

***Staphylococcus aureus* PROCEDENTES DE QUESOS: SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y SU RELACIÓN CON PLÁSMIDOS**

***Staphylococcus aureus* Coming from Cheeses: Antibiotic Susceptibility and Relationship with Plasmids**

Jhoandry Rivera-Salazar*, Isabel Mujica de Fernández, Velina Aranaga-Natera, Carlos Navarro-Ocando, Irene Zabala-Díaz y Lorena Atencio-Bracho

Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Apartado 526. *E-mail: jhoandrivas@gmail.com

RESUMEN

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos que rápidamente ha adquirido resistencia a los antibióticos y su portación de manera asintomática en humanos y animales lo convierte en serio problema cuando estos microorganismos son transferidos a los alimentos. Se evaluó la susceptibilidad a antibióticos y la localización de los marcadores moleculares de resistencia en ADN plasmídico en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos comercializados en las ciudades de Maracaibo y San Francisco del estado Zulia-Venezuela. En los ensayos se detectaron cepas de *S. aureus* multiresistentes; los antibióticos con mayor frecuencia de cepas resistentes fueron: Penicilina, Oxacilina, Tetraciclina, Eritromicina, Amikacina, Kanamicina, Ciprofloxacina y Clindamicina. Todos los aislados fueron sensibles a Trimetropim/Sulfametoxazole, Imipenem y Gentamicina. Una cepa fue caracterizada como *Staphylococcus aureus* Meticilino-Resistente (SARM), por capacidad de crecimiento en placas hipersalinas suplementadas con Oxacilina, y se evidenció la capacidad de producir β -lactamasas entre los aislados estudiados. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) encontradas fueron: Penicilina G: ≤ 6 -140 $\mu\text{g/mL}$; Oxacilina: $< 0,625$ -6,56 $\mu\text{g/mL}$; Amikacina: 32,00 $\mu\text{g/mL}$; Clindamicina: 10,31-45,00 $\mu\text{g/mL}$; Tetraciclina: 7-195 $\mu\text{g/mL}$; Eritromicina: ≤ 15 ->210,00 $\mu\text{g/mL}$. Las cepas de *S. aureus* aisladas portaban bandas plasmídicas cuyos tamaños oscilaron entre 2,30-34,357 kpb, siendo común cepas que llevaban consigo entre 1 a 4 bandas plasmídicas. La pérdida de las bandas de 27,821 y 3,657 kpb en cepas crecidas a 45°C se

asoció a la pérdida de la capacidad para producir β -lactamasas y resistencia a Eritromicina respectivamente.

Palabras clave: *S. aureus*, quesos, resistencia antibiótica, plásmidos, β -lactamasas.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the microorganisms that quickly developed resistance to antibiotics, and it is carried out in an asymptomatic way by humans and animals turning it in a serious when this microorganism are transferred to food. It was evaluated the susceptibility to antibiotics and localization of molecular markers of resistance in plasmidic DNA in *S. aureus* strains isolated from cheeses marketed in the cities of Maracaibo and San Francisco of Zulia State-Venezuela. In the tests, multiresistant strains of *S. aureus* were detected. Antibiotics with highest frequency of resistant strain were: Penicillin, Oxacillin, Tetracycline, Erythromycin, Amikacin, Kanamycin, Ciprofloxacin and Clindamycin. All isolates were susceptible to Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Imipenem and Gentamicin. Only one strain was characterized as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), by its capacity for growth in hypersaline plates supplemented with oxacillin, and showed the ability to produce β -lactamases among isolates studied. The minimum inhibitory concentrations found were: Penicillin G: 6-140 $\mu\text{g/mL}$; Oxacillin: < 0.625 -6.56; Amykacin: 31.25 $\mu\text{g/mL}$; Clindamycin: 10.31-45.00 $\mu\text{g/mL}$; Tetracycline: 7-195 $\mu\text{g/mL}$; Erythromycin: 15- >210.00 $\mu\text{g/mL}$. The strains of *S. aureus* isolated carrying plasmidic bands whose sizes ranged of 2.30-34.357 kpb, normally they carried between 1 and 4 plasmidic bands. The loss of bands of 27.821 kpb and 3.657 kpb in

strains grown at 45°C was associated with loss of ability to produce β -lactamases and Erythromycin resistance, respectively.

Key words: *S. aureus*, cheese, antibiotics resistance, plasmids, β -lactamases.

