% y 43% de sensibilidad; en plomo antibióticos la tanto la resistencia como la sensibilidad obtuvieron 50%, sólo el 13% de los aislados fue resistentes a cobre y plomo, 14% sensibles.

Se determinó la asociación entre la resistencia a metales pesados y antibióticos. En la cual sólo el 8% de los aislados presentó resistencia para ambos metales y a más de un antibiótico; el 18 % fue sensible a metales y a antibióticos (se consideró resistencia a más de 6 antibióticos, resistente a 400µg/ml ó más para cobre y resistente a partir de 20mM para plomo).

El 73% de los aislados presentó comportamientos particulares para los metales y antibióticos, lo cual no permitió incluirlos en la asociación. Nuestros resultados coinciden con trabajos anteriores donde indican que hay asociación entre resistencia a metales y a antibióticos aun en porcentajes bajos. (Cardona A, 2004).

I. INTRODUCCIÓN

I. 1 GÉNERO *Escherichia*

I.1.1 GENERALIDADES DE *Escherichia*

El género *Escherichia* está constituido por bacilos Gram negativos, no esporulados móviles, anaerobios facultativos, crecen en medios de cultivo simples o en medios sintéticos con glicerol o glucosa como única fuente de carbón y energía. En medios de cultivo sólidos, las colonias son circulares, lisas, de bordes continuos; algunas producen colonias mucoides. En medios con sangre, se detecta la producción de una beta-hemolisina probablemente relacionada con la patogenicidad de la bacteria (Blanco y col., 2001).

I.1.2 *Escherichia coli*

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que es un vasto grupo de bacilos Gram negativos. Esta familia incluye muchos géneros, entre los que se encuentran *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros.

E. coli es el principal habitante facultativo del intestino grueso que integran la flora normal y el patógeno humano aislado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones urinarias, de heridas, de neumonía, de meningitis y de septicemia y además causa una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales (Zinsser 1998).

También puede desempeñar una función nutricional en el tracto intestinal mediante la síntesis de vitaminas, especialmente la vitamina K. Como aerobio facultativo, este organismo probablemente también ayuda a consumir oxígeno, convirtiendo el intestino grueso en anóxico (Brock 2001).

I.1.3 MECANISMO DE INFECCIÓN (TRANSMISIÓN)

E. coli es una bacteria perteneciente a la flora normal del intestino grueso, pero puede ser patógena si sale de éste causando enfermedades intestinales. Esta bacteria es excretada en las heces y se puede encontrar en el medio

ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Blanco y col., 2001).

El reservorio de los agentes de las diarreas infecciosas es el hombre, exceptuando el caso de *Salmonella* que es de origen animal. La fuente de infección es la materia fecal del hombre infectado, sintomático o asintomático, siendo este último más peligroso ya que no presenta datos clínicos que permitan identificarlo (Mota Hernández, 2002).

El mecanismo de transmisión clásico es el ciclo ano-boca, entendido éste como la salida del agente infeccioso con la materia fecal y su ingestión, casi siempre a través de las manos contaminadas o de fomites (Figura 1). Otro mecanismo de transmisión frecuente es la ingestión de alimentos contaminados o de agua, otras bebidas o hielo, no sometidos a algún proceso de purificación (Sabat, 2000).

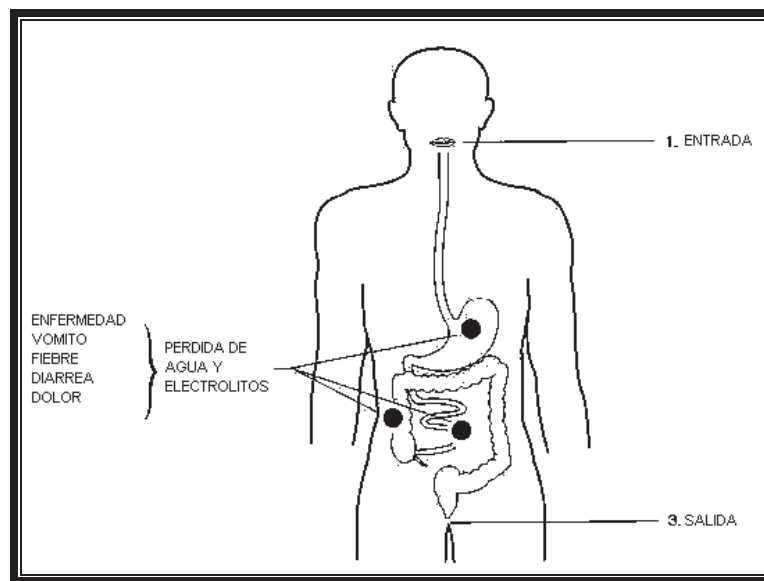


Figura 1. Patogénesis de la enfermedad diarreica.
Basado en el original de Evans y Evans (2003).

Algunos factores de riesgo en el huésped son: el estado nutricional (círculo vicioso diarrea-desnutrición-diarrea); enfermedades previas de tipo anergizante (sarampión); ablactación temprana o ausencia de alimentación al pecho materno; saneamiento deficiente (carencia de agua potable, fecalismo); malos hábitos

higiénicos, no aceptación de medidas sanitarias. También hay que mencionar a los factores de tipo económico como limitantes en la incorporación de obras de saneamiento, la adquisición de nutrientes y la búsqueda limitada de atención médica por la falta de recursos económicos lo que lleva a una automedicación y por consiguiente se genera una resistencia de las bacterias hacia los antibióticos (Tomé y col., 1996).

I.2 ANTIBIOTICOS

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por ciertos microorganismos, bacterias u hongos) que inhiben el crecimiento o matan otros microorganismos, constituyen una clase especial de quimioterapéuticos, que se distinguen de los análogos de factores de crecimiento porque son naturales. La elección de uno u otro antibiótico en el tratamiento de una infección depende del microorganismo (obtenido por cultivo), de la sensibilidad del microorganismo (obtenida por un antibiograma), la gravedad de la enfermedad, la toxicidad, los antecedentes de alergia del paciente y el costo. En infecciones graves puede ser necesario combinar varios antibióticos.

I.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

Existen dos tipos de antibióticos: 1) de amplio espectro, actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas; 2) de corto espectro, solo actúa sobre un único grupo de microorganismos, pero puede ser muy valioso para el control de microorganismos que no responden a otros antibióticos.

Se pueden agrupar de acuerdo a su estructura química o a su modo de acción. En las bacterias el blanco para la acción de los antibióticos son la pared celular, la membrana citoplasmática y los procesos de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Los antibióticos difieren de otros medicamentos porque no sólo ejercen un efecto terapéutico sino que alteran también la ecología de la microflora del cuerpo y del medio externo (Kunin CM, 1981).

Los antibióticos actúan a través de 2 mecanismos principales: Matando los microorganismos existentes (bactericida), e impidiendo su reproducción (bacteriostática).

a) Bactericidas. Incluye a Beta-lactámicos (Penicilinas y cefalosporinas), Glicopéptidos (Vancomicina, teicoplanina), Aminoglucósidos (Grupo estreptomicina), Quinolonas (Grupo norfloxacino) y Polimixinas

- **Antibióticos β -lactámicos:** incluyen las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas. Se denominan β -lactámicos porque contienen un anillo β -lactámico en su estructura química.

- **Penicilinas.** son los antibióticos más antiguos y siguen siendo los de primera elección en muchas infecciones. Actúan rompiendo la pared bacteriana. Existen muchos tipos de penicilina:

Penicilina G. Se utiliza por vía intravenosa (penicilina G sódica), intramuscular (penicilina G procaína, penicilina G benzatina), u oral (penicilina V). Es de primera elección en infecciones como las causadas por estreptococos o en la sífilis. Muchas bacterias, sin embargo, la inactivan produciendo un enzima (beta-lactamasa).

Penicilinas resistentes a la beta-lactamasa (tipo cloxacilina). Pueden con algunas bacterias que producen beta-lactamasa, como el estafilococo.

Aminopenicilinas (Amoxicilina, ampicilina, etc). Tienen más actividad frente a los microorganismos llamados 'gram-negativos', y si se asocian con sustancias como el ácido clavulánico o el sulbactam, también pueden con las bacterias que producen beta-lactamasa, como el estafilococo.

Penicilinas antipseudomona. (Tipo carbenicilina o piperacilina). Como su nombre indica, pueden actuar contra *Pseudomona* (una bacteria peligrosa que causa infecciones muy graves).

- **Cefalosporinas**

Difieren estructuralmente de las penicilinas porque poseen un anillo de dihidrotiacina de seis miembros, en lugar del anillo tiazólico de cinco miembros. Tiene un espectro más amplio que las penicilinas y son más resistentes a la acción de las enzimas que destruyen los anillos β -lactámicos, las β -lactamasas. Son antibióticos en parte similares a las penicilinas, pero a diferencia de aquellas (que proceden parcial o totalmente del hongo *Penicillium*), las cefalosporinas son totalmente de síntesis química.

Las cefalosporinas se clasifican en "generaciones", según el tipo de bacterias que atacan:

Cefalosporinas de 1ª generación: cefadroxilo, cefalexina, cefalotina, cefazolina..

Cefalosporinas de 2ª generación: cefaclor, cefuroxima, cefonicid, cefamandol,

Cefalosporinas de 3ª generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima,

....

- **Aminoglicósidos**: contienen aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos a otros aminoazúcares. Estreptomina y sus parientes gentamicina, kanamicina y neomicina. Se consideran ahora como antibióticos de segunda elección y se utilizan fundamentalmente cuando otros antibióticos son ineficaces.

La actividad de los antibióticos debe medirse a través de métodos específicos utilizando medios de cultivo adecuados.

Actualmente, se sabe que no sólo los antibióticos generan resistencia, también algunos metales pesados como el cobre, plomo, plata, zinc, mercurio, cadmio, entre otros. Por ello se requiere realizar estudios que nos permitan demostrar si todas las bacterias presentan esta resistencia o existen factores que influyen en el desarrollo de una resistencia cruzada. En este grupo se encuentran:

Estreptomina. Actualmente se usa (generalmente asociada) para tratar tuberculosis y brucelosis y en infecciones raras como tularemia y peste.

Neomicina. Se usa sólo por vía tópica (pomadas, colirios, gotas para los oídos, etc), por su toxicidad. Puede producir alergias de contacto.

Gentamicina, Tobramicina, Amikacina, Netilmicina. Se usan sólo en infecciones graves por microorganismos gram-negativos. Todos los aminoglucósidos son tóxicos sobre el riñón y el oído.

- Quinolonas

Hay 2 subgrupos de quinolonas. Las más antiguas (**ácido nalidíxico, ácido pipemídico**) sólo actúan contra algunos microorganismos de los llamados 'gram-negativos' y se utilizan sólo como antisépticos urinarios (en infecciones leves de orina). Las más recientes, o fluoroquinolonas, incluyen fármacos como **norfloxacino, ciprofloxacino y ofloxacino**, y son activos frente a otras muchas bacterias, incluyendo la llamada *Pseudomona* (una bacteria peligrosa que causa infecciones muy graves).

- Otros antibióticos beta-lactámicos

Imipenem y **aztreonam** son los prototipos de nuevos grupos antibióticos beta-lactámicos. El **ácido clavulánico** o el **sulbactam** tienen muy poca actividad, pero inhiben la beta-lactamasa que producen muchas bacterias, por lo que se asocian con otras penicilinas para aumentar su actividad.

b) Bacteriostáticos. Incluye Macrólidos (Grupo eritromicina), Tetraciclinas, Cloramfenicol, Clindamicina, Lincomicina y Sulfamidas.

- **Macrólidos.** La eritromicina y fármacos similares (claritromicina, azitromicina, etc) son activos, sobre todo, frente a microorganismos de los llamados 'gram-positivos' y tienen utilidad en muchas infecciones (amigdalitis, infecciones bucales, neumonías, etc), sobre todo en alérgicos a penicilina. Producen molestias de estómago en muchas personas.

- **Tetraciclinas.** Las tetraciclinas (oxitetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, aureomicina...) tienen un espectro de actividad muy amplio. Se utilizan en infecciones de boca, bronquitis, e infecciones por bacterias relativamente raras como rickettsias, clamidias, brucelosis, etc, y en la sífilis en

alérgicos a penicilina. Producen molestias de estómago, sobreinfecciones, manchas en los dientes, y crecimiento anormal de los huesos en niños y fetos de mujer gestante. Nunca deben usarse en niños menores de 8 años ni en el 1.er trimestre de gestación.

- **Cloranfenicol.** Es un antibiótico de espectro muy amplio, pero puede producir una anemia aplásica (falta completa de glóbulos rojos por toxicidad sobre la médula ósea), que puede llegar a ser mortal. Por ello, su empleo se limita al uso tópico en colirios y gotas para los oídos ("*chemicetina*"); así como para infecciones muy graves cuando los otros antibióticos son menos eficaces o más tóxicos, como por ejemplo fiebre tifoidea y algunas meningitis.

- **Glicopeptidos: vancomicina, teicoplanina**

Son antibióticos muy activos frente a microorganismos llamados "Gram-positivos", incluso los resistentes a penicilinas y cefalosporinas. Por ello se emplean en infecciones hospitalarias graves, sobre todo en alérgicos a penicilina.

- **Lincomicina y clindamicina**

Son activos también frente a microorganismos llamados "Gram-positivos", pero además pueden con otros microorganismos llamados anaerobios. También se emplean en infecciones de hospital, sobre todo en alérgicos a penicilina. La clindamicina se utiliza tópicamente en algunas infecciones de piel.

- **Metronidazol**

Se utiliza contra unos microorganismos llamados protozoos (*Giardia*, *Tricomona* y otros), y también contra los llamados anaerobios. Dependiendo del tipo de infección, se puede usar por vía oral, intravenosa o en óvulos vaginales.

- **Sulfamidas**

Son agentes antimicrobianos sintéticos, bacteriostáticos, con un espectro amplio que abarca la mayoría de las "Gram positivos" y muchos 'Gram negativos'. Actualmente en relativo desuso, a excepción de algunas sulfamidas tópicas (sulfadiazina argéntica, mafenida), y de la combinación **trimetoprim-sulfametoxazol** (o cotrimoxazol) que se usa en infecciones urinarias y bronquiales, en la fiebre tifoidea y en otras infecciones, y que es de elección para

el tratamiento y la prevención de la neumonía por el protozoo *Pneumocystis carinii*, que afecta a los pacientes con SIDA.

1.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS USADOS EN ESTE TRABAJO.

Ampicilina y carbenicilina: poseen un espectro más amplio que incluye las Gram negativas gracias a sus grupos N-acilo que les permite ser transportadas dentro de la envoltura de las células Gram negativas en donde inhiben la síntesis de la pared celular.

1.- La ampicilina es una penicilina semisintética de amplio espectro con acción bactericida que actúa a nivel de la pared celular de las bacterias.

Está indicada en infecciones genitourinarias, respiratorias, digestivas y biliares, infecciones locales o generalizadas que no responden adecuadamente a otros antibióticos (cloranfenicol, tetraciclinas).

La ampicilina es efectiva contra bacterias Gram positivos y Gram negativos. *In vitro* es activa contra *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis* no productor de penicilinas, *Shigella*, *Escherichia coli*, algunas cepas de *Klebsiella*, *Streptococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*

2.- La Carbenicilina es una penicilina de tercera generación, fue la primera penicilina antipseudomonas. Actualmente es poco usada, habiendo sido retirada del mercado en USA y sustituida por ticarcilina que es más activa contra *Pseudomonas aeruginosa* y tiene menos efectos secundarios.

