

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS
VEGETALES
EN CEPAS HOSPITALARIAS DE *Staphylococcus
aureus* CON RESISTENCIA MÚLTIPLE.**

CONCEPCIÓN GARCÍA LUJÁN

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el
grado de**

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

Subdirección de Postgrado

Torreón, Coahuila, México.

Diciembre de 2006



ISBN 978-84-691-7226-1

Reservados todos los derechos
© La autora
Universidad de La Rioja

Logroño, 2008

Universidad de La Rioja
Biblioteca Universitaria
C/ Piscinas s/n
26006 LOGROÑO
LA RIOJA – ESPAÑA

E-mail: dialnet@unirioja.es
Página web: dialnet.unirioja.es

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS VEGETALES
EN CEPAS HOSPITALARIAS DE *Staphylococcus aureus* CON
RESISTENCIA MÚLTIPLE.**

POR

CONCEPCIÓN GARCÍA LUJÁN

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor principal _____
Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Asesor: _____
Dr. Raúl Villegas Vizcaíno

Asesor: _____
Dr. Pedro Robles Trillo

Asesor: _____
Dr. Joel López Pérez

Asesor: _____
Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Posgrado

M. C. Gerardo Arellano Rodríguez
Jefe del Departamento de Posgrado

Torreón, Coah. México

Diciembre de 2006.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS VEGETALES
EN CEPAS HOSPITALARIAS DE *Staphylococcus aureus* CON
RESISTENCIA MÚLTIPLE.**

POR

CONCEPCIÓN GARCÍA LUJÁN

Elaborado bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor

Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Torreón, Coah. México

Diciembre de 2006

PREFACIO

La prevalencia de las enfermedades infecciosas se produce en respuesta a los cambios ecológicos globales incluyendo aquellos debidos al desarrollo de las comunidades y uso de la tierra, al comportamiento humano irracional, a los viajes y comercio internacional, al desarrollo tecnológico e industrial, a los cambios y adaptaciones microbianas y a las crisis en las medidas de salud pública.

Los cambios y adaptaciones microbianas a su vez han generado el fenómeno de la resistencia a los antibióticos en cepas patógenas bacterianas, que es un problema de salud a nivel mundial. Las cepas patógenas resistentes han surgido principalmente en los hospitales a consecuencia de varios factores como son el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, las altas posibilidades de transmisión o contagio y el estado inmunocomprometido de los pacientes que los hace susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas. Existen otros dos elementos que favorecen el surgimiento de este fenómeno: el primero es el uso inadecuado de los antibióticos y el segundo es la adaptabilidad bacteriana a los diferentes ambientes.

El fenómeno de resistencia y resistencia múltiple, se presenta especialmente en grupos de bacterias como los estafilococos que son microorganismos oportunistas y patógenos adaptables que tienen la capacidad de infectar, invadir, persistir y replicarse en cualquier tejido humano incluyendo la piel, los huesos, órganos o tejido vascular. Como resultado de la adaptación a tejidos específicos, los estafilococos causan muchos síndromes patológicos tales como abscesos,

bacteriemias, osteomielitis, síndrome de shock tóxico, envenenamiento por alimentos y endocarditis. Debido a que las cepas de *Staphylococcus aureus* colonizan continuamente la piel humana están expuestas a todas las terapias con antibióticos. Cuando surgen los microbios resistentes, estas cepas se pueden diseminar muy rápidamente por contacto directo en las poblaciones humanas, como se ejemplifica con la amenaza mundial de los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), los cuales presentan resistencia a la primera línea de antibióticos como la ampicilina y la penicilina; y de los *S. aureus* resistentes a la vancomicina (VRSA).

El trabajo de investigación se inicia como respuesta a la inquietud de proponer nuevos agentes para el tratamiento de infecciones estafilococales causadas por cepas hospitalarias con resistencia múltiple, y tiene como propósito generar una parte importante de las bases para la propuesta de incluir agentes naturales con propósito terapéutico en el tratamiento de las infecciones nosocomiales por cepas de *S. aureus* con resistencia múltiple. La parte financiera se vio favorecida por un apoyo económico por parte del Sr. rector de la Universidad Juárez del Estado de Durango, CP Rubén Calderón Luján. Los apoyos en cuanto a metodología en la elaboración de los extractos se agradecen a la QFB Bertha Rosas Campos, en la parte de las pruebas de susceptibilidad y adquisición de las cepas hospitalarias a la QFB Sara E. Alonso Rojo (IMSS 71, Torreón Coah.) y en la parte de la determinación de los componentes químicos de los extractos al MC José Vinicio Torres Muñoz (UA de CH, Chihuahua, Chih). Inicialmente las pruebas preliminares se realizaron con una metodología sumamente complicada y laboriosa que permitió establecer un control efectivo de la contaminación y la buena aplicación

de las técnicas microbiológicas necesarias en el proceso, además permitió ver un primer panorama de las propiedades de los extractos y aceites. Después se implementó otra técnica de macrodiluciones que es la utilizada en las pruebas de antibióticos y está respaldada por el Comité Nacional de Estándares para el Laboratorio Clínico (NCCLS). La obtención de los extractos vegetales de gobernadora, ruda, tomillo y perejil se realizó según las indicaciones usuales para su elaboración, se prepararon de dos tipos: hidroalcohólicos (planta seca) y alcohólicos(planta fresca). La extracción de los aceites esenciales de orégano y de clavo se hizo por arrastre de vapor. Los extractos puros, al ser utilizados, se diluyeron al 5%.

Los resultados preliminares mostraron que no hubo diferencias en el nivel de acción de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos, como la técnica para la determinación de los componentes químicos sólo acepta soluciones con base alcohólica, se seleccionaron sólo éstos para el segundo estudio.

En cuanto a las cepas bacterianas hospitalarias, fueron obtenidas del hospital general de zona No. 71 de la Cd. de Torreón, Coah., y se hizo una prueba inicial de antibiograma con oxacilina por el método de Kirby-Bauer para determinar si eran cepas con resistencia múltiple. El resultado indicó que todas las cepas probadas tenían resistencia múltiple. Se adquirió una cepa de referencia en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas cuya clave es: ENCB *S. aureus* ATCC 25923.

Este trabajo está estructurado como una tesis en el modelo de artículos científicos, para lo cual se están presentando dos artículos que actualmente se encuentran en revisión para su evaluación y publicación, el primero por la Revista Agraria Nueva Época (respaldada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro e indexada

al CONACYT) y el segundo trabajo por la revista Universidad y Ciencia (respaldada por la Universidad Autónoma de Tabasco e indexada por el CONACYT). Además se incluye una discusión general y un apéndice con las cartas de recepción de los artículos.

El primer artículo muestra los resultados obtenidos de una serie de pruebas de susceptibilidad de una cepa de *S. aureus*, probando la capacidad antibacteriana de los diez extractos de hierbas: tomillo, gobernadora, ruda y perejil (cuatro alcohólicos y cuatro hidroalcohólicos) y dos aceites esenciales, los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos mostraron una concentración mínima inhibitoria semejante, mientras que en los aceites esenciales ésta fue variable.

El segundo documento es un artículo que tiene como objetivo la evaluación de la actividad antibacteriana de cuatro extractos vegetales y dos aceites esenciales en contra de cepas hospitalarias con resistencia múltiple de *S. aureus*, además se determinaron los principales componentes químicos de los extractos vegetales y de los aceites esenciales.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a las H. Autoridades de Universidad Juárez del Estado de Durango, al C. P. Rubén Calderón Luján, Rector de la UJED así como a la M. E. María de Jesús Cedillo Gómez, Directora de la Facultad de Ciencias Químicas por el apoyo siempre incondicional para el desarrollo de este proyecto.

A las Autoridades de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el apoyo proporcionado para la continuación del programa.

A mis asesores del programa del Postgrado en Ciencias Agropecuarias, Dr. Rafael Rodríguez Martínez y al Dr. Miguel Arenas Vargas, por su tiempo, paciencia y dedicación para mi formación durante estos años.

A mis compañeros del Postgrado por sus lecturas, críticas y consejos para el mejoramiento de todos los manuscritos presentados.

A la Dra Virginia Nevárez Moorillón por su ayuda para la realización de los análisis químicos de los extractos vegetales.

A la QFB Bertha Rosas Campos, a la QFB Sara Alonso Rojo y al QFB José Vinicio Torres-Muñoz, por toda su ayuda en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos:

Por todo el apoyo y paciencia brindados durante todo este tiempo.

Especialmente a mi esposo e hijas:

**Fernando Castro Barraza
Fabiola Castro García
Diana Estefanía Castro García**

COMPENDIO

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS VEGETALES EN CEPAS HOSPITALARIAS DE *Staphylococcus aureus* CON RESISTENCIA MÚLTIPLE.

POR

CONCEPCIÓN GARCÍA LUJÁN

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

Torreón, Coah. 2006

La permanencia de las enfermedades infecciosas causadas por cepas patógenas bacterianas resistentes es un problema de salud a nivel mundial. Las cepas patógenas resistentes han surgido principalmente en los hospitales a consecuencia de varios factores como son el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, otros elementos que influyen son las altas posibilidades de transmisión o contagio y el estado inmunocomprometido de los pacientes que los hace susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas. A nivel celular, los principales mecanismos de la resistencia y de la resistencia

múltiple a los antibióticos incluyen sistemas de eflujo activo de la droga, mutaciones que resultan en alteraciones de la permeabilidad celular, degradación celular de los antibióticos y alteraciones de sus blancos celulares por mutaciones o por metilación. Específicamente en los estafilococos, y como resultado de su adaptación a tejidos, estos patógenos causan muchos síndromes patológicos como abscesos en la piel e infecciones de heridas, osteomielitis, endocarditis, neumonía, meningitis, bacteriemia, síndrome de shock tóxico, osteomielitis y envenenamiento por alimentos. Debido a que las cepas de *Staphylococcus aureus* colonizan continuamente la piel humana, son expuestas a todas las terapias con antibióticos, lo cual permite el desarrollo de microorganismos resistentes, cuyas cepas se pueden diseminar muy rápidamente por contacto directo en las poblaciones humanas, como se ejemplifica con la amenaza mundial de los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), que los cuales presentan resistencia a la primera línea de antibióticos como la ampicilina y la penicilina; y con los *S. aureus* resistentes a la vancomicina (VRSA). Las opciones de agentes antimicrobianos utilizadas en las terapias para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias con resistencia múltiple están por lo tanto seriamente limitadas. Las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas de otras fuentes incluyendo las plantas y los animales. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico. Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Aunque se han identificado algunas

sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos. Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias, pero como el uso de extractos vegetales a nivel hospitalario es limitado, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra. Entonces es posible que los extractos puedan inhibir el crecimiento de cepas con resistencia múltiple. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue valorar la actividad antimicrobiana *in vitro* de ocho extractos vegetales y dos aceites esenciales en contra de varias cepas hospitalarias con resistencia múltiple de *S. aureus* y una cepa de referencia (ATCC 25923). Los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos evaluados fueron: perejil (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y gobernadora (*Larrea tridentata*); y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y de orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de macrodilución. La determinación de los componentes químicos principales de los extractos se realizó mediante cromatografía de gases-masas. En las pruebas de actividad antibacteriana, los resultados muestran que no existió diferencia en entre las concentraciones mínimas inhibitorias (2.77 mg mL^{-1}) de los extractos vegetales alcohólicos y los hidroalcohólicos en todas las cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a concentraciones mínimas inhibitorias variables e inferiores a las de los extractos alcohólicos. Los resultados mostraron que los componentes químicos más abundantes en los extractos fueron el etil ester ácido hexadecanoico, fitol, cariofilenos, timol y para-cimeno. Los compuestos

estudiados tienen una aplicación potencial como antibacterianos por lo que se sugiere medir sus propiedades farmacéuticas para establecer su uso como agentes terapéuticos.

Palabras clave: Extractos vegetales, aceites esenciales, cepas hospitalarias con resistencia múltiple, *S. aureus*.

ABSTRACT

**Antimicrobial activities of herbal extracts on *S. aureus*
nosocomial strains with multidrug resistance.**

BY

CONCEPCIÓN GARCÍA LUJÁN

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

Torreón, Coah. 2006

The emergente of the resistance in bacterial pathogenic strains is a problem of health at world-wide level. The resistance pathogenic strains have arisen mainly in the hospitals as a result of several factors as they are the ample antibiotic use, the used doses, the time of treatment, and the elimination of half of the drug that is not reached to metabolizar in its totality, other elements that influence are the high possibilities of transmission or infect and the immunocompromissed state of the

patients that makes susceptible to infections with opportunistic pathogens. At cellular level, the main mechanisms of the resistance and the multidrug resistance to antibiotics include systems of active efflux of the drug, mutations that are in alterations from the cellular permeability, cellular degradation of antibiotics and alterations of their cellular targets by mutations or methylation. Specifically, in the staphylococci, and as resulting from their adaptation to weaves, these pathogens to many pathological syndromes like abscesses in the skin and infections of wounds, osteomyelitis, endocarditis, pneumonia, meningitis and foodborne poisons. Because the strains of *Staphylococcus aureus* colonize the human skin continuously, are exposed to all the therapies with antibiotics, arise then the resistant microorganisms, these strains can be scattered very quickly by direct bonding in the community, as the world-wide threat of *S aureus* resistant to methicillin (MRSA) (which offer resistance to forward edge of antibiotics like the ampicillin and penicillin) and with the *S aureus* vancomycin resistant (VRSA). The options of used antimicrobial agents in the therapies for the treatment of the infectious diseases caused by the bacteria with multiple resistance therefore are seriously limited. The pharmaceutical companies are looking for alternative drugs of other sources including plants and animals. The medicinal plants are considered like a potential source of new chemotherapeutic drugs due to the content of phytochemicals and to their little or null poisonous effect. Certainly, the plants have enormous and a strange reservoir of substances derived from their systems of defense against insects and herbivorous. Although some simple substances like phenolics have been identified, derives of the phenolics (quinones, flavones, flavonoids, flavonols, tannins and coumarins), essential oils, terpenoids,

alkaloids, lectinas and polipeptides. One of the mechanisms for the induction of the resistance is the selective pressure which the bacteria are put under, but as the use of herb extracts at nosocomial level is limited, the bacteria have not developed mechanisms of resistance in his against. Then it is possible that the extracts can inhibit the growth of multidrug resistant strains. Therefore the aim of the present work was to assess the antimicrobial activity *in vitro* of eight herbal extracts and two essential oils against various multidrug resistant nosocomial strains of *S. aureus* and reference one (ATCC 25923). The evaluated extracts are both alcoholic and hidroalcoholic were: parsley (*Petroselinum sativum*), rue (*Ruta graveolens*), thyme (*Thymus vulgaris*), creosote bush (*Larrea tridentata*); and the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Lippia graveolens*), to determining the minimum inhibitory concentrations by means of the macrodilution method. Determination of main chemical components was performed by mean of espectrophotometry of gas-mass. The antibacterial tests showed that did not exist differences in the minimum inhibitory concentrations (2.77 mg mL^{-1}) for the vegetable alcoholic and hidroalcoholic extracts in the strains, while the essential oils inhibited the bacterial growth at a lesser and variable minimum inhibitory concentrations than those of the alcoholic extracts. The results showed that the most abundant chemical components were: hexadecanoic acid etil ester, phytol, cariophyllene, thymol and p-cymene. The studied compounds have a potential application as antibacterials for what is suggested to measure their pharmaceutical properties to establish their use as a therapeutic agents.

Key words: Herb extracts, essential oils, nosocomial multidrug resistant strains, *S. aureus*.

Índice de contenido

PREFACIO.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	ix
DEDICATORIA.....	x
COMPENDIO.....	xi
ABSTRACT.....	xv
Índice de contenido.....	xviii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xx
ARTICULO 1.....	xx
Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos vegetales.....	xx
evaluados en dos cepas de Staphylococcus aureus. 84.....	xx
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Evolución de la resistencia bacteriana.....	7
Resistencia múltiple.....	10
Repercusiones de la resistencia múltiple.....	13
1) Salud.....	13
2) Economía y ambiente.....	16
Staphylococcus aureus.....	17
Biomembranas.....	22
Bacteriocinas.....	24
Infecciones hospitalarias causadas por <i>S. aureus</i>	24
Diagnóstico e identificación de <i>S. aureus</i>	29
Resistencia de <i>S. aureus</i> a los grupos de antibióticos.....	31
Macrólidos, lincosamida y estreptogramina B.....	31
Mupirocina.....	32
Penicilinas y β lactamas.....	32
Oxacilina.....	33
Macrólidos.....	33
Vancomicina.....	34
Fluoroquinolonas.....	35_Toc152645753
Meticilina.....	36
Prevalencia de los MRSA.....	37
Genes que transmiten la resistencia en <i>S. aureus</i>	40
Alternativas de tratamiento.....	41
Antibióticos.....	41
Uso indebido de los antibióticos.....	43
Farmacología y fitoterapia.....	45
Terapias complementarias.....	47
Extractos vegetales.....	49
Aceites esenciales.....	50
Interacciones de las hierbas.....	51
Estandarización de las fitomedicinas.....	52
Búsqueda de nuevos agentes.....	54
Propiedades antibacterianas de los extractos vegetales.....	55

JUSTIFICACIÓN.....	56
REFERENCIAS	58
DISCUSIÓN.....	71
Colección de las plantas.	79
Preparación de los extractos.	80
Microorganismos y medios.	80
Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos vegetales evaluados en dos cepas de Staphylococcus aureus.....	82
Tabla 1. Principales componentes químicos de los extractos vegetales.....	92
Tabla 2. Componentes químicos identificados en las seis especies vegetales analizadas.	95
Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos después de 24 h de incubación.....	96
ANEXO	101

ÍNDICE DE CUADROS

ARTICULO 1

Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos vegetales evaluados en dos cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	84
--	----

ARTÍCULO 2

Cuadro 1. Main chemical compounds of the herb extracts.	94
Cuadro 2. Chemical components identify in the six species of studied herb.	97
Cuadro 3. Minimal inhibitory concentrations (MIC) alter 24 h of incubation.	98

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de las enfermedades infecciosas en los hospitales causadas por cepas patógenas de bacterianas resistentes es un problema de salud a nivel mundial. Las cepas patógenas resistentes han surgido principalmente en los hospitales a consecuencia de varios factores como son el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, otros elementos que influyen son las altas posibilidades de transmisión ó contagio y el estado inmunocomprometido de los pacientes que los hace susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas (Bergstrom *et al.* 2004; Gatton *et al.* 2004).

Según Levy (2002), los principales factores que favorecen el surgimiento de la resistencia bacteriana son: el movimiento de pacientes dentro y entre instituciones médicas; la apropiación de prescripción y uso de antibióticos (automedicación); las medidas excesivas de control de las infecciones; los viajes y otros factores socioeconómicos diversos. Además existen otros elementos que favorecen este proceso que son: la selección bacteriana por sustancias no antibióticas; los residuos de antibióticos en el medio ambiente; las dosis y duración del tratamiento, el grado de resistencia en las bacterias; la transferencia de genes y la dispersión de clones bacterianos.

El fenómeno de la resistencia se puede entender en base a dos factores: los antibióticos que actúan como un agente selectivo, que favorece la supervivencia y

propagación de los microorganismos que tienen el segundo factor: los genes de resistencia. Un aspecto importante que contribuye a la diseminación de la resistencia es la capacidad de los genes de resistencia para moverse hacia otras bacterias por varios mecanismos de intercambio genético (Levy 2002).

A nivel celular, los principales mecanismos de la resistencia y de la resistencia múltiple a los antibióticos incluyen sistemas de eflujo activo de la droga, mutaciones que resultan en alteraciones de la permeabilidad celular, degradación celular de los antibióticos y alteraciones de sus blancos celulares por mutaciones o por metilación (Brehm-Stecher *et al.* 2003).

Específicamente en los estafilococos, y como resultado de su adaptación a tejidos, estos patógenos causan muchos síndromes patológicos como abscesos en la piel e infecciones de heridas, osteomielitis, endocarditis, neumonía, meningitis, bacteriemia, síndrome de shock tóxico, osteomielitis y envenenamiento por alimentos. Debido a que las cepas de *Staphylococcus aureus* colonizan continuamente la piel humana, están expuestas a todas las terapias con antibióticos, surgen entonces los microorganismos resistentes, estas cepas se pueden diseminar muy rápidamente por contacto directo en las poblaciones humanas, como se ejemplifica con la amenaza mundial de los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), los cuales presentan resistencia a la primera línea de antibióticos como la ampicilina y la penicilina; y con los *S. aureus* resistentes a la vancomicina (VRSA) (Bae *et al.* 2004; O'Flaherty *et al.* 2005).

Las opciones de agentes antimicrobianos utilizadas en las terapias para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias con resistencia múltiple están seriamente limitadas.

Las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas de otras fuentes incluyendo las plantas y los animales. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico (Beg 2000).

Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Aunque se han identificado algunas sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, los extractos de plantas completas permanecen en uso (Thuille 2003).

Mientras que algunos aceites esenciales son usados por sus propiedades que se tienen bien documentadas en experimentos, pero hay pocos datos para muchos otros. Algunos estudios se concentran exclusivamente en un extracto o aceite y en un tipo de microorganismo. Estos datos son útiles, sin embargo, los reportes no son directamente comparables debido a diferencias metodológicas tales como la elección del extracto vegetal, el organismo a probar y el método microbiológico de prueba (Hammer 1999). Aunque los aceites esenciales tienen un amplio espectro de actividad, no todos son capaces de matar a todas las bacterias (Bergonzelli *et al.* 2003).

El principal reservorio de los MRSA en las instituciones hospitalarias son los pacientes colonizados e infectados, mientras que permanecen en el hospital, el transporte del microorganismo hacia las manos de las enfermeras es uno de los principales mecanismos de transmisión. La mayoría de las investigaciones han

encontrado una amplia prevalencia de bacterias resistentes en los hospitales, más que en la comunidad. Sin embargo ya se han encontrado cepas de MRSA en la comunidad. Existen estudios que documentan el incremento de costos asociados con las infecciones con MRSA, así como la importancia de la presión de colonización (Haddadin *et al.* 2002). Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias, pero como el uso de extractos vegetales a nivel hospitalario es limitado, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Lowy 2003; Begun *et al.* 2005). Entonces es posible que los extractos puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes, y multirresistentes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es valorar la actividad antimicrobiana *in vitro* de ocho extractos vegetales y dos aceites esenciales en contra de cepas hospitalarias resistentes y con resistencia múltiple de *S. aureus*.

REVISIÓN DE LITERATURA

La resistencia bacteriana es la capacidad de un microorganismo de tolerar o resistir ciertas condiciones físico-químicas y biológicas adversas. Donde quiera que exista un cambio de susceptibilidad bacteriana provocado por un agente que ha sido e poco efectivo en contra de cierto microorganismo, éste se considera como resistente. Muchos microorganismos han sido siempre no susceptibles y por lo tanto intrínsecamente resistentes a un agente en particular por su naturaleza fisiológica o bioquímica, los microorganismos susceptibles pueden volverse

insensibles por mutaciones o por la incorporación de información genética que codifica a la resistencia (Kummerer 2004).