INTRODUCCIÓN

La portación nasofaríngea de *S. aureus* es un hallazgo común en la población y en el caso de los manipuladores de alimentos, esto se traduce en un serio problema, al igual que su presencia en animales o derivados de éstos destinados a la producción alimenticia, no sólo porque es el principal causante de toxiinfecciones alimentarias sino porque *S. aureus* ha adquirido resistencia múltiple a antimicrobianos y cuyos marcadores genéticos de resistencias pueden estar codificados en elementos extracromosomales como: integrones, secuencias de inserción, transposones o plásmidos; pudiendo éstos últimos ser altamente transferible entre especies bacterianas emparentadas o no genéticamente causando la diseminación de genes de resistencias entre poblaciones bacterianas [5, 13].

Por otro lado, factores como la prescripción indiscriminada de drogas, la automedicación de pacientes, el uso masivo de antibióticos como aditivos en alimentos para animales, las prescripciones veterinarias y el consumo de alimentos que contienen estos aditivos, han ocasionado la propagación de mecanismos de resistencia a antibióticos dificultando cada día más la erradicación de éstos agentes infecciosos [5, 20]. Por ello, en países europeos se considera ilegal la presencia de residuos antimicrobianos en leche destinada al consumo humano y penaliza con multas a quienes incurrir en ello. Por su parte, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación/Organización Mundial de la Salud y la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (FDA) establecen concentraciones de residuos permisibles en leche, consideradas como niveles seguros para el consumo humano [26].

Según Gaceta Oficial, en Venezuela apenas desde el año 2006 se regula la venta de un selecto grupo de antibióticos como medida para controlar el uso y abuso [14]. La ley regula la venta de los antibióticos del grupo de Quinolonas tales como: Ofloxacino, Ciprofloxacino, Pefloxacino, Henoxacino, Norfloxacino, Fleroxacino, Levofloxacino, Trovafloxacino y Moxifloxacino; del grupo Macrólidos-Lincosamidas: Eritromicina, Espiramicina, Roxitromicina, Claritromicina, Azitromicina, Clindamicina y Licomicina y los del grupo de las Cefalosporinas de tercera generación: Cefotaxima, Ceftacídima, Ceftriaxona, Cefixima, Cefoperazona, Cefpodoxima y Ceftibuteno y aquellos cuyo agente principio activo sea la Rifampicina. Sin embargo, quedaron exenta de la ley las Cefalosporinas de primera y segunda generación, las penicilinas y otros betalactámicos como: imipenem, meropenem, aztreonam, así como los del grupo que pertenecen a los Aminoglicósidos, Tetraciclinas y el Cloranfenicol.

Por otro lado existen reportes que evidencian la presencia de residuos antimicrobianos en leches destinadas al consumo humano en el país y esto principalmente se debe a que los productores incumplen con los lapsos de tiempo de retiro de los vacunos (*Bos taurus-Bos indicus*) tratados con antibióticos, generalmente por mastitis bacteriana, de las líneas de producción de leche. Esto trae como consecuencia que la flora autóctona y otros gérmenes que entren en contacto con esta leche estén sometidas a una presión selectiva que favorece la aparición y proliferación de bacterias antibiótico-resistentes; y aunque la pasteurización es el proceso más utilizado para la destrucción de la flora patógena en leche, en algunos casos no es aplicada eficientemente [11, 16]. Esto último es más perceptible en la fabricación de quesos artesanales donde este procedimiento ni siquiera se realiza.

Es bien conocido que la población venezolana es un potencial consumidor de quesos, es por ello que este estudio se focalizó en estudiar el fenómeno de resistencia a antimicrobianos y la genética involucrada en cepas de *S. aureus* aisladas de estos alimentos de origen lácteo con el propósito de innovar conocimientos sobre la vulnerabilidad de los consumidores y/o manipuladores a ser colonizados por *S. aureus* foráneo antibiótico-resistentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de estudio, aislamiento y confirmación bioquímica de las cepas de *S. aureus*

Se estudiaron un total de veinticinco (25) cepas de *S. aureus* provenientes de doce quesos pasteurizados y trece no pasteurizados seleccionados de forma aleatoria de establecimientos comerciales ubicados entre los municipios San Francisco y Maracaibo del estado Zulia-Venezuela. Los mismos fueron trasladados y mantenidos en recipientes isotérmicos hasta el momento de la preparación homogénea de la muestra para aislar las cepas de *S. aureus* según estándares metodológicos COVENIN 1292-2004 [7]. Los aislados fueron confirmados como *S. aureus* por pruebas bioquímicas convencionales [7, 21] y preservadas a -20°C (Premier, modelo CG-2439, China) en una solución de Caldo Infusión Cerebro-Corazón (Merck, Alemania) con Glicerol (Fischer Scientific, EUA) al 20% v/v [4].