Ticarcilina es destruida por varias betalactamasas de las bacterias Gram positivas y negativas, aunque es más estable frente a las betalactamasas de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus* indol positivo y *Providencia*. Su acción es similar a ampicilina sobre *E.coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella* y *N.meningitidis*.

3.- Ceftriaxona: altamente resistente a las β -lactamasas, es ampliamente utilizada, ha sustituido a la penicilina como fármaco de elección para en tratamiento de infecciones.

La ceftriaxona tiene un amplio espectro antibacteriano, siendo eficaz contra la mayor parte de las bacterias entéricas Gram negativas. Es un antibiótico cefalosporínico semisintético de actividad bactericida debido a la inhibición de la síntesis de la pared celular.

Está indicada en el tratamiento de las infecciones moderadas a graves, simples o mixtas, causadas por cepas sensibles como:

Aerobios Gram negativos: *Aeromonas spp*, *Alcaligenes spp*, *Branhamella catarrhalis*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, ***E. coli***, *H. parainfluenzae*, *Klebsiella spp*, *Moraxella spp*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia spp*, *Pseudomonas aeruginosa* (algunas cepas son resistentes), *Salmonella spp* (incluyendo *typhi*), *Serratia spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*, *Yersinia spp* (incluyendo *Y. enterocolitica*).

Anaerobios: *Bacteroides spp*, *Clostridium spp*, *Fusobacterium spp*, *Peptococcus spp*, *Peptostreptococcus spp*.

4.- Gentamicina: actúan inhibiendo la síntesis de proteína interfiriendo con la unidad 30s del ribosoma. Utilizada en clínica contra bacterias Gram negativas. (Brock 2001)

La gentamicina inhibe el desarrollo de bacterias al interferir en la síntesis de proteínas bacterianas. Su acción depende de la capacidad para unirse a proteína(s) de la subunidad 30S de los ribosomas de las bacterias, después de lo cual ocurre una lectura o codificación e Septicemia y otras infecciones graves debidas a bacilos Gram negativos aerobios; es el medicamento para el tratamiento de primera elección de septicemia letal por bacilos Gram negativos aerobios en pacientes hospitalizados.

También está indicado en el tratamiento urgente inicial de la septicemia por microorganismos no identificados, en cuyo caso se puede combinar con penicilina G, cefalotina o carbenicilina, sobre todo en pacientes neutropénicos con cáncer.

En septicemia cuyo origen es una infección intraabdominal o del sistema genital de la mujer, combinado con cloranfenicol o clindamicina constituye un régimen terapéutico adecuado.

En las infecciones graves por *Pseudomonas aeruginosa*, ha dado buenos resultados la combinación con carbenicilina. En estos casos no es conveniente mezclar los dos antimicrobianos en líquidos para infusión intravenosa. Ha producido buenos resultados en la septicemia por *Pseudomonas* que complica a las quemaduras. También es útil en el tratamiento de la artritis séptica aguda debida a bacilos Gram negativos.

5.- Cloranfenicol: agente bacteriostático activo de amplio espectro contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, rickettsias y clamidias. Inhibe la síntesis proteica de las bacterias se une de forma exclusiva a la subunidad 50s. La resistencia puede ser por mutación (cromosómica) o por plásmidos, la resistencia al cloranfenicol con frecuencia se acompaña de resistencia a las tetraciclinas. Este fenómeno de resistencia cruzada se limita a las Enterobacteriaceae y está mediado por plásmidos (Zinsser 1998).

Antibiótico indicado en: fiebre tifoidea, paratifoidea, rickettsias, brucelosis, meningitis, endocarditis, osteomielitis, bacteriemia y en infecciones causadas por gérmenes anaerobios.

El cloranfenicol es un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad ribosomal 50S. El cloranfenicol usualmente produce un efecto bacteriostático sobre la bacteria susceptible, es un antibiótico clínicamente útil, que debe ser reservado para infecciones serias causadas por organismos susceptibles, cuando otros agentes terapéuticos potencialmente menos dañinos sean ineficaces o estén contraindicados. No obstante, el cloranfenicol puede ser agente de elección para inicio de tratamiento si existe la impresión clínica de presencia de alguna de las condiciones médicas mencionadas más adelante. Las pruebas de sensibilidad *in vitro* deben llevarse a cabo de modo simultáneo, de tal forma que la administración de cloranfenicol pueda suspenderse tan pronto como

sea posible, en caso de existir otros agentes terapéuticos potencialmente menos peligrosos.

6.- La cefalotina sódica es una cefalosporina de primera generación que está indicada para el tratamiento de infecciones estreptocócicas, estafilocócicas y aquéllas causadas por bacterias sensibles a ésta.

Infecciones del aparato respiratorio: *S. pneumoniae*, *Staphylococcus* (productores y no productores de penicilinas), *S. pyogenes*, algunas especies de *Klebsiella* y *H. influenzae*. Infecciones del aparato genitourinario: *E. coli*, *P. mirabilis* y algunas especies de *Klebsiella*.

La cefalotina es un antibiótico cefalosporínico de espectro amplio con acción bactericida, actúan sobre la pared celular de manera similar a las penicilinas; así la cefalotina inhibe el *septum* y la síntesis de la pared celular bacteriana, probablemente mediante aciclación de las enzimas transpeptidasas que se unen a la membrana.

Esto previene el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano, el cual es necesario para mantener la rigidez de la pared celular bacteriana. También se inhiben la división celular y el crecimiento bacteriano, lo cual lleva a la lisis y elongación del microorganismo.

Resultan más susceptibles a la acción de la cefalotina las bacterias que presentan una división rápida

7.- Nitrofurantoina: es utilizada en el tratamiento de infecciones del aparato urinario, en especial en pacientes que no pueden soportar las sulfonamidas. Posee un grupo nitro en la posición 5 del anillo furano. Es de amplio espectro. Inhiben la síntesis proteica. De forma preferencial la síntesis de enzimas inducibles por bloqueo de la iniciación de la transducción. (Zinsser 1998).

Es un bactericida *in vitro* para la mayoría de los gérmenes patógenos Gram positivos y Gram negativos de las vías urinarias.

Su mecanismo de acción parece ser dependiente de la formación de productos intermedios por reducción. Es efectiva contra los *enterococci in vitro*, así como

contra otras especies de Gram positivos incluyendo estafilococo, estreptococo y corinebacteria. La mayoría de las especies de ***Escherichia coli*** son particularmente sensibles a la nitrofurantoína, pero los *Enterobacter* y *Klebsiella spp.* son menos sensibles y algunos pueden desarrollar resistencias. *Pseudomona aeruginosa* es habitualmente resistente y la mayoría de las especies de *Proteus spp.* son moderadamente resistentes.

8.- Trimetoprim-sulfametaxazol: Antimicrobiano bactericida de amplio espectro. En las siguientes infecciones:

- De las vías respiratorias superiores: amigdalitis, faringitis, laringotraqueítis y laringitis.
- De vías respiratorias inferiores: bronquitis, influenza, bronquiectasias y neumonía. En infecciones de oído, nariz y garganta: otitis media, sinusitis y rinitis.
- En infecciones genitourinarias: cistitis agudas o crónicas, uretritis y pielonefritis. En infecciones del sistema digestivo: gastroenteritis, salmonelosis.

Es un antimicrobiano de amplio espectro, su efecto bactericida deriva de un principio nuevo. El bloqueo de dos enzimas que catalizan reacciones sucesivas en la biosíntesis del ácido folínico en el microorganismo.

Posee un espectro de acción muy amplio: gérmenes grampositivos y gramnegativos como los estreptococos (incluyendo los betahemolíticos), estafilococos, neumococos, meningococos, gonococos, *Salmonellas*, *Klebsiella/Aerobacter*, *Shigella* y vibrión colérico, entre otros.

Actúa también sobre ciertos gérmenes reputados como difíciles: *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*.

9. Cefotaxima: Es un antibiótico cefalosporínico semisintético de tercera generación que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, por lo que causa lisis de la misma.

La cefotaxima tiene una actividad *in vitro* en contra de una gran cantidad de cepas Gram positivas y Gram negativas. Se ha demostrado que la cefotaxima es un

potente inhibidor de las betalactamasas producidas por cierto tipo de bacterias Gram negativas. La cefotaxima es usualmente activa en contra de los siguientes microorganismos, tanto *in vitro*, como en infecciones clínicas:

Aerobios Gram negativos: *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, ***Escherichia coli***, *Haemophilus influenzae* (incluyendo cepas resistentes a las ampicilinas), *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella spp* (incluyendo *Klebsiella pneumoniae*), *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* (incluyendo cepas b-lactamasas negativas y positivas), *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus inconstans* grupo B, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Acinetobacter spp*.

10.- Amikacina: Está indicado en el tratamiento de las infecciones del aparato respiratorio bajo, del aparato genitourinario, de huesos y articulaciones, del sistema nervioso central, de piel y tejidos blandos, así como de infecciones intraabdominales (incluye peritonitis), septicemias (incluyendo sepsis neonatal), bacteriemias y quemaduras e infecciones postoperatorias producidas por bacterias Gram negativas sensibles.

Tiene actividad *in vitro* contra *Pseudomona sp*, ***E. coli***, *Proteus sp* (indol-positivas e indol-negativas), *Providencia sp*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia sp*, *Acinetobacter sp*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus sp* (cepas productoras y no productoras de penicilinasa).

Puede utilizarse como terapia inicial en infecciones que se sospechen por microorganismos Gram negativos, aun antes de tener resultados del antibiograma. Diversos estudios realizados *in vitro* han demostrado que cuando AMIKACINA se combina con un antibiótico betalactámico, actúan sinérgicamente en contra de muchos gérmenes Gram negativos de importancia en la clínica.

11.- Netilmicina: Está indicada en el tratamiento de infecciones causadas por cepas sensibles de los siguientes microorganismos: ***E. coli***, especies de *Klebsiella-Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Proteus* (indol-positivos e indol-negativos), *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Staphylococcus* (coagulasa-

positivos y coagulasa-negativos, incluso cepas resistentes a la penicilina y meticilina) y *Neisseria gonorrhoeae*.

Los estudios clínicos han demostrado que netilmicina es eficaz en: bacteremia, septicemia (incluyendo sepsis neonatal), Infecciones graves de las vías respiratorias, renales, genitourinarias, de la piel y de tejidos blandos, Infecciones óseas y articulares, Infecciones de quemaduras, heridas y perioperatorias, Infecciones intrabdominales (incluyendo peritonitis), Infecciones del aparato gastrointestinal.

Se recomiendan como tratamiento inicial en infecciones en las que se sospecha o se ha confirmado la participación de Gram negativos. Cirugía de órganos infectados (por ejemplo: colangitis, colelitiasis, infecciones del tracto

12.- La pefloxacin es una fluoroquinolona monofluorada. Tiene una actividad más potente, un mayor espectro antibacteriano, una semivida más larga y alcanza buenos niveles séricos, con lo que es posible tratar infecciones sistémicas administrándose tanto por vía oral como parenteral.

Es un antibiótico bactericida que inhibe la DNA girasa. Tiene un amplio espectro de actividad *in vitro*: presenta buena actividad frente a bacterias Gram (-) (*E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria* y *Haemophilus* productores y no productores de beta-lactamasa, *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas aeruginosa*), poca actividad frente a otras especies de *Pseudomonas*, Neumococo y Enterococo y nula frente a anaerobios, *Treponema pallidum* y *Candida albicans*.

I.2.3 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La resistencia es la capacidad que tiene un organismo para resistir los efectos de los antibióticos ante el cual es normalmente sensible. Los genes de resistencia se obtienen probablemente de los productores de antibióticos, a través de un proceso de intercambio genético. Con el fin de defenderse de los antibióticos que ellos producen, estos organismos han desarrollado mecanismos para neutralizar o destruir sus propios antibióticos. La existencia de estos genes significa que, bajo las condiciones adecuadas, es posible transferir esta resistencia

a otros organismos (Brock, 2003). La mayoría de las diarreas son causadas por *E. coli*, éstas se tratan con antibióticos comunes como gentamicina, ampicilina, amikacina, trimetoprim-sulfametaxazol, cloranfenicol, entre otros, desafortunadamente un alto porcentaje de los enfermos no acuden al médico por falta de recursos económicos y optan por la automedicación, contribuyendo en la generación de una resistencia bacteriana y haciendo más fuerte al microorganismo.

El consumo masivo de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable a la selección de bacterias que soportan los efectos tóxicos de los antimicrobianos (Levy SB 2002). Actualmente 70% de las bacterias responsables de las enfermedades nosocomiales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas (Behra-Miellet J, 2003).

Entre los factores que han contribuido al aumento de la resistencia a los antibióticos están la concentración de la población en centros urbanos, el control inadecuado de las infecciones en los hospitales, la tendencia a internar en los hospitales a los pacientes seriamente enfermos, la migración masiva a través de las regiones del globo y el uso inadecuado de antibióticos, entre otros (Avom J, Solomon DH, 2000).

La gran capacidad adaptativa de las bacterias es el resultado del efecto combinado de rápidos índices de crecimiento, de mutaciones genéticas y de la selección de las mismas, así como de sus habilidades para intercambiar material genético horizontalmente (Beaber JW, Hochhut B, Waldor Mk, 2004; Amábile-Cuevas Cf, 2003).

En México un estudio realizado en el 2005 en hospitales del distrito federal indicaron que el 80% de los antibióticos utilizados fueron los responsables de la resistencia observada en los seis hospitales estudiados: gentamicina, ampicilina, ciprofloxacina, amikacina, cefalotina, piperacilina y trimetoprim-sulfametaxazol (Benavides P y col., 2005).

I.2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

No todos los antibióticos actúan frente a todos los microorganismos. Algunos microorganismos son naturalmente resistentes a algunos antibióticos. La resistencia puede ser una propiedad inherente a un microorganismo, o puede adquirirla. Existen varias razones por las que un microorganismo puede tener una resistencia a un antibiótico, inherente:

- 1) El organismo puede carecer de la estructura diana sobre la que actúa un antibiótico. p.e los micoplasmas no carecen de una pared típica y son resistentes a la penicilina.
- 2) El organismo puede ser impermeable al antibiótico. p.e. las bacterias Gram negativas son impermeables a la penicilina G.
- 3) El organismo puede ser capaz de alterar el antibiótico pasándolo a una forma inactiva. P.e. muchos estafilococos contienen β -lactamasas que rompen el anillo β -lactámico de la mayoría de las penicilinas.
- 4) El organismo puede modificar la diana de un antibiótico.
- 5) Por intercambio genético, puede tener lugar la alteración de una vía metabólica que bloquea el agente antimicrobiano.
- 6) El organismo puede ser capaz de bombear hacia fuera el antibiótico que va entrando en la célula (eflujo)

TABLA I. Mecanismos de resistencia de *E. coli* a antibióticos

MECANISMO DE RESISTENCIA	EJEMPLO DE ANTIBIÓTICO	BASE GENÉTICA DE LA RESISTENCIA
Permeabilidad reducida	Penicilinas	Cromosómica
Inactivación del antibiótico	Penicilinas, cloranfenicol	Plasmídica, cromosómica
Alteración de la diana (RNA polimerasa)	Rifampicina, Estreptomicina, Norfloxacin	Cromosómica
Desarrollo de una vía bioquímica resistente	Sulfonamidas	Cromosómica
Eflujo	Tetraciclinas	Plasmídica

(Brock 2003)

a) MECANISMOS DE RESISTENCIA MEDIADOS POR PLÁSMIDOS

Generalmente las células resistentes a antibióticos, se aíslan de cultivos que eran predominantemente sensibles a antibióticos. La resistencia de estos aislamientos se debe a mutaciones en genes cromosómicos.