El fenómeno de la resistencia lo podemos entender en base a dos factores: los antibióticos que actúan como un agente selectivo, que ayuda a propagar a los microorganismos que tienen el segundo factor: los genes de resistencia. Un aspecto importante que contribuye a la diseminación de la resistencia es la capacidad de los genes de resistencia para moverse hacia otras bacterias por una variedad de medios genéticos (Levy 2002), estos medios que facilitan el intercambio de material genético se conocen como mecanismos parasexuales e incluyen la transformación, la transducción y la conjugación. La transformación es la toma de fragmentos de DNA presentes en el medio por bacterias que compiten; la transducción es la forma más común de intercambio genético e involucra el empaquetamiento de DNA del hospedante por medio de fagos; la conjugación que involucra el contacto célula-célula y el movimiento de DNA del hospedero por medio de plásmidos conjugantes o transposones y como resultado se da el intercambio de grandes cantidades de material genético (Robinson *et al.* 2004).

A nivel de la célula bacteriana, los principales mecanismos de la resistencia y de la resistencia múltiple a los antibióticos incluyen sistemas de eflujo activo de la droga, mutaciones que resultan en alteraciones de la permeabilidad celular, degradación celular de los antibióticos y alteraciones de sus blancos celulares (Brehm-Stecher y Johnson 2003; Kaatz *et al.* 2005). En cuanto a los mecanismos de eflujo activo de la droga en bacterias resistentes, son aquellos que están mediados por sistemas ABC (ATP-binding casete) que son comúnmente atribuidos a bombas de eflujo. También existe un creciente número de proteínas que

consisten de una sola cadena de polipéptidos, que transportan dos dominios fusionados del tipo ABC, que confieren resistencia a los antibióticos del grupo de los macrólidos, la lincosamida y la estreptogramina (Chesneau *et al.* 2005).

En el caso de bacterias con resistencia múltiple, existen datos para entender el mecanismo del transporte de drogas, estos mecanismos se basan en bombas de eflujo que contribuyen a la resistencia de varias maneras: (i) resistencia inherente a un grupo completo de antibióticos, (ii) resistencia inherente a un agente antibacteriano específico, y (iii) resistencia adquirida cuando hay una sobre expresión de una bomba de eflujo. El fortalecimiento del flujo de sustancias puede ser mediado por mutaciones en varios niveles, como por ejemplo en el gene represor local, en un gene regulatorio global, en la región promotora de un gene de transporte, o por la inserción de elementos en los genes de transporte (Piddock 2006). Los genes de resistencia se originan a partir de mutaciones espontáneas o de genes celulares o son introducidos de nuevo en una población bacteriana por su adquisición a partir de microbios resistentes. Las cepas productoras de antibióticos, poseen funciones codificadas para su protección, estas son consideradas como una fuente potencial de genes de resistencia (Woegerbauer *et al.* 2005).

En cuanto a los mecanismos relacionados con la alteración de la estructura de su membrana celular, las bacterias han desarrollado numerosas formas para resistir los efectos de los antibióticos; en el caso de la vancomicina -actualmente uno de los pocos antibióticos que es activo en contra de muchas bacterias potencialmente letales- la resistencia puede resultar de un pequeño pero crucial cambio en la estructura de los precursores de la pared celular (Kirkpatrick 2006). El grosor de la

pared celular bacteriana también es un factor principal y determinante para la resistencia a la vancomicina (Cui *et al.* 2003)

La resistencia bacteriana a los péptidos también está ligada a las particularidades químicas de la pared bacteriana que detectan la interacción inicial de la bacteria con el agente antibiótico. Una de las estrategias bacterianas mejor conocidas es la pérdida de cargas negativas de la superficie por la adición de aminoarabinosa a los lipopolisacáridos o por la incorporación de α -alanina en los ácidos teicoicos de las paredes celulares de las bacterias gram-positivas (Campos *et al.* 2004).

Evolución de la resistencia bacteriana.

Todos los seres vivos, incluyendo, los patógenos bacterianos y sus hospederos participan en una evolución constante, en una batalla de ataque, defensa y contraataque. En varios documentos publicados recientemente, se describe cómo los patógenos bacterianos a través de su poder de evolución han obtenido una importante ventaja sobre sus hospederos, ya que los mecanismos de defensa de estos conducen a la evolución de nuevas formas virulentas de los patógenos a través de cambios en el genoma bacteriano (Holden *et al.* 2004; O'Connell 2006).

La presión de selección de los antibióticos en general da como resultado el surgimiento de mecanismos de resistencia por parte de la bacteria. Existe una relación directa entre el uso de antibióticos y el desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos a través de los años. De manera contraria, la incidencia de resistencia bacteriana puede reducirse con la restricción en el uso de antibióticos. Esta interrelación entre el uso de antibióticos y desarrollo de resistencia es parcialmente determinado por el llamado costo biológico de la

resistencia a antibióticos tal parece que la resistencia nunca va a desaparecer por completo (Wichelhaus *et al.* 2002).

Varios autores han escrito acerca del problema en el continuo incremento de las bacterias clínicamente importantes que han desarrollado resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos. Se sugiere que la supervivencia como mecanismo de adaptabilidad biológica, es el elemento clave para entender la dimensión del problema. Algunas organizaciones como la Food and Drug Authority (FDA), la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Unión Europea, se han expresado en torno al incremento en la resistencia a las drogas y han hecho un llamado para que sean implementados más y mejores estudios de supervivencia bacteriana (Bax *et al.* 2001; Cuevas *et al.* 2004).

La evolución en aumento de las especies bacterianas resistentes tiene su raíz en una multitud de factores que incluyen la diseminación de la resistencia y el uso inadecuado de los antimicrobianos, el uso extensivo de estos agentes como promotores del desarrollo en alimentación animal y el incremento de los viajes nacionales e internacionales, que facilitan que las bacterias resistentes a los antibióticos crucen las barreras geográficas (Lowy 2003).

Se puede asumir que la virulencia y la resistencia son mecanismos de adaptación similares utilizados por las bacterias para sobrevivir bajo condiciones de estrés (ya sea invasión de hospedero o tratamiento con antibióticos). Existen dos procesos diferentes para la evolución de los genotipos en la virulencia-resistencia bacteriana: la mutación y la recombinación genética (incluida la transferencia horizontal de genes) (Martinez *et al.* 2002).

Las mutaciones en los cromosomas bacterianos que pueden causar alteraciones de las proteínas esenciales, frecuentemente tienen efectos nocivos en la adaptación de las bacterias en su medio, lo cual provoca un crecimiento bacteriano reducido, un aumento de virulencia y poca supervivencia. Algunas especies bacterianas, sin embargo, pueden compensar este período de adaptación durante el crecimiento *in vitro* e *in vivo* sin tener una pérdida en la resistencia (Besier *et al.* 2005).

Los procesos evolutivos en *S. aureus* que pueden ser de limitación o aumento en su potencial de invasividad en diferentes hospederos están poco definidos, aunque por ejemplo, varios tipos y combinaciones de ciertos genes de virulencia pueden contribuir de manera importante en su potencial patogénico (van Leeuwen *et al.* 2005). La evolución de *S. aureus* ha sido descrita en base al descubrimiento de clones, se ha encontrado evidencia de siete clases diferentes, de tal manera que aunque las poblaciones poseen una estructura general, la recombinación entre aislamientos relacionados dentro de los complejos de clones (CCs) puede contribuir a la evolución y generación de nuevos clones de *S. aureus* (Kuhn *et al.* 2006). Los modelos farmacodinámicos tienen una aplicabilidad general para describir la evolución de la resistencia en *S. aureus* y demostrar posteriormente la importancia de las variantes con bajos niveles de resistencia para la evolución de la resistencia (Campion *et al.* 2005).

La adquisición de genes de resistencia puede permitir a la bacteria producir enzimas que destruyan la droga antibacteriana, la expresión de sistemas de eflujo que previenen que la droga alcance su sitio de acción, la modificación del sitio de acción o la producción de una nueva ruta metabólica que impida la acción de la

droga (Tenover 2006). Los mecanismos más utilizados para el intercambio de material genético son por transformación, transducción y conjugación, sin embargo se desconoce si para el proceso evolutivo es más importante el intercambio de grandes fragmentos de genes o pequeños fragmentos junto con el movimiento de elementos genéticos móviles (Robinson y Enright 2004; Casci 2006). Para entender los mecanismos de la evolución en la diversidad genética de las especies bacterianas, se pueden analizar los primeros pasos de la adaptación genética para los nuevos hábitat, particularmente en aquellos que son subóptimos para mantener el crecimiento sostenido, donde hay una fuerte selección para los cambios adaptativos (Sokurenko *et al.* 2006).

No podemos destruir al mundo microbiano en el que hemos evolucionado. La mejor solución está en respetar y tratar de impactar lo menos posible a la flora comensal de nuestro organismo, que se puede convertir en nuestra aliada en la reversibilidad del problema de la resistencia bacteriana. Como los microorganismos comensales son capaces de reconstruir sus componentes, pueden controlar los niveles de resistencia a través de la competencia con cepas resistentes. Entonces cuando las poblaciones bacterianas u otros microorganismos que causen infecciones sean susceptibles a las drogas con las que se cuentan en ese momento, se podrá tener un armamento para tratarlas de manera efectiva y exitosa (Levy 2002).

Resistencia múltiple.

La resistencia no está restringida a un sólo tipo de antimicrobiano, sino que involucra múltiples agentes pertenecientes a diferentes grupos (resistencia a

multidrogas, resistencia múltiple o multirresistencia). La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que “en la carrera por la supremacía, los microbios permanecen a la cabeza” y que “la resistencia microbiana a los tratamientos disponibles puede llevar al mundo a una época anterior o previa a los antibióticos” todo lo anterior subrayando la seriedad de uno de los retos y problemas de salud global de hoy: la lucha en contra de las enfermedades infecciosas causadas por gérmenes resistentes a multidrogas (Crisostomo *et al.* 2001; Critchley *et al.* 2003; Schmidt 2004).

Además de los patógenos conocidos, la aparición de organismos oportunistas, intrínsecamente resistentes a muchos antibióticos, está ahora complicando los avances que se habían hecho en tecnología médica (Levy 2002). Los microorganismos resistentes a las drogas de antibióticos ponen en riesgo la vida y el bienestar de los pacientes (Leibovici 2003).

En años recientes ha habido un dramático incremento en la prevalencia en cepas con resistencia múltiple. A nivel mundial el surgimiento de la resistencia en estafilococos es un problema serio y en incremento, especialmente en hospitales (Sidhu *et al.* 2002).

El primer reporte de *S. aureus* con un nivel intermedio de resistencia a la vancomicina (VISA) fue hecho en Japón en 1997, que alcanzó el nivel de infección estafilocócica incurable. Desde entonces se han reportado casos en todo el mundo, con ocho casos confirmados en los EU en junio del 2002. La mayoría de estos han ocurrido en pacientes que han sido sometidos al uso prolongado de vancomicina. Además, la mayoría de las cepas causantes, parecen haber

evolucionado a partir de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) que habían infectado previamente a los pacientes (Liu *et al.* 2003).

Los MRSA, pueden ahora incluir resistencia virtualmente a todos los tipos de agentes antimicrobianos permitidos. Los MRSA que son resistentes a muchos otros agentes antimicrobianos, incluyendo las quinolonas son endémicos de muchos hospitales, existen reportes de Japón, de EU y de Europa acerca del surgimiento de *S. aureus* con resistencia múltiple y con baja sensibilidad a los glicopéptidos (Witte 1999).

La flexibilidad genética en *S. aureus*, ha facilitado el desarrollo de muchas cepas virulentas y resistentes a los antibióticos (Holden, Feil *et al.* 2004), esto ha causado el surgimiento de la resistencia a multidroga de los MRSA, la baja sensibilidad a los glucopéptidos, la susceptibilidad intermedia y completa a la vancomicina; todo lo anterior provoca que las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* tienda a ser limitada (Bin 2004; Huang *et al.* 2005; Xiong *et al.* 2005). Existen otros tipos de cepas de *S. aureus* que poseen poblaciones heteroresistentes con resistencia intermedia a vancomicina (hetero-VISA), para las cuales las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC's) son las convencionales ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$), excepto cuando es utilizada una alta densidad del inóculo; con tal inóculo, existen subpoblaciones para las cuales las MIC's se presentan en el rango intermediario (de 8 a 16 $\mu\text{g/ml}$) (Plipat *et al.* 2005).

Repercusiones de la resistencia múltiple.

A raíz del fenómeno de la resistencia múltiple bacteriana se derivan muchas afectaciones que se pueden apreciar al menos en los siguientes aspectos:

1) Salud

Las enfermedades infecciosas, aún durante los mejores tiempos, permanecen en todo el mundo como la principal fuente de mortalidad humana. Actualmente entre 17 y 20 millones de personas mueren anualmente a causa de enfermedades infecciosas. A menos que se implemente algún mecanismo de control gubernamental e interinstitucional, se puede esperar que el incremento en la resistencia bacteriana permanezca como un problema de salud pública en ascenso (Schmidt 2004; Real 2005).

La incesante dispersión de la resistencia bacteriana ha sido reconocida por organizaciones públicas y privadas conjuntando un llamado para que entren en acción la comunidad del cuidado de la salud, los gobiernos y el público. Voceros de la organización mundial de la salud (OMS), por ejemplo han declarado a la resistencia bacteriana como una de las tres cuestiones cumbre en salud global. Los esfuerzos para el manejo de la resistencia bacteriana, permanecen insuficientes para enfrentar la magnitud del problema (Knobler 2003).

Durante muchos años, ciertos clones de MRSA han mostrado que empiezan a ser dominantes en una situación de brote en algunos hospitales o muestran la capacidad para su diseminación a otros lugares y son conocidos como epidémicos (Gomes *et al.* 2005). Las condiciones de salud de las personas que transportan

bacterias MRSA va desde un transporte sin síntomas hasta infecciones severas que se tienen que tratar de por vida en los pacientes. Algunos estudios epidemiológicos han revelado que un gran número de estas infecciones fueron causadas por un sólo clon de MRSA que se dispersó rápidamente en los hospitales (MRSA epidémico), otros clones que se presentaron al mismo tiempo no se dispersaron (MRSA esporádicos). Las variaciones genéticas causan diferencias y las investigaciones en las poblaciones genéticas pueden ser utilizadas para identificar como esta variación se crea y se mantiene (Kuhn, Francioli *et al.* 2006).

El surgimiento de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y que son adquiridos en las comunidades (CA-MRSA), que habían sido reportados inicialmente en Australia y Canadá, se convirtieron en pandemia que pudo ser contenida a tiempo, pero que causó infecciones en la piel, sepsis y pulmonía severa en niños sanos y adultos jóvenes. De este hecho surgen una serie de cuestiones clínicas y de salud pública que sugieren la existencia de un problema médico de gran severidad (Clancy *et al.* 2005; Dryla *et al.* 2005). Este problema también se ha reportado en grupos comunitarios como los equipos deportivos y de atletismo, cárceles, clubes de natación, y en personas que no presentan los factores de riesgo clásicos (Clancy, Graepler *et al.* 2005).

La resistencia a los antibióticos y otros agentes anti-infecciosos constituye un riesgo para la salud pública, esto, aunado con el poco desarrollo de nuevos antibióticos, deben incentivar la creación de programas para abatir la resistencia, siempre que se asegure la eficacia continua de los antimicrobianos disponibles. El

diseño de un programa para el manejo de antimicrobianos debe estar basado en un mejor entendimiento de la relación entre el uso de antimicrobianos y la resistencia. Tales programas pueden ser administrados por equipos multidisciplinarios compuestos por médicos especialistas en enfermedades infecciosas, farmacéuticos clínicos, microbiólogos clínicos y practicantes del control de las infecciones y debe estar soportado activamente por los administradores de los hospitales (Kummerer 2004; MacDougall *et al.* 2005).

La amplia diseminación de la resistencia a los antibióticos entre las poblaciones bacterianas ha mantenido o hasta incrementado el número de bacterias dañinas involucradas en las infecciones. En efecto, las enfermedades infecciosas están entre los más importantes problemas de salud hoy en día, en parte como consecuencia del incremento en el número de fenotipos resistentes a los antibióticos, los cuales han hecho a las infecciones bacterianas difíciles de tratar con los protocolos terapéuticos disponibles (Martinez y Baquero 2002; Cornell *et al.* 2003).

El surgimiento y diseminación de las bacterias resistentes a múltiples antibióticos continúa ganando importancia como un problema de salud pública. Un aspecto epidémico es el incremento en la frecuencia de las infecciones adquiridas resistentes a múltiples antibióticos, una tendencia alarmante que ha continuado a pesar de los esfuerzos para el control de la transmisión a través del manejo prudente de los antibióticos y del control de las infecciones a nivel hospital (Smith *et al.* 2005).

2) Economía y ambiente.

En un estudio realizado en las unidades de cuidado intensivo (UCIS) europeas, el 30% de todas las infecciones se atribuyeron a *S. aureus* y 60% de estas fueron resistentes a la meticilina o a la oxacilina. En los EU, en 1996 solamente las infecciones por *S. aureus* en el área de New York causaron 14 000 muertes y los costos para la ciudad fueron de 435 millones de dólares; 29% de estas infecciones fueron resistentes a todos los antibióticos excepto a la vancomicina, y en suma contribuyeron al 48% de la mortalidad (Carbon 1999).

Los pacientes con infecciones hospitalarias frecuentemente tienen estancias de hospitalización prolongadas, y pueden requerir diagnósticos e intervenciones quirúrgicas adicionales. Algunos estudios se han enfocado a los costos asociados con patógenos intrahospitalarios bien definidos, y muestra que existen costos financieros considerables asociados con los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y con enterococos resistentes a los glicopéptidos (Daxboeck *et al.* 2006). En el caso de los brotes hospitalarios de patógenos resistentes a la vancomicina y a la meticilina, se consideran clínicamente importantes y se asocian con costos económicos adicionales cuando se comparan con aquellos provocados por organismos susceptibles (Campos, Vargas *et al.* 2004).

Además de los efectos directos de la resistencia microbiana sobre la salud humana, también existe un costo económico. En un estimado, por ejemplo, los cientos de miles de infecciones que ocurren en los Estados Unidos cada año, suman 30 millones de dólares en facturas de cuidados de salud nacionales. Los altos costos que resultan de la resistencia bacteriana son una carga

especialmente en países subdesarrollados, y en algunos casos las terapias efectivas están fuera del alcance de los pacientes o de los hospitales (Knober 2003).

Hay una creciente preocupación por el aumento de la resistencia de las bacterias patógenas en el medio ambiente y sus efectos ecotóxicos en el medio ambiente. El incremento de la resistencia a los antibióticos se ve como un problema ecológico. Esto incluye a la ecología de los genes de resistencia y de la bacteria resistente por si misma (Kummerer 2004).

Staphylococcus aureus.

El *S. aureus* es un coco gram positivo cuyas células miden aproximadamente 1 µm de diámetro, se agrupan en racimos que son indicativos de que tienen la capacidad de dividirse en más de un plano. Su respiración es aeróbica y anaeróbica y la mayoría de las cepas pueden fermentar el manitol de manera anaeróbica. Sobre el agar sangre forman colonias doradas (latín *aureum*) o blancas. Producen catalasa, coagulasa y un factor de agrupamiento extracelular, algunas cepas producen cápsulas (Briskin 2000; Haddadin, Fappiano *et al.* 2002).

Los estafilococos son organismos oportunistas y patógenos adaptables que tienen la capacidad de infectar, invadir, persistir y replicarse en cualquier tejido humano incluyendo la piel, los huesos, órganos internos o tejido vascular. El *S. aureus* es uno de los principales patógenos en humanos y animales, capaz de causar una amplia gama de infecciones de diferente severidad, ha desarrollado de forma gradual una resistencia a todas las clases de antibióticos y su virulencia es

variable entre cepas. Los *S. aureus* resistentes a la meticilina han surgido por la adquisición de un elemento genético móvil llamado casete cromosómico estafilocócico (*Sc*)*mec*, que transporta el gen *mecA*, del cual se han descrito cinco tipos diferentes en tamaño y estructura (Crisostomo, Westh *et al.* 2001; Aires de Sousa *et al.* 2005; Begun, Sifri *et al.* 2005; Bjorland *et al.* 2005; Haveri *et al.* 2005; Kanemitsu *et al.* 2005; Ko *et al.* 2005).

Algunas cepas con genotipos particularmente virulentos de *S. aureus* se conocen como “superbichos”, además se reporta su capacidad para sobrevivir dentro de organismos acuáticos microscópicos como la amoeba *Acanthamoeba polyphaga* (Foster 2004; Hopkin 2006).

El surgimiento de cepas resistentes se ha presentado en varios grupos bacterianos, especialmente en los estafilococos, su capacidad de producir enfermedad está fuertemente relacionada con el amplio uso de los antibióticos (Knober 2003), además de su enorme potencial para desarrollar resistencia múltiple. Las infecciones estafilocócicas más serias permanecen asociadas con una alta mortalidad (Dryla, Prustomersky *et al.* 2005).

El *Staphylococcus aureus* ha surgido como uno de los patógenos humanos más importantes y desde hace varias décadas, es una de las principales causas de infecciones hospitalarias y adquiridas en la comunidad. Se le asocia con una gran variedad de infecciones clínicas incluyendo septicemia, neumonía, sepsis de heridas, artritis séptica, osteomielitis y el síndrome de shock tóxico con tasas sustanciales de morbilidad y mortalidad. Una de las razones para el éxito de estos patógenos humanos es su gran variabilidad que ocurre en diferentes lugares y períodos manifestándose con diversos tipos de clones y patrones de resistencia

que son diferentes en una región y en un país. Aunque las infecciones causadas por *S. aureus* resistentes a los antibióticos, conducen a serios problemas en la población en general, tales infecciones pueden ser particularmente devastadoras para los jóvenes, los adultos mayores y las personas inmunocomprometidas (Shittu *et al.* 2006).

Como resultado de la adaptación a tejidos específicos, los estafilococos causan muchos síndromes patológicos como abscesos en la piel e infecciones de heridas, osteomielitis, endocarditis, neumonía, meningitis, bacteriemia, síndrome de shock tóxico, osteomielitis y envenenamiento por alimentos. Debido a que las cepas de *S. aureus* colonizan continuamente la piel humana, son expuestas a todas las terapias con antibióticos. Cuando surgen los microorganismos resistentes, estas cepas se pueden diseminar muy rápidamente por contacto directo en las poblaciones humanas, como se ejemplifica con la amenaza mundial de los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA)(los cuales presentan resistencia a la primera línea de antibióticos como la ampicilina y la penicilina) y con los *S. aureus* resistentes a la vancomicina (VRSA) (Bae, Banger *et al.* 2004; O'Flaherty, Ross *et al.* 2005).