Actividad in vitro de antibióticos sobre las cepas de *S. aureus*

Se evaluó por la técnica difusión en agar Müller-Hinton (HiMedia, India) de discos de antibióticos (Sensi-Disc™, BD BBL): Penicilina (P; 10U/mL), Tetraciclina (TE; 30µg/mL), Trimetropin-Sulfamethoxazole (SxT; 1,25-23,75µg/mL), Ciprofloxacina (CIP; 5µg/mL), Gentamicina (GM; 10µg/mL), Cloranfenicol (C; 30µg/mL), Rifampicina (RA; 5µg/mL), Vancomicina (VA; 30µg/mL), Clindamicina (CC; 2µg/mL), Eritromicina (E; 15µg/mL), Oxacilina (OX; 1µg/mL), Kanamicina (KN;

30 µg/mL), Amikacina (AK; 30 µg/mL) e Imipenem (IMP; 10 µg/mL). Adicionalmente, para los antibióticos Tetraciclina HC[®] (Laboratorio Vargas), Oxacilina (Sigma-Aldrich[®]), Penicilina G (Bristol-Myers Squibb), Eritromicina (Abbott Laboratories), Amikacina (Bristol-Myers Mead Johnson) y Clindamicina (Laboratorio Viteco) se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) necesaria para inhibir el crecimiento de las cepas que resultaron resistentes, para los mismos antibióticos en la técnica de difusión en agar Müller-Hinton, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [6]. Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC[®] 25923.

Confirmación de la resistencia a Oxacilina para denominación de cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (SARM) y producción de β-lactamasas

Las cepas de *S. aureus* con fenotipos presuntivos de resistencia o resistencia intermedia a Oxacilina en el antibiograma fueron sembradas sobre agar Mueller-Hinton hipertónicas (4% p/v de NaCl) suplementado con 6 µg/mL de Oxacilina (Sigma-Aldrich[®]); se denominaron cepas SARM aquellas que crecieran en este medio a 35°C en términos de 24 horas (h). Las cepas controles fueron *S. aureus* ATCC[®] 25923 (sensible a Oxacilina) y *S. aureus* ATCC[®] 43300 (resistente a Oxacilina) [6]. La detección de la producción de β-lactamasas se realizó mediante el método acidimétrico: empleando placas de microtitulación con 0,1 mL de solución de penicilina G (1 millón de U/mL) a pH 8,5 y rojo de fenol (0,5% p/v) por pocillo y sobre los cuales se hicieron resuspender 4-5 colonias de los *S. aureus* estudiados. El cambio de color violeta al amarillo de esta solución antes de 15 min se interpretó como capacidad de producción de β-lactamasas [6, 21] como controles se utilizaron las cepas *S. aureus* ATCC[®] 25923 no productora de β-lactamasas y ATCC[®] 29213 productora de β-lactamasas.

Extracción, separación y visualización de ADN plasmídico (ADNp) crípticos

Se utilizó el protocolo de lisis alcalina modificada [22] con lisostafina (0,5 mg/mL). La separación de las bandas de ADNp se realizó por electroforesis en cámara horizontal (Thermo Electron Corporation Midicell[®] Primo[™], modelo EC330, EUA) en geles de agarosa (0,7% p/v) sumergidos en buffer TBE (Tris 90mM – Borate 90mM – EDTA 2mM) con Bromuro de Etidio (0,5 g/mL) a 50 voltios con fuente de poder programable (Bio-Rad, modelo Power-Pac Basic, EUA) durante 1 h., éstos fueron observados y fotografiados sobre un transiluminador (UVP-White/UV-trasilluminator, Reino Unido). El cálculo aproximado de los tamaños de las bandas plasmídicas se realizó empleando la aplicación Origin Lab, Origin Pro 7.5 para Windows [4, 23, 24].

Ubicación en plásmidos de determinantes moleculares responsable de la capacidad de resistencia a los antibióticos estudiados

Fue necesario someter algunas de las cepas *S. aureus* aisladas de los quesos a un proceso de eliminación de plásmidos que involucró el crecimiento de las mismas a elevada temperatura como la descrita por Asheshov [2], con modificación de la temperatura de incubación (45°C por 24 h) en baño de agua con agitación (Lab-Line Instruments, Inc, modelo Shaker-Bath 3580, EUA). De cada cepa se seleccionaron siete colonias al azar luego del tratamiento térmico y se les determinó los mismos fenotipos probados a cada una de sus cepas parentales. Para aquellas colonias que cambiaron su fenotipo silvestre se les realizó nuevamente la extracción del ADNp según los protocolos descritos, para correlacionar la pérdida de algún(as) de la(s) banda(s) de ADNp con los fenotipos de resistencia observados en las cepas parentales.