La mayoría de las bacterias resistentes a los fármacos, aisladas de pacientes contienen los genes de resistencia a las drogas en plásmidos R., generalmente esta resistencia es mediada por genes cromosómicos a causa de mutaciones de la *diana* de acción de antibiótico.

La resistencia del plásmido R, se debe a la presencia en los plásmidos R de genes que codifican nuevas enzimas que inactivan al antibiótico o de genes que codifican enzimas que evitan la incorporación del antibiótico o lo bombean activamente hacia fuera (eflujo) (Zinsser, 2004).

b) ORIGEN DE LOS PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA

Aunque no se conoce la evidencia específica que indique el origen de los plásmidos de resistencia R, hay una serie de hechos que indica que éstos existían antes de la era antibiótica. Uno de los hechos más sobresalientes es sin duda el creciente uso de los antibióticos, hecho que proporcionó condiciones favorables para la dispersión de los plásmidos R.

En efecto, una cepa de *E.coli* que fue congelada en 1946, contenía un plásmido con genes que conferían resistencia a la tetraciclina y a la estreptomicina, a pesar de que estos antibióticos empezaron a utilizarse varios años más tarde (Brock 2001).

Se demostró que cepas que llevan en el plásmido R, genes de resistencia a las penicilinas semisintéticas, existían mucho antes que se sintetizaran estas penicilinas.

Los plásmidos también tienen relevancia ecológica ya que los plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos, han sido detectados en algunas bacterias no patógenas habitantes del suelo lo que puede conferir ventaja selectiva porque los principales organismos productores de antibióticos (*Streptomyces* y *Penicillium*) son habitantes normales del suelo (Brock 2001). Pero no todos los

antibióticos son producidos por organismos naturales, algunos son se producen sintéticamente.

I.3 METALES PESADOS

Los metales pesados son metales con una densidad más allá de 5g/cm^3 , por consiguiente, los elementos de transición V para el medio ambiente. La mayoría de los metales pesados son elementos de transición con orbitales-d llenos. Estos d-orbitales proporcionan cationes de metales pesados que tienen la capacidad para formar compuestos complejos que pueden o no tener actividades redox. Por consiguiente los cationes de metales pesados juegan un papel importante en reacciones bioquímicas sofisticadas semejantes a las que fijan el nitrógeno, durante la fotosíntesis y oxigenación de la incisión del agua, respiración con nitrato y oxígeno, en la catálisis de un electrón, ref-preparativos de uniones C-C, asimilación de hidrógeno, incisión de la urea, transcripción de genes en RNAm y programas de desarrollo en una sola célula para la unión en humanos. Éstas son todas las bases en la formación de una catálisis en compuestos complejos de metales pesados (Silver, S, 2005)

Sin embargo, una alta concentración de iones de metales pesados, o de compuestos complejos inespecíficos en la célula, encabezan los efectos tóxicos. Algunos iones de metales pesados p.e. Hg^{+2} , Cd^{+2} y Ag^{+} , forman complejos tan tóxicos que son peligrosos para algunas funciones biológicas. De igual forma altas trazas de metales como Zn^{+2} O Pb^{+2} y especialmente Cu^{+2} son tóxicas a altas concentraciones. De esta manera, las concentraciones intracelulares de iones de metales pesados son controladas con fuerza, y la resistencia a metales pesados es solo un caso específico en la demanda general de cada célula viva de algunos sistemas homeostáticos de metales pesados (DEHESA N, 1994)

I.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS METALES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

a) Plomo

Proviene de fuentes naturales y antropogénicas. Puede ingresar al organismo por el agua, alimentos, tierra y polvillo desprendido de viejas pinturas conteniendo plomo. Es maleable, dúctil y se le puede dar forma con facilidad. Asimismo, es uno de los metales no ferrosos que más se recicla. Se le emplea en aleaciones, baterías, compuestos y pigmentos, revestimientos para cables, proyectiles, derivados del petróleo y municiones. La exposición puede tener diversos efectos en humanos. Los niveles altos de exposición pueden afectar la síntesis de hemoglobina, la función renal, el tracto gastrointestinal, las articulaciones y el sistema nervioso.

Síntomas precoces: fatiga, dolores de cabeza, dolores óseos, dolores abdominales, trastornos del sueño, dolores musculares, impotencia, trastornos de conducta, etc. Síntomas avanzados: anemia, cólicos intestinales, náuseas y vómitos, enfermedad renal, impotencia sexual, delirio, esterilidad, daños al feto, hipertensión arterial, estreñimiento agudo, afectación de los nervios, enfermedad ósea, problemas de cáncer y muerte.

Su uso es muy antiguo. Desde el año 2500 A.C. se conocen sus efectos. Pero la tasa histórica de emisión de plomo parece haber tenido un salto marcado con la Revolución Industrial. El plomo forma parte de numerosos procesos industriales, destacándose su presencia en la industria automovilística, específicamente en la fabricación de baterías. Otra fuente de plomo relacionada con el transporte es la gasolina. Se trata de compuestos alquilados, de mayor toxicidad y difusión orgánica que el plomo metálico. Estos aditivos se usan como antidetonantes y las cifras tolerables se están reduciendo en el mundo, impactando favorablemente en los niveles de plomo ambiental y en su toxicidad.

Se han detectado efectos hematológicos, cardiovasculares y evidencia de deterioro de la función renal en sujetos con cifras de plomo plasmático elevado. Asimismo, los daños al sistema respiratorio se reflejan en el incremento de neumonías asociadas a niveles elevados de plomo en aire. Se ha detectado la

inhibición de fagocitos y distintos efectos sobre la inmunidad pulmonar. A niveles de bajas dosis, existen evidencias de daño neurológico y neurocomportamental, que podrían expresarse en trastornos del aprendizaje y déficit atencional. También existen asociaciones en trabajadores expuestos a plomo, con mayor mortalidad por tumores en general. Otros efectos tienen que ver con el sistema reproductivo. Por ejemplo, se atribuye a la toxicidad de plomo, la sostenida baja del recuento de espermios en Europa en las últimas décadas.

b) Cobre

Es un elemento esencial para la vida humana, pero en dosis elevadas puede provocar anemia, irritación del estómago e intestino y daño renal y hepático. Los pacientes con la enfermedad de Wilson, pueden tener mayores riesgos en caso de sobreexposición al cobre. El cobre puede encontrarse en el agua potable, procedente de las cañerías de ese metal o de aditivos empleados para evitar la proliferación de algas.

La configuración electrónica del cobre, es $Ar-4s^13d^8$, el cobre tiene dos formas iónicas $Cu(I)$ y $Cu(II)$ con $Ar-3d^9$. El potencial electroquímico del cobre ($Cu(II)/Cu(I)$) es 0.153V, se encuentra dentro del rango fisiológico.

Los complejos de cobre nunca tienen más de seis electrones, siempre menos, porque el estado de estos electrones son específicos y tiene un carácter comparable para radicales, por tal razón el cobre fácilmente interacciona con radicales, pero mejor con moléculas de oxígeno.

Además la superóxido-dismutasa cobre-zinc, tiene una de las funciones más importante en la cadena respiratoria ya que la cobre oxidasa está en el citocromo c y en enzimas emparentadas que son oxígeno dependientes en muchos organismos (Iwata y col., 1995).

c) Plata

Es una sustancia tóxica, que produce de las más diversas alteraciones a la salud humana. Entre las sales de plata, están: AgNO_3 , es soluble en agua, Ag_2SO_4 y acetato de plata, moderadamente solubles, y AgCl , AgBr , AgI , y Ag_2S son básicamente insolubles (Cotton, F. A. y col., 1988).

El potencial del par de la plata Ag(II)/Ag(I) es 1.980 V (Weast, 1984). Por consiguiente, la mayoría de las formas iónicas del elemento es Ag^+ . La plata es un catión monovalente forma un riguroso complejo con sulfuro, la solubilidad del producto Ag_2S es 6.62×10^{-50} , pero solo 1.28×10^{-36} de Ag_2S .

La toxicidad de la plata la hace un elemento poco atractivo que deja huella, pero este ha sido usado desde un largo tiempo como un agente antimicrobiano (Slawson y col., 1992). En la mayoría de las ciudades, el primer contacto de un niño recién nacido es junto a una ligera gota de nitrato de plata en los ojos para prevenir infecciones con cepas de *Neisseria*. Consecuentemente, se desarrolla la resistencia bacteriana (Deshpande, y col., 1994).

I.3.2 RESISTENCIA A METALES PESADOS

I.3.2.1 TOXICIDAD, TOLERANCIA Y RESISTENCIA DE LOS METALES PESADOS

De la mayoría de los iones de metales pesados que entran en la célula, ninguno tiene efecto fisiológico y tóxico. Los cationes divalentes de metales pesados tiene estructura muy similar; los cationes divalentes Mn^{+2} , Pb^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} Y Zn^{+2} tienen diámetros iónicos entre 138pm y 160 pm (Weast 1984) una diferencia del 14%, y todas son de tratamiento con cargas doblemente positivas.

Por consiguiente el sistema de captación de iones de metales pesados tiene una unión muy forzada si entre ellos se diferencia una pareja de iones estructurales muy similares. Sin embargo, las dos uniones cuestan esfuerzo, tiempo y energía.

La mayoría de las células resuelve sus problemas de rompecabezas pudiendo usar dos tipos de sistemas de captación de pares de iones de metales pesados:

Uno es rápido e inespecífico, desde hace mucho tiempo es usado en una variedad de sustratos, expresados constitutivamente. Este sistema es rápido, solo impulsa el gradiente quimiostático de un lado a otro de la membrana citoplasmática de la bacteria. El segundo tipo tiene un sustrato altamente específico, es lento, usa la hidrólisis de ATP, en la mucho casos es la fuente de energía, algunas veces en la adición del gradiente quimiostático, y este caro sistema de captación solo es producido en tiempos cuando las células lo necesitan, en inanición o situaciones metabólicas específicas; que sean inducibles (Nies y Silver, 1995)

TABLA II. Familia de proteínas importantes para el transporte de metales pesados

Familia	Dirección del transporte	Energía	Iones Metales	Composición
Tipo-P	Captación, Eflujo	ATP	Cu ⁺² , Pb ⁺² , Ag ⁺	Una proteína unida al núcleo de la membrana
CHRh	Antiporte	Quimo-osmótico	cromato	Proteína integrada en la membrana (ChrA)

(Fagan and Saier 1994)

Cuando en la superficie de una célula una alta concentración de un metal pesado es acumula por un sistema inespecífico semejante, el ion del metal pesado específico es transportado dentro del citoplasma en concentraciones altas que molestan, porque tiene que expresar urgentemente este transporte inespecífico. Por consiguiente, la puerta debe estar cerrada. La primera razón de que los metales pesados sean tóxicos es porque esta puerta está abierta (Nies and Silver, 1995). Una vez dentro de la célula, el metal pesado con alto número atómico sobre todo el catión tiene tendencia a unir con grupos SH, p.e. Hg⁺², Cd⁺² y Ag⁺. La MIC (concentración mínima inhibitoria) de estos iones de metal tiene la función de disociar un complejo constante de los sulfuro respectivamente (Tabla III).

TABLA III. CMI a cual los iones de metales pesados son tóxicos

MIC (mM)	iones de metal pesado
0.02	Ag ⁺ , Au ³⁺
1.0	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺
5.0	Pb ²⁺ , Ir ³⁺ , Os ³⁺ , Cr ³⁺ , Be ²⁺
10.0	Cr ²⁺

MIC; concentración mínima inhibitoria

(Silver, S, 2005)

Los metales pesados en el medio ambiente son tóxicos para los microorganismos y afectan los dos factores, bióticos y abióticos (Collins, Y. E. y col., 1987). Estos factores, por ejemplo, alteran la biodisponibilidad de los iones de metales (Russell, A. D, y col. 1994).

El agua contaminada con metales pesados es un fuerte problema ambiental para los humanos con actividades en las industrias. A altas concentraciones los metales son metabolitamente tóxicos. Seguramente porque inhiben la actividad de ciertas enzimas involucradas en los procesos metabólicos (Mitigan y col. 2003).

Las cepas de *E. coli* son frecuentemente resistentes a metales pesados y la resistencia con frecuencia puede transferirse por conjugación (Chai, T.-J, y col., 1993). Mediante plásmidos la resistencia a metales pesados como Niquel, arsenato, arsénico, plata, plomo y el cobre está dada en *E.coli* (Tetaz, T.J., y col 1983).

La función y actividad de las enzimas en las células y su participación en la oxidación y reducción, el transporte y la resistencia del cobre tiene un amplio estudio en los recientes años, especialmente en *E. coli* (Rensing C, Grass G 2003) y *Enterococcus hirae* (Solioz M, Odermantt A 1995; Solioz M, Stoyanov, J 2003).

I.3.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A METALES PESADOS

Existen tres mecanismos que provocan la resistencia a metales:

1. Atrapamiento de los metales.
2. Transformaciones redox a través de enzimas.
3. Expulsión de los metales por bombas (especial para plata). (Cervantes C, 2006)

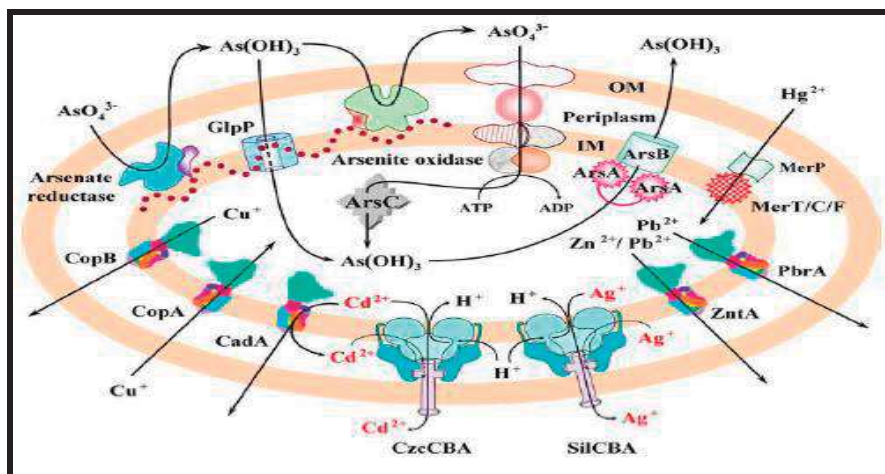


Figura 2. Conjunto de membranas asociadas a captación, eflujo, reducción y oxidación de iones de metales pesados (Silver, S, 2005).

a) RESISTENCIA A PLOMO

La resistencia bacteriana al plomo ha sido objeto de estudios microbiológicos ambientales, cuando una bacteria crece en concentraciones altas de Pb^{2+} más que otras. Sin embargo todavía es confuso si los mecanismos de resistencia al plomo son individuales o son diferentes en diferentes tipos de bacterias.