La morfología colonial de *S. aureus* presenta ciertas variantes conocidas como variantes de pequeñas colonias (SCV) que son colonias con cierta variación en forma y tamaño y que están implicadas con la persistencia, las recaídas y la resistencia a antibióticos que se presenta en las infecciones. Los fenotipos alterados de las SCV en la mayoría de las cepas se atribuyen a defectos en el transporte de electrones debido a mutaciones en la síntesis de hemina o menadiona. La capacidad patógena de las SCV comparada con cepas de

fenotipos normales es variable dependiendo del atributo analizado, con algunos estudios muestran virulencia reducida y en otros muestran virulencia normal o aumentada (Sifri *et al.* 2006).

El transporte nasal de *S. aureus* en los humanos es el mayor factor de riesgo en las infecciones estafilocócicas, debido a que la colonización es relativamente común tanto en pacientes como en personas sanas que no han manifestado síntomas de enfermedad (Henderson 2006). Existen dos patrones de transporte nasal: transporte persistente y transporte intermitente. La densidad de las poblaciones de *S. aureus* en las fosas nasales es alta en transportadores persistentes, lo cual explica un incremento en el riesgo de infección. El tamaño de las poblaciones bacterianas es variable en los transportadores intermitentes (Nouwen *et al.* 2004). Estas personas pueden permanecer colonizados por años sin que la bacteria les cause enfermedad o daño, cuando incrementan su presión de colonización, pueden traspasar las bacterias a otros pacientes que también comienzan a transportar bacterias resistentes o que pueden adquirir una infección resistente (Smith *et al.* 2004). También es posible encontrar una co-colonización en vías nasales de pacientes con cirugía cardiotorácica con MRSA y MRSA-coagulasa negativos (Becker *et al.* 2006).

Son innumerables los componentes bacterianos y los productos secretados que afectan la patogénesis de las infecciones causadas por *S. aureus*, e incluyen: adhesinas asociadas con la superficie celular, polisacáridos capsulares, exoenzimas, exotoxinas y proteínas inmunomoduladoras. Esta constelación de productos bacterianos le permiten a los estafilococos adherirse a la membrana de la célula eucariótica, resistir la opsonización, lisar las células eucarióticas y activar

la producción en cascada de una serie de moléculas inmunomoduladoras por parte del hospedante (O'Riordan *et al.* 2004; Garver *et al.* 2006). Las toxinas de *S. aureus* incluyen a un grupo de exotoxinas superantigénicas (SAGs) cuyo espectro de acción va desde la intoxicación relativamente benigna por alimentos hasta la producción del síndrome de shock tóxico. Las principales SAGs de *S. aureus* que se producen incluyen a la toxina del síndrome de shock tóxico (TSS) y a la enterotoxina SE con serotipos de A hasta Q excluyendo la F (Orwin *et al.* 2003). Las proteínas secretadas tales como las hemolisinas, las lipasas y las enzimas proteolíticas son las responsables de la capacidad de invasión y daño a los tejidos. Las proteínas asociadas a la superficie celular tales como la proteína A, proteínas de unión de colágeno, el factor de agrupación, las proteínas de unión de fibronectina y la proteína de leucocidina Panton Valentine (PVL), son las que intervienen en la adhesión a la superficie del hospedero (Holmes *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006). En la pared celular de los estafilococos también existen variaciones estructurales y químicas, los factores que están implícitos en la biosíntesis de estas paredes debe ser un aspecto importante en el combate en contra de las bacterias resistentes (Giesbrecht *et al.* 1998).

Con excepción de las enfermedades causadas por toxinas específicas, como las enterotoxinas y las toxinas exfoliativas o la toxina de síndrome de shock séptico, no se ha demostrado que un sólo factor de virulencia sea capaz de provocar una infección por estafilococos. Las infecciones son promovidas por la acción coordinada de varios factores de virulencia, los cuales están asociados con la pared celular y con proteínas secretadas por la bacteria (Fournier *et al.* 2005; Rihn *et al.* 2005). Otro gen relacionado con los factores de virulencia es el *tst* que

codifica la producción de la toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSS-1) que es una toxina superantigénica secretada por algunas cepas de *S. aureus*. Esta toxina está presente en los casos de fiebre escarlatina estafilocócica, y con el shock tóxico del neonato a manera de enfermedad exantemática, descrita recientemente en Francia y Japón. Las TSS fueron descritas inicialmente en 1978 como una enfermedad de multisistemas caracterizada por la presencia rápida de fiebre, hipotensión, salpullido eritematoso e hiperemia mucosa seguidas de descamación y complicaciones de multiorganos (Durand *et al.* 2006).

La gama diversa de enfermedades provocadas por *S. aureus* se atribuye a su capacidad para producir un arreglo de factores de virulencia, la expresión de los cuales es controlada por sistemas de regulación global en respuesta a factores tales como la densidad celular, la presión de colonización, la disponibilidad de energía, la tensión de oxígeno y otras señales del medio ambiente, además de su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones del mismo (Lowy 2003; Begun, Sifri *et al.* 2005)

Biomembranas

Los estafilococos son microorganismos ubicuos presentes en el tracto respiratorio y sobre la piel de un alto porcentaje de adultos. Sin embargo, en estos grupos de adultos colonizados, existe un riesgo serio de sufrir infecciones estafilococales. Dentro del género *Staphylococcus*, *S. aureus* es el agente causal de la mayoría de las infecciones estafilococales y está asociado con serias enfermedades adquiridas en la comunidad y hospitalarias (Perez-Roth *et al.* 2001). Las enfermedades que produce se deben a la colonización de aditamentos, sin

embargo, es particularmente problemático desde que estos dispositivos proveen una vía de acceso a través de la barrera de defensas corporal y proveen una superficie para el crecimiento celular. Esta capacidad de *Staphylococcus* spp de adherirse y formar biomembranas de multicapas en los tejidos del hospedante y sobre otras superficies es uno de los mecanismos importantes por medio de los cuales son capaces de producir enfermedades persistentes. Las biomembranas son comunidades de microorganismos incluidas en una matriz extracelular que ellas mismas producen, es difícil de erradicar y es una fuente de muchas infecciones recalcitrantes (Jabra-Rizk *et al.* 2006). Las biomembranas son un problema clínico mayor, principalmente debido a que incrementan la resistencia a los antibióticos, y a que producen infecciones persistentes. En los estafilococos, la formación de biomembranas está asociada con la producción de la molécula de poli-N-acetilglucosamina (Cerca *et al.* 2005).

El *Staphylococcus aureus* puede evolucionar en la resistencia a las drogas con la alteración de uno o más nucleótidos dentro de su genoma de 2.8-Mbp. Los cambios de un solo nucleótido le confieren resistencia a un amplio rango de antimicrobianos, incluyendo rifampicina, fluoroquinolonas y quinupristina-dalfopristina. Las mutaciones múltiples se requieren para un incremento en la resistencia a otras drogas, tales como el linezolid. La identificación de las mutaciones que confieren resistencia es esencial para entender los mecanismos genéticos de la resistencia a las drogas y frecuentemente aclaran los mecanismos más allá de la acción de las drogas (Friedman *et al.* 2006)

Bacteriocinas

Las bacterias como *S. simulans* bv *staphylolyticus* secretan lisostapina (una endopeptidasa de 27-kDa), una bacteriocina que corta las uniones de pentaglicina en la pared celular de *S. aureus* (Kusuma *et al.* 2005) y es efectiva en contra de los ORSA (*S. aureus* resistentes a la oxacilina) y de los VISA (*S. aureus* resistentes a la vancomicina). En las pasadas tres décadas, el tratamiento de las infecciones ha empezado a ser difícil debido a la colonización con cepas que son resistentes a virtualmente todos los agentes antibióticos. La lisostapina ha sido utilizada para la eliminación de los estafilococos de la piel y de las fosas nasales de los individuos que constituyen un incremento en el riesgo de infección por *S. aureus* (Climo *et al.* 2001; Grundling *et al.* 2006).

Infecciones hospitalarias causadas por *S. aureus*.

Los estafilococos son un grupo diverso de bacterias que causan enfermedades desde infecciones menores de la piel hasta la amenaza a la vida constituída por la bacteriemia. A pesar de los esfuerzos a gran escala para controlar su dispersión, persiste como la causa principal de infecciones comunitarias y hospitalarias en el mundo. Solamente en los hospitales, son responsables de un millón de infecciones serias al año. Los dos patógenos oportunistas principales son *S. aureus* y *S. epidermidis* que colonizan una considerable porción de la población. Las especies predominantes de *S. epidermidis*, se dispersan regularmente a través del ecosistema de la piel, mientras que *S. aureus* es transportado en

superficies mucosas. Dentro de este contexto, los estafilococos tienen una relación de simbiosis benigna con sus hospedantes. Sin embargo, la apertura de la barrera cutánea por un trauma, por agujas de inoculación, o por la implantación directa de instrumentos quirúrgicos permite a los estafilococos entrar al hospedante y adquirir el rol de patógeno (Gill *et al.* 2005; Kuklin *et al.* 2006).

Los estafilococos son causa importante de infecciones humanas, pero también se encuentran como microorganismos no patógenos en muestras fecales humanas (Dominguez *et al.* 2002). Las Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) que se iniciaron en los hospitales, empiezan a hacerse comunes entre pacientes no hospitalizados. Numerosos brotes de infecciones causadas por MRSA se han reconocido en personas previamente sanas quienes carecían de los factores de riesgo tradicionalmente asociados para la adquisición de MRSA. En décadas pasadas, el incremento en el número y proporción de las infecciones con MRSA en diferentes ciudades se debe a la dispersión de cepas epidémicas. La dispersión de los clones de cepas de MRSA epidémicos dentro de los hospitales, entre hospitales de la misma comunidad, y también entre comunidades y continentes. En Europa, la prevalencia de los MRSA varía considerablemente de menos de 3%(en Dinamarca, Suiza y Holanda) a más del 30% (en Grecia, Italia y Reino Unido) (Wannet *et al.* 2004). El surgimiento y la dispersión de MRSA epidémicos en Europa fue reportado inicialmente en el Reino Unido en 1980. Los tres clones epidémicos más comunes de MRSA son las cepas llamadas EMRSA-3,-15 y -16. Durante la última década, fueron identificadas cinco clones de MRSA de dispersión internacional: Ibérica, Brasileña, Hungara, New York/Japan y clones pediátricos, la detección se realizó usando una combinación

de polimorfismos CLAI-MecA, patrones de inserción Tn554 y electroforesis de campos pulsantes (PFGE) (Soo Ko *et al.* 2005; Sola *et al.* 2006).

Inicialmente los MRSA eran considerados como patógenos hospitalarios. Sin embargo, recientemente, existe un incremento en el número de cepas de MRSA que han sido aisladas de pacientes de todo el mundo con infecciones adquiridas en la comunidad (Huang *et al.* 2006; Ramdani-Bouguessa *et al.* 2006). Reportes recientes indican que se ha empezado a incrementar la prevalencia en la comunidad a partir de 1990, ahora, las cepas de MRSA designados adquiridos en la comunidad o asociados a la comunidad (CA-MRSA), se han incrementado en pacientes sanos que no presentan los factores de riesgo tradicionales asociados con la colonización con MRSA (Hisata *et al.* 2005).

Las infecciones en la piel y en los tejidos suaves (SSTIs) son una manifestación común de enfermedad estafilocócica en muchos brotes comunitarios con enfermedad estafilococica invasiva que por ahora es menos común. Estas cepas de MRSA asociadas a la comunidad CA-MRSA son genéticamente distintas de las que están asociadas con los cuidados de la salud (HA-MRSA). Las cepas asociadas a la comunidad MRSA frecuentemente albergan factores de virulencia diferentes de los que albergan las cepas HA-MRSA, particularmente los genes de leucocidina de Pantom Valentine (citotoxina formadora de poros que tiene como blanco a las células humanas mononucleares y polimorfonucleares) que están asociados con las SSTIs. La resistencia a la meticilina está conferida por el gen del tipo IV en el casete cromosómico *mec* (SCC-*mec* IV), el cual es distinto de los tipos I hasta el III, que han sido encontrados previamente en las cepas de HAMRSA (Holmes, Ganner *et al.* 2005; Patel *et al.* 2006). El análisis genotípico del

SCC*mec* ha proporcionado fuertes evidencias para pensar que el origen de los MRSA adquiridos en la comunidad y los MRSA asociados a los hospitales son independientes (Chongtrakool *et al.* 2006). El establecimiento del elemento SCC*mec* en los estafilococos enfrenta dos obstáculos principales: uno es el costo del mantenimiento de un elemento adicional relativamente grande, del cual solamente el gen *mecA* es esencial para la resistencia; el segundo es el acomodo del nuevo PBP2a en el complejo de la pared celular bacteriana. La habilidad para el acomodo de estos elementos genéticos es variable entre cepas, lo cual resulta en un nivel de resistencia variable (Ender *et al.* 2004).

Pocos estudios se han enfocado al estudio de los *S. aureus* susceptibles a la meticilina (MSSA) debido a su susceptibilidad a todos los antibióticos de primera línea. Existe un renovado interés en la genética de las poblaciones de MSSA, impulsado por estudios que han reportado casi 20 adquisiciones independientes de nuevos elementos del tipo IV SCC*mec* por MSSA en linajes no relacionados. Parece ser que el éxito de los clones de MRSA apoyados por del tipo IV SCC*mec* en las áreas comunitarias del mundo es debido a la existencia de MSSA precursores que se han adaptado a la comunidad (Shore *et al.* 2005; Vivoni *et al.* 2006).

El *S. aureus* permanece entre los patógenos hospitalarios más importantes debido a la diversidad y severidad de las infecciones que causa. Algunos estudios han demostrado que estas infecciones son causadas comúnmente por la propia flora comensal de los pacientes. El reservorio original del cual los pacientes adquieren estas bacterias no se ha aclarado. Mientras que algunos pacientes infectados son colonizados por *S. aureus* al tiempo de la hospitalización, otros probablemente se

colonizan con aislamientos altamente resistentes a los antibióticos durante sus estancias en los hospitales. El personal hospitalario está implicado entre las posibles fuentes de de estos patógenos potencialmente más resistentes a los antibióticos. La transmisión de estas cepas a los pacientes es probable que ocurra durante la rutina de cuidado del paciente (Cespedes *et al.* 2002). EL *S. aureus* es un organismo comensal de las fosas nasales de los humanos; aproximadamente el 20% de la población está colonizada con esta bacteria, mientras que el 60% de la población son transportadores transitorios (Brady *et al.* 2006).

La incidencia en incremento de las cepas de *S. aureus* con resistencia múltiple entre infecciones hospitalarias (o adquiridas en el hospital HA), ha alcanzado una dimensión de reto mayor al problema de *Staphylococcus aureus*. Estas cepas son etiquetadas típicamente como *Staphylococcus aureus* HA resistentes a la meticilina (MRSA) o simplemente cepas MRSA. Algunos factores de riesgo que predisponen a la adquisición de los MRSA, son la hospitalización reciente o la exposición a un área de cuidado de la salud, estancias en áreas de cuidados de largo período, procedimientos invasivos o de cirugía y hábitos de inyección de drogas (Said-Salim *et al.* 2005). Se estima que arriba del 20% de los pacientes que han sufrido cirugías adquieren al menos una infección hospitalaria, se reporta que este fenómeno genera costos adicionales de 5 a 10 billones de dólares en los sistemas de cuidado de la salud en EU (Brady, Leid *et al.* 2006).

Diagnóstico e identificación de *S. aureus*.

Anualmente en los EU ocurren un total de 660 000 casos de sepsis causadas por estafilococos, con una mortalidad superior al 50%. Datos similares son reportados en Alemania. Los estafilococos son las bacterias más frecuentemente aisladas de los cultivos de sangre (hemocultivos), se categorizan como *Staphylococcus aureus* y no-*S. aureus* (estafilococos coagulasa negativos [CoNS]). Aunque los CoNS son las bacterias más comunes en los cultivos de sangre (~35%), la mayoría son contaminantes de la flora normal de la piel. Así, la identificación directa de los estafilococos a partir de hemocultivos puede permitir el diagnóstico temprano de la septicemia por *S. aureus*, la cual es empíricamente mejor tratada con vancomicina (Hartmann *et al.* 2005).

Para que el control de las infecciones y las iniciativas de prevención sean efectivas y evitar la dispersión de los MRSA dentro de las áreas de los cuidados de la salud, es fundamental la identificación rápida de este patógeno a partir de las muestras clínicas (Vinh 2006). El reporte rápido de la identificación y de las pruebas de susceptibilidad pueden mejorar significativamente los resultados para los pacientes infectados porque permite un ajuste inmediato en la antibioterapia, lo cual conduce a una disminución en la mortalidad, disminución en el periodo de estancia hospitalaria y una baja en los costos de hospitalización (Hallin *et al.* 2003).

El aislamiento e identificación rápidos de los *S. aureus* en las muestras clínicas se ha vuelto esencial para el cuidado adecuado de los pacientes y para el control de estos microorganismos en los hospitales. En las rutinas del laboratorio clínico, el

S. aureus es aislado en medios no específicos y entonces identificado presuntivamente antes de la caracterización de toda la noche. Existen medios selectivos que han sido desarrollados para llevar a cabo el aislamiento y la identificación presuntiva en un solo paso. Algunos de los medios más utilizados es el agar de sal y manitol y el cromagar (CHROMagar) que también se recomiendan para el análisis selectivo de los MRSA (Kluytmans *et al.* 2002).

Como la resistencia a la meticilina en los estafilococos que es mediada por PBP 2^a (Penicillin Binding Protein) se expresa de manera heterogénea, la detección por PCR del gene *mecA* es el “estándar de oro” para la detección de la resistencia a la meticilina. En el caso de infecciones severas es clínicamente útil proveer una metodología para la identificación rápida y para conocer la susceptibilidad antimicrobiana. Muchas técnicas de PCR han sido descritas para la caracterización de los estafilococos. La mayoría de estas pruebas son realizadas con extractos de DNA genómico de colonias bacterianas o de caldos de cultivo lisados (Maes *et al.* 2002). La determinación genética del gen de resistencia a los antibióticos lactámicos de amplio espectro, es un gen adquirido por *S. aureus*. Los esfuerzos para identificar el origen extraespecie de este importante determinante de resistencia a las drogas, se ha emprendido con la detección de un gen homólogo cercano en *S. sciuri*, una especie de estafilococo taxonómicamente distante de *S. aureus* y que es más frecuentemente recuperado de la piel de los roedores y de mamíferos primitivos (Wu *et al.* 2001; Severin *et al.* 2005).

Resistencia de S. aureus a los grupos de antibióticos.

En los diferentes grupos de antibióticos se han presentado considerables niveles de resistencia en las cepas de *S. aureus*, enseguida se hace una breve reseña de la situación en los diferentes grupos de antibióticos:

Macrólidos, lincosamida y estreptogramina B.

En los estafilococos, la modificación de los sitios de acción es el mecanismo más común de adquirir resistencia a los antibióticos como los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS), además les confieren resistencia cruzada a los antibióticos MLS (es el llamado fenotipo MLS_B). La resistencia MLS_B puede ser constitutiva (MLS_BC) o inducible (MLS_Bi), cuando es inducible, la bacteria frecuentemente se muestra resistente a la eritromicina (ER) pero susceptible a la clindamicina (CL). Cuando la prueba de difusión en disco se usa para determinar la susceptibilidad, se observa una zona de inhibición en forma de D alrededor de la CL si se coloca un disco de ER cerca. Aunque los aislamientos muestran susceptibilidad a la CL en ausencia de un agente de inducción, esto indica que no se debe prescribir CL para el tratamiento de pacientes con infecciones causadas por tales organismos debido a la alta probabilidad de que se puede desarrollar resistencia a la CL durante la terapia (Schreckenberger *et al.* 2004; Novotna *et al.* 2005). Este mecanismo de resistencia está mediado por el gen *mrsA* que codifica un mecanismo de eflujo activo (solamente en macrólidos y estreptogramina B), el gen *erm* codifica enzimas que confieren resistencia inducible o constitutiva a los agentes MLS por la vía de metilación del 23S rRNA, reduciendo la unión de los agentes MLS al ribosoma (Fiebelkorn *et al.* 2003; Zelazny *et al.* 2005).

Mupirocina.

La mupirocina es un agente tópico antimicrobiano utilizado para el tratamiento y la erradicación de los MRSA. También se usa para evitar las infecciones postoperatorias de heridas y para disminuir el transporte nasal de los mismos (Hurdle *et al.* 2004). El surgimiento de la resistencia a la mupirocina ha demandado la precaución en contra del uso prolongado y amplio en las instituciones. Más aún, existen estudios contradictorios de la habilidad de la mupirocina para erradicar a los MRSA, que reportan diferencias en la tasa de surgimiento de resistencia que puede contribuir a la variabilidad de las cepas resistentes. Un alto nivel de resistencia en *S. aureus* está asociado con el gen *mupA* que es un plásmido que tiene su origen en la mayoría de las cepas y codifica una isoleucil-tRNA sintetasa que actúa mediante inhibición competitiva (Chaves *et al.* 2004). Las cepas con un gene *mupA* expresan resistencia de bajo nivel o resistencia de alto nivel no transferible. Más comúnmente, una resistencia de bajo nivel es causada por mutaciones en la sintetasa isoleucine-tRNA nativa codificada cromosómicamente (Walker *et al.* 2004).

Penicilinas y β lactamas.

Las penicilinas y las β lactamas relacionadas, reducen significativamente la morbilidad y mortalidad de las infecciones por *S. aureus* pero aumentan constantemente la amenaza de disminuir su utilidad. La resistencia de los estafilococos a las β lactamas está mediada por dos mecanismos: (i) producción de β lactamasas o (ii) producción de dos proteínas de unión con la penicilina (PBP), PBP2a y PBP2, ambas controladas por el gen *murE* (Katayama *et al.* 2003;

Gardete *et al.* 2004). La producción de β lactamasas es controlada por el gen *blaZ* β lactamasa y dos genes asociados *blaI* y *blaR* que han sido identificados sobre algunos transposones diferentes (Anthonisen *et al.* 2002).

Oxacilina.

La oxacilina es el agente recomendado por el Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico (CLSI; anteriormente NCCLS = nacional committee of the clinical laboratory standards) para la realización de las pruebas fenotípicas en la predicción de la resistencia a las penicilinas penicilinasas estables (PSP), debido a que su estabilidad y sensibilidad son superiores a otras PSP para pruebas de susceptibilidad. El producto del gen *mecA*, la proteína de unión con la penicilina PBP2a, es el mediador de la resistencia a la oxacilina. La PBP2a tiene una baja afinidad para los antibióticos β lactámicos que produce PBP endógeno de los estafilococos, permitiendo la síntesis de peptidoglucan en la presencia de dosis letales de beta lactámicos. La detección exacta del gen *mecA* mediador de la resistencia a la oxacilina y otras penicilinas penicilinasas estables, por ejemplo la meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina y flucoxacilina es necesaria para asegurar la quimioterapia antimicrobiana apropiada de las infecciones estafilococicas, particularmente aquellas asociadas a la comunidad (Miller *et al.* 2005; Swenson *et al.* 2005).