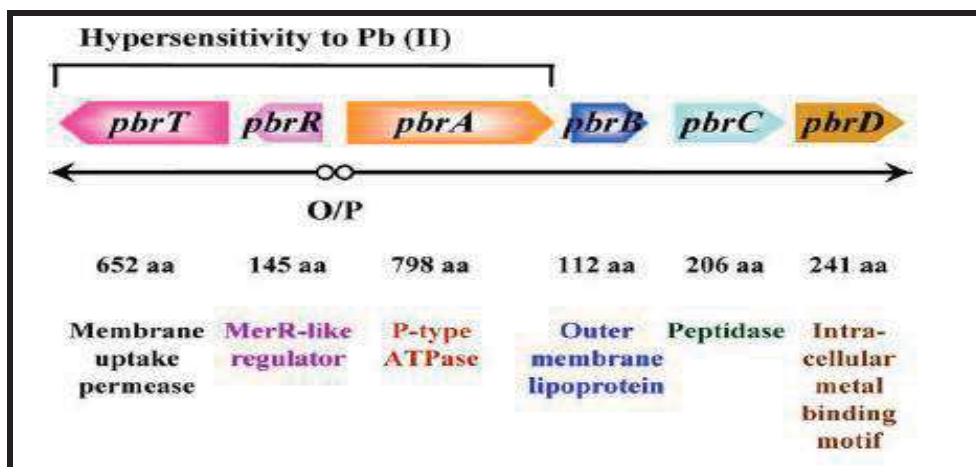


Figura 3. Genes que confieren resistencia al plomo para un microorganismo específico, R-metallidurans de tipo CH34.

La secuencia de los genes del ADN de resistencia al plomo proporciona una interpretación considerable (fig 3) (Borremans B, y col, 2001). El sexto gen de la región de resistencia al plomo está organizado por dos operones divergentes (reacción en cadena) de transcripción (fig 3). Un operador/ promotor de región (con 19 nucleótidos entre el -10 y 35- unidas a la RNA polimerasa motivadas) unido, actúa favorablemente (MerR-típico like) con PbrR originado en el medio (fig 3) como es de suponerse en la posición bidimensional de la transcripción.

En la transcripción de izquierda a derecha es sintetizada la inducción adicionada en plomo (Borremans B, 2001).

La PbrABCD es co-transcriptor para un solo mRNA. La unión de PbrR para el DNA promotor tiene en un sólo sitio que tiene preferencia por Pb+2 por encima de otros cationes divalentes incluyendo el Zn+2 (Chen P, 2005).

El principal gen productor de PbrT parece ser una proteína de membrana de la clase de las “permeasas”, ésta puede transportar hacia fuera el plomo (captación). PbrD parece ser una proteína intracelular unida a plomo. Esta secuencia contiene una cis potencialmente rica unida al metal (cis-X7-cis-cis-X7-cis-X7-His-X14-cis) y la unión con el metal en la región de PbrD contiene un gran número de residuos de Pro y Ser entre los residuos de Cis. La eliminación del gen PbrD baja la

acumulación de plomo a los niveles de células sensibles (Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL, van der Lelie D, 2001).

Los genes de extrema derecha y extrema izquierda codifican un mecanismo de resistencia basado en una expulsión (eflujo) seguido por secuencias intracelulares. El primer gen que está en el operon PbrABCD es PbrA codifica un amplio grupo de tipos-P de la familia de las ATPasa de la cis-pro-cis que bombea hacia fuera el metal libre (Midigan MT 2003).

La PbrA ATPasa tipo-P, comparte otra secuencia con características generales de todos los tipos-P de ATPasas incluyendo al Ca^{+2} que introduce la ATPasa. PbrB pronosticado como una lipoproteína de membrana, esta indicado para ayudar a la eliminación del plomo que es bombeado por PbrA en el compartimiento periplásmico. PbrC puede señalar peptidasas que remueven los péptidos de una proteína resistente al plomo transportada hacia el espacio periplásmico, probablemente PbrB.

b) RESISTENCIA, TRANSPORTE Y HOMEOSTASIS DEL COBRE.

Según Nies la acción del cobre es semejante a la del mercurio el cual es muy tóxico para *E.coli*. Estudios realizados indican que la *E. coli* es resistente al cobre a una concentración de 250 $\mu\text{m}/\text{ml}$ (Marine, 1994)

El cobre tiene dos formas de cationes, Cu^{+2} y Cu^{+} que químicamente se reducen, éstos tienen una unión cercana para el equilibrio entre el transporte y homeostasis.

En medio aeróbico el Cu^{+2} es mas abundante cuando es extracelular y es menos toxico el Cu^{+} si es intracelular (aunque no para un catión libre). No se puede reducir de Cu^{+2} a Cu^{+} , si esto ocurre en la superficie de las células antes del transporte, o unidos en la entrada de la membrana citoplasmática externa. Sin embargo se cree que lo que actúa en células internas es únicamente el catión Cu^{+} del cobre (S. silver, 2003).

E. coli crece en rangos milimolares de Cu^{+2} , en comparación con *Cyanobacter*, una clase diferente de bacterias Gram negativas, que se inhibe con concentraciones micromolares bajas. Esto además es confuso en condiciones de resistencia y bombas de eflujo.

La MIC de cobre para *E. coli* en medio TMYG es 1mM, como Co^{+2} Y Ni^{+2} , sin embargo, muchos organismos son más sensibles a cobre (Gorden y col. 1994). La toxicidad del cobre es básica en la producción de radicales hidropéroxido (Rodríguez, Montelongo y col 1993) y en interacción con las células de membrana (Suwalsky y col., 1998). Cuando extiende sustratos para Cu^{+} y Ag^{+} están divididos en un solo sistema o separados el ion Cu^{+} y el ion Ag^{+} , funcionalmente ocurren en sistemas resistentes, cuando algunos son reconocidos y atraviesan la membrana (Silver S 2003; Rensing C, Grass G 2003)

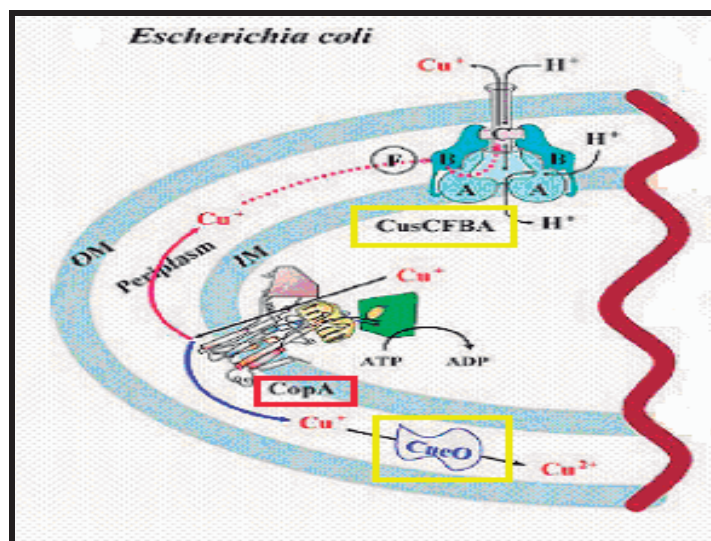


Figura 4. Actual opinión del transporte y resistencia del cobre en *E. coli* (Rensing C, y col, 2003)

En el espacio periplásmico extracelular de las Gram negativas como *E. coli*, se encuentran los multicomponentes del sistema de eflujo de transporte como son la **CueO** multi oxidasa de cobre y la CusCFBA (Singh SK, y col 2004), que aparecen para proteger la célula (Rensing C, Grass G 2003; Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH, 2003) (FIG 4).

En el estudio del metabolismo de cobre bacteriológico de *E. coli* con los usuales mecanismos (captación), se descubrió que el típico catión del cobre y el cobre intracelular para el movimiento no tienen enzimas específicas conocidas (Rensing C, Grass G 2003). A pesar de que el CopA P-tipo ATPasa (fig 3) tiene las propiedades características de un catión de metal ligero en eflujo, la ATPasa tratada primero con el CadA de cadmio eflujo ATPasa, le falta la secuencia completa que proporcione la interpretación de Cu^+ específicamente para CupA que contrasta con Cd^+ específicamente con CadA o captación (fig 3).

El sistema CusCFBA confiere resistencia a Ag^{+2} pero no para el Cu^{+2} . La proteína similar CusCFBA secuencial tiene cerca de la SilCFBA un gen productor confiriendo resistencia a Ag^{+2} , que fortalece la idea de la clase de cationes monovalentes del sistema RND (Gupta A, y col 1999).

El pequeño gen adicional *cusF* *encodes*, es una pequeña proteína que se separa de la serie dirigente y se establece en el periplasma. CusF es ideal para las funciones que tiene una “chaperona” del periplasma, una proteína unida al Cu^+ para la bomba de eflujo de CusCBA con un solo catión cobre delimitado con participación de residuos de metionina M69 y M71. Algunas cepas de *E. coli* tienen un plásmido adicional en el sistema de resistencia del cobre (Brown NL y col, 1995); examinado por Cooksey, Rensing y Grass con genes homólogos también establecidos en *R. metallidurans* CH34 (Mergeay M y col, 2003).

Los plásmidos *pco* determinantes son ideales para moderar uniones periplásmicas y oxidación por exceso de cationes cobre llevados transmembranalmente.

La función del cobre en la citocromo c oxidasa ilustra la importancia del cobre para todos los organismos aerobios. Sin embargo, los radicales esperados del cobre para este carácter son también muy tóxicos.

CopA es la ATPasa de eflujo de tipo-P de *E. coli* (fig 3) responsable de mantener el cobre intracelular a bajas concentraciones, de manera que un solo Cu^+ no presenta desequilibrio y prefiere una cinética unidireccional donde hay un equilibrio dominante y homeostasis en las concentraciones de cobre.

c) RESISTENCIA A PLATA

La toxicidad de la plata lo hace un elemento poco atractivo que deja huella, pero este ha sido usado desde un largo tiempo como un agente antimicrobiano (Slawson y col, 1992).

En la mayoría de las ciudades, el primer contacto de un niño recién nacido es junto a una ligera gota de nitrato de plata en los ojos para prevenir infecciones con cepas de *Neisseria*. Consecuentemente, se desarrolla la resistencia bacteriana (Deshpande, y col, 1994).

Aunque reducida la acumulación de la plata se observa resistencia bacteriana, estas uniones también son siempre para otros complejos intracelulares como el H_2S y fosfato. El ion plata a una concentración de $20\mu M$ es toxico en *E.coli* (medio TMYG) (Nies, 2003).

Recientemente, algunas moléculas biológicas se han hecho resistentes. La resistencia a plata en *E.coli* fue recientemente aclarada en Simon Silver's Lab (Gupta y col 1999).

La resistencia es catalizada por una tipo-RNA transportadora con extraordinaria similitud al sistema Czc de *A. eutrophus*. Por consiguiente, la resistencia a plata es en la mayoría de las bases de RNA-unidas traslapadas por eflujo en bacterias Gram negativas, la ATPasa tipo-P eflujo participa cuando son compuestos complejos y para compuestos intracelulares en organismos Gram positivos.

Los iones plata son sumamente tóxicos para todos los microorganismos talvez debido a la intoxicación del transporte de electrones encadenado a la respiración y a los componentes de la replicación del ADN. Recientemente se ha examinado profundamente (Silver S, 2003). El sistema resistente Sil Ag⁺ estudiado mas profundamente es el plásmido de *Salmonella* pMG101 que contiene nueve genes gobernantes Ag⁺ resistentes en estas 180 kb largas.

En un hospital de Chicago se colectaron bacterias al azar y aproximadamente 10 % presentaron plásmidos con genes de resistencia a Ag⁺ 2003).

Los nueve genes que determinan la resistencia a la plata empiezan con el gen *silE* que determina una pequeña proteína periplásmica unida al metal que no esta relacionada a otros dominios de uniones polipeptídicas con el metal, excepto para la pCOE polipéptido de la *E.coli* del sistema de resistencia al cobre (Gupta A, y col 2003) (fig 2).

SilE es una proteína periplásmica unida al metal, ésta es purificada y moderada por la plata unida a ella. SilS y SilR son supuestamente dos componentes de la membrana que responden sensorial y transcripcionalmente, y SilCBA y SilP (fig 2) son presumiblemente catión-protón quimiostáticos de la Ag⁺ eflujo antiporter y una ATPasa tipo-P, respectivamente (Gupta A., K, 2003)

Los componentes unidos a la plata son semejantes a biomazas microbianas, proteínas, y clorhidratos. La resistencia a metales pesado incluyendo la resistencia a plata se encuentra expuesta en el medio ambiente lo que podrían proporcionar la selección (Siver, S., 2003).

La adición de Cl a una baja concentración de plata incrementa la toxicidad para la bacteria porque incrementa la permeabilidad de la membrana (Gutknecht, J. 1981). Sin embargo, la mayoría de los reportes preliminares que se tienen y los existentes de resistencia bacteriana a plata en clínica están en duda principalmente porque los efectos de los compuestos del medio ambiente son factores de toxicidad y resistencia (Collins, Y. E., and G. Stotzky, 1987).

Tabla IV. Mecanismos y sistemas de resistencia bacteriana a metales pesados.

Toxic ions	Gene mnemonic	Protein function
Hg ²⁺ and organomercurials	<i>mer</i>	Mercuric reductase and transport
AsO ₄ ³⁻ and As(OH) ₃	<i>ars</i>	Arsenate reductase and transport
As(OH) ₃	<i>aso</i>	Arsenite oxidase and transport
AsO ₄ ³⁻	<i>arr</i>	Respiratory arsenate reductase
Cd ²⁺	<i>cad</i>	P-type efflux ATPase
Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	<i>czc</i>	CBA efflux permease
Co ²⁺ , Ni ²⁺	<i>cnr</i>	CBA efflux permease
Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺	<i>ncc</i>	CBA efflux permease
Ni ²⁺	<i>nre</i>	CBA efflux permease
Cu ²⁺ , Cu ⁺	<i>cop</i> and <i>pcp</i>	Copper resistance and transport
CrO ₄ ²⁻	<i>chr</i>	Chromate efflux permease
Ag ⁺	<i>sil</i>	Silver resistance and binding
Pb ²⁺	<i>phr</i>	Lead resistance and efflux
TeO ₃ ²⁻	<i>tel</i> , <i>teh</i> , or <i>kil</i>	Tellurite resistance

(Silver, S; Le. T. Punhg, 2005)

I.4 ASOCIACION DE LA RESISTENCIA METALES PESADOS-ANTIBIOTICOS

La contaminación con metales pesados es un problema severo del medio ambiente y se espera que incremente por las actividades industriales (ASM Colloquium Report, 1999).

En los últimos años se ha descubierto que la asociación entre la resistencia a metales pesados y a la resistencia a antibióticos es notable (Burnes BS, 2003) En algunos ejemplos la resistencia hacia metales es mediada por plásmidos, los cuales determinan la resistencia a antibióticos. Estos también están reportados en un único plásmido en *E. coli* que llevan genes por combinación de propiedades semejantes (Nakahara, H., T. y col. 1977).

Algunos estudios están diseñados para asegurar propiedades bioquímicas incluyendo resistencia a drogas y metales pesados en serogrupos de *E. coli* (Barber, R. S., y col. 1955). Un estudio realizado en Brasil, indica que la resistencia a metales está asociada con la resistencia a antibióticos, ya que el 36% de las cepas de *E. coli* fueron resistentes a más de un antibiótico y todas resistentes a cobre, Zinc y mercurio. (Cadonha A. M. S, y col. 2004).

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo General:

Determinar la diversidad fisiológica basada en la resistencia a antibióticos y metales de aislados clínicos de *E.coli* a partir de muestras de pacientes de Morelia, Michoacán, México con enfermedades agudas.

II.2. Objetivos Específico

- ❖ Evaluar la resistencia a antibióticos de aislados de *E. coli* provenientes de pacientes con diferentes diagnósticos clínicos.
- ❖ Determinar la resistencia a Cu, Pb y Ag de aislados clínicos de *E. coli*
- ❖ Establecer la posible relación entre la resistencia a antibióticos y la resistencia a los metales probados.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

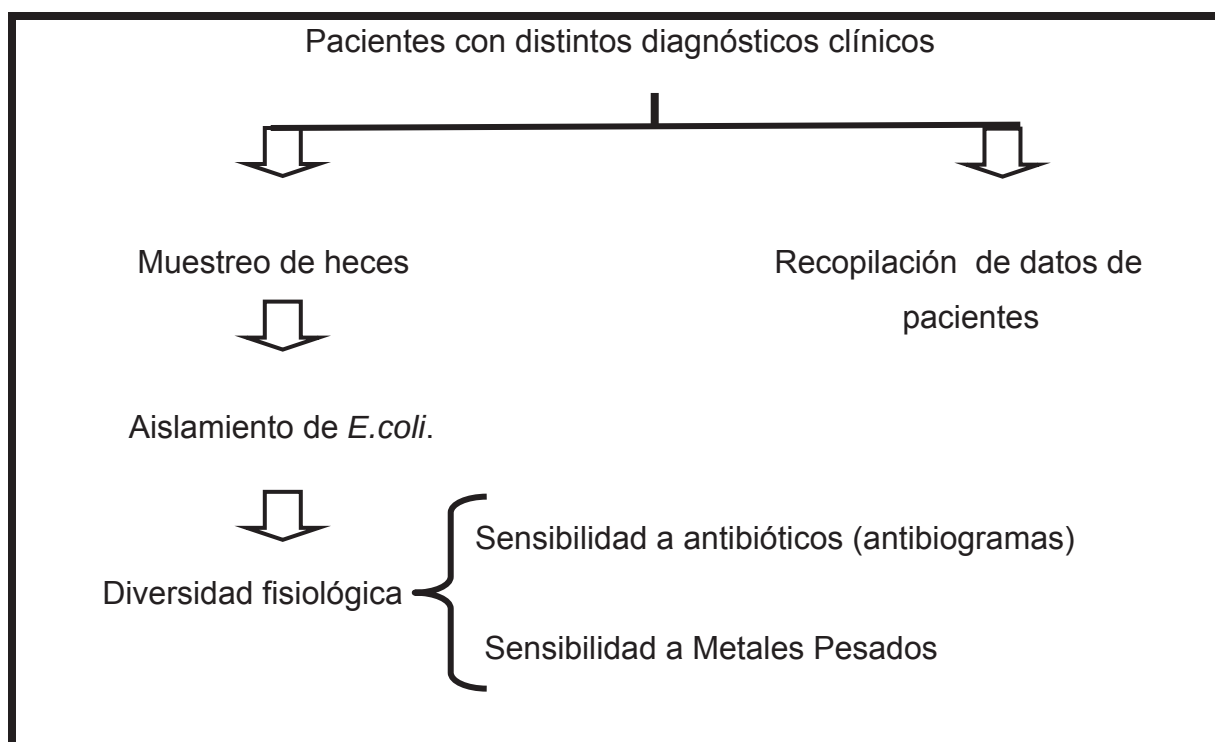


Figura 5. Representación de la estrategia experimental.

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1 Material Biológico

Para este trabajo se utilizaron aislados de *E.coli* proporcionados por el “Hospital General Regional Número 1” (IMSS) de la Ciudad de Morelia, Michoacán, México, provenientes de las heces de pacientes, con enfermedades agudas y que presentaban infecciones gastrointestinales, de 8 a 74 años, sembradas en placas de Agar Nutritivo en estría masiva y en viales con agar francés para su conservación.

IV.2 MEDIOS DE CULTIVO

IV.2.1 AGAR NUTRITIVO (BD Bioxon^{MR}).

Se utilizó para la conservación de los aislados en Cajas de Petri y pruebas de resistencia a metales, así como pruebas de sensibilidad a antibióticos y se preparó de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Se esterilizó a 121° C/15lb/pulg² durante 15 minutos.

IV.2.2 AGAR FRANCES O STAB AGAR

Este medio para conservación de cepas bacterianas se prepara agregando a un litro de agua desionizada caldo nutritivo (BD Bioxon^{MR}), 10 g; Cisteina (SIGMA[®]), 10 mg; NaCl (J.T. Baker[®]), 5 g ; Timina (SIGMA[®]), 10 mg; y agar bacteriológico (BD Bioxon^{MR}), 6 g. Posteriormente se esteriliza a 121°C/15lb /pulg² . Finalmente se vacía en crioviales de 2.0 ml hasta 2/3 de su volumen. La conservación de las cepas se realizó sembrando en agar francés por picadura e incubando a 37°C por 24 horas, observándose después crecimiento en la línea de picadura.

IV.3 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

La susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos probados fue determinada por el método de difusión con disco, recomendada por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990), con multidiscos

antimicrobianos comerciales (Multidiscos Gram negativos, BIO-RAD). Los multidiscos usados en el estudio se muestran en la tabla V así mismo se muestra el valor para el halo de inhibición.

Con un hisopo estéril de algodón, se toca una colonia previamente aislada y a continuación, en una placa nueva, se estría en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar nutritivo, para obtener un inóculo uniforme; al finalizar se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar nutritivo, cuando el inóculo se ha secado (de 3 a 5 min) se procede a colocar el multidisco el cual se toma con pinza estéril y se coloca presionando ligeramente en el medio en un tiempo menor de 15 min después de haber inoculado la placa. Después de 15 min de haber colocado el multidisco, la caja de Petri se invierte y se incuba a 37 °C por un tiempo de 16 a 18 horas. Tras la incubación, se anota la presencia y el tamaño de las zonas de inhibición alrededor de los discos. Las zonas que se ven sobre la placa se miden y se comparan con datos estándar para establecer si el aislado es verdaderamente sensible a un determinado antibiótico (Método Kirby Bauer)

IV.3.1 TECNICA PARA DETERMINAR SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

La sensibilidad frente a un antibiótico se determinó de acuerdo al método de Kirby-Bauer que consiste en Inocular una placa con agar nutritivo, distribuyendo una muestra de cultivo uniformemente por toda la superficie del agar y después colocando sobre la placa discos de papel filtro con sensidiscos (Gram negativos, BIO-RAD) una concentración conocida de distintos antimicrobianos.

Tabla V. Antibióticos y concentraciones utilizadas para el estudio

Antibiótico	concentración	R	I	MS	S
AMIKACINA	30 mcg	<14	15 --16		>17
AMPICILINA	10 mcg	<11	12 --13		>14
CARBENICILINA	100 mcg	<17	18 --22		>23
CEFALOTINA	30 mcg	<14	15 --17		>18
CEFOTAXIMA	30 mcg	<14		15 --22	>23
CEFTRIAXONA	30 mcg	<13		14 --20	>21
CLORAMFENICOL	30 mcg	<12	13 -- 17		>18
GENTAMICINA	10 mcg	<12	13 --14		>15
NETILMICINA	30 mcg	<12	13 -- 14		>15
NITROFURANTOINA	300 mc	<14	15 --16		>17
PEFLOXACINA	5 mcg	<14	15 --22		>23
TRIMETROPRIM					
SULFAMATAZOL	30mcg	<10	11 --15		>16

Resistente(R), Intermedio (I), Medianamente Sensible (MS), Sensible(S)

IV.4 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A METALES PESADO

V.4.1 PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK

Este ensayo se realiza, preparando primeramente una solución concentrada (stock) de los metales pesados como son: Sulfato de cobre pentahidratado 0.1g/ml ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ J.T BAKER ®), Nitrato de plomo 0.1M ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ J.T BAKER ®), Nitrato de plata 0.1M (AgNO_3 J.T BAKER ®). Las soluciones se esterilizan por filtración a través de membranas de 0.45µm y se conserva en frascos ambar a 4° C por no más de 7 días (Barber, R. S., R. Braude, K. G. Mitchell, and J. Cassidy. 1955).

IV.4.2 DETERMINACION DE RESISTENCIA A METALES PESADOS

La determinación de la resistencia a metales pesados se lleva a cabo por duplicado cajas de Petri con agar nutritivo que contiene diferentes concentraciones del metal. La temperatura del medio y la de la solución stock debe ser la misma, se mezclan y se llenan las placas de Petri, rotuladas con la concentración y metal correspondiente, con un hisopo estéril de algodón, se toca una colonia previamente aislada y se procede a inocular en estría en cuatro direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar, para obtener un inóculo uniforme. Se

invierte la placa y se incuba a 37 °C por un tiempo de 24 horas. Si se observa crecimiento, la cepa es resistente y se procede a realizar otra prueba con una concentración mayor, hasta que ya no halla crecimiento de la cepa, entonces se determina la sensibilidad o resistencia. Esto para cada metal (Norma M. y col 1984). Las concentraciones utilizadas para cada metal fueron las siguientes: AgNO₃, 100mM y 250mn; Pb(NO₃)₂, 0.5, 1, 10, 20, 40 y 50mN; CuSO₄·5H₂O, 100,250,400,500,600, 700 y 800µg/ml.

V. RESULTADOS

V.1 RECOLECCION DE MUESTRAS

El total de muestras recolectadas fue de 40, de noviembre de 2004 a abril de 2005 (Figura 6).

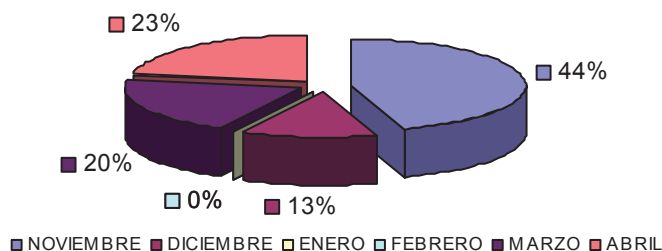


Figura 6. Distribución del porcentaje de muestras recolectadas por mes.

V.2. Descripción de la población estudiada.

En primera instancia se realizó un análisis de la población total de pacientes incluidos en el presente estudio. Se colectaron un total de 40 aislados clínicos de pacientes con de los cuales 17 (43%) pertenecen a pacientes del género masculino, y 23 (57%) al género femenino (Figura 6).

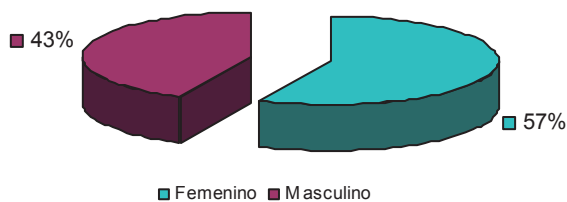


Figura 7. Distribución del género de los pacientes.

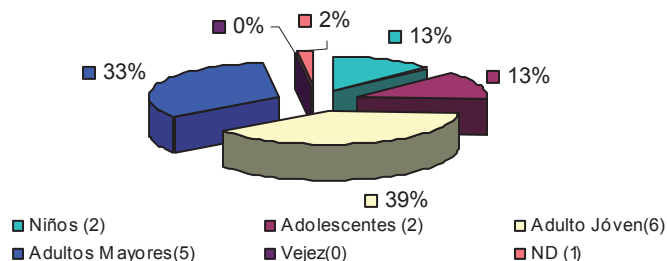


Figura 8. Distribución de edades de pacientes del género masculinos. Niños (0-12años), adolescentes (12-18 años), adulto joven (18-40 años), adulto mayor (40-65 años), vejez (65 ó más años).

Los límites de edad oscilaron entre niños de 8 años hasta adultos mayores, 62 años. La mayor proporción fue de adultos jóvenes (39%), seguida de adultos mayores (33%), adolescentes (13%), niños (13%), mientras que la menor proporción fue de edad desconocida, con 2% y no se presentaron pacientes en la edad de la vejez.

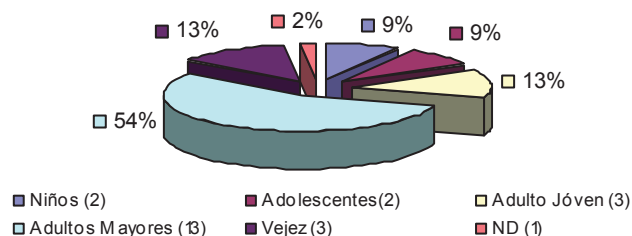


Figura 9. Distribución de edades de pacientes del género femenino. Niños (0-12 años), adolescentes (12-18 años), adulto joven (18-40 años), adulto mayor (40-65 años), vejez (65 ó más años).

Los límites de edad fueron dentro de un rango mayor ya que el límite menor fue de niños de 9 años hasta adultos mayores, 74 años. La mayor proporción fue de adultos mayores (54%) seguida de adultos jóvenes (13%), vejez (13%), adolescentes y niños (8% respectivamente), mientras que la menor proporción fue de edad desconocida, con 2%.

TABLA VI. Diagnóstico de pacientes

Diagnostico	No de casos	Diagnostico	No de casos
Cefalea en estudio	3	Linfoma no H	1
Colitis	1	Lupus	2
Colitis pos-radiación	1	ND	13
Desnutrición por Áscaris	1	Podislipidemia	1
Enfermedad por Reflujo Gastro esofágico	5	Rinitis Alérgica	2
Enteritis	7	Síndrome Febril	1
Insuficiencia Renal Crónica	1	Urticaria	1

ND; no determinado;

V.3. Ensayo de sensibilidad a antibióticos.

TABLA VII. RESULTADO DE ANTIBIOGRAMAS

CEPA	AK	AM	CBX	CF	CTX	CRO	CL	GE	NET	NF	PEF	SXT
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
5	MS	R	R	S	MS	S	R	R	R	R	R	R
6	MS	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R
7	S	S	R	I	MS	MS	S	I	R	I	I	S
8	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
9	S	R	R	I	MS	S	S	I	I	S	I	S
10	S	S	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
19	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
21	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S
22	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R
23	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
24	I	R	R	I	S	S	S	R	I	S	I	R
25	S	I	S	R	S	S	S	R	I	S	S	S
26	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	I	S
27	I	S	I	S	MS	S	S	R	R	I	I	R
29	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
32	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
33	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R
35	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S
37	R	S	S	I	S	R	R	R	R	S	I	S
38	R	R	I	I	MS	R	S	R	R	S	I	R
39	S	R	R	R	MS	S	S	I	S	S	S	R
40	S	S	I	R	S	S	S	R	S	S	S	S
41	R	R	S	S	R	S	S	S	S	I	I	R
42	MS	R	R	R	MS	S	S	R	R	I	R	R
43	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44	I	R	R	I	S	S	S	I	R	S	R	R
45	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	I	R
46	R	S	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R
47	I	R	R	I	S	MS	S	I	I	S	S	R
48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
49	I	R	R	R	R	MS	I	R	R	R	R	R
50	I	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R
52	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
54	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
55	R	R	R	R	R	MS	R	I	S	S	R	R

(AK) Amikacina; (AM) Ampicilina; (CBX) Carbenicilina; (CF) Cefalotina; (CTX) Cefotaxima; (CRO) Ceftriaxona; (CL) Cloranfenicol; (GE) Gentamicina; (NET) Netilmicina; (NF) Nitrofurantoina; (PEF) Pefloxacin; (SXT) Trimetoprim-sulfametaxazol. (R) Resistente; (I) Intermedio; (MS) Moderadamente sensible; (S) Sensible.