Macrólidos.

Desde el descubrimiento de la eritromicina en 1952, los macrólidos fueron presentados como alternativa a la penicilina, especialmente para el tratamiento de

infecciones causadas por microorganismos gram-positivos. Actualmente, son recomendados como la primera línea de terapia para los adultos con neumonía adquirida en la comunidad. Desafortunadamente está en aumento la resistencia a los macrólidos entre *Streptococcus pneumoniae*, la causa más común de infecciones en tracto respiratorio. Este es sin duda el resultado del incremento en el uso de los macrólidos (Berg *et al.* 2004).

Vancomicina.

La vancomicina es un antibiótico del grupo de los glucopéptidos que fue introducido en 1958 para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gram-positivas. El uso de este antibiótico se ha incrementado en los últimos 20 años, en gran parte debido al incremento en la resistencia a la meticilina en estafilococos coagulasa-negativos y en *S. aureus*. Reportes del año 2000 del Nacional Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) indican que cerca del 75% de los aislamientos de las unidades de cuidados intensivos estafilococos coagulasa-negativos y 47% de los *S. aureus*, fueron resistentes a la meticilina. La vancomicina permanece como el antibiótico de elección para estas infecciones (Srinivasan *et al.* 2002).

Se han reportado cepas de *S. aureus* altamente resistentes (VISA) que han sido recuperadas de muestras clínicas coexisten dos genes en la misma célula bacteriana: el gen *mecA* de la resistencia a las β lactamas y el complejo del gen de la resistencia a la *vanA* (Severin *et al.* 2004).

Existe un reporte de que aislamientos de *S. aureus* resistentes al oxacilina (ORSA) recobrados de pacientes de pacientes con infecciones serias en Japón y Estados

Unidos han presentado una falta de susceptibilidad a la vancomicina y a otros glucopéptidos (*S. aureus* vancomicina intermediarios [VISA]). En adición, además de tener una disminución en la susceptibilidad a la vancomicina, estos aislamientos son también resistentes a otros antimicrobianos, dejando pocas opciones para una terapia antimicrobiana efectiva (Finan *et al.* 2001).

Fluoroquinolonas.

La resistencia microbiana a la fluoroquinolonas resultan de mutaciones en la topoisomerasa II (DNA girasa), topoisomerasa IV, y/o la activación de bombas de eflujo. La selección de microorganismos resistentes evolucionan de la combinación y frecuencia de mutaciones que son necesarias para expresar el genotipo de la resistencia, la potencia de la droga, concentración de prueba de la droga y otros factores. Las mutaciones y la presión de selección crean el potencial para la ventaja de supervivencia y la dispersión de los clones de resistencia (Gilbert *et al.* 2001).

Debido a que las fluoroquinolonas difieren tanto en su afinidad de blancos o sitios diana como en su activación de las bombas de eflujo, se puede especular que la expresión fenotípica de la resistencia a las quinolonas puede ser diferente (Boos *et al.* 2001). El eflujo activo por la inhibición de la reserpina, contribuye sustancialmente en el fenotipo de la resistencia de algunas cepas (Linde *et al.* 2001).

Meticilina.

La meticilina es uno de los antibióticos que se produjeron especialmente en contra de cepas resistentes, de ahí la importancia de la falta de susceptibilidad bacteriana a este antibiótico. Los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) fueron reportados por primera vez en 1961 y desde entonces empezaron a ser los patógenos más importantes en los hospitales de todo el mundo. En el Reino Unido, la incidencia media de las bacteriemias causadas por MRSA es del 40%. Otras variantes relacionadas que también han surgido son los *S. aureus* con resistencia intermedia y completa a la vancomicina (Crisostomo, Westh *et al.* 2001; Baptiste 2005; Lu *et al.* 2005; Bartlett 2006). Esta situación remarca la necesidad de realizar estudios de supervivencia bacteriana más profundos, en diversas áreas geográficas, incluyendo todo tipo de instituciones especialmente aquellas que se han visto más afectadas (Cuevas, Cercenado *et al.* 2004). En Bélgica, la proporción de las cepas de MRSA aisladas de pacientes con bacteriemia causada por *S. aureus* ha alcanzado desde un 23% en 1999 hasta un 28% en 2002. Desde 1995, el laboratorio de referencia para el seguimiento de los MRSA ha determinado estudios de supervivencia epidemiológica para el monitoreo de la evolución de los perfiles en los genotipos y en la resistencia a antibióticos de los MRSA aislados de pacientes hospitalizados en Bélgica. De los aislamientos de MRSA realizados sólo fueron caracterizados a nivel molecular el 90%, se utilizó la electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE), los resultados mostraron la existencia de tres tipos epidémicos principales: A1, B2 y C3 (Denis *et al.* 2004).

La primera penicilina semisintética llamada metilicina, fue introducida en 1959, utilizada para superar los problemas que surgieron de la prevalencia en incremento de los *S. aureus* resistentes a la penicilina y productores de penicilinasas. En los años 1980s los MRSA empezaron a constituir un problema de salud de importancia mundial (Perez-Roth, Claverie-Martin *et al.* 2001).

Prevalencia de los MRSA.

La prevalencia de los MRSA varía ampliamente en los países. Su prevalencia es consistentemente más alta en los EU, en Japón y en el sur de Europa que en otras poblaciones; más del 30% de los individuos de estos países están infectados, comparado con un 2% en Escandinavia, Holanda y Suiza. Reportes recientes sugieren que ha habido un aumento en la frecuencia de los casos de infecciones en personas sanas que no poseen los factores de riesgo de las infecciones causadas por los MRSA adquiridos en la comunidad (CA-MRSA). Las personas afectadas son principalmente de áreas marginadas, como los indios americanos, en el oeste de EU, aborígenes canadienses, isleños del pacífico de la región pacífica del sudoeste y aborígenes australianos (Dailey *et al.* 2005). En Europa, el producto extracelular leucocidina Panton-Valentine se ha asociado con pulmonía severamente necrotizante y con infecciones de la piel producidas por estafilococos asociados a la comunidad, tales como las furunculosis (Boyle-Vavra *et al.* 2005; Hanssen *et al.* 2005).

La incidencia de la resistencia a la metilicina entre aislamientos hospitalarios de *S. aureus* es de más del 70% en algunas ciudades de Asia como Taiwan, China y

Korea. Uno de los aspectos que favorecen el rápido surgimiento de los MRSA en el mundo es la diseminación de clones específicos; esto contribuye a un incremento acelerado en su incidencia (Ko, Lee *et al.* 2005), además de estar en aumento, de 1990 a 1992 este microorganismo ha sido la causa más común de neumonías e infecciones de heridas quirúrgicas (Dartois *et al.* 2005).

La epidemiología de los MRSA es difícil de precisar debido a la dificultad que presenta el poder determinar el nivel infectivo de la bacteria que puede ser de colonización o de infección invasiva en cuyo caso deriva en la muerte del paciente (Panagea *et al.* 2006).

Las cepas de MRSA tienen la tendencia de acumular resistencia adicional, que da como resultado la formación de cepas con resistencia múltiple, las cuales están incrementando los problemas terapéuticos con la limitante de que hay pocas opciones terapéuticas (Perez-Roth, Claverie-Martin *et al.* 2001).

Las infecciones con MRSA son difíciles de tratar, los pacientes infectados, pueden permanecer colonizados por muchos meses y requieren de largos periodos de hospitalización. Además se requiere del uso de desinfectantes locales y antibióticos sistémicos específicos para cada paciente (Maisch *et al.* 2005). Otro problema es el escaso número de antibióticos que son efectivos en contra de estas bacterias (Middleton *et al.* 2005).

En los años 1980's, se reportó un nuevo tipo de infecciones en personas que no tenían los factores de riesgo tradicionales. Estas infecciones fueron adquiridas aparentemente en la comunidad y se conocen como infecciones asociadas a la comunidad CA-MRSA (Buck *et al.* 2005; Faria *et al.* 2005; Ibia 2005).

Los brotes de MRSA adquiridos en los hospitales (HA-MRSA) son el resultado típico de la dispersión de los clones de MRSA empezando con la transferencia de paciente a paciente, utilizando frecuentemente como intermediarios al personal del cuidado de la salud. Los HA-MRSA son multirresistentes. La vancomicina es el estándar para el tratamiento de infecciones serias con MRSA, sin embargo, recientemente han surgido en los EU unos pocos casos de *S. aureus* resistentes a la vancomicina (VRSA) (Rice 2006).

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo originado en cepas de *S. aureus* vancomicina intermediarios (VISA) que consiste en la protección de la producción de peptidoglucan en la membrana citoplasmática permitiendo a las células producir la pared celular de peptidoglucano lo cual permite a las células resistir la acción de la vancomicina (Cui *et al.* 2006).

Se ha encontrado que las medidas de control capaces de prevenir brotes sostenidos en corto plazo, pero usadas repetidamente, pueden resultar en un fallo a largo plazo generando incrementos graduales en el reservorio de la comunidad. Si los recursos no se destinan para el control, la prevalencia las políticas de aislamiento pueden fallar catastróficamente (Cooper *et al.* 2004). Los altos niveles de resistencia múltiple entre cepas MRSA de la comunidad en asociación con el uso indiscriminado de los antibióticos destacan la importancia del problema de la presión de selección, existen resultados que indican que la dispersión de los clones y la transmisión de aislamientos hospitalarios contribuyen a esta pesada carga en la comunidad (Lu, Chin *et al.* 2005).

Genes que transmiten la resistencia en *S. aureus*.

Los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) son un grupo de patógenos bacterianos que son endémicos de la mayoría de los hospitales de Hong Kong. Existen datos que indican que este país tiene una de las tasas de prevalencia más altas entre los hospitales dentro de la región del pacífico asiático (Ip *et al.* 2005).

Desde su descubrimiento, los MRSA han permanecido como el principal patógeno hospitalario en el mundo. Recientes reportes manifiestan su prevalencia en la comunidad desde los años noventas (Hisata, Kuwahara-Arai *et al.* 2005; Rihn, Michaels *et al.* 2005). Los MRSA surgen cuando los organismos de *S. aureus* adquieren un elemento genético móvil de gran tamaño, llamado casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*). La mayoría de las cepas contienen el *SCCmec* II o III; mientras que la mayoría de las cepas CA-MRSA poseen el *SCCmec* IV. Recientemente un nuevo tipo de *SCCmec* V fue encontrado y caracterizado en una cepa de CA-MRSA en Australia (Chen 2005; Dakic *et al.* 2005; Hsu *et al.* 2005; Katayama *et al.* 2005). Solo unos pocos clones epidémicos son responsables de un gran porcentaje de todas las enfermedades producidas por los MRSA en todo el mundo (Arakere *et al.* 2005; O'Brien *et al.* 2005; Ribeiro *et al.* 2005). Los tipos epidemiológicos del casete del cromosoma *mec* (*SCCmec*) y la electroforesis en campos pulsantes (PFGE), muestran que las cepas aisladas de pacientes con impétigo y con el síndrome de piel escaldada estafilocócica (SSSS) tienen el tipo IV *SCCmec* (Noguchi *et al.* 2006).

Virtualmente todas las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) producen una proteína de unión con la penicilina, que puede ser la PBP2a o la

PBP2; las cuales les confieren resistencia a todos los agentes β -lactámicos disponibles. La PBP2a es codificada por el gene *mecA* (Rihn, Michaels *et al.* 2005; Wisplinghoff *et al.* 2005).

La evaluación de la epidemiología molecular por medio de un nuevo perfil de electroforesis en gel de campos pulsátiles (Kerttula *et al.* 2005), de los MRSA y de los *S. aureus* susceptibles a la meticilina (MSSA), es una herramienta que facilita el conocimiento sobre las posibles relaciones y la evolución de las cepas encontradas en los hospitales de una región específica (Koessler *et al.* 2006; Vindel *et al.* 2006; Vivoni, Diep *et al.* 2006).

Alternativas de tratamiento.

El tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por cepas resistentes a múltiples antibióticos se basa principalmente en el uso de terapias con antibióticos o combinaciones de estos.

Antibióticos.

Durante el último siglo, los antibióticos constituyen una de las estrategias que han tenido una amplia aplicación en el tratamiento de enfermedades bacterianas. La estimación correcta del potencial bactericida de estos agentes, -un parámetro importante en farmacología-, es un punto crítico para su uso apropiado y seguro (Liu *et al.* 2004).

Existen diversos compuestos de antibióticos que pertenecen a grupos como los aminoglucósidos, las cefalosporinas, las penicilinas, los glicopeptidos, los β -lactámicos, los macrólidos, fluoroquinolonas, etc. Algunos de los mecanismos de

acción son: en el caso de los β -lactámicos, la inhibición de la síntesis de mureína que es un constituyente importante en la pared bacteriana dando como resultado la lisis de la célula (Korsak *et al.* 2005; Maiques *et al.* 2006); los aminoglucósidos que interfieren la síntesis de proteínas y se producen proteínas no funcionales (Hobbie *et al.* 2006); los macrólidos que inhiben la síntesis de proteínas al bloquear las uniones de los azúcares (Pereyre *et al.* 2004).

Existe otro grupo de penicilinas penicilinasa-resistentes también llamado antiestafilocócicas que no son hidrolizadas por la penicilinasa estafilocócica, cuyo espectro antimicrobiano queda restringido a su uso en contra de infecciones cuya causa conocida o sospechada sean los estafilococos productores de penicilinasas. En caso de presentarse resistencia, los antibióticos de elección serán la vancomicina como único agente o asociado con la rifampicina. A este grupo también pertenece la meticilina que es una penicilina semisistémica que se prepara con ácido 6-aminopenicilánico. La meticilina es bactericida frente a la mayoría de las cepas de *S. aureus*, no tiene efecto para las bacterias gramnegativas, se absorbe mal por vía oral y cuando se utiliza por vía intramuscular, las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan de 30 minutos a una hora. El 40% de la meticilina se une a las proteínas plasmáticas (Lozano 1998).

Comúnmente se aplican terapias sistémicas con combinaciones de antibióticos (Kim *et al.* 2004), pero aunque son efectivas en la eliminación de bacterias circulantes, fallan cuando se presentan casos en los que las superficies de cateteres no son esterilizados adecuadamente, llevando al paciente a un riesgo de complicaciones o reinfección. Por estas razones, se ha puesto especial atención

hacia el tratamiento *in situ* de catéteres colonizados, conocido como técnica de encerrado, también llamada terapia intraluminal. Esta técnica involucra la instilación de una solución concentrada de antibiótico en el cateter colonizado por bacterias, en un volumen elegido hasta llenar al lumen pero sin vertirse hacia la circulación (Giacometti *et al.* 2005).

Además de los antibioticos, existen nuevas estrategias para inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro* o en cultivos celulares, una de ellas es el uso de oligodesoxinucleotidos (ODNs), que han sido utilizados exitosamente en una variedad de aplicaciones para apagar la expresión génica en los sistemas eucarióticos y así lograr una mejor precisión de los blancos y para propósitos terapéuticos. La tecnología de los ODN del apagado de los genes ha sido utilizada en la regulación de los genes blanco que son críticos para la viabilidad bacteriana, esto es para la inhibición de su crecimiento (Tan *et al.* 2005).

Otra opción son los virus que pueden matar a las bacterias, los bacteriófagos infectan a las células bacterianas, multiplicándose y disolviendo a sus hospederos, listos para iniciar la siguiente etapa de destrucción. Los fagos se reproducen en el cuerpo hasta que su alimento- la infección- se acaba. Entonces dejan a las células humanas sin daño. Sin embargo esta terapia no ha sido probada por los rigurosos estándares modernos de experimentación en humanos (Hausler 2006; Yacoby *et al.* 2006).

Uso indebido de los antibióticos.

En los estafilococos el surgimiento de cepas resistentes y la capacidad de producir enfermedad están fuertemente relacionados con el amplio uso de los antibióticos

(Knobler 2003), además del enorme potencial bacteriano para desarrollar resistencia múltiple. Las infecciones estafilocócicas más serias permanecen asociadas con alta mortalidad (Cha *et al.* 2005; Dryla, Prustomersky *et al.* 2005).

La optimización de las concentraciones de los antibióticos disponibles es necesaria para controlar la evolución de la resistencia, algunos autores proponen que el medio ambiente provoca pequeñas diferencias en las concentraciones de los antibióticos que tienen un efecto selectivo en los cultivos bacterianos que están formados por subpoblaciones con fenotipos de resistencia heterogéneos (Campion *et al.* 2004).

El aumento en la resistencia bacteriana puede abatirse cortando el periodo de prescripción de ciertos antibióticos. Muchos antibióticos son prescritos por una semana, diez días o más y los pacientes dicen que terminan las tabletas para asegurarse de que las bacterias causantes de la infección han sido erradicadas. Se cree que el no terminar los tratamientos puede permitir la persistencia de unas pocas bacterias, aumentando el riesgo de que una población de bacterias resistente a antibióticos pueda desarrollarse, sin embargo, existe la posibilidad de que tratamientos más cortos y dosis más bajas, también puedan ser igualmente efectivos (Pearson 2006).

La transferencia de los genes de resistencia así como las bacterias resistentes por sí mismas, se favorece particularmente por el uso de antibióticos por largos periodos de tiempo y en concentraciones subterapéuticas. Estos factores juegan un papel en el estímulo de la resistencia y su transferencia a través del material genético bacteriano. Se considera que la exposición de las bacterias a ciertas concentraciones de antimicrobianos incrementa la velocidad con la cual las cepas

bacterianas resistentes son seleccionadas, por ejemplo si los antibióticos son usados como promotores del crecimiento o por su uso inadecuado en medicina veterinaria y en medicina humana (Gilbert *et al.* 2003; Kummerer 2004; Nandi *et al.* 2004).

Farmacología y fitoterapia.

La farmacología moderna tiene sus raíces en la herbolaria médica tradicional, muchas de las drogas convencionales fueron originadas en el reino vegetal. En muchas partes del mundo, la medicina herbolaria estuvo en declive cuando las potentes drogas estuvieron disponibles, pero en una tercera parte de los países del mundo, la herbolaria étnica aún permanece en uso hasta nuestros días. En otros países, la herbolaria médica también continúa en una coexistencia con la farmacología moderna (Ernst 2001).

Mientras que las medicinas derivadas de fuentes vegetales han sido usadas desde tiempos remotos como una forma primitiva de terapéutica, la investigación moderna de la acción de las drogas es una actividad relativamente reciente que tiene sus orígenes en Alemania (Cuthbert 2006; Vallance *et al.* 2006).

Claudius Galeno debe ser considerado como uno de los primeros practicantes de la farmacología, en los años 150 a.C., cuando reconoció la importancia de la experimentación y la teoría en el uso racional de los medicamentos (farmacología galénica). El médico suizo Paracelso, propuso el momento inicial de la farmacología con la investigación de los principios o ingredientes activos de muchas preparaciones medievales. Fue él quien reconoció que todas las drogas pueden ser venenos y el conocimiento de las dosis permite determinar si un

compuesto es útil o tóxico, posiblemente el más temprano reconocimiento hacia el aspecto terapéutico, un tema que debe ser familiar para los practicantes del cuidado de la salud de hoy. En esencia se piensa que la ciencia de la farmacología que es ampliamente reconocida surge a mediados del siglo XIX con Oswald Schiedeberg quien también fundó la primer revista de farmacología (Vallance y Smart 2006).

El uso de productos naturales con propiedades terapéuticas es tan antiguo como la civilización y por un largo tiempo los minerales, las plantas y los animales fueron las principales fuentes de drogas. La revolución industrial y el desarrollo de la química orgánica tuvieron como resultado la preferencia por los productos sintéticos para el tratamiento farmacológico. Sin embargo, si consideramos el impacto del descubrimiento de la penicilina obtenida de los microorganismos, para el desarrollo de la terapia anti-infecciosa, la importancia de los productos naturales es enorme. Cerca del 25% de las drogas prescritas alrededor del mundo vienen de las plantas: 121 compuestos bioactivos se convierten en drogas de uso común. De las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales para la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 11% son exclusivamente de origen vegetal y un número significativo son drogas sintéticas obtenidas de precursores naturales (Rates 2001).

En la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, la implementación de modelos farmacodinámicos es una herramienta útil para el análisis de los compuestos naturales potencialmente activos, estos se deben construir cuidadosamente para poder generar datos en estudios *in vivo* e *in vitro* y así pueden generar ideas en la dinámica de las poblaciones bacterianas que son la

base del surgimiento de la resistencia bacteriana (Campion *et al.* 2005). Algunos estudios hechos con modelos farmacodinámicos muestran la importancia de que existen variantes de bacterias que poseen resistencia a dosis bajas de antibióticos, estas son determinantes en la evolución de la resistencia bacteriana (Campion, Chung *et al.* 2005).

La evaluación de la sensibilidad que tienen las bacterias a los diferentes agentes antibacterianos está basada en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con diferentes concentraciones del agente. La sensibilidad de una bacteria a un antibiótico determinado está dada por la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana (Koneman 1999; Prescott 2000). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) son consideradas como el 'estándar de oro' para la determinación de la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos y es por lo tanto usado para juzgar la interpretación de todos los otros métodos para probar la susceptibilidad (Lambert *et al.* 2000; Andrews 2001; Lambert *et al.* 2001).

Terapias complementarias.

La utilización de terapias alternativas o complementarias para el tratamiento de las enfermedades está empezando a incrementarse en los países occidentales, incluyendo los Estados Unidos. Uno de las principales atractivos de estos tratamientos es su aparente falta de efectos secundarios comparada con la de terapias de drogas usadas en la medicina alopática (Tomlinson *et al.* 2000).

En la cultura China, la medicina tradicional china, es usada para mantener tasas de buena salud y para curar los padecimientos para lo cual tiene desarrollado la mayoría de las mismas formas farmacéuticas que las vitaminas o que los suplementos minerales o preparaciones de herbolaria que son usadas en los países occidentales (Chan *et al.* 2000; Cheng 2000; Critchley *et al.* 2000).

Debido a la tradición, los extractos de plantas son muy populares en algunos pueblos, como Francia y Alemania, con un mercado compartido de cerca del 50% de todas las drogas usadas para el tratamiento de diversos padecimientos. En estas poblaciones, los agentes fitoterapéuticos son medicamentos de prescripción (Dreikorn 2002).

Los remedios herbolarios son más populares que nunca, una fuente demostró que se registró un 380% de incremento en el uso de medicinas herbolarias en los Estados Unidos entre los años 1990 y 1997. Las ventas están a la alza con la extraordinaria oleada de medicinas basadas en plantas. En los Estados Unidos, el mercado de los medicamentos botánicos para el año de 1998 se calcula en 3.87 billones de dólares. Este nivel de aceptación de los consumidores requiere del establecimiento de los aspectos de seguridad en la posibilidad de las interacciones entre las drogas sintéticas y de las hierbas. Los usuarios de los tratamientos son predominantemente individuos de edad mediana que sufren de condiciones crónicas que tienen la creencia de que las medicinas botánicas son inherentemente seguras (Ernst 2000; Ernst 2000; Ernst 2001).