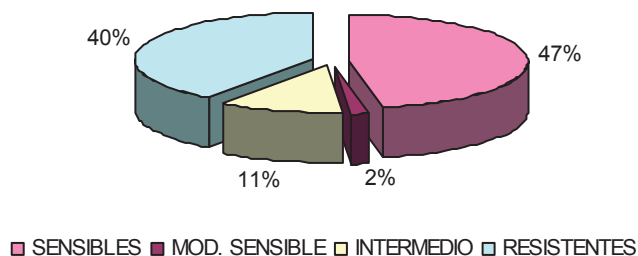


Figura 10. Distribución general de la resistencia y sensibilidad presentada por aislados de *E. coli* a antibióticos.

Tabla VIII. Distribución porcentual de Sensibilidad a antibióticos

ANTIBIOTICO	R (%)	I (%)	MS (%)	S (%)
AMIKACINA	30	15	8	47
AMPICILINA	57	3	0	40
CARBENICILINA	52	10	0	38
CEFALOTINA	35	25	0	40
CEFOTAXIMA	32	18	3	47
CEFTRIAXONA	28	3	10	59
CLORANFENICOL	15	3	0	82
GENTAMICINA	57	18	0	25
NETILMICINA	50	10	0	40
NITROFURANTOINA	23	10	0	67
PEFLOXACINA	45	25	0	30
TMP SXT	55	0	0	45

(R) Resistente; (I) Intermedio; (MS) Moderadamente sensible; (S) Sensible

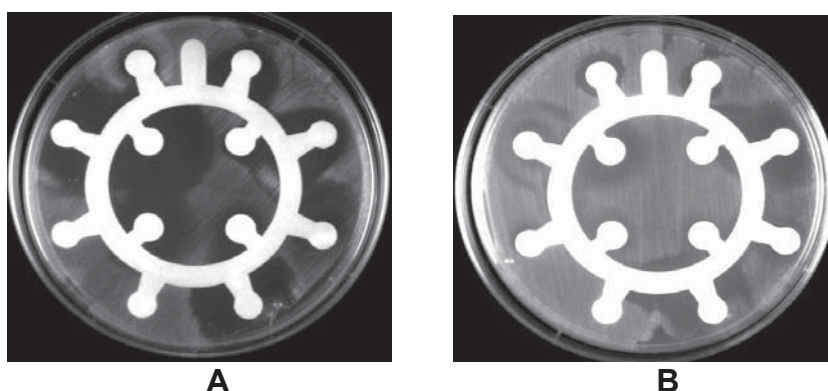


Figura 11. Antibiogramas con aislados de *E.coli*. Sensibilidad (A); Resistencia (B).

En esta figura se observa como es inhibido el crecimiento de un aislado de *E. coli* por los diferentes antimicrobianos (A); el aislado presenta resistencia ala mayoría de los antimicrobianos (B).

V. 4. Ensayo de sensibilidad a Metales Pesados

V. 4.1 Sensibilidad presentada por aislados de *E. coli* a cobre.

Tabla IX. Frecuencia de resistencia en aislados de *E. coli* a cobre

	1o	2o	3o	4o	5o	6o	7o
AISLADO	100µg/ml	250µg/ml	400µg/ml	500µg/ml	600µg/ml	700µg/ml	800µg/ml
1	R	R	I	MS	MS	S	S
2	R	R	MS	MS	S	S	S
3	R	R	I	S	S	S	S
4	R	R	MS	S	S	S	S
5	R	R	MS	MS	S	S	S
6	R	R	S	S	S	S	S
7	R	S	S	S	S	S	S
8	R	R	R	R	I	S	S
9	R	R	I	S	S	S	S
10	R	MS	S	S	S	S	S
11	R	I	S	S	S	S	S
21	R	MS	S	S	S	S	S
22	R	MS	S	S	S	S	S
23	R	I	S	S	S	S	S
24	R	R	I	S	S	S	S
25	R	R	MS	S	S	S	S
26	R	I	S	S	S	S	S
27	R	I	S	S	S	S	S
29	R	R	MS	S	S	S	S
32	R	R	I	S	S	S	S
33	R	S	S	S	S	S	S
35	R	I	MS	MS	S	S	S
37	R	MS	MS	MS	S	S	S
38	R	I	MS	MS	S	S	S
39	R	R	R	I	I	S	S
40	R	R	R	MS	S	S	S
41	R	R	I	MS	S	S	S
42	R	R	I	MS	MS	S	S
43	R	R	R	I	I	MS	S
44	R	R	R	S	S	S	S
45	R	I	MS	S	S	S	S
46	R	I	MS	MS	S	S	S
47	R	I	MS	S	S	S	S
48	R	R	R	R	R	I	S
49	R	MS	S	S	S	S	S
50	R	MS	S	S	S	S	S
52	R	R	I	MS	MS	MS	S
54	R	R	R	R	R	I	S
55	R	MS	S	S	S	S	S

R, Resistencia (+++ = 100%); I, Intermedio (+= 66.6%); MS, Moderadamente Sensible (+=33.3%); S, Sensible (-)

Tabla X. Representación Porcentual de la sensibilidad a cobre

C (µg/ml)	R (%)	I (%)	MS (%)	S (%)
100	100	0	0	0
250	52	25	18	5
400	18	23	27	32
500	8	5	30	57
600	5	8	8	79
700	0	5	5	90
800	0	0	0	100

(C) Concentración (R) Resistente; (I) Intermedio; (MS) Moderadamente sensible; (S) Sensible

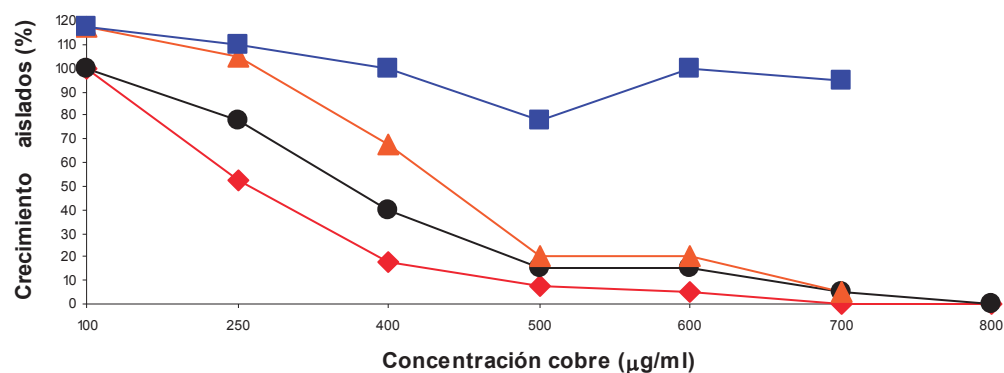


Figura 12. Representación de la inhibición del crecimiento bacteriano por el cobre.

En la figura anterior se observa la disminución del crecimiento bacteriano, al aumentar la concentración del metal.

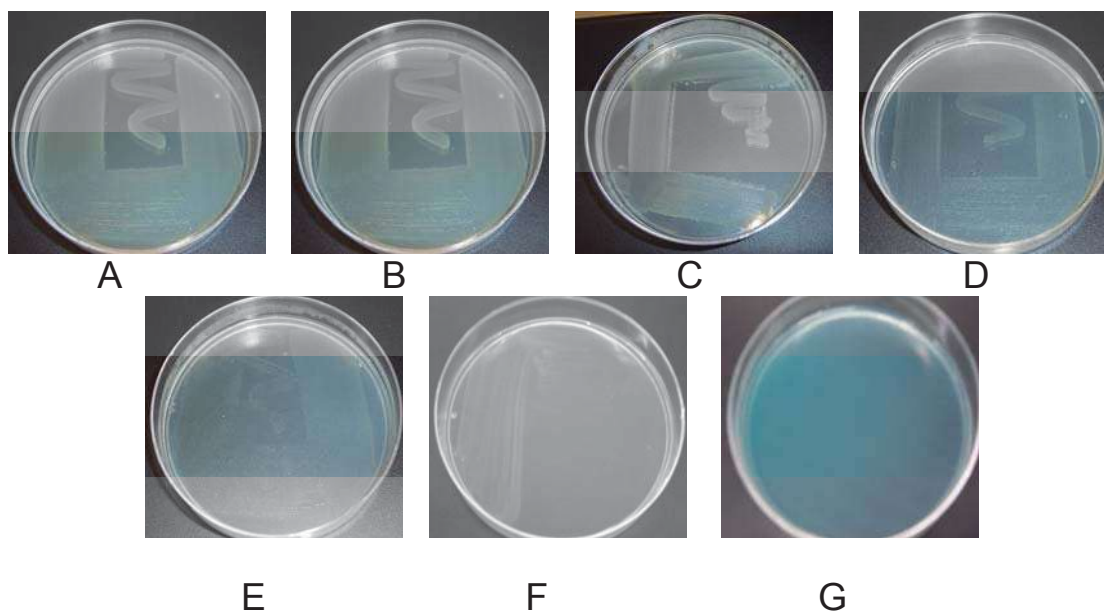


Figura 13. Resistencia presentada por un aislado de *E. Coli* a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Concentración: 100µg/ml (A); 250µg/ml (B); 400µg/ml (C); 500µg/ml (D); 600µg/ml (E); 700µg/ml (F); 800µg/ml (G).

V.4.2. Representación de resistencia presentada a plomo por aislados de *E. Coli*

Tabla XI. Frecuencia de resistencia en aislados de *E. coli* a plomo

	1°	2o	3o	4o	5o	6°
Mtra	0.5Mm	1mM	10mM	20mM	40mM	50mM
1	R	I	I	MS	S	S
2	R	I	I	MS	S	S
3	R	I	I	MS	S	S
4	R	I	I	MS	S	S
5	R	I	I	MS	S	S
6	R	I	I	I	S	S
7	R	I	I	MS	S	S
8	R	MS	S	S	S	S
9	R	MS	S	S	S	S
10	R	S	S	S	S	S
11	R	MS	I	MS	S	S
19	R	I	I	MS	S	S
21	R	MS	I	MS	S	S
22	R	S	S	S	S	S
23	R	S	S	S	S	S
24	R	S	S	S	S	S
25	R	MS	MS	MS	S	S
26	R	R	S	S	S	S
27	R	MS	S	S	S	S
29	R	R	S	S	S	S
32	R	S	S	S	S	S
33	R	MS	MS	MS	S	S
35	R	MS	MS	MS	MS	S
37	R	MS	MS	MS	S	S
38	R	R	MS	MS	S	S
39	R	S	S	S	S	S
40	R	R	MS	MS	MS	S
41	R	R	S	S	S	S
42	R	MS	S	S	S	S
43	R	MS	MS	S	S	S
44	R	I	S	S	S	S
45	R	MS	MS	MS	MS	S
46	R	MS	MS	MS	MS	S
47	R	MS	MS	MS	S	S
48	R	MS	MS	MS	S	S
49	R	I	I	MS	S	S
50	R	I	MS	MS	S	S
52	R	MS	MS	MS	S	S
54	R	I	MS	MS	S	S
55	R	I	MS	MS	S	S

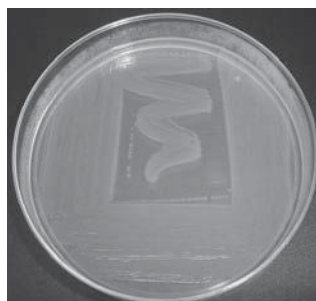
R, Resistencia (+++ = 100%); I, Intermedio (++= 66.6%); MS, Moderadamente Sensible (+=33.3%); S, Sensible (-)

En la tabla anterior, nos representa el comportamiento de los aislados frente a plomo, nótese, que al aumentar la concentración disminuye la resistencia, hasta llegar a ser totalmente sensibles. Los valores I y MS nos indican que hay crecimiento, pero no son totalmente sensibles.

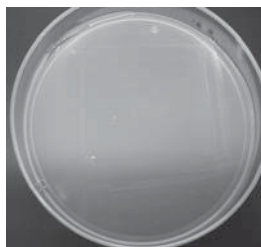
Tabla XII. Representación porcentual de la Sensibilidad a Plomo

C (mM)	R (%)	I (%)	MS (%)	S (%)
1	13	33	39	15
10	0	28	37	35
20	0	3	60	15
40	0	0	10	90

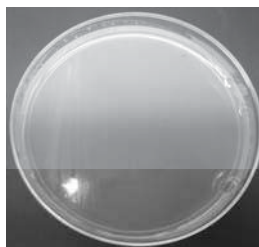
C, Concentración; R, Resistencia (+++ = 100%); I, Intermedio (++= 66.6%); MS, Moderadamente Sensible (+=33.3%); S, Sensible (-).



A



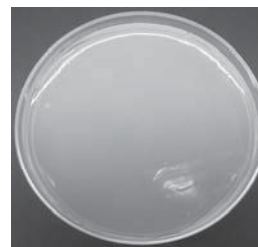
B



C



D



E

Figura 14. Resistencia y sensibilidad presentada por un aislado de *E.coli* a plomo. 0.5mM (A); 1mM (B); 10mM (c); 20mM (D); 40mM (E).

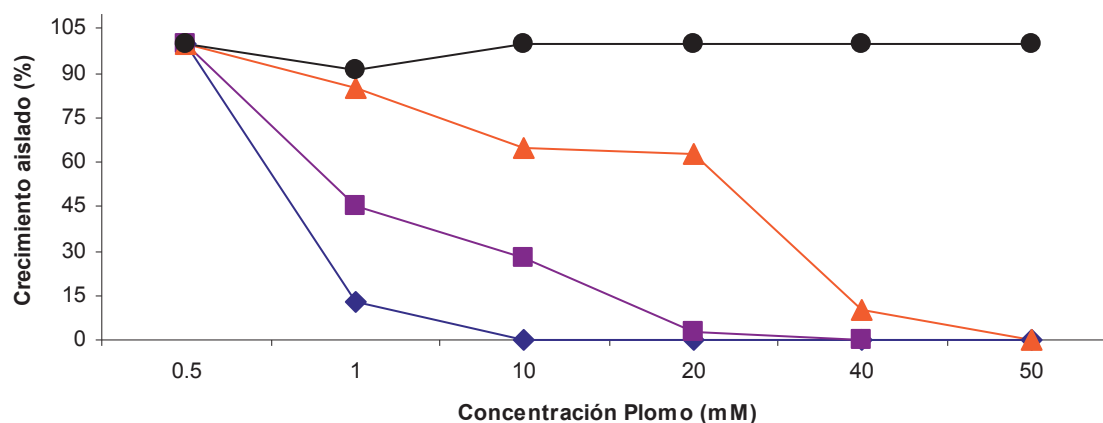


Figura 15. Representación de la inhibición del crecimiento por el plomo

V. 4.3. Prueba de sensibilidad en aislados de *E. coli* con plata.

Para esta prueba se inició con concentraciones por arriba de 0.25mM, y los todos los aislados fueron sensibles, se bajo la concentración hasta 0.100mM y todos los aislados presentaron resistencia, con este intento termino el estudio. Como sabemos la plata es sumamente tóxica para *E. coli* y concentraciones tan elevadas inhiben el crecimiento. Por cuestión de tiempo no se realizaron pruebas en el rango de 0.100- 0.200mM. Por esta razón se recomienda trabajar primeramente con concentraciones dentro del rango señalado.