El uso de los agentes antimicrobianos naturales puede ser una alternativa efectiva o complementaria para el control de los microorganismos patógenos (Knowles *et al.* 2005).

Extractos vegetales.

La búsqueda de poderes curativos en las plantas es una idea ancestral. La gente de todos los continentes aplica cataplasmas y utiliza infusiones de cientos o miles de plantas autoctonas que datan desde la prehistoria. Existen evidencias de que los neardentales que vivieron hace 60,000 años en el hoy conocido Irak usaban plantas que son aún utilizadas ampliamente en la etnomedicina en todo el mundo (Winslow *et al.* 1998; Cowan 1999).

El uso de hierbas para el tratamiento de padecimientos tiene su raíz en una tradición de salud holística ancestral que se originó en Asia hace más de 3,000 años. Fue descontinuada por los practicantes de la medicina norteamericana en los siglos XIX y XX, sin embargo, los practicantes de la salud a principios del siglo XXI, incorporaron remedios herbolarios, tales como la medicina tradicional China(CTM), japonesa, y la medicina Ayurveda de la India que están ganando gran aceptación. La medicina herbolaria consiste en el uso de mezclas complejas de plantas mínimamente procesadas (Kong *et al.* 2003; Plaeger 2003).

Desde la perspectiva de la fisiología vegetal, existen grandes oportunidades para la investigación básica de las plantas medicinales y para el estudio de su producción química fitomedicinal (Briskin 2000). Se estima que existen 420,000 especies de plantas en la naturaleza y que al menos el 5% de las plantas conocidas han sido analizadas para una o más actividades biológicas (Vuorelaa *et al.* 2004).

Los productos de las plantas, poseen numerosas propiedades farmacológicas, incluyendo las propiedades antiinflamatorias y antitumorales y la habilidad de

promover la cicatrización de heridas (Dunsmore *et al.* 2001; Chen *et al.* 2003). Una de las principales fuentes de agentes antimicrobianos son los metabolitos secundarios de la plantas. La biosíntesis de estas moléculas es llevada ya sea de manera constitutiva, patógeno-independiente (fitoanticipinas) o si es inducida como una parte de la respuesta defensiva de las plantas en contra de una infección por bacterias, hongos o nemátodos (fitoalexinas) en este grupo se encuentran las flavanonas, las isoflavonas, las auronas y los fenalenones (Tanaka *et al.* 2002; Luque-Ortega *et al.* 2004).

Los extractos de plantas son muy populares en algunos países, las drogas son usadas para el tratamiento de diversos padecimientos como la hiperplasia prostática benigna sintomática (BPH) y las infecciones en vías urinarias (Dreikorn 2002; Dreikorn *et al.* 2002).

Aceites esenciales.

Los aceites esenciales (también conocidos como aceites volátiles o etéreos), son líquidos aromáticos aceitosos que se obtienen de material vegetal (flores, botones, semillas, hojas, corteza, madera, frutos y raíces) (Trombetta *et al.* 2005). Pueden obtenerse por medio de expresión o por extracción, pero el método que es más utilizado para la producción comercial es el de destilación por arrastre de vapor. Algunas de sus propiedades son: antimicrobianos, antimutagénicos, antivirales, antimicóticos, antitoxigénicos, antiparasitarios e insecticidas, además son utilizados en el tratamiento de furúnculos, del acné, de la gingivitis, de la candidiasis vaginal y para evitar la formación de placa dental (Katsura *et al.* 2001).

Otra posibilidad es su uso en los alimentos como aditivos antibacteriales (Hammer *et al.* 1998; Hammer 1999; Inouye *et al.* 2001; Burt 2004).

La fragancia de las plantas se lleva en la llamada quinta esencia, o la fracción de aceite esencial- estos aceites son metabolitos secundarios que son ricos en compuestos basados en una estructura isoprena. Estos son llamados terpenos, su estructura química general es $C_{10}H_{16}$ y se presentan como diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (C_{20} , C_{30} y C_{40}) así como hemoterpenos y sesquiterpenos (C_{15}). Cuando los compuestos contienen elementos adicionales, usualmente oxígeno, reciben el nombre de terpenoides (Cowan 1999; Dorman *et al.* 2000; Kalemba *et al.* 2003).

Aunque los aceites esenciales tienen un amplio espectro de actividad, no todos son capaces de matar a todas las bacterias (Bergonzelli, Donnicola *et al.* 2003). Algunos estudios se han concentrado exclusivamente en un aceite o en un microorganismo. Los reportes no se pueden comparar directamente debido a las diferencias metodológicas tales como la planta elegida, organismo a probar y método para probar la susceptibilidad antimicrobiana (Hammer 1999; Faleiro *et al.* 2003).

Interacciones de las hierbas.

En contraste con las drogas farmacéuticas sintéticas que están basadas en un solo principio activo, muchas fitomedicinas ejercen sus efectos benéficos por medio de acción sinérgica o aditiva de algunos principios químicos que actúan en un solo sitio o múltiples sitios que están asociados a un proceso fisiológico. Este efecto farmacológico sinérgico o aditivo, puede ser benéfico por que se eliminan

los efectos secundarios asociados con la predominancia de un solo compuesto xenobiótico en el organismo (Briskin 2000).

Los productos de las hierbas están incrementando su uso como una fuente importante de fitoquímicos, en las naciones industrializadas hay una clara tendencia a sustituir los químicos antropogénicos por fitoquímicos, cuyo origen natural sugiere cierta seguridad. La población general es ajena al hecho de que los productos naturales tienen el potencial de inducir efectos adversos cuando se toman junto con drogas tradicionales. El conocimiento de los efectos de las preparaciones de herbolaria sobre los sistemas enzimáticos, puede permitir alterar las dosis para cuantificar las interacciones entre las drogas medicinales y los fitoquímicos, o la elección de combinaciones alternativas que no estén sujetas a tales interacciones (Ernst 2000; Ioannides 2003).

Estandarización de las fitomedicinas.

Históricamente, las primeras aproximaciones a la medicina pleiotrópica, fueron mejor articuladas no por la medicina occidental sino por los sistemas de medicina tradicional China y del Ayurveda que han enfatizado las interacciones positivas y negativas de los diferentes componentes en las mezclas médicas complejas. Sin embargo, debido a que estos sistemas carecen de validación y estandarización científica, la comunidad médica moderna no le da mucha credibilidad (Lila 2005). Para juzgar mejor el potencial terapéutico de los extractos de plantas, se requiere de tratamientos clínicos aleatorizados controlados con placebo y con suficiente tiempo de seguimiento (Dreikorn, Berges *et al.* 2002).

Muchos cientos de especies vegetales alrededor del mundo son utilizadas en la medicina tradicional como tratamientos para las infecciones bacterianas. Algunas de estas también han sido sujetas a análisis en laboratorio pero la eficacia de tales medicinas herbolarias pocas veces han sido analizadas en tratamiento clínicos controlados. Las drogas convencionales generalmente proveen terapia con antibióticos para las infecciones bacterianas pero hay un incremento en la problemática de la resistencia a antibióticos y es inminente la necesidad de la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas (May 2000; Martin *et al.* 2003). La etnobotánica también conocida como medicina folclórica es la principal fuente para el desarrollo e investigación de las drogas naturales, el uso de la información en la medicina tradicional o investigación vegetal ha recibido un considerable interés en los últimos años (Kong, Goh *et al.* 2003).

En la Gran Bretaña, los productos medicinales de herbolaria (HPM) son más populares que cualquier otra forma de terapia complementaria. La mayoría de los productos de la HMP se venden como suplementos de dieta, fuera del control de la Agencia para el Control de las Medicinas (Ernst 2002).

Las compañías europeas están realizando investigación clínica para la legitimización de la fitoterapia, estos productos ofrecen las ventajas de ser capaces de llevar programas clínicos con extractos vegetales bien caracterizados y mezclas de composición definida. Este nivel de definición química empieza a ser preponderante para la aprobación de las normas regulatorias. La calidad de los datos clínicos, acoplada con la magnitud de las oportunidades comerciales, va a generar un alto nivel de interés en los productos fitofarmacéuticos dentro de la industria (Wyllie 2003).

Búsqueda de nuevos agentes.

Las tasas de resistencia de las especies bacterianas de importancia clínica a los antibióticos disponibles continúa incrementándose (Kim, Kim *et al.* 2004). Los organismos problema incluyen patógenos gram-positivos como los estafilococos, los neumococos y los enterococos afectando a la comunidad y a los hospitales. Muchas de estas cepas son resistentes a múltiples antibióticos, lo cual limita severamente las opciones para su tratamiento y constituye un problema de salud tratado a nivel mundial. Los genes de resistencia se originan a partir de mutaciones espontáneas o de genes celulares o son introducidos de nuevo en una población bacteriana por su adquisición a partir de microbios resistentes. Las cepas productoras de antibióticos, poseen funciones codificadas para la protección, son consideradas como una fuente potencial de genes de resistencia (Woegerbauer, Lagler *et al.* 2005).

En los últimos 30 años han entrado al mercado pocos antibacterianos con nuevos quimiotipos, y son pocas las nuevas clases de agentes que están en desarrollo. Esto es, existe una urgente necesidad del descubrimiento de nuevos quimiotipos con actividad antibacteriana para superar los mecanismos de resistencia existentes y para combatir efectivamente a patógenos humanos que pueden causar infecciones que requieren tratamientos de por vida (Pucci *et al.* 2004).

La necesidad de encontrar nuevas clases estructurales de antibióticos tiene un punto crítico para el desarrollo de nuevas clases estructurales de agentes antibióticos que es el limitado entendimiento de los mecanismos moleculares de acción de las sustancias bioactivas (Freiberg *et al.* 2005).

Esta búsqueda de nuevos agentes debe enfocarse a otros agentes con nuevos mecanismos de acción que sean capaces de burlar los mecanismos de resistencia bacteriana actuales (Critchley, Blosser-Middleton *et al.* 2003; Dartois, Sanchez-Quesada *et al.* 2005; Dryla, Prustomersky *et al.* 2005). De la misma forma, el surgimiento y transmisión de cepas con resistencia a los glucopéptidos, hace urgente la prioridad en el desarrollo de estrategias de tratamiento y la creación de nuevas drogas para el control en la diseminación de los MRSA (Jacqueline *et al.* 2003; Cooper, Medley *et al.* 2004; Jacqueline *et al.* 2005). En un esfuerzo por detener esta diseminación y el incremento en la incidencia de la resistencia a los antibióticos, las industrias farmacéutica y de los alimentos han invertido importantes recursos en la búsqueda de nuevos compuestos inhibitorios de origen microbiano, vegetal y animal (Brehm-Stecher y Johnson 2003; Wyllie 2003; Gurib-Fakim 2006).

Propiedades antibacterianas de los extractos vegetales.

Últimamente, el surgimiento de nuevos padecimientos incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana ha incentivado la investigación intensiva dentro de los derivados vegetales los cuales pueden ser efectivos, especialmente para su uso en las naciones subdesarrolladas con poco acceso a las medicinas caras (Cowan 1999; Navarro 2006).

La resistencia a los antibióticos en uso se ha convertido en un gran problema de salud pública, ante lo cual, los extractos vegetales con acción antibacteriana capaces de burlar los mecanismos de resistencia actuales, representan una importante alternativa para su uso clínico en el tratamiento de enfermedades

infecciosas (Critchley, Blosser-Middleton *et al.* 2003; Dartois, Sanchez-Quesada *et al.* 2005; Dryla, Prustomersky *et al.* 2005).

Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias, pero como el uso de extractos vegetales a nivel hospitalario es limitado, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Haddadin, Fappiano *et al.* 2002; Lowy 2003; Begun, Sifri *et al.* 2005). Entonces es posible que los extractos vegetales y aceites esenciales puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes, y multirresistentes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de ocho extractos vegetales y dos aceites esenciales en contra de cepas resistentes y multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

JUSTIFICACIÓN

La tendencia actual de volver a lo natural para llevar una vida más sana induce a quienes se dedican a la tecnología farmacéutica a investigar y desarrollar formulaciones innovadoras que permitan el empleo de productos naturales de origen vegetal para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por patógenos que han desarrollado resistencia múltiple. Las alternativas para el tratamiento de estas afecciones especialmente en pacientes hospitalizados tiende a ser limitada en parte por los pocos antibióticos que surgen y por otra parte por que los patógenos desarrollan resistencia a éstos agentes debido a su mal uso básicamente porque se utilizan en dosis subterapéuticas o bien por períodos de tiempo largos e innecesarios.

Uno de los factores que han influido más decisivamente en el auge de la fitoterapia es la gran confianza que merecen los remedios de origen natural en amplios sectores de la población, ya que en general ofrece unos márgenes terapéuticos más amplios que los fármacos sintéticos y una menor proporción de efectos secundarios. La fitoterapia constituye una herramienta que puede ser muy útil como complemento terapéutico: algunas veces será suficiente para prevenir o curar un estado patológico, otras como coadyuvante o simplemente como medida paliativa de determinados síntomas. Por ello la fitoterapéutica aspira a ocupar un lugar importante en la asistencia médica, especialmente en el tratamiento de afecciones leves o moderadas y en enfermedades crónicas, no sólo para huir de la iatrogenia medicamentosa, sino para enriquecer las posibilidades terapéuticas.

Esta investigación puede proveer una alternativa para el problema en el tratamiento de afecciones hospitalarias causadas por patógenos bacterianos con resistencia múltiple.

Lo ideal sería promover la utilización racional de la fitoterapia, indicando en que casos se requiere la opción más adecuada en función de su efectividad, minimización de los problemas derivados del uso de otros tratamientos y del cociente costo/beneficio.

Otro factor importante es establecer un consenso interdisciplinario sobre el proceso de prescripción y utilización de medicamentos (protocolos) que propicie la utilización racional y sostenida de esta nueva alternativa.

REFERENCIAS

- Aires de Sousa, M, et al. (2005). "Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community." J Clin Microbiol **43**(10): 5150-7.
- Andrews, J M (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations." J Antimicrob Chemother **48 Suppl 1**: 5-16.
- Anthonisen, I L, et al. (2002). "Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and Tn552-related beta-lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins." Antimicrob Agents Chemother **46**(11): 3606-12.
- Arakere, G, et al. (2005). "Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in Bangalore, South India." J Clin Microbiol **43**(7): 3198-202.
- Bae, T, et al. (2004). "Staphylococcus aureus virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(33): 12312-7.
- Baptiste, K, Kerry Williams, Nicola j. Williams, Andrew Wattret, Peter D Clegg, Susan Dawson, John E. Corkill, Turlough O'Neill, and C Anthony Hart (2005). "Methicillin-resistant Staphylococci in Companion animals." Emerging Infectious Diseases **11**: 1942-1946.
- Bartlett, J G (2006). "Update in infectious diseases." Ann Intern Med **144**(1): 49-56.
- Bax, R, et al. (2001). "Surveillance of antimicrobial resistance--what, how and whither?" Clin Microbiol Infect **7**(6): 316-25.
- Becker, K, et al. (2006). "Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods?" J Clin Microbiol **44**(1): 229-31.
- Beg, A y I A (2000). "Effect of *Plumbago zeylanica* extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical drugs." Word Journal of Microbiology & Biotechnology **16**: 841-844.
- Begun, J, et al. (2005). "Staphylococcus aureus virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model." Infect Immun **73**(2): 872-7.
- Berg, H F, et al. (2004). "Emergence and persistence of macrolide resistance in oropharyngeal flora and elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* after therapy with slow-release clarithromycin: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4183-8.
- Bergonzelli, G E, et al. (2003). "Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3240-6.
- Bergstrom, C T, et al. (2004). "Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13285-90.

- Besier, S, et al. (2005). "Compensatory adaptation to the loss of biological fitness associated with acquisition of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(4): 1426-31.
- Bin, K H C J, Hee Jung Nam, Yeong seon Lee, Bong Su Kim, Wam Beom Park, Ki Deok lee, Young Joo Choi, Sang Won Park (2004). "In Vitro Activities of 28 Antimicrobial mAgents Against *Staphylococcus aureus* Isolates from Tertiary-Care Hospitals in Korea: a Nationwide Survey." *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1124-1127.
- Bjorland, J, et al. (2005). "Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway." *J Clin Microbiol* **43**(9): 4363-8.
- Boos, M, et al. (2001). "In vitro development of resistance to six quinolones in *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(3): 938-42.
- Boyle-Vavra, S, et al. (2005). "Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV." *J Clin Microbiol* **43**(9): 4719-30.
- Brady, R A, et al. (2006). "Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection." *Infect Immun* **74**(6): 3415-26.
- Brehm-Stecher, B F yE A Johnson (2003). "Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10): 3357-60.
- Briskin, D P (2000). "Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health." *Plant Physiol* **124**(2): 507-14.
- Buck, J M, et al. (2005). "Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000-2003." *Emerg Infect Dis* **11**(10): 1532-8.
- Burt, S (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review." *Int J Food Microbiol* **94**(3): 223-53.
- Campion, J J, et al. (2005). "Pharmacodynamic modeling of the evolution of levofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(6): 2189-99.
- Campion, J J, et al. (2004). "Evolution of ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* in in vitro pharmacokinetic environments." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12): 4733-44.
- Campion, J J, et al. (2005). "Pharmacodynamic modeling of ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(1): 209-19.
- Campos, M A, et al. (2004). "Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides." *Infect Immun* **72**(12): 7107-14.
- Carbon, C (1999). "Costs of treating infections caused by methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci." *J Antimicrob Chemother* **44 Suppl A**: 31-6.
- Casci, T (2006). "Bacterial evolution: a small leap for adaptation." *Nature reviews microbiology* **4**: 322-323.

- Cerca, N, et al. (2005). "Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms." *Appl Environ Microbiol* **71**(12): 8677-82.
- Cespedes, C, et al. (2002). "Differences between *Staphylococcus aureus* isolates from medical and nonmedical hospital personnel." *J Clin Microbiol* **40**(7): 2594-7.
- Cha, H Y, et al. (2005). "Prevalence of the ST239 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differences in antimicrobial susceptibilities of ST239 and ST5 clones identified in a Korean hospital." *J Clin Microbiol* **43**(8): 3610-4.
- Chan, P yB Tomlinson (2000). "Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from the Chinese herb sanchi (*Panax pseudoginseng*)." *J Clin Pharmacol* **40**(5): 457-61.
- Chaves, F, et al. (2004). "Molecular characterization of resistance to mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from nasal samples." *J Clin Microbiol* **42**(2): 822-4.
- Chen, F e a (2005). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan." *Emerg Infect Dis* **11**: 1761.
- Chen, X, et al. (2003). "Shikonin, a component of chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(9): 2810-6.
- Cheng, J T (2000). "Review: drug therapy in Chinese traditional medicine." *J Clin Pharmacol* **40**(5): 445-50.
- Chesneau, O, et al. (2005). "Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the Vga proteins of staphylococci." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(3): 973-80.
- Chongtrakool, P, et al. (2006). "Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(3): 1001-12.
- Clancy, M J, et al. (2005). "Widespread emergence of methicillin resistance in community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Denver." *South Med J* **98**(11): 1069-75.
- Climo, M W, et al. (2001). "Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(5): 1431-7.
- Cooper, B S, et al. (2004). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10223-8.
- Cornell, S J, et al. (2003). "Spatial parasite transmission, drug resistance, and the spread of rare genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7401-5.
- Cowan, M M (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clin Microbiol Rev* **12**(4): 564-82.
- Crisostomo, M I, et al. (2001). "The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9865-70.

- Critchley, I A, et al. (2003). "Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001." Antimicrob Agents Chemother **47**(5): 1689-93.
- Critchley, J A, et al. (2000). "Alternative therapies and medical science: designing clinical trials of alternative/complementary medicines--is evidence-based traditional Chinese medicine attainable?" J Clin Pharmacol **40**(5): 462-7.
- Cuevas, O, et al. (2004). "Evolution of the antimicrobial resistance of Staphylococcus spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4240-5.
- Cui, L, et al. (2006). "Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **50**(2): 428-38.
- Cui, L, et al. (2003). "Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus." J Clin Microbiol **41**(1): 5-14.
- Cuthbert, A W (2006). "A brief history of the British Pharmacological Society." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S2-8.
- Dailey, L, et al. (2005). "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Western Australia." Emerg Infect Dis **11**(10): 1584-90.
- Dakic, I, et al. (2005). "Isolation and molecular characterization of Staphylococcus sciuri in the hospital environment." J Clin Microbiol **43**(6): 2782-5.
- Dartois, V, et al. (2005). "Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3302-10.
- Daxboeck, F, et al. (2006). "Economic burden associated with multi-resistant Gram-negative organisms compared with that for methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university teaching hospital." J Hosp Infect **62**(2): 214-8.
- Denis, O, et al. (2004). "National surveillance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Belgian hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones." Antimicrob Agents Chemother **48**(9): 3625-9.
- Dominguez, E, et al. (2002). "Antibiotic resistance in Staphylococcus isolates obtained from fecal samples of healthy children." J Clin Microbiol **40**(7): 2638-41.
- Dorman, H J yS G Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." J Appl Microbiol **88**(2): 308-16.
- Dreikorn, K (2002). "The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia." World J Urol **19**(6): 426-35.
- Dreikorn, K, et al. (2002). "[Phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. Current evidence-based evaluation]." Urologe A **41**(5): 447-51.
- Dryla, A, et al. (2005). "Comparison of antibody repertoires against Staphylococcus aureus in healthy individuals and in acutely infected patients." Clin Diagn Lab Immunol **12**(3): 387-98.
- Dunsmore, K E, et al. (2001). "Curcumin, a medicinal herbal compound capable of inducing the heat shock response." Crit Care Med **29**(11): 2199-204.
- Durand, G, et al. (2006). "Detection of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France." J Clin Microbiol **44**(3): 847-53.
- Ender, M, et al. (2004). "Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2295-7.
- Ernst, E (2000). "Interactions between synthetic and herbal medicinal products Part 2:a systematic review of the direct evidence." Perfusion **13**: 60-70.