A



B

Figura 16. Resistencia y sensibilidad presentada por un aislado de *E.coli* a plata. Concentración: 0.1mM resistente (A); 0.25mM sensible (B).

Tabla XIII. Concentración Máxima de crecimiento

AISLADO	COBRE (µg/ml)	PLOMO (mM)	PLATA (mM)
1	600	20	100
2	500	20	100
3	400	20	100
4	400	20	100
5	500	20	100
6	250	20	100
7	100	20	100
8	600	1	100
9	400	1	100
10	250	0.5	100
11	250	20	100
19	500	20	100
21	250	20	100
22	250	20	100
23	250	20	100
24	400	20	100
25	400	20	100
26	250	20	100
27	250	20	100
29	400	20	100
32	400	20	100
33	100	20	100
35	500	40	100
37	500	20	100
38	500	20	100
39	600	20	100
40	500	40	100
41	500	20	100
42	600	20	100
43	700	20	100
44	400	20	100
45	400	40	100
46	500	40	100
47	400	20	100
48	700	20	100
49	400	20	100
50	400	20	100
52	700	20	100
54	700	20	100
55	250	20	100

V.4.4 RELACIÓN METALES PESADOS- ANTIBIÓTICOS

Para determinar si la resistencia de los aislados es la misma para metales pesados y antibióticos, se debe relacionar ambos resultados y así comprobar si la resistencia esta relacionada o cada aislado se comportan de diferente manera ante los antibióticos y metales pesados. A continuación se presentan graficas de esta relación.

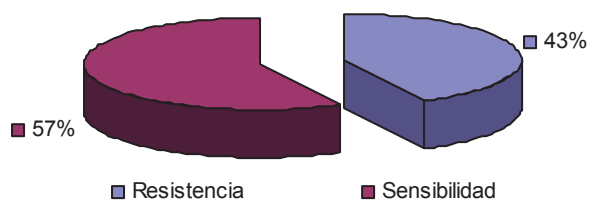


Figura 17. Distribución de la resistencia cobre-antibióticos de aislados de *E. coli*

La resistencia presentada por los aislados de *E.coli* no fue la misma en antibiogramas y metales pesados, ya que solo el 43% de los aislados presento resistencia en ambas pruebas y el 57% presento una misma sensibilidad. Para determinar esta resistencia se determino que el valor a considerar seria si el aislado presentara resistencia a mas de 6 antibióticos y concentraciones mayores o iguales a 400µg/ml.

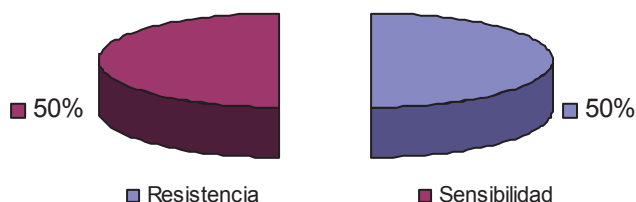


Figura 18. Distribución de la resistencia plomo-antibiótico en aislados de *E. coli*.

Evidentemente el comportamiento de los aislados frente al metal y a los antibióticos es semejante ya que el porcentaje es el mismo tanto para resistencia como para sensibilidad. Aquí se tomo en cuenta la resistencia presentada a 20mM y 40mM, para los antibióticos debían ser resistentes a más de 5 antibióticos para considerarse la relación.

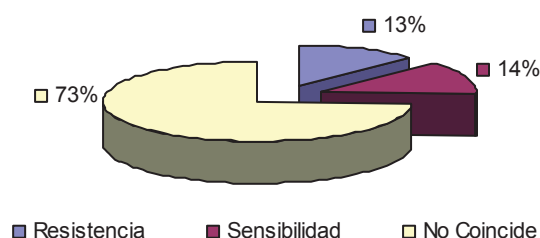


Figura 19. Distribución de resistencia plomo- cobre en aislados de *E.coli*

Sólo unos cuantos aislados presentaron resistencia (13%) en la prueba con ambos metales ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{-CuSO}_4$) al igual para la sensibilidad (14%), el 73% corresponde a aislados que no coinciden ni con la resistencia ni la sensibilidad de cada metal. Se tomo en cuenta que un mismo aislado presentara resistencia a 20mM, 40mM y a partir de 400 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

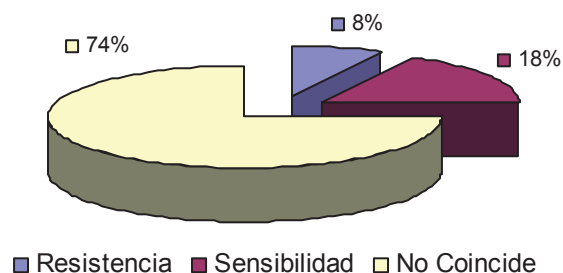


Figura 20. Distribución de resistencia Plomo-Cobre-Antibiótico en aislados de *E.coli*.

La resistencia en las tres pruebas sólo coincidió en pocos aislados (8%), la sensibilidad se presento en un porcentaje mayor (18%) y en el mayor porcentaje se encuentran englobados los aislados que no coincidieron en ninguna prueba. Para obtener estos valores se tomo en cuenta que para el CuSO_4 los aislados presentaran resistencia a 400 $\mu\text{g/ml}$ o una concentración mayor; en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentración de 40mM y que presentarán resistencia a 6 o más antibióticos.

VI. DISCUSIÓN

Los aislados utilizados para este estudio provienen de pacientes femeninos y masculinos, con edades que van desde los 9 años hasta 74 años y 8 años a 62 años, respectivamente, con diagnósticos variados y todos provienen de una Institución de salud pública de Morelia, a la cual acuden personas de la región, lógicamente con diferentes formas de vida, probablemente algunos de ellos tienen más contacto con metales pesados y/o con antibióticos que otros. Estos datos nos pueden llevar a generar una hipótesis, sobre la distribución de la sensibilidad a metales pesados y a antibióticos, esta hipótesis sugiere que por ser pacientes con tratamientos prolongados en algunos casos, la resistencia sería múltiple. Ahora analizaremos cada prueba.

El amplio uso de antibióticos es la razón principal para un incremento en la resistencia a antibióticos. La prevalencia de la resistencia de *E. coli* a ampicilina, uno de los antibióticos más comúnmente usados, se ha estudiado, encontrándose alta resistencia no solo a este antibiótico sino a E, Gm, Cl, (Liliana Benavides,et, al., 2005). Nuestros aislados mostraron multirresistencia a antibióticos pero a diferencia de los reportado para aislados clínicos de *E. coli* que mostraron resistencia del 80% a ampicilina (AM), ciprofloxacina (Cip), amikacina (Ak), cefalotina (Cf), piperinicilina (Pip) y trometroprim-sulfametaxazol (T/S) (Liliana Benavides,et, al., 2005), los aislados que se estudiaron aquí muestran resistencia a lagunos de estos y a otros que no se han reportado, además el nivel de sensibilidad también fue diferente.

El 57% de los aislados mostró resistencia a ampicilina y gentamicina, que es cercano al reportado por J Lin en el 2003(46.5%) para *E. coli*, este antibiótico inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias gram negativas. Sin embargo la diferencia en el grado de resistencia entre los aislados puede deberse a resistencia intrínseca o bien a un mecanismo de resistencia adquirida (Fouces, 1999).

Los aislados que se utilizaron para el presente estudio pertenecían a pacientes con diferentes diagnósticos clínicos, que al realizarles un estudios de laboratorio, en especifico, un coprocultivo, se observo el crecimiento de la *E.coli*, a la cual se

le aisló para realizar los estudios de sensibilidad a antibióticos a metales pesados. Según Harnett M. Norma, la resistencia metales pesados es mediada por los mismos plásmidos que determinan la resistencia a antimicrobianos, por tal razón se creería que los aislados con resistencia a antibióticos presentarían resistencia a metales pesados.

Nuestros resultados indican que: del 100% de los aislados sólo el 40% presento multirresistencia y el 47% fueron sensibles. Por lo tanto, más o menos la mitad de los pacientes probablemente ya había tenido contacto con los antibióticos lo que motivo probable de resistencia.

Respecto a la resistencia por antibiótico la ampicilina (AM) y gentamicina (GE) con un 57% cada una, seguida de trimetoprim-sulfametaxazol (TMP-SXT) con el 55%, carbenicilina (CBX) 52% , netilmicina (NET) 50%, pefloxacina (PEF) 45%, tuvieron el mayor número de aislados resistentes, seguidos de la cefalotina (CF) 35%, cefotaxima (CTX) 32%, amikacina (AK) 30%; entre los que se presento menor resistencia están ceftriaxona (CRO) 28%, nitrofurantoina (NF) 23%, cloranfenicol (CL) 15%. Como se observa la mayor resistencia es hacia los antibióticos que se prescriben comúnmente sobre todo en hospitales y clínicas públicas como medicamento de primera elección, donde la mayoría de los pacientes no terminan sus tratamientos lo que trae como consecuencia la resistencia bacteriana (Brock 2003), el porcentaje menor es antibióticos menos prescritos o de tercera generación como la cefalotina.

Si la ampicilina (AM), gentamicina (GE), trimetoprim-sulfametaxazol (TMP-SXT), carbenicilina (CBX) , netilmicina (NET) y pefloxacina (PEF) obtuvieron el mayor porcentaje de resistencia sería lógico que obtuvieran el menor porcentaje de sensibilidad, pero no fue así, ya que algunos aislados también presentaron una sensibilidad moderada y un valor intermedio indicado en control. El cloranfenicol (CL) 82%, nitrofurantoina (NF) 67%, ceftriaxona (CRO) 59%, cefotaxima (CTX) 47% y amikacina (AK) 47% coinciden con ser los de menor resistencia y mayor sensibilidad, pero trimetoprim-sulfametaxazol (TMP-SXT) 45%, netilmicina (NET) 40%, ampicilina (AM) 40%, cefalotina (CF) 40% carbenicilina (CBX) 38%, pefloxacina (PEF) 30%, y gentamicina (GE) 25%, presentaron un alto número de

aislados resistentes, pero no sensibles, es decir, que algunos aislados fueron moderadamente sensibles u obtuvieron un halo de inhibición que equivale a intermedio.

La mayoría de las infecciones gastrointestinales son causadas por la *E. coli* y la lucha por controlar estas enfermedades, ahora se encuentra con un gran problema, la resistencia de las bacterias no sólo es hacia los antibióticos, también a los metales pesados, por tal razón en los últimos años el estudio de la resistencia a metales pesados a sido de gran interés ya que los plásmidos que la generan también participan en la resistencia a metales pesados (Nies, 2003).

El 52% de los aislados tratados presento resistencia a sulfato de cobre a una concentración de 250µg/ml, al incremento la concentración a 400µg/ml sólo el 18% presento resistencia, nuevamente se aumento la concentración a 500µg/ml, pero sólo el 3% de los aislados fue sensible, este 5% se trato a una concentración de 600µg/ml, sólo disminuyó el crecimiento, finalmente a 800µg/ml los aislados fueron totalmente sensibles, esto coincide con lo reportado por Cardona M. S. Angela , 2004 donde la *E. coli* es resistente a 250µg/ml. EL cobre es considerado dentro de los metales de alta toxicidad y participa activamente en la cadenas respiratoria.

La resistencia a plomo se observo a 1mM en el 13% de los aislados, es sensible a 10mM pero aún se observo crecimiento, la sensibilidad total se presento hasta una concentración de 50mM, en el estudio realizado por Harnett, 1984 señala que la *E. coli* es sensible a 10mM, pero nuestros aislados resistieron a una concentración de 40mM.

Sin lugar a duda, la plata es uno de los cationes de metales más tóxicos, pero todas las personas estamos en contacto diario con este cation, se usa como agente antimicrobiano para la higiene, en agricultura e industria (Gupta y Silver 1998), este y otros contactos como las amalgamas son la causa de que se genere resistencia a la plata. En este estudio, el 100% de los aislados presento resistencia a 0.100mM y sensibilidad a 0.250mM, el rango es corto pero al parecer la CMI, esta dentro de este rango, el resultado concuerda con lo reportado por

Gupta Amit, 1998, donde indica que la *E. coli* es sensible al ion Ag^+ a partir de 0.200mM.

Para confirmar si la resistencia a metales pesados está relacionada con la resistencia a antibióticos, se realizaron varios análisis sobre esta resistencia. En primer lugar, los aislados presentaron un grado de resistencia elevado, mucho mayor al reportado, al enfrentarlo con los resultados de antibiogramas, el 57% presento sensibilidad a ambas pruebas y 43% fueron resistentes. Se tomaron los aislados resistentes a 400µg/ml ó más y resistentes a 6 ó más antibióticos.

Es segundo lugar, se realizo el estudio entre la resistencia a plomo y a antibióticos, tomando en cuenta los aislados resistentes a 20 y 40mM y 5 antibióticos, se presento un 50% de resistencia e igual de sensibilidad. Al parecer la resistencia está más asociada con plomo.

En el tercer estudio, se analizaron los resultados arrojados de las pruebas de sensibilidad a cobre y plomo, el 13% de los aislados presento resistencia ambos metales, y 14% fueron sensibles, ya que se tomo en cuenta que un mismo aislado fuera sensible o resistente a ambos metales, para cobre a partir de 400µg/ml y plomo 20 y 40mM. En el 73%, los aislados, no coincidieron en sensibilidad ni en resistencia.