- Ernst, E (2000). "Possible interactions between synthetic and herbal medicinal products Part 1: a systematic review of the indirect evidence." Perfusion **13**: 4-15.
- Ernst, E (2001). "Herbal medicine products: an overview of systematic reviews and meta-analyses." Perfusion **14**: 398-404.
- Ernst, E (2002). "Herbal Medicine Products." British Journal of General Practice: 410.
- Faleiro, M L, et al. (2003). "Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus." Lett Appl Microbiol **36**(1): 35-40.
- Faria, N A, et al. (2005). "Epidemiology of emerging methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection." J Clin Microbiol **43**(4): 1836-42.
- Fiebelkorn, K R, et al. (2003). "Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci." J Clin Microbiol **41**(10): 4740-4.
- Finan, J E, et al. (2001). "Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **45**(11): 3070-5.
- Foster, T J (2004). "The Staphylococcus aureus "superbug"." J Clin Invest **114**(12): 1693-6.
- Fournier, B yD J Philpott (2005). "Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system." Clin Microbiol Rev **18**(3): 521-40.
- Freiberg, C, et al. (2005). "Discovering the mechanism of action of novel antibacterial agents through transcriptional profiling of conditional mutants." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 749-59.
- Friedman, L, et al. (2006). "Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 2137-45.
- Gardete, S, et al. (2004). "Role of murE in the Expression of beta-lactam antibiotic resistance in Staphylococcus aureus." J Bacteriol **186**(6): 1705-13.
- Garver, L S, et al. (2006). "The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of Staphylococcus aureus in Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 660-5.
- Gatton, M L, et al. (2004). "Evolution of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in Plasmodium falciparum." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2116-23.
- Giacometti, A, et al. (2005). "Comparative efficacies of quinupristin-dalfopristin, linezolid, vancomycin, and ciprofloxacin in treatment, using the antibiotic-lock technique, of experimental catheter-related infection due to Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **49**(10): 4042-5.
- Giesbrecht, P, et al. (1998). "Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1371-414.
- Gilbert, D N, et al. (2001). "Phenotypic resistance of Staphylococcus aureus, selected Enterobacteriaceae, and Pseudomonas aeruginosa after single and multiple in vitro exposures to ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin." Antimicrob Agents Chemother **45**(3): 883-92.
- Gilbert, P yA J McBain (2003). "Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance." Clin Microbiol Rev **16**(2): 189-208.
- Gill, S R, et al. (2005). "Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a

- biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain." J Bacteriol **187**(7): 2426-38.
- Gomes, A R, et al. (2005). "Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 366-79.
- Grundling, A yO Schneewind (2006). "Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **188**(7): 2463-72.
- Gurib-Fakim, A (2006). "Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow." Mol Aspects Med **27**(1): 1-93.
- Haddadin, A S, et al. (2002). "Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit." Postgrad Med J **78**(921): 385-92.
- Hallin, M, et al. (2003). "Clinical impact of a PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance directly from blood cultures." J Clin Microbiol **41**(8): 3942-4.
- Hammer, K (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts." Journal of Applied Microbiology **86**: 985-990.
- Hammer, K A, et al. (1998). "In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp." J Antimicrob Chemother **42**(5): 591-5.
- Hanssen, A M, et al. (2005). "Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate." J Clin Microbiol **43**(5): 2118-24.
- Hartmann, H, et al. (2005). "Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by a combination of fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes and flow cytometry." J Clin Microbiol **43**(9): 4855-7.
- Hausler, T (2006). "News Feature: Bug killers." Nat Med **12**(6): 600-1.
- Haveri, M, et al. (2005). "Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection." J Clin Microbiol **43**(2): 959-61.
- Henderson, D K (2006). "Managing ethicillin-Resistant *Staphylococci*: A Paradigm for Preventing Nosocomial Transmission of Resistant Organisms." American Journal of Medicine **119**(6): 45-52.
- Hisata, K, et al. (2005). "Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children." J Clin Microbiol **43**(7): 3364-72.
- Hobbie, S N, et al. (2006). "Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to mutant ribosomes with alterations in the A site of 16S rRNA." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1489-96.
- Holden, M T, et al. (2004). "Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9786-91.
- Holmes, A, et al. (2005). "*Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease." J Clin Microbiol **43**(5): 2384-90.
- Hopkin, M (2006). "MRSA "hiding in hospital sinks and vases" Killer bug could breed inside microscopic water-borne organisms." News@Nature.com
doi:10.1038/newa060227-4.

- Hsu, L Y, et al. (2005). "Dissemination of multisusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Singapore." J Clin Microbiol **43**(6): 2923-5.
- Huang, H, et al. (2006). "Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MSRA infections in Sacramento, California." J Clin Microbiol **44**(7): 2423-7.
- Huang, V yM J Rybak (2005). "Pharmacodynamics of cefepime alone and in combination with various antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamic infection model." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 302-8.
- Hurdle, J G, et al. (2004). "Analysis of mupirocin resistance and fitness in *Staphylococcus aureus* by molecular genetic and structural modeling techniques." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4366-76.
- Ibia, E (2005). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in children: a call for increased vigilance." South Med J **98**(11): 1059-60.
- Inouye, S, et al. (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact." J Antimicrob Chemother **47**(5): 565-73.
- Ioannides, C (2003). "Drug-phytochemical interactions." Inflammopharmacology **11**(1): 7-42.
- Ip, M, et al. (2005). "Contemporary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hong Kong." J Clin Microbiol **43**(10): 5069-73.
- Jabra-Rizk, M A, et al. (2006). "Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1463-9.
- Jacqueline, C, et al. (2003). "In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods." J Antimicrob Chemother **51**(4): 857-64.
- Jacqueline, C, et al. (2005). "In vitro and in vivo synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 45-51.
- Kaatz, G W, et al. (2005). "Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 1857-64.
- Kalemba, D yA Kunicka (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." Curr Med Chem **10**(10): 813-29.
- Kanemitsu, K, et al. (2005). "Evaluation of a fully automated system (RAISUS) for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococci*." J Clin Microbiol **43**(11): 5808-10.
- Katayama, Y, et al. (2005). "Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*." J Clin Microbiol **43**(5): 2380-3.
- Katayama, Y, et al. (2003). "Jumping the barrier to beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **185**(18): 5465-72.
- Katsura, H, et al. (2001). "In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms." Antimicrob Agents Chemother **45**(11): 3009-13.
- Kerttula, A M, et al. (2005). "Molecular epidemiology of an outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a health care ward and associated nursing home." J Clin Microbiol **43**(12): 6161-3.

- Kim, J M, et al. (2004). "Distribution of antibiotic MICs for Helicobacter pylori strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea." Antimicrob Agents Chemother **48**(12): 4843-7.
- Kirkpatrick, P (2006). "Antibacterial drugs: Pinpoint attack on resistance." Nature reviews Drug Discovery **5**: 284.
- Kluytmans, J, et al. (2002). "Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying Staphylococcus aureus and detecting methicillin resistance." J Clin Microbiol **40**(7): 2480-2.
- Knober, S, Stanley M Lemon, Marjan Najafi, and Tom Burroughs, Ed. (2003). The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors. Washington, D.C., Forum on Emerging Infections. Institute of medicine of the National Academies Press.
- Knowles, J R, et al. (2005). "Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by Staphylococcus aureus and Salmonella enterica serovar Typhimurium." Appl Environ Microbiol **71**(2): 797-803.
- Ko, K S, et al. (2005). "Distribution of major genotypes among methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Asian countries." J Clin Microbiol **43**(1): 421-6.
- Koessler, T, et al. (2006). "Use of oligoarrays for characterization of community-onset methicillin-resistant Staphylococcus aureus." J Clin Microbiol **44**(3): 1040-8.
- Koneman, E (1999). Diagnóstico Microbiológico. México, D.F., Ed. Médica Panamericana.
- Kong, J M, et al. (2003). "Recent advances in traditional plant drugs and orchids." Acta Pharmacol Sin **24**(1): 7-21.
- Korsak, D, et al. (2005). "Susceptibility to antibiotics and beta-lactamase induction in murein hydrolase mutants of Escherichia coli." Antimicrob Agents Chemother **49**(4): 1404-9.
- Kuhn, G, et al. (2006). "Evidence for clonal evolution among highly polymorphic genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus." J Bacteriol **188**(1): 169-78.
- Kuklin, N A, et al. (2006). "A novel Staphylococcus aureus vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine S. aureus sepsis model." Infect Immun **74**(4): 2215-23.
- Kummerer, K (2004). "Resistance in the environment." J Antimicrob Chemother **54**(2): 311-20.
- Kusuma, C M yJ F Kokai-Kun (2005). "Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3256-63.
- Lambert, R J yJ Pearson (2000). "Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values." J Appl Microbiol **88**(5): 784-90.
- Lambert, R J, et al. (2001). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol." J Appl Microbiol **91**(3): 453-62.
- Leibovici, L (2003). "Considering resistance in systematic reviews of antibiotic treatment." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **52**: 564-571.
- Levy, S (2002). "Factors impacting on the problem of antibiotic resistance." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**: 25-30.

- Lila, M y R, I (2005). "Health-related Interactions of phytochemicals." Journal of Food Science **70**(1).
- Linde, H J, et al. (2001). "In vitro activities of six quinolones and mechanisms of resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci." Antimicrob Agents Chemother **45**(5): 1553-7.
- Liu, C yH F Chambers (2003). "Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3040-5.
- Liu, Y, et al. (2006). "Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2392-7.
- Liu, Y Q, et al. (2004). "Novel concentration-killing curve method for estimation of bactericidal potency of antibiotics in an in vitro dynamic model." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3884-91.
- Lowy, F D (2003). "Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*." J Clin Invest **111**(9): 1265-73.
- Lu, P L, et al. (2005). "Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage." J Clin Microbiol **43**(1): 132-9.
- Luque-Ortega, J R, et al. (2004). "Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1534-40.
- MacDougall, C yR E Polk (2005). "Antimicrobial stewardship programs in health care systems." Clin Microbiol Rev **18**(4): 638-56.
- Maes, N, et al. (2002). "Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative Staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures." J Clin Microbiol **40**(4): 1514-7.
- Maiques, E, et al. (2006). "beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **188**(7): 2726-9.
- Maisch, T, et al. (2005). "Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells." Antimicrob Agents Chemother **49**(4): 1542-52.
- Martin, K W yE Ernst (2003). "Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials." J Antimicrob Chemother **51**(2): 241-6.
- Martinez, J L yF Baquero (2002). "Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance." Clin Microbiol Rev **15**(4): 647-79.
- May, J (2000). "Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **45**: 639-643.
- Middleton, J R, et al. (2005). "Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals." J Clin Microbiol **43**(6): 2916-9.
- Miller, M B, et al. (2005). "Comparison of conventional susceptibility testing, penicillin-binding protein 2a latex agglutination testing, and *mecA* real-time PCR for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus*." J Clin Microbiol **43**(7): 3450-2.
- Nandi, S, et al. (2004). "Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(18): 7118-22.
- Navarro, G V (2006). "Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants." Pharmaceutical Biology **44**: 297.

- Noguchi, N, et al. (2006). "Antimicrobial Agent of Susceptibilities and Antiseptic Resistance Gene Distribution among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from Patients with Impetigo and Staphylococcal Scalded Skin Syndrome." J Clin Microbiol **44**(6): 2119-25.
- Nouwen, J, et al. (2004). "Human factor in Staphylococcus aureus nasal carriage." Infect Immun **72**(11): 6685-8.
- Novotna, G, et al. (2005). "Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3586-9.
- O'Brien, F G, et al. (2005). "Survey of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from two hospitals in El Paso, Texas." J Clin Microbiol **43**(6): 2969-72.
- O'Connell, D (2006). "Bacterial evolution. Evolving virulence." Nature reviews **4**: 83.
- O'Flaherty, S, et al. (2005). "Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals." Appl Environ Microbiol **71**(4): 1836-42.
- O'Riordan, K yJ C Lee (2004). "Staphylococcus aureus capsular polysaccharides." Clin Microbiol Rev **17**(1): 218-34.
- Orwin, P M, et al. (2003). "Characterization of Staphylococcus aureus enterotoxin L." Infect Immun **71**(5): 2916-9.
- Panagea, S yJ G Cunniffe (2006). "Inappropriate inclusion of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on death certificates." J Hosp Infect **62**(2): 240.
- Patel, M, et al. (2006). "Prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated Staphylococcus aureus isolates." J Clin Microbiol **44**(7): 2481-4.
- Pearson, H (2006). "Antibiotics abridged. Unnecessarily long prescriptions may fuel drug resistance." News@nature.com.
- Pereyre, S, et al. (2004). "In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in Mycoplasma pneumoniae." Antimicrob Agents Chemother **48**(2): 460-5.
- Perez-Roth, E, et al. (2001). "Multiplex PCR for simultaneous identification of Staphylococcus aureus and detection of methicillin and mupirocin resistance." J Clin Microbiol **39**(11): 4037-41.
- Piddock, L J (2006). "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria." Clin Microbiol Rev **19**(2): 382-402.
- Plaeger, S F (2003). "Clinical immunology and traditional herbal medicines." Clin Diagn Lab Immunol **10**(3): 337-8.
- Plipat, N, et al. (2005). "Unstable vancomycin heteroresistance is common among clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus." J Clin Microbiol **43**(5): 2494-6.
- Prescott (2000). Microbiología. Madrid, España, McGraw-Hill- interamericana.
- Pucci, M J, et al. (2004). "Antimicrobial evaluation of nocardiacins, a thiazole peptide class of antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3697-701.
- Ramdani-Bougoussa, N, et al. (2006). "Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital." Antimicrob Agents Chemother **50**(3): 1083-5.

- Rates, S M (2001). "Plants as source of drugs." Toxicon **39**(5): 603-13.
- Real, L A (2005). "The community-wide dilemma of hospital-acquired drug resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2683-4.
- Ribeiro, A, et al. (2005). "First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America." J Clin Microbiol **43**(4): 1985-8.
- Rice, L B (2006). "Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria." American Journal of Medicine **119**(6): 11-19.
- Rihn, J A, et al. (2005). "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging problem in the athletic population." Am J Sports Med **33**(12): 1924-9.
- Robinson, D A yM C Enright (2004). "Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements." J Bacteriol **186**(4): 1060-4.
- Said-Salim, B, et al. (2005). "Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains." J Clin Microbiol **43**(7): 3373-9.
- Schmidt, F R (2004). "The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials." Appl Microbiol Biotechnol **63**(4): 335-43.
- Schreckenberger, P C, et al. (2004). "Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital." J Clin Microbiol **42**(6): 2777-9.
- Severin, A, et al. (2004). "Penicillin-binding protein 2 is essential for expression of high-level vancomycin resistance and cell wall synthesis in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the enterococcal *vanA* gene complex." Antimicrob Agents Chemother **48**(12): 4566-73.
- Severin, A, et al. (2005). "High-level (beta)-lactam resistance and cell wall synthesis catalyzed by the *mecA* homologue of *Staphylococcus sciuri* introduced into *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **187**(19): 6651-8.
- Shittu, A O yJ Lin (2006). "Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa." BMC Infect Dis **6**(1): 125.
- Shore, A, et al. (2005). "Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 2070-83.
- Sidhu, M S, et al. (2002). "Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci." Antimicrob Agents Chemother **46**(9): 2797-803.
- Sifri, C D, et al. (2006). "Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model." Infect Immun **74**(2): 1091-6.
- Smith, D L, et al. (2004). "Persistent colonization and the spread of antibiotic resistance in nosocomial pathogens: resistance is a regional problem." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3709-14.
- Smith, D L, et al. (2005). "Strategic interactions in multi-institutional epidemics of antibiotic resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 3153-8.
- Sokurenko, E V, et al. (2006). "Source-sink dynamics of virulence evolution." Nat Rev Microbiol **4**(7): 548-55.
- Sola, C, et al. (2006). "Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina." J Clin Microbiol **44**(1): 192-200.

- Soo Ko, K, et al. (2005). "Genotypic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Korean hospitals." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3583-5.
- Srinivasan, A, et al. (2002). "Vancomycin resistance in staphylococci." Clin Microbiol Rev **15**(3): 430-8.
- Swenson, J M yF C Tenover (2005). "Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp." J Clin Microbiol **43**(8): 3818-23.
- Tan, X X, et al. (2005). "Peptide nucleic acid antisense oligomer as a therapeutic strategy against bacterial infection: proof of principle using mouse intraperitoneal infection." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3203-7.
- Tanaka, H, et al. (2002). "Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Lett Appl Microbiol **35**(6): 494-8.
- Thuille, N (2003). "Bactericidal activity of herbal extracts." Int. J. Hyg. Environ. Health **206**: 1-5.
- Tomlinson, B, et al. (2000). "Toxicity of complementary therapies: an eastern perspective." J Clin Pharmacol **40**(5): 451-6.
- Trombetta, D, et al. (2005). "Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes." Antimicrob Agents Chemother **49**(6): 2474-8.
- Vallance, P yT G Smart (2006). "The future of pharmacology." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S304-7.
- van Leeuwen, W B, et al. (2005). "Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **187**(13): 4584-91.
- Vindel, A, et al. (2006). "Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002." J Clin Microbiol **44**(1): 266-70.
- Vinh, D C, Kim A. Nichol, Fern Rand y James A Karlowsky (2006). "Not so Pretty in Pink: *Staphylococcus cohnii* masquerading as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on Chromogenic Media." Journal of Clinical Microbiology doi:10.1128/JCM.01746-06.
- Vivoni, A M, et al. (2006). "Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: Identification of international circulating lineages." J Clin Microbiol **44**(5): 1686-91.
- Vuorelaa, P, et al. (2004). "Natural products in the process of finding new drug candidates." Curr Med Chem **11**(11): 1375-89.
- Walker, E S, et al. (2004). "A decline in mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* accompanied administrative control of prescriptions." J Clin Microbiol **42**(6): 2792-5.
- Wannet, W J, et al. (2004). "Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin." J Clin Microbiol **42**(7): 3077-82.
- Wichelhaus, T A, et al. (2002). "Biological cost of rifampin resistance from the perspective of *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **46**(11): 3381-5.
- Winslow, L C yD J Kroll (1998). "Herbs as medicines." Arch Intern Med **158**(20): 2192-9.
- Wisplinghoff, H, et al. (2005). "Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998." J Clin Microbiol **43**(11): 5445-51.

- Witte, W (1999). "Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects." J Antimicrob Chemother **44 Suppl A**: 1-9.
- Woegerbauer, M, et al. (2005). "DNA in antibiotic preparations: absence of intact resistance genes." Antimicrob Agents Chemother **49**(6): 2490-4.
- Wu, S W, et al. (2001). "Recruitment of the mecA gene homologue of Staphylococcus sciuri into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in Staphylococcus aureus." J Bacteriol **183**(8): 2417-24.
- Wyllie, M G (2003). "The genesis of a phyto-pharmaceutical industry (Mark II)." BJU Int **91**(7): 721-2.
- Xiong, Y Q, et al. (2005). "Real-time in vivo bioluminescent imaging for evaluating the efficacy of antibiotics in a rat Staphylococcus aureus endocarditis model." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 380-7.
- Yacoby, I, et al. (2006). "Targeting antibacterial agents by using drug-carrying filamentous bacteriophages." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 2087-97.
- Zelazny, A M, et al. (2005). "Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in Staphylococci: a CLSI collaborative study." J Clin Microbiol **43**(6): 2613-5.

DISCUSIÓN

El uso de extractos vegetales y aceites esenciales para el tratamiento de enfermedades a nivel hospitalario es limitado, se supone que las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra, es por esto que se propone que los extractos y aceites pudieran ser una alternativa importante para el tratamiento de estas afecciones.

En el primer experimento, para determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas, los resultados muestran que todos ellos tienen propiedades antibacterianas, y que las CMI de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos son similares (.27 % vol:vol) para las dos cepas, sin importar el tipo de especie vegetal, lo que permite señalar que los componentes inhibitorios de los extractos vegetales no se modificaron con el tratamiento de extracción utilizado, ya que ensayos previos mostraron que el etanol no inhibe el crecimiento de la cepa.

En el caso de los aceites esenciales de clavo y orégano, las CMI para la cepa hospitalaria de *S. aureus* fue de .13 % vol:vol en el aceite esencial de clavo y de 0.017 % vol:vol en el aceite esencial de orégano; para la cepa de referencia, las CMI fueron de .034 % vol:vol en el clavo y de .017 % vol:vol en el orégano.

En el segundo experimento, los análisis de los extractos vegetales caracterizados por cromatografía de gases-masas, revelaron los componentes principales que son comunes para varias de las especies vegetales estudiadas que son los siguientes: etil ester ácido hexadecanoico presente en los extractos de la ruda, la gobernadora, el tomillo y del perejil. Otro componente es el fitol que está presente en la ruda, la gobernadora y el perejil. El β -cariofileno y el α -cariofileno están

presentes en los aceites esenciales de clavo y orégano y el Timol y P-cimeno se encontró en el tomillo y el orégano.

Los resultados de las pruebas experimentales de la actividad antibacteriana por medio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), indican que todos los extractos analizados tienen actividad antibacteriana, aunque tuvieron un comportamiento muy semejante para los extractos alcohólicos, en cambio los aceites esenciales de clavo y de orégano se comportaron de forma variable, el aceite con más poder bactericida es el del orégano, en segundo término se encuentra el del clavo y por último los cuatro extractos alcohólicos de gobernadora, ruda, perejil y tomillo. Los controles fueron negativos.

La hipótesis original se comprueba, al encontrar que los extractos en efecto tienen actividad antibacteriana, todos los extractos vegetales y los aceites esenciales evaluados demostraron tener actividad antibacteriana en menor o mayor concentración, siendo el aceite esencial de orégano el de mayor poder antibacteriano, después el aceite esencial de clavo y por último los extractos vegetales alcohólicos de gobernadora, ruda, perejil y tomillo.

Los resultados concuerdan en todos los casos, con reportes previos (Cowan 1999); (Dorman y Deans 2000) (Burt 2004), quienes registraron actividad bactericida en contra de diversos patógenos importantes en la gobernadora (*Larrea tridentata*), en el clavo (*Syzygium aromaticum*) y en el tomillo (*Thymus vulgaris*). Las CMI reportadas por Hammer (1999), de 0 a 25 [%v/v] para los aceites esenciales de orégano, de tomillo y de clavo en contra de *S. aureus*, son coincidentes con las que se reportan en este experimento. Las posibles discrepancias que se presentan en los resultados de los análisis de la

susceptibilidad bacteriana a los extractos de especies evaluadas podrían ser consecuencia en primer término, del mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos que tiene que ver, con el tipo de microorganismo y de la constitución de la estructura de su pared celular y del arreglo de su membrana celular. En segundo lugar y con referencia a los extractos, los factores que influyen pueden ser la fuente botánica, la precedencia de la planta, la época de cosecha, la etapa de desarrollo, la técnica de extracción, el tratamiento de la planta (seca o fresca), y por último, también la metodología utilizada en las pruebas de susceptibilidad bacteriana (Vuorelaa, Leinonenb et al. 2004). Por todo lo anterior los resultados de estos estudios no se pueden generalizar a otras bacterias y a otras especies vegetales.

Los resultados aportan evidencia de la capacidad antibacteriana de los extractos de las especies vegetales y de la diferencia en su potencia de acuerdo a tipo de extracto, ya que los aceites esenciales requirieron de una menor concentración para lograr la inhibición bacteriana que los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos.

Las pruebas *in vitro* constituyen un buen aporte para el conocimiento de las propiedades de los extractos, sin embargo para continuar con la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos hace falta analizar la gran variedad de plantas disponibles que son fuente potencial de agentes bioactivos y evaluar además sus propiedades farmacéuticas, tales como su farmacodinamia, farmacocinética y toxicidad entre otras.

ARTÍCULOS EN REVISIÓN

ARTÍCULO 1

Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

Assess *in vitro* of a resistant strain of *Staphylococcus aureus* to different herb extracts.