Por último, la relación más importante es si hay asociación entre la resistencia a metales y a antibióticos. En nuestro estudio sólo el 8% de los aislados presento resistencia múltiple, el 18% fue sensible en ambas pruebas y 74% no coincidió. Se considero para cobre 400µg/ml, plomo 40mM y 6 ó más antibióticos. Nuestros resultados coinciden con trabajos anteriores que indican que en *E. coli* la resistencia a antibióticos suele ir asociada a la resistencia a metales pesados. (Int. Microbiol 2004: 7(3): 213-218; Cardona Angela M. S, Vieiria, y col , 2004)

VII. CONCLUSIONES.

- ❖ La resistencia fue notable, sólo el 5% de los aislados fue sensible a todo los antibióticos y el 95% presento múltiple resistencia.
- ❖ Se logro encontrar la concentración máxima de crecimiento de cada aislado con dos de los tres metales probados.
- ❖ La prueba con plata debe realizarse a concentraciones menores de 0.200mM, para encontrar la concentración máxima de crecimiento.
- ❖ Se comprobó que la resistencia a metales está asociada con la resistencia a antibióticos, aunque en un porcentaje mínimo.
- ❖ La edad o género no son factor para la resistencia.
- ❖ Desafortunadamente no se tuvo acceso al archivo de pacientes para comprobar el contacto con metales.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Barber Braude R. S., R., Mitchell K. G., and Cassidy J. 1955. High copper mineral mixture for fattening pigs. Chem. Ind. (London) 74:601
- Barkay T. M., Gillman and Turner R. R. 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. Appl. Environ. Microbiol. 63:4267-4271.
- Beard S. J., Hashim R, Membrillo Hernandez J., Hughes M. N., Poole R. K., 1997. Zinc (II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. Mol Microbiol 25 : 883-891.
- Blattner F. R., Plunfett G, r., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. 1997 The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 (complement). Science 277: 1453-1474.
- Borremans B., Hobman J.L., Provoost A, Brown NL, van der Lelie D. 2001 Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. J Bacterial 183:5651-5658.
- Brown N. L., Barreto SR, Camakaris J, Lee Bt, Rouch DA 1995. Molecular Genetics and functional analysis of the copper-resistance determinant (poc) from *Escherichia coli* plásmido pRJ1004. Mol Microbiol 17:1153-1166
- Cardonha Angela M. S., Vieira Regine H. S. F., Rodríguez Dália P., Macrae Andrew, Peirano Gizele, Teophilo Grace N. D. 2004. Fecal pollution in water from store sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. Vol 7 pag.213-218.
- Cavet J. S., Borrelly GP, Robinson NJ 2003. Zn, Cu y Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. FEMS Microbiol Rev 27:165-181.
- Chen C. M., Misra T. K, Silver S., Rosen B. P. 1986. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. J Biol Chem 261: 15030-15038.
- Chai T. J. 1993. Characteristics of *Escherichia coli* grow in bay water as compared with rich medium. Appl. Environ. Microbiol. 45:1316-1323.
- Chen P., Greenberg B, Taghavi S, Romano C, van der Lelie D, He C (2005) An excetionalli selective lead (II)-regulatory protein from *Ralstonia*

metallidurans: development of a fluorescent lead (II) probe. Angew Chem Int Ed Engl 44: 2715-2719.

- Chin M. H., Kaur P., Karkaria C. E., Steiner R. F., Rosen B. P. 1991. Substrate- induced dimerization of the ArsA protein, the catalytic component of an anion-translocating ATPase. J Biol Chem 266: 2327-2332
- Clement J. L., and P.S. Jarrete. 1994. Antibacterial silver. Metal-Based Drugs 1:4267-4271.
- Collins Y. E., and Stotzky G., 1987. factors affecting la toxicidad of heavy metals to microbes, p. 31-90. In T. J. Beveridge and R. J. Doyle (ed), Metal ions and bacteria. John Wiley and Sons, Inc., New York, N, Y.
- Cooksey D. A. 1994. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. FEMS Microbiol Rev 14:381-386.
- Cravioto A., Reyes R. E., Trujillo F, y col 1990. Risk of diarrhea during the year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epid 131:886,
- Cravioto A., Tello A., Navarro J, y col. 1991 Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet 337:262
- Cotton F. A., and Wilkinson G., 1988. Silver and gold: group IB(11), p.937-949. In Advanced inorganic chemistry, 5th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, N. Y
- Dehesa N., 1991. Diarrea crónica. En. Diagnóstico y Terapéutica en Medicina Interna. G. Llamas Esperón (ed). México: Méndez Cervantes, pp 574-579.
- Deshpande L. M., and Chopade B. A., 1994. Plasmid mediated silver resistance in *Acinobacter baumannii*. Biometals 7:49-56.
- Dey S., Dou D., Tisa L. S., Rosen B. P. 1994. Interaction of the catalytic and the membrane subunits of an axyanion-translocating ATPase. Arch Biochem Biophys 311: 418-424.
- Dey S., Rosen B. P. 1995. Dual mode of energy coupling by the axyanion-translocating ArsB protein. J Bacteriol 177: 385-389.
- Diels L., De Smet M., Hooyberghs L., Corbiersier P. 1999. Heavy metals bioremediation of soil. Mol Biotechnol 12:149-158. Erratum in Mol Biotechnol 113-171.

- Dou D., Owolabi J. B., Dey S., Rosen B. P. 1992. Construction of a chimeric ArsA-ArsB protein for overexpression of the axyanion-translocating ATPase. J Biol Chem 267: 25768-25775.
- Elek S. D., and Higney L. 1970. Resistogram typing- a new epidemiological tool: application to *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 3:103-110.
- Evans D.J., Evans D. G. 2003. *Escherichia coli* in Diarrheal Disease
- Fagan M. J., Saier M. H. J. 1994. P-type ATPase of eukaryotes and bacteria: sequence comparisons and construction of phylogenetic trees. J Mol Evol 38: 57-99.
- Fath M. J., Kolter R. 1993. ABC-transporters: The bacterial exporters. Microbiol Rev 57: 995-1017.
- Francis M. J., Jones E. E. Levy E. R., Ponnambalam S., Chelly J., Monaco A. P. 1998. A Golgi localization signal identified in the Menkes recombinant protein. Hum Mol Genet 7: 1245-1252.
- Franke S., Grass G., Rensing C., Nies DH. 2003. Molecular analysis of de copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. J Bacteriol 185:3804-3812.
- George N., Faoagali J., and Muller M. 1997. SilvazineTM (silver sulfadiazine and chlorhexidine) activity against 200 clinical isolates. Burns 23: 493-495
- Goddard, P. A., and A. T. Bull. 1998. The isolation and characterization of bacteria capable of accumulating silver. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 308-313.
- Giono C. 1994. Diagnostico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Secretaría de Salud (ed). México pp 54.
- Giron J. A., Joes T., Millan V. F, y col. 1991. Diffuse adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. J Infect Dis 163 :507.
- Gupta A., Matsui K., Lo J.F., Silver S. 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. Nat Med 5:183-188.
- Gupta A., Maynes Maria and Silver Simon. 1998. Effects of Halides on Plasmid-Mediated Silver Resistance in *Escherichia coli*. Vol 64, No 12 pag: 5042-5045

- Gupta A., K. Matsui, J. F. Lo, and S. Silver. 2003. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. Nature Med., in press.
- Gupta A. and Silver S. 1998. Silver as a biocide: will resistance become a problem? Nat. Biotechnol. 16:888.
- Gutknecht J. 1981. Inorganic mercury (Hg_2^+) through lipid bilayer membranes. J. Membr. Biol. 6:61-62.
- Harris E. 1998. A low-cost approach to PCR: Apropiate Transfer of Biomolecular Techniques. Edited by Nazreen Kadir. Oxford University Press.
- Hmiel S. P., Snavelly M. D., Florer J. B., Maguire M. E., Miller C. G. 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. J Bacteriol 171: 4742-4751.
- Hobman J. L., Brown N. L. 1996. Overexpression of MerT, the mercuric ion transport protein of transposon Tn501, and genetic selection of mercury hypersensitivity mutations. Mol Genet 250: 129-134.
- Hobman J. L., Brown N. L. 1997. Bacterial mercury-resistance genes. Met ions Biol Syst 34: 527-568.
- Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B., Michel H 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Nature 376: 660-669.
- Ji G. Y., Silver S. 1992. Reduction of arsenate by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. Proc Natl Acad Sci USA 89: 9474-9478.
- Kachur A. V., Koch C. J., Biaglow J. E. 1998. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. Free Radical Res 28: 259-269.
- Karkaria C. E., Rosen B. P. 1991: Trinitrophenyl-ATP binding to the ArsA protein: the catalytic subunit of an anion pump. Arch Biochem Biophys 288: 107-111.
- Karkaria C. E., Steiner R. F., Rosen B. P. 1991. Ligand interactions in the ArsA protein, the catalytic component of an anion-translocating adenosinetriphosphatase. Biochemistry 30: 2625-2628.
- Kolenbrander P. E., Andersen R. N., Baker R. A., Jenkinson H. F. 1998. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordinii* encodes an

inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. J. Bacteriol 180: 290-295.

- KurdiHaidar B., Heath D., Aebi S., Howell S. B. 1998. Biochemical characterization of the human arsenite-stimulated ATPase (hASNA-I). J Biol Chem 273:22173-22176.
- KurdiHaidar B., Hom D. K., Flittner D. E., Heath D., Fink L., Naredi P., Howell S. B., 1998. Dual cytoplasmatic and nuclear distribution of the novel arsenite-stimulated human ATPase (hASNA-I) J Cell Biochem 71: 1-10.
- Kuroda M., Dey S., Sanders O. I., Rosen B. P. 1997. Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. J Biol Chem 272: 326-331.
- LaFontaine S., First S. D. Lockhart P. J., Brooks H., Parton R. G., Camakaris J. Mercer J. F. B 1998. Functional analysis and intracellular localization of the human Menkes protein (MNK) stably expressed from a cDNA construct in Chinese hamster ovary cells (CHO-k1). Hum Mol Genet 7: 1293-1300.
- Levine M. M., Naturo J. P., Karch H, y col. 1985. The diarrhoeal response of humans to some classic serotype of enteropathogenic *Escherichia coli* is depend on a plasmid encoding and enteroadhesiveness factor. J Infect Dis 152:550.
- Levinson H. S., Mahler I., Blackwelder P., Hood T. 1996. Lead resistance and sensitivity in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 145: 421-425.
- Liesegang H. K. Lemke, R. A. Siddiqui, H.-G. Schlegel 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. J Bacteriol 175: 767-778.
- Liu J., Gladysheva T. B, Lee L, Rosen B. P. 1995. Identification of an essential cysteinyl residue in the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. Biochemistry 34: 13472-13476.
- Liu J. Rosen B. P. 1997. Ligand interactions of the ArsC arsenate reductase. J Biol chem. 272: 21084-21089.
- Lutsenko S. Cooper M.J.1998 Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria. Proc Nat Acad Sci Usa 95: 6004-6009.
- MacDiarmid C.W, Gardner R. C. 1998. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. J Biol Chem 273: 1727-1732.

- Marine 1991. Diarrea aguda. En: Diagnóstico y Terapéutica en Medicina Interna. G. Llamas Esperón (ed). México: Méndez Cervantes pp 571-574.
- Mathewson J. S., Jonson P.C., Dupont H.L., y col 1989. A newly recognized cause of traveller's diarrhoea: enteroadherent *Escherichia coli*. J Infect Dis 151:471
- Mergeay M., Monchy S., Vallaes T., Auquier V., Benotmane A., Bertin P., Taghavi S., Dunn J., van der Lelie D., Watties R. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiol Rev 27:385-410.
- Mergeay M., Nies D., Schlegel H. G., Gerits J., Charles P., Van gijsegem F. 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J Bacteriol 162:328-334.
- Midigan M. T., Martinko J. M. and Parker J. 2003. *Brock: Biology of Microorganisms* (10 th edn). Chapter 19, Pearson Education Inc., Prentice Hall. 673-674
- Nakahara H., Ishikawa T., Sarai Y., Kondo I., Kozukue H., and Mitsuhashi S. 1977. Mercury resistance and R plasmids in *Escherichia coli* isolates from clinical lesions in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 11:999-1003.
- Navarro C., Wu L. F., Mandrand Berthelot M. A. 1993. The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. Mol Microbiol 9: 1181-1191.
- Nelson D. L., Kennedy E. P. 1971. Magnesium transport in *Escherichia coli*: Inhibition by cobaltous ion. J Biol Chem 246: 3042-3049.
- Nies D., Mergeay M., Friedrich B., Schlegel H. G. 1987. Cloning of plasmid *grnrd* encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. J Bacteriol 169: 4865-4868.
- Nies D. H. 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* strain. J Bacteriol 171: 4073-4075.
- Nies D. H., Silver S. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* J. Bacteriol 171: 896-900.
- Nies D. H., 1999 Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol 51: 730-750.

- Norma M., Harnett and Carlton L., Gyles.1984. Resistance to Drugs and Metals, Colicin Production, and Biochemical Characteristics of Selected Bovine and Porcine *Escherichia coli* strains. 48:930-945.
- Odermatt A., Solioz M. 1995. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. J Biol Chem 270: 4349-4354.
- Ohta Y., Shiraishi N., Nishikimi M. 1997. Occurrence of two missense mutations in Cu-ATPase of the macular mouse, a menkes disease model. Biochem Mol Biol Int 43: 913-918.
- Park M. H., Wong B. B., Lusk J. E. 1976. Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*. J Bacteriol 126: 1096-1103.
- Patzer S. I., Hantke K. 1998 The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator zur in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 28: 1199-1210.
- Paulsen I. T., Brown M. H., Choi P.S. 1997. A family of Gram negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from negative bacteria. FEMS Microbiol Lett 156: 1-8.
- Porter F. D., Silver S., Ong C., and H. Nakahara. 1982. Selection for mercurial resistance in hospital settings. Antimicrob. Agents Chemother. 22:852-858.
- Rensing C., Grass G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment FEMS. Microbiol Rev 27:197-213.
- Rodríguez Ángeles G. 1994. Exotoxinas. En: Diagnostico de Laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono,S. Escobar, A y Valdespino J.L. Ed. México. Secretaria de Salud.
- Russell A. D., and W. B. Hugo. 1994. Antimicrobial activity and action of silver. Prog. Med. Chem. 31:351-370
- Silver, S. 1981. Mechanisms of plasmid-determined heavy metal resistances, p, 179-189. In S. B. Levy, R. C. Clowes, and E. L. Koenig (ed), Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids. Plenum Publishing Corp., New York, N. Y.
- Silver S. 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbiol Rev 27: 341-353.
- Simon Silver., Phung Le T., 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. 32:587-605.

- Singh SK., Grass G., Rensing C., Montfort WR. 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186: 7815-7817.
- Slawson R. M., Van Dyke M. I., Lee H, and J.T. Trevors. 1992. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. Plasmid 27:72-79.
- Smith R. L., Gottlieb E., Kucharski L. M., Maguire M. E. 1998. Funcional Similarity between Archaeal and Bacterial. J Bacteriol 177: 1638-1640.
- Solioz M., Odermantt A. 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. J Biol Chem 270: 9317-9221.
- Solioz M., Stoyanov J. 2003 Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. FEMS Microbiol Rev 27:183-195.
- Tao T., Grulich P. F., Kucharski L. M., Smith R. L., Maguiere M. E. 1998. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: biphasic magnesium and time dependence of the transcription of the *mgtA* and *mgtCB* loci. Microbiology 144: 655-664.
- Tetaz T.J., and R. K. J. Luke. 1983. Plasmid-controlled resistance to cooper in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 154:1263-1268.
- Varman M. M., Thomas W. A., and C. Prasad. 1976. Resistance to inorganic salts and antibiotics among sewage-borbe *Enterobacteriaceae* and *Achromobacteriaceae*. J. Appl. Bacteriol. 41:344-349.
- Wang CL., Clark DS., Keasling JD. 2001. Analysis of an engineered sulfate reduction pathway and cadmium precipitation on the cell surface. Biotechnol Bioeng 75: 285-291.
- Weast R. C., 1984. CRC handbook of chemistry and physics, 64 edition, CRC Press, Inc., Boca Rton, Florida, USA.
- Wolfram L., Friedrich B., Eitinger T. 1995. The *Alcaligenes eutrophus* protein HoxN mediares nickel transport in *Escherichis coli*. J Bacteriol 177: 1840-1843.