¹Concepción García Luján, ²Sara E. Alonso Rojo, ³Rafael Rodríguez Martínez, ⁴Aurora Martínez Romero, ⁵Patricia Ramírez Baca, ⁶Alejandro Moreno Reséndez.

^{1,4,5}Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Juárez del Estado de Durango conygarcialujan@hotmail.com. ²Laboratorio de Microbiología de la Clínica # 71 del IMSS en Torreón Coah., ^{3,6}Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Unidad Laguna.

Resumen.

El surgimiento de cepas resistentes y la capacidad de producir enfermedad por los *Staphylococcus aureus* están relacionados con el amplio uso de los antibióticos y su potencial para desarrollar resistencia y multiresistencia. Las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno tienden a ser limitadas, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de dos cepas de *S. Aureus*, una hospitalaria y la otra de referencia (ATCC 25923), a diez extractos vegetales y dos aceites esenciales. Los extractos evaluados fueron: uno alcohólico y uno hidroalcohólico de: perejil (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y gobernadora (*Larrea tridentata*); y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de macrodilución. Los resultados mostraron que no existió diferencia en las concentraciones mínimas inhibitorias (2.77 %vol/vol) en los extractos vegetales tanto alcohólicos como hidroalcohólicos en las dos cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a concentraciones mínimas inhibitorias inferiores a las de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos (clavo 1.38 %vol/vol y orégano 0.17%vol/vol para la cepa hospitalaria, y, clavo 0.34 %vol/vol y orégano 0.17 %vol/vol para la cepa de referencia). Los compuestos estudiados tienen una aplicación potencial como antibacterianos por lo que se sugiere medir sus propiedades farmacéuticas para establecer su uso como agentes terapéuticos.

Palabras clave: Multiresistencia bacteriana, enfermedad infecciosa, nuevos antimicrobianos

Abstract

The emergence of resistant *Staphylococcus aureus* strains and the capacity to produce illness are strongly related to the widespread antibiotics use and their potential to develop resistance and multidrug resistance. The therapeutic options for the treatment of the infections caused by this pathogen tend to be limited, therefore the objective of this work was to assess the susceptibility of two strains of *S. aureus* an hospital one and the reference one(ATCC 25923) to ten vegetable extracts and two essential oils. The evaluated extracts were: one alcoholic and one hidro-alcoholic of: parsley (*Petroselinum sativum*), rue (*Ruta graveolens*), thyme (*Thymus vulgaris*), creosote bush (*Larrea tridentata*); and the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Lippia graveolens*), determining the minimum inhibitory concentrations by means of the macro-dilution method. The results

showed that did not exist differences in the minimum inhibitory concentrations (2.77 %vol/vol) neither the vegetable extracts nor the alcoholic and hidro-alcoholic ones in the two strains, while the essential oils inhibited the bacterial growth at a lesser minimum inhibitory concentrations than those of the alcoholic and hidro-alcoholic extracts (clove 1.38 %vol/vol and oregano 0.17 %vol/vol for the hospital strain and clove 0.34 %vol/vol and oregano 0.17 %vol/vol for the reference strain). The studied compounds have a potential application as antibacterials for what is suggested to measure their pharmaceutical properties to establish their use as a therapeutic agents.

key Words : *Bacterial multiresistance, infectious diseases, new antimicrobials*

Introducción.

Todos los seres vivos, incluyendo los patógenos bacterianos y sus hospederos participan en una evolución constante, en una batalla de ataque, defensa y contraataque. Se plantea que los patógenos bacterianos a través del poder de la evolución, han obtenido una importante ventaja sobre sus hospederos, ya que los mecanismos de defensa de estos conducen a la generación de nuevas formas virulentas a través de cambios en el genoma bacteriano de los patógenos (Holden, Feil et al. 2004; O'Connell 2006). La evolución de las especies bacterianas resistentes se debe a una variedad de factores que incluyen la diseminación y el uso inadecuado de agentes antimicrobianos, el uso extensivo de estos agentes como promotores del crecimiento en la alimentación animal y el incremento de los viajes regionales e internacionales, a través de los cuales se facilita que las bacterias resistentes a los antimicrobianos crucen las barreras geográficas (Lowy 2003).

Se entiende por resistencia a la capacidad de un organismo de tolerar la acción de agentes químicos, físicos y biológicos. Donde quiera que exista un cambio de susceptibilidad provocado por un agente inefectivo en contra de cierto organismo, este organismo será considerado como resistente. Muchos organismos carecen de susceptibilidad a un agente particular, y por lo tanto son intrínsecamente resistentes por su naturaleza fisiológica o bioquímica; los organismos susceptibles pueden volverse insensibles ante los antimicrobianos, esto debido a mutaciones o por la incorporación de información genética que codifica la resistencia (Kummerer 2004), sin embargo, la resistencia a menudo, no se restringe a un solo agente o grupo antimicrobiano, sino que involucra a múltiples agentes pertenecientes a diferentes grupos de antimicrobianos, empleándose entonces el término de multiresistencia a drogas, resistencia múltiple o multiresistencia. La OMS establece que

“en la carrera por la supremacía entre el hombre y los microbios, estos permanecen a la cabeza” y que “la resistencia microbiana a los tratamientos disponibles puede llevar al mundo a regresar a una época anterior a los antibióticos”. Lo anterior subraya la seriedad de uno de los retos y problemas de salud global de hoy: la lucha en contra de las enfermedades infecciosas causadas por gérmenes multirresistentes (Witte 1999; Crisostomo, Westh et al. 2001; Critchley, Blosser-Middleton et al. 2003; Schmidt 2004).

En la actualidad, el incremento de la resistencia entre los patógenos limita el uso de los agentes antimicrobianos disponibles, lo cual ha favorecido la búsqueda de nuevos agentes con nuevas formas de acción, que sean capaces de burlar los mecanismos de resistencia actuales (Critchley, Blosser-Middleton et al. 2003; Dartois, Sanchez-Quesada et al. 2005; Dryla, Prustomersky et al. 2005).

Una opción tan antigua como la civilización, es el uso de productos naturales de origen mineral, vegetal y animal, con propiedades terapéuticas, que por mucho tiempo fueron las principales fuentes de fármacos. Con la revolución industrial y el desarrollo de la química orgánica se provocó la preferencia de los productos sintéticos para el tratamiento farmacológico, ya que los compuestos puros se obtienen fácilmente y las modificaciones estructurales para producir drogas potencialmente más activas y seguras favorece el incremento del poder económico de las compañías farmacéuticas. Sin embargo, el impacto en la terapia anti-infecciosa con el descubrimiento de la penicilina (obtenida de microorganismos) resaltó la importancia de los productos naturales. Otro hecho que resalta esta importancia, es el que cerca del 25% de las drogas prescritas a nivel mundial provienen de las plantas y que 121 de sus compuestos activos se convierten en drogas de uso común, además de que de las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales para la OMS, el 11% son de origen vegetal y que un gran número son drogas sintéticas que se obtienen de precursores naturales (Rates 2001).

El surgimiento de la resistencia múltiple en las bacterias patógenas de humanos ha creado un grave problema clínico para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. De manera permanente, las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas provocadas por patógenos resistentes. Las plantas medicinales se consideran una fuente potencial de drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y al poco o nulo efecto tóxico (Holden, Feil et al. 2004), por

lo que se ha sugerido que el uso de los agentes antimicrobianos naturales puede ser una alternativa efectiva o suplementaria para el control de microorganismos patógenos (Knowles, Roller et al. 2005).

La evaluación de la sensibilidad de las bacterias a los diferentes agentes antibacterianos se basa en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria a diferentes concentraciones del agente. La sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico es determinada por la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la menor concentración del agente antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana (Prescott 2000) y es considerada como el 'estándar de oro' para la determinación de la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos y por lo tanto es usada para juzgar la interpretación de otros métodos para probar la susceptibilidad a los antibióticos (Andrews 2001).

En ciertas bacterias, como el *S. aureus*, los procesos evolutivos que pueden limitar o aumentar su potencial de invasividad en diferentes hospederos están poco definidos, aunque por ejemplo, el tipo y las combinaciones de ciertos genes de virulencia pueden contribuir de manera importante a su potencial patogénico (van Leeuwen, Melles et al. 2005).

Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión de selección a la que se someten las bacterias con el uso de antibióticos. A la fecha, los extractos vegetales han sido poco utilizados como terapia antibacteriana, por lo cual se supone que las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Haddadin, Fappiano et al. 2002; Lowy 2003; Begun, Sifri et al. 2005), entonces, es posible que éstos puedan inhibir el crecimiento de cepas bacterianas resistentes y multirresistentes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de ocho extractos vegetales y de dos aceites esenciales en contra de dos cepas de *Staphylococcus aureus* (una cepa hospitalaria y una cepa de referencia).

Materiales y métodos.

Colección de las plantas.

Durante agosto de 2005, se colectaron plantas de gobernadora (*Larrea tridentata*) y de orégano (*Lippia graveolens*) en Gómez Palacio, Dgo. (103° 40'00" LN y 25° 34'15" LO), y de ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y perejil (*Petroselinum sativums*) en huertos de Juárez, Dgo., (103°35'42" LN 25°29'43" LO), cortando las dos terceras partes

de la planta para asegurar su regeneración. El clavo (*Syzygium aromaticum*), del cual se utilizan los botones florales, se compró en un mercado de la localidad. Todas las plantas fueron identificadas taxonómicamente en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Preparación de los extractos.

Se prepararon los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de gobernadora (*Larrea tridentata*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y perejil (*Petroselinum sativums*), y se extrajo el aceite esencial del orégano (*Lippia graveolens*) y del clavo (*Syzygium aromaticum*), mediante arrastre de vapor en un aparato de destilación. Para los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos (governadora, ruda, tomillo y perejil) se lavaron con agua de la llave las plantas hasta quitar toda la tierra e impurezas; el material limpio se dividió en dos partes, la primera mitad se secó al sol para ser molida en mortero, se adicionó solución de agua-alcohol (50-50v:v) y se colocó en frasco ámbar para protegerlas de la luz del sol (extracto hidroalcohólico). La otra mitad se sujetó a un proceso de maceración en fresco con una solución de etanol al 70% (extracto alcohólico) (Kuklinsky 1993).

Para obtener los aceites esenciales de las especies de orégano (*Lippia graveolens*) y clavo (*Syzygium aromaticum*), estas especies se sometieron a una extracción por arrastre de vapor en un aparato de destilación, para obtener sus aceites esenciales; el proceso de extracción se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga vegetal, el cual permite la separación de los componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles (Kuklinsky 1993).

Microorganismos y medios.

Los materiales y el equipo empleados en el proceso se esterilizaron previamente en autoclave (FELISA, USA) y las pruebas de susceptibilidad se realizaron por triplicado en una campana de flujo laminar (Listed Man MTR CNTLR 572^a, U.S.A.). Para medir la susceptibilidad a los extractos vegetales, se utilizó una cepa hospitalaria de *Staphylococcus aureus*, que se obtuvo de la Clínica N° 71 del IMSS de la Ciudad de Torreón, Coah., México resistente a los siguientes antibióticos: trimetropin con sulfametoxazol, ampicilina, levofloxacin, cefuroxima, meropenem, carbenicilina, amikacina, piperacilina con tazobactam. La cepa de referencia ENCB *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se obtuvo

del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para estandarizar el tamaño del inóculo bacteriano, las colonias se inocularon en caldo infusión de cerebro corazón(CC) (OXOID, LTD) y se ajustó la turbidez con caldo de cultivo CC estéril hasta alcanzar un equivalente al estándar 0.5 en la escala de MacFarland, de aproximadamente 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) mL^{-1} (Kalemba and Kunicka 2003).

Método de macrodilución.

Se preparó una solución madre con los extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*), de ruda (*Ruta graveolens*), de tomillo (*Thymus vulgaris*), de perejil (*Petroselinum sativums*), de orégano (*Lippia graveolens*) y de clavo (*Syzygium aromaticum*), con una concentración al 5% (22.22 %vol/vol) mezclando 5 mL del extracto más 95 mL de etanol. Se preparó una serie de 10 tubos con 2 mL de caldo CC, se añadieron 2 mL del extracto a evaluar (solución madre) al primer tubo y se mezcló; a partir de este tubo se prepararon diluciones seriadas. Las concentraciones (mg mL^{-1}) de los extractos fueron entonces de 22.22 en el primer tubo y de 11.11, 5.5, 2.77, 1.38, 0.69, 0.34, 0.17, 0.086 y de 0.043 %vol/vol en los tubos subsecuentes hasta el 10. A cada tubo con el extracto se le añadieron 0.5 mL del inóculo previamente preparado que contenía aproximadamente 1.5×10^8 UFC mL^{-1} . Se incluyó un testigo negativo con 2 mL del caldo CC adicionado con 2 mL del extracto. Todos los tubos se incubaron a 37°C por 24 h, transcurrido este tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria en el tubo con la menor concentración de extracto donde se observó desarrollo bacteriano por medio de turbidez visible a simple vista. Las pruebas se realizaron por triplicado y se empleó un testigo (Andrews 2001; NCCLS 2005).

Resultados.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los diferentes extractos vegetales se muestran en el Cuadro 1, muestran que todos ellos tienen propiedades antibacterianas, y que las CMI de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos son similares (2.77 %vol/vol) para las dos cepas, sin importar el tipo de especie vegetal, lo que permite señalar que los componentes inhibitorios de los extractos vegetales no se modificaron con el tratamiento de

extracción utilizado, ya que ensayos previos mostraron que el etanol no inhibe el crecimiento de la cepa.

En el caso de los aceites esenciales la CMI para la cepa hospitalaria de *S. aureus* fue de 1.38 %vol/vol en el aceite esencial de clavo y de 0.17 %vol/vol en el aceite esencial de orégano; para la cepa de referencia, las CMI fueron de 0.34 %vol/vol en el clavo y de 0.17 %vol/vol en el orégano (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos vegetales evaluados en dos cepas de *Staphylococcus aureus*.

Especie vegetal	Tipo de extracto	CMI (% vol/vol) Cepa hospitalaria	CMI(% vol/vol) Cepa de referencia
Gobernadora	alcohólico	.27	.27
Ruda	alcohólico	.27	.27
Tomillo	alcohólico	.27	.27
Perejil	alcohólico	.27	.27
Gobernadora	hidroalcohólico	.27	.27
Ruda	hidroalcohólico	.27	.27
Tomillo	hidroalcohólico	.27	.27
Perejil	hidroalcohólico	.27	.27
Clavo ^{AE}	Aceite esencial	.13	.034
Orégano ^{AE}	Aceite esencial	.017	.017

Discusión

Se evaluó la actividad antibacteriana de ocho extractos vegetales y dos aceites esenciales en cepas de *S. aureus* por medio de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la hipótesis de la capacidad antibacteriana de los extractos vegetales, inclusive ante una cepa resistente, ya que todos los extractos utilizados inhibieron el crecimiento de las cepas evaluadas. Los resultados de este experimento indican que tanto los extractos alcohólicos como los hidroalcohólicos de gobernadora, ruda, tomillo y perejil, así como los aceites esenciales de clavo y orégano tienen actividad antibacteriana *in vitro* en contra de *S. aureus*, observándose que la CMI para todos los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos fue similar (2.77 %vol/vol). Para los aceites esenciales las CMI fueron diferentes entre sí (clavo

1.38, orégano 0.17 % vol/vol para la cepa hospitalaria; y de 0.34 % vol/vol en el clavo y de 0.17 % vol/vol en el orégano para la cepa de referencia).

Los resultados concuerdan en todos los casos, con reportes previos (Cowan 1999); (Dorman y Deans 2000) (Burt 2004), quienes registraron actividad bactericida en contra de diversos patógenos importantes en la gobernadora (*Larrea tridentata*), en el clavo (*Syzygium aroamticum*) y en el tomillo (*Thymus vulgaris*). Las CMI reportadas por Hammer (1999) (0 a 25 [%v/v] para los aceites esenciales de orégano, de tomillo y de clavo en contra de *S. aureus*) coinciden con las que se reportan en este experimento. En relación a los extractos alcohólicos y acuosos de tomillo, Thuillé (2003), reporta una CMI de 2.5 % vol/vol para el primero y mayor de 5.0 % vol/vol para el segundo, en contra de *S. aureus*. Las discrepancias que se presentan en los resultados de los análisis de la susceptibilidad bacteriana a los extractos de especies evaluadas podrían ser consecuencia en primer término, del mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos que tiene que ver, con el tipo de microorganismo y de la constitución de la estructura de su pared celular y del arreglo de su membrana celular. En segundo lugar y con referencia a los extractos, los factores que influyen pueden ser la fuente botánica, la precedencia de la planta, la época de cosecha, la etapa de desarrollo, la técnica de extracción, el tratamiento de la planta (seca o fresca), y por último, también la metodología utilizada en las pruebas de susceptibilidad bacteriana (Vuorelaa, Leinonenb et al. 2004).

Los resultados aportan evidencia de la capacidad antibacteriana de los extractos de las especies vegetales y de la diferencia en su potencia de acuerdo a tipo de extracto, ya que los aceites esenciales requirieron de una menor concentración para lograr la inhibición bacteriana que los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos. Las pruebas *in vitro* constituyen un buen aporte para el conocimiento de las propiedades de los extractos, sin embargo para continuar con la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos hace falta probar la gran variedad de plantas disponibles que son fuente potencial de agentes bioactivos y evaluar además sus propiedades farmacéuticas, tales como su farmacodinamia, farmacocinética y toxicidad entre otras.

Conclusiones

Las cepas de *Staphylococcus aureus* resultaron susceptibles a todos los extractos de las especies vegetales evaluadas, aunque en diferentes concentraciones: los extractos alcohólicos (planta fresca) y los hidroalcohólicos (planta seca) no presentan diferencias en su acción bactericida resaltando así que los componentes bactericidas tienen el mismo peso molecular y su acción no se ve afectada por el método de extracción utilizado. En el caso de los aceites esenciales, el orégano mostró tener el mejor poder bactericida, le sigue el aceite esencial de clavo y por último los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de la gobernadora, el perejil, la ruda y finalmente el tomillo.

Los resultados muestran el potencial de bioactividad que tienen todos los extractos vegetales evaluados, y por lo tanto la gran importancia de las plantas como fuentes de nuevos agentes antibacterianos.

Agradecimientos:

A la MC María de Jesús Cedillo Gómez, directora de la Fac. de Ciencias Químicas-UJED, a la QFB Bertha Rosas Campos, a la Dra. Virginia Nevárez Moorillón, por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Literatura citada

- Andrews, J. M. (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations." J Antimicrob Chemother **48 Suppl 1**: 5-16.
- Begun, J., C. D. Sifri, et al. (2005). "Staphylococcus aureus virulence factors identified by using a high-throughput Caenorhabditis elegans-killing model." Infect Immun **73**(2): 872-7.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review." Int J Food Microbiol **94**(3): 223-53.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev **12**(4): 564-82.
- Crisostomo, M. I., H. Westh, et al. (2001). "The evolution of methicillin resistance in Staphylococcus aureus: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9865-70.
- Critchley, I. A., R. S. Blosser-Middleton, et al. (2003). "Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001." Antimicrob Agents Chemother **47**(5): 1689-93.
- Dartois, V., J. Sanchez-Quesada, et al. (2005). "Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3302-10.

- Dorman, H. J. and S. G. Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." J Appl Microbiol **88**(2): 308-16.
- Dryla, A., S. Prustomersky, et al. (2005). "Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients." Clin Diagn Lab Immunol **12**(3): 387-98.
- Haddadin, A. S., S. A. Fappiano, et al. (2002). "Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit." Postgrad Med J **78**(921): 385-92.
- Holden, M. T., E. J. Feil, et al. (2004). "Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9786-91.
- Kalemba, D. and A. Kunicka (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." Curr Med Chem **10**(10): 813-29.
- Knowles, J. R., S. Roller, et al. (2005). "Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Appl Environ Microbiol **71**(2): 797-803.
- Kuklinsky, C. (1993). Farmacognosia. Barcelona España, Editorial Omega.
- Kummerer, K. (2004). "Resistance in the environment." J Antimicrob Chemother **54**(2): 311-20.
- Lowy, F. D. (2003). "Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*." J Clin Invest **111**(9): 1265-73.
- NCCLS (2005). "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement." Clinical and Laboratory Standards Institute **25**.
- O'Connell, D. (2006). "Bacterial evolution. Evolving virulence." Nature reviews **4**: 83.
- Prescott (2000). Microbiología. Madrid, España, McGraw-Hill- interamericana.
- Rates, S. M. (2001). "Plants as source of drugs." Toxicon **39**(5): 603-13.
- Schmidt, F. R. (2004). "The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials." Appl Microbiol Biotechnol **63**(4): 335-43.
- Thuille, N. (2003). "Bactericidal activity of herbal extracts." Int. J. Hyg. Environ. Health **206**: 1-5.
- van Leeuwen, W. B., D. C. Melles, et al. (2005). "Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **187**(13): 4584-91.
- Vuorelaa, P., M. Leinonenb, et al. (2004). "Natural products in the process of finding new drug candidates." Curr Med Chem **11**(11): 1375-89.
- Witte, W. (1999). "Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects." J Antimicrob Chemother **44 Suppl A**: 1-9.

ARTÍCULO 2

DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
EXTRACTOS VEGETALES EN CEPAS HOSPITALARIAS DE *Staphylococcus aureus* CON
RESISTENCIA MÚLTIPLE.

Actividad antibacteriana de extractos vegetales en contra de *S. aureus* con resistencia múltiple.

DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS VEGETALES EN CEPAS HOSPITALARIAS DE *Staphylococcus aureus* CON RESISTENCIA MÚLTIPLE.

DETERMINATION OF THE CHEMICAL COMPONENTS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS ON NOSOCOMIAL STRAINS OF *Staphylococcus aureus* WITH MULTIDRUG RESISTANCE.

Concepción García-Luján, Sara E. Alonso-Rojo, Rafael Rodríguez-Martínez, Aurora Martínez-Romero, Patricia Ramírez-Baca, José Vinicio Torres-Muñoz, Fernando Castro-Barraza.

(CGL)Facultad de Ciencias Químicas.UJED.

Av artículo #123 s/n Fracc. Filadelfia
Gómez Palacio 35010 Durango, Mex
conygarcialujan@hotmail.com

RESUMEN. El incremento de la resistencia entre los patógenos gram-positivos está limitando el uso de los agentes antimicrobianos disponibles en la actualidad lo cual conduce a la búsqueda de nuevos agentes con nuevos mecanismos de acción que sean capaces de burlar los mecanismos de resistencia bacteriana actuales. Las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* tienden a ser limitadas, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue medir la susceptibilidad de cuatro cepas multirresistentes hospitalarias de *S. Aureus*, y una cepa de referencia (ATCC 25923), a cuatro extractos vegetales y dos aceites esenciales. Los extractos alcohólicos evaluados fueron: perejil (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y gobernadora (*Larrea tridentata*); y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y de orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de macrodilución. La determinación de los componentes químicos principales de los extractos se realizó mediante cromatografía de gases-masas. Los resultados mostraron que los componentes químicos más abundantes en los extractos fueron el etil ester ácido hexadecanoico, fitol, cariofilenos, timol y para-cimeno. En las pruebas de actividad antibacteriana, los resultados muestran que no existió diferencia en las concentraciones mínimas inhibitorias (.27 %vol/vol) en los extractos vegetales alcohólicos en todas las cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a concentraciones mínimas inhibitorias variables e inferiores a las de los extractos alcohólicos. Los compuestos estudiados tienen una aplicación potencial como antibacterianos por lo que se sugiere medir sus propiedades farmacéuticas para establecer su uso como agentes terapéuticos.

Palabras clave: resistencia bacteriana, extractos vegetales, componentes químicos

ABSTRACT. Increased resistance among gram-positive pathogens is limiting the use of presently available antimicrobial agents and is driving the search for new agents with novel mechanisms of action that are capable of circumventing present mechanisms of resistance. The therapeutic options for the treatment of the infections caused by *Staphylococcus aureus* trend to be limited, therefore the aim of the present work was to measure the susceptibility of four multiresistant nosocomial strains of

S. aureus and reference one (ATCC 25923) to four vegetable extracts and two essential oils. The evaluated extracts alcoholic were: parsley (*Petroselinum sativum*), rue (*Ruta graveolens*), thyme (*Thymus vulgaris*), creosote bush (*Larrea tridentata*); and the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Lippia graveolens*), determining the minimum inhibitory concentrations by means of the macro-dilution method. The results showed that the most abundant chemical components were: hexadecanoic acid ethyl ester, phytol, carophyllene, thymol and p-cymene. The antibacterial tests showed that did not exist differences in the minimum inhibitory concentrations (.27 %vol/vol) for the vegetable alcoholic extracts in the five strains, while the essential oils inhibited the bacterial growth at a lesser and variable minimum inhibitory concentrations than those of the alcoholic extracts. The studied compounds have a potential application as antibacterials for what is suggested to measure their pharmaceutical properties to establish their use as therapeutic agents.

Key words: bacterial resistance, herbal extracts, chemical components

INTRODUCCIÓN

El surgimiento de la resistencia a múltiples drogas en bacterias patógenas de humanos ha creado un serio problema para el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Martinez & Baquero 2002; Cornell, Isham *et al.* 2003). Como resultado de la adaptación a tejidos específicos, los estafilococos causan muchos síndromes patológicos como abscesos en la piel e infecciones de heridas, osteomielitis, endocarditis, neumonía, meningitis, bacteriemia, síndrome de shock tóxico, osteomielitis y envenenamiento por alimentos. Debido a que las cepas de *Staphylococcus aureus* colonizan continuamente la piel humana, son expuestas a todas las terapias con antibióticos, surgen entonces los microorganismos resistentes, estas cepas se pueden diseminar muy rápidamente por contacto directo en las poblaciones humanas, como se ejemplifica con la amenaza mundial de los *S. aureus* resistentes a la metilina (MRSA) (los cuales presentan resistencia a la primera línea de antibióticos como la ampicilina y la penicilina) y con los *S. aureus* resistentes a la vancomicina (VRSA) (Bae, Banger *et al.* 2004; O'Flaherty, Ross *et al.* 2005).

Las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas de otras fuentes incluyendo las plantas y los animales. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico (Beg 2000).

Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Aunque se han identificado algunas sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, los extractos de plantas completas permanecen en uso (Thuille 2003).

Mientras que algunos aceites esenciales son usados en base a sus propiedades que tienen bien documentadas *in vitro*, hay pocos datos para muchos otros. Algunos estudios se concentran exclusivamente en un extracto o aceite y en un microorganismo. Estos datos son útiles, sin embargo, los reportes no son directamente comparables debido a diferencias metodológicas tales como la elección del extracto vegetal, el organismo a probar y el método microbiológico de prueba (Hammer 1999). Aunque los aceites esenciales tienen un amplio espectro de actividad, no todos son capaces de matar a todas las bacterias (Bergonzelli, Donnicola *et al.* 2003).

Los extractos vegetales y los aceites esenciales no han sido utilizados como tratamiento en las enfermedades hospitalarias causadas por cepas de *S. aureus* con resistencia múltiple, por lo tanto las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra, se espera que los extractos y aceites sean de utilidad para el tratamiento y control de estos padecimientos. En base a lo anterior, el propósito de este documento es evaluar la actividad antibacteriana de cuatro extractos alcohólicos: de gobernadora (*Larrea tridentata*), de ruda (*Ruta graveolens*), de tomillo (*Thymus vulgaris*) y de perejil (*Petroselinum sativums*); y de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*) y de clavo (*Syzygium aromaticum*) en contra de cepas hospitalarias con resistencia múltiple de *S aureus* y determinar los componentes químicos principales de los extractos y de los aceites.

MATERIALES Y MÉTODOS Colección de las plantas.- Durante agosto de 2005, se colectaron plantas de gobernadora (*Larrea tridentata*) y de orégano (*Lippia graveolens*) en Gómez Palacio, Dgo.

(103° 40'00" LN y 25° 34'15" LO), y de ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y perejil (*Petroselinum sativum*) en huertos de Juárez, Dgo., (103°35'42" LN 25°29'43" LO), cortando las dos terceras partes de la planta para asegurar su regeneración. El clavo (*Syzygium aromaticum*), del cual se utilizan los botones florales, se compró en un mercado de la localidad. Todas las plantas fueron identificadas taxonómicamente en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Preparación de los extractos. Se prepararon los extractos alcohólicos de gobernadora (*Larrea tridentata*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y perejil (*Petroselinum sativum*), y se extrajo el aceite esencial del orégano (*Lippia graveolens*) y del clavo (*Syzygium aromaticum*), mediante arrastre de vapor en un aparato de destilación. Para los extractos alcohólicos (gobernadora, ruda, tomillo y perejil) se lavaron con agua de la llave las plantas hasta quitar toda la tierra e impurezas y se sometieron a un proceso de maceración en fresco con una solución de etanol al 70%, posteriormente, se colocaron en frascos ambar (Kuklinsky 1993).

Para obtener los aceites esenciales de las especies de orégano (*Lippia graveolens*) y clavo (*Syzygium aromaticum*), estas especies se sometieron a una extracción por arrastre de vapor en un aparato de destilación, para obtener sus aceites esenciales; el proceso de extracción se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga vegetal, el cual permite la separación de los componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles (Kuklinsky 1993).

Microorganismos y medios. Los materiales y el equipo empleados en el proceso se esterilizaron previamente en autoclave (FELISA, USA) y las pruebas de susceptibilidad se realizaron por triplicado en una campana de flujo laminar (Listed Man MTR CNTLR 572^a, U.S.A.). Para medir la susceptibilidad a los extractos vegetales, se utilizaron cuatro cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus*, que se obtuvieron de la Clínica N° 71 del IMSS de la Ciudad de Torreón, Coah., México multirresistentes. La cepa de referencia ENCB *S. aureus* ATCC 25923, se obtuvo del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Para estandarizar el tamaño del inóculo bacteriano, las colonias se inocularon en caldo infusión de cerebro corazón (CC) (OXOID, LTD) y se ajustó la turbidez con caldo de cultivo CC estéril hasta alcanzar un equivalente al estándar 0.5 en la escala de MacFarland, de aproximadamente 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) mL^{-1} (Kalemba & Kunicka 2003).

Método de macrodilución. Se preparó una solución madre con los extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*), de ruda (*Ruta graveolens*), de tomillo (*Thymus vulgaris*), de perejil (*Petroselinum sativums*), de orégano (*Lippia graveolens*) y de clavo (*Syzygium aromaticum*), con una concentración al 5% (22.22 %vol/vol) mezclando 5 mL del extracto más 95 mL de etanol. Se preparó una serie de 10 tubos con 2 mL de caldo CC, se añadieron 2 mL del extracto a evaluar (solución madre) al primer tubo y se mezcló; a partir de este tubo se prepararon diluciones seriadas. Las concentraciones (mg mL^{-1}) de los extractos fueron entonces de 2.2 en el primer tubo y de 1.1, .55, .27, .13, .06, .03, .017, .0086 y de .0043 %vol/vol en los tubos subsecuentes hasta el 10. A cada tubo con el extracto se le añadieron 0.5 mL del inóculo previamente preparado que contenía aproximadamente 1.5×10^8 UFC mL^{-1} . Se incluyó un testigo negativo con 2 mL del caldo CC adicionado con 2 mL del extracto. Todos los tubos se incubaron a 37°C por 24 h, transcurrido este tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria en el tubo con la menor concentración de extracto donde se observó desarrollo bacteriano por medio de turbidez visible a simple vista. Las pruebas se realizaron por triplicado y se empleó un testigo (Andrews 2001; NCCLS 2005).

Caracterización de los extractos vegetales. Se realizó en el laboratorio de análisis instrumental, "Antonio Anzaldúa Morales" de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. En un aparato de Cromatógrafo de Gases-Masas (Perkin Elmer Instruments Turbo Mass Gold Spectrometer Auto System XL Gas Chromatograph, USA), se utilizó la columna capilar de silicagel SP TM 2380. Se utilizó Helio como gas portador a 1.5 mL/min, después de la inyección de la muestra, la columna se mantuvo a una temperatura inicial de 150°C por dos minutos, luego se

incrementó 10°C /min hasta alcanzar 250°C en donde permaneció por 8 min. La identificación positiva de los diferentes componentes se llevó a cabo mediante la combinación del análisis del espectro de masas y los tiempos de retención.

RESULTADOS.

Principales componentes químicos de los extractos.

Los análisis de los extractos vegetales caracterizados por cromatografía de gases-masas, revelaron los componentes principales que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales componentes químicos de los extractos vegetales.

Especie vegetal	Tipo de extracto	Componente químico	Peso molecular(equiv. moleculares)
Orégano(<i>Lippia graveolens</i>)	Aceite esencial	-β-Mirceno	136
		-P-cimeno	134
		-Timol	150
		-Carvone	150
		-β cariofileno	204
		-α cariofileno	204
		-Dihidroactinidiolida	180
		-Isospatulenol	220
Gobernadora(<i>Larrea tridentata</i>)	alcohólico	-α-metilglucofuranósido	194
		-Piperina	285
		-Ácido octadecanoico	284
		-Pitol	296
		-Ácido 4 acetoxi-meta-anisico	210
		-4-etoxi-3	195

		metoxifenetilamina	
Ruda(<i>Ruta graveolens</i>)	alcohólico	-Nonanona	142
		-2-undecanona	170
		-Etil-alfaD-glucopiranosido	208
		-Ácido pentadecanoico, etil ester	270
		-4-imidazolidinona-5-(2-metilpropil)-3fenil-2-tioxo(S)	248
		-Pitol	296
		-Ácido hexadecanoico, etil ester	284
		-9,12,15,acido octadecatrienoico, metil ester	292
		-Ketoprofen	254
		-9,12,acido octadecadienoico, metil ester	294
		-5,8,11,14-acido eicosatetraenoico, metil ester	318
		-p-cimeno	134
		-Ciclohexene-1-metil-4(1-metiletilideno)	136
-Borneol	154		
Tomillo(<i>Thymus vulgaris</i>)	alcohólico		

		-Timol	150
		-n-heptilbenceno	176
		-Ácido hexadecanoico, etil ester	284
Perejil(<i>Petroselinum sativum</i>)	alcohólico	-Acido acético, carvacril	192
		-Alfa-D-manofuranosida 1-tio-N exil	280
		-Apiol	222
		- Tetradecanal	212
		-Acido eicosanoico	312
		- Acido hexadecanoico, etil ester	284
		fitol	296
		- Acido octadecanoico, metil ester	294
Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Aceite esencial	- Eugenol	164
		- Cariofileno	204
		- Alfa-cariofileno	204
		- Acetil-isoegenol	206

En la Tabla 2 se observa la presencia de los componentes químicos en las seis especies vegetales analizadas. Los compuestos fueron identificados en los extractos alcohólicos (ruda, perejil, tomillo y gobernadora) y de los aceites esenciales de clavo y orégano. Los compuestos fueron identificados por inyección de los estándares y/o por comparación de espectrometría de masas con la librería del equipo. En esta Tabla 2 también es posible comparar la presencia de componentes que se encontraron en varias plantas como el caso del etil ester ácido hexadecanoico presente en los extractos de la ruda, la gobernadora, el tomillo y del perejil. Otro componente es el fitol que está

presente en la ruda, la gobernadora y el perejil. El β -cariofileno y el α -cariofileno están presentes en los aceites esenciales de clavo y orégano y el Timol y P-cimeno se encontró en el tomillo y el orégano.

Tabla 2. Componentes químicos identificados en las seis especies vegetales analizadas.

Compuesto	Especie vegetal					
	Ruda	Orégano	Gobernadora	Tomillo	Perejil	Clavo
Etil ester ácido hexadecanoico	(X)		(X)	(X)	(X)	
Pitol	(X)		(X)		(X)	
β -cariofileno		(X)				(X)
α -cariofileno		(X)				(X)
Timol		(X)		(X)		
P-cimeno		(X)		(X)		
Eugenol						(X)
Acetil-isoeugenol						(X)
Tetradecanal					(X)	
Piperina			(X)			
Pinitol			(X)			
Nonanona	(X)					
Metil(Z)5,11,14,17-eicosatetrateonato	(X)					
Metil ester, ácido octadecanoico					(X)	
Metil ester 9,12,15 ácido octadecatrienoico	(X)					
Metil ester 9,12, ácido octadecadienoico	(X)					
Ketoprofen	(X)					
Heptil-benceno				(X)		
Etil ester del ácido pentadecanóico	(X)					
Etil alfa-D-glucopiranosido	(X)					
Ethyl-alphaD-glucopiranosido	(X)					
Dihidroactinidiolida		(X)				
Ciclohexeno-1-metil-4(1 metiletilideno)				(X)		
Carvone		(X)				
Cariofileno óxido		(X)				
Borneol				(X)		
Beta- mirceno		(X)				
Apiol						(X)
Alfa-D-manofuranosido 1-tio-N hexil						(X)
Acido octadecanoico			(X)			
Ácido eicosanoico						(X)
Ácido acetico, carvacril-						(X)
Ácido 4-acetoxi-meta-anisico			(X)			
4-imidazolidinona-5-(2-metilpropil)-3fenil-2-tioxo(S)	(X)					
4-etoxi-3-metoxifenetilamina			(X)			
2-Undecanona	(X)					

Actividad antibacteriana.

Los resultados de las pruebas experimentales de la actividad bactericida se muestran en la Tabla 3. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cepas muestran que todos los extractos analizados tienen actividad antibacteriana, aunque tuvieron un comportamiento muy semejante para los extractos alcohólicos, en cambio los aceites esenciales de clavo y de orégano se comportaron de forma variable, el aceite con más poder bactericida es el del orégano y en segundo término se encuentra el del clavo y enseguida los cuatro extractos alcohólicos de gobernadora, ruda, perejil y tomillo (Tabla 3). Los controles fueron negativos.

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos después de 24 h de incubación.

Cepa	Extracto vegetal	CMI (%vol/vol)
01	Gobernadora	.27
	Perejil	.27
	Ruda	.27
	Tomillo	.27
	Clavo ^{AE}	.13
	Orégano ^{AE}	.017
591	Gobernadora	.27
	Perejil	.27
	Ruda	.27
	Tomillo	.55
	Clavo ^{AE}	.55
	Orégano ^{AE}	.017
89	Gobernadora	.27
	Perejil	.27

	Ruda	.27
	Tomillo	.27
	Clavo ^{AE}	.55
	Orégano ^{AE}	.034
8R	Gobernadora	.27
	Perejil	.27
	Ruda	.27
	Tomillo	.27
	Clavo ^{AE}	.017
	Orégano ^{AE}	.017
ATCC 25923	Gobernadora	.27
	Perejil	.27
	Ruda	.27
	Tomillo	.27
	Clavo ^{AE}	.034
	Orégano ^{AE}	.017

^{AE} aceite esencial.

DISCUSIÓN

Se investigaron las actividades antibacterianas de cuatro extractos vegetales y dos aceites esenciales y se determinaron sus componentes químicos principales.

Se puede comentar la presencia de componentes que se encontraron en varias plantas como el caso del etil ester ácido hexadecanoico (ac. palmítico) presente en los extractos de la ruda, la gobernadora, el tomillo y de perejil. Otro componente es el fitol que está presente en la ruda, la gobernadora y el perejil. El β -cariofileno y el α -cariofileno están presentes en los aceites esenciales de clavo y orégano y el timol y P-cimeno se encontraron en el tomillo y en el orégano. La actividad antimicrobiana está reportada para los fenoles – timol, carvacrol y eugenol, lo cual se explica por la

naturaleza ácida del grupo hidroxil, que forma un puente de hidrógeno con un centro enzimático activo. Así, los aceites esenciales con fenol como componente principal expresan el más alto espectro de actividad en contra de los microorganismos, y su espectro de actividad es el mayor. Se incluyen los aceites esenciales de tomillo, orégano que contienen timol y carvacrol así como el aceite de clavo que contiene eugenol (Kalemba & Kunicka 2003). Los laboratorios a nivel mundial han encontrado literalmente cientos de fitoquímicos los cuales tienen efectos inhibitorios sobre todos los microorganismos *in vitro* (Cowan 1999).

Lo anterior es apoyado por Burt (2004), que reporta que algunos aceites esenciales y sus componentes tienen actividad antibacteriana en contra de patógenos alimentarios *in vitro* y, salvo pocas excepciones en los alimentos. Los componentes fenólicos son los más activos y parecen actuar principalmente como permeabilizadores de la membrana. Los organismos gram positivos son más sensibles a los aceites esenciales que los organismos gram negativos.

Un componente químico importante es el ácido graso omega 3 (9, 12, 15, ácido octadecanoico, metil ester) que se detectó en la ruda y no está reportado en otros estudios.

En cuanto a la actividad bactericida en contra de las cepas resistentes de *S. aureus*, se encontró que todos los extractos analizados tienen esta actividad, aunque tuvieron un comportamiento muy semejante para los extractos alcohólicos, en cambio los aceites esenciales de clavo y de orégano se comportaron de forma variable, el aceite con más poder bactericida es el del orégano y en segundo término se encuentra el del clavo y enseguida los cuatro extractos alcohólicos de gobernadora, ruda, perejil y tomillo. Indiscutiblemente, el área de aplicación de los aceites esenciales es la inhibición del crecimiento y la reducción en número de los patógenos alimentarios más serios tales como la *Salmonella* spp., *E coli* O157 y *L monocytogenes* (Burt 2004).

Lo anterior permite comprobar la hipótesis de que efectivamente, los extractos vegetales y aceites esenciales probados tienen efectos antibacterianos en cepas de *S. aureus* con resistencia múltiple.

Estos resultados no pueden ser aplicados a otros extractos y a otras cepas principalmente considerando que el modelo biológico fue *S. aureus*, por el tipo de método de obtención de los extractos y por la metodología utilizada en las pruebas de susceptibilidad.

Agradecimientos. Quiero agradecer especialmente al rector de la Universidad Juárez del Estado de Durango CP Rubén Calderón Luján, a la directora de la Facultad de Ciencias Químicas MC María de Jesús Cedillo Gómez, a la QFB Bertha Rosas Campos y al MC José Vinicio Torres Muñoz, por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1: 5-16.
- Bae, T., A. K. Banger, *et al.* (2004). Staphylococcus aureus virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(33): 12312-7.
- Beg, A. y. I. A. (2000). Effect of *Plumbago zeylanica* extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical drugs. *Word Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 841-844.
- Bergonzelli, G. E., D. Donnicola, *et al.* (2003). Essential oils as components of a diet-based approach to management of Helicobacter infection. *Antimicrob Agents Chemother* 47(10): 3240-6.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* 94(3): 223-53.
- Chan, P. and B. Tomlinson (2000). Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from the Chinese herb sanchi (*Panax pseudoginseng*). *J Clin Pharmacol* 40(5): 457-61.
- Cornell, S. J., V. S. Isham, *et al.* (2003). Spatial parasite transmission, drug resistance, and the spread of rare genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7401-5.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12(4): 564-82.
- Hammer, K. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.
- Kalemba, D. and A. Kunicka (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 10(10): 813-29.
- Kuklinsky, C. (1993). *Farmacognosia*. Barcelona España, Editorial Omega.
- Martinez, J. L. and F. Baquero (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15(4): 647-79.

- NCCLS (2005). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute 25.
- O'Flaherty, S., R. P. Ross, *et al.* (2005). Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Appl Environ Microbiol* 71(4): 1836-42.
- Thuille, N. (2003). Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 1-5.

ANEXO



Agraria

Nueva Epoca

Tel. (844) 411-02-80; (844) 411-02-12; Fax (844) 411-02-11 agraria_ne@uaan.mx

Organo de Difusión Científica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Folio 79

FECHA: 4 de julio de 2006

ACUSE DE RECIBO

RECIBÍ DE LA C. Concepción García Luján

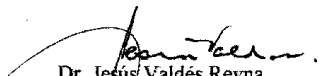
EL SIGUIENTE TRABAJO PARA SU POSIBLE PUBLICACIÓN EN LA REVISTA AGRARIA NUEVA EPOCA:

"Susceptibilidad *in vitro* de una cepa resistente de *Staphylococcus aureus* a
diferentes extractos vegetales"

Cuyos autores son: Concepción García Luján, Sara E. Alonso Rojo, Rafael
Rodríguez Martínez, Aurora Martínez Romero, Patricia Ramírez Baca y Alejandro
Moreno Reséndez.

MISMO QUE SERÁ SOMETIDO AL PROCESO DE ARBITRAJE.

R E C I B I


Dr. Jesús Valdés Reyna
Editor Ejecutivo
Revista **Agraria** Nueva Época

DEPARTAMENTO DE VALIDACIÓN

C.c.p Dr. Miguel Ángel Capó Arteaga. Editor en Jefe Revista **Agraria** N.E.



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Dirección de Investigación
Buenavista, Saltillo, Coah., México. C. P. 25315: www.uaan.mx



Dirección de Investigación y Posgrado
Secretaría de Servicios Académicos
Teléfono/fax 01.993.3127210

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
"ESTUDIO EN LA DUDA, ACCIÓN EN LA FE"



Villahermosa, Tabasco. 17 de octubre de 2006.

Autor (es): C García-Luján, SE Alonso-Rojo, R Rodríguez-Martínez, A Martínez- Romero, P Ramírez-Baca, JV Torres-Muñoz, F Castro-Barraza.

Tengo el agrado de comunicar que recibimos copia electrónica del manuscrito:

284UC VALORACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS VEGETALES EN CONTRA DE *Staphylococcus aureus* HOSPITALARIOS Y CON RESISTENCIA MÚLTIPLE

Agradecemos el envío del manuscrito para su posible publicación. Reciba un saludo respetuoso.

Atentamente


Dr. Juan Barajas Fernández
Editor

c.p. archivo