Análisis estadístico

Los fenotipos de susceptibilidad y bandas de ADNp presentes en las cepas estudiadas fueron analizados a través de estadísticos descriptivos como frecuencias y reportándose la distribución porcentual de la susceptibilidad a los diferentes fármacos ensayados en las cepas de *S. aureus* estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas estudiadas mostraron resistencia completa a: Penicilina 44%, Oxacilina 20%, Tetraciclina 12%, Eritromicina y Amikacina 8%, Rifampicina, Kanamicina, Clindamicina y Ciprofloxacina 4% cada una (TABLA I). Así mismo se observó un elevado porcentaje de cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a: Eritromicina (76%), Clindamicina (40%), Ciprofloxacina (44%), Oxacilina (20%), poco frecuente fueron cepas con resistencia intermedia a: Amikacina, Kanamicina (12% cada una) y para Tetraciclina y Cloranfenicol (8% cada una) (TABLA I). Todos los *S. aureus* aislados fueron 100% sensibles a: Imipenem, Trimetropim-Sulfametoxazole y Gentamicina, y alrededor del 90% fueron sensibles a: Rifampicina, Vancomicina y Cloranfenicol.

Entre los fenotipos de los *S. aureus* aislados de los quesos, se observaron veintidós (22) patrones de resistencia diferentes, encontrándose el patrón Pen^R-Ox^R-Er^I común para dos de las cepas que procedían de quesos diferentes (TABLA I). Entre estos patrones se evidenció que el 56% de los aislados de *S. aureus* eran multiresistentes, considerando en este estudio como *multiresistencia* cepas con resistencia intermedia o completa a tres o más antibióticos de diferente familia. Sólo dos de los aislados de *S. aureus* (8%) no presentaron resistencia a ningún antibiótico, hecho que no suele suceder en cepas de *S. aureus* de origen hospitalario y/o comunidad [1, 3, 8, 17, 18].

TABLA I
FENOTIPOS Y PERFIL DE DNA PLASMÍDICO EN LAS CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS DE LOS QUESOS

Código	Perfiles de resistencia	SARM	β-Lactamasas	Perfiles plasmídicos (kpb)	CIM (µg/mL)					
					Pen G	OX	Ak	CC	TE	E
*Mt-01	P ^R -E ^I	ND	-	27,821	≤6	-	-	-	-	≤15
*Mt-02	E ^I -K ^I -AK ^R	ND	ND	27,821	-	-	31,25	-	-	-
*PI-01	P ^R -CIP ^I -CC ^I -E ^I -AK ^I	ND	-	23,132; 2,295	≤6	-	31,25	10,31	-	≤15
*PI-02	P ^R -TE ^R -CIP ^I -CC ^I -E ^R -KN ^I -AK ^R	ND	+	23,132	8,436	-	31,25	40,31	60,0	90,0
*PI-03	P ^R -CIP ^I -CC ^I -OX ^R	-	-	23,132	≤6	5,0	-	45,0	-	-
*Sdf-01	C ^I -E ^I	ND	ND	23,132	-	-	-	-	-	≤15
*Sdf-02	P ^R -OX ^I -E ^I	-	-	23,132	≤6	<0,625	-	-	-	≤15
*Sdf-03	•	ND	ND	23,132; 2,13	-	-	-	-	-	-
*Sdf-04	CIP ^I -CC ^I -OX ^I -E ^I	-	ND	23,132; 2,13	-	4,53	-	-	-	≤15
*Sdf-05	TE ^I -CIP ^I -CC ^I -E ^I	ND	ND	23,132; 2,791; 2,13	-	-	-	10,31	60,0	≤15
**Am-01	P ^R -OX ^R -E ^I	-	+	34,357	7,218	<0,625	-	-	-	≤15
**Am-03	E ^I	ND	ND	>34,00; 27,821; 3,657; 2,723	-	-	-	-	-	≤15
*Md-01	P ^R -CIP ^I -CC ^R -OX ^R -E ^R -KN ^R	-	+	ND	7,218	1,093	-	45,0	-	≤15
*Md-02	TE ^R -E ^R -AK ^I	ND	ND	>34,00; 27,821; 3,657	-	-	31,25	-	195,0	75,0
*Md-03	CIP ^I -E ^I	ND	ND	>34,00; 27,821; 3,657	-	-	-	-	-	≤15
**Mn-02	CIP ^I -CC ^R -OX ^R	-	ND	>34,00; 34,357	-	<0,625	-	45,0	-	-
**Mn-03	P ^R -OX ^R -E ^I	-	+	>34,00; 34,357	≤6	<0,625	-	-	-	>210
**Mn-04	P ^R -TE ^R -CIP ^I -E ^I	ND	-	>34,00; 27,821	≤6	-	-	-	170,0	≤15
**Mn-05	P ^R -RA ^R -Er ^R -Kan ^I -AK ^I	ND	+	>34,00; 23,268	140	-	31,25	-	-	30,0
**Mz-01	CIP ^I -C ^I -E ^I	ND	ND	27,821	-	-	-	-	-	≤15
**Mz-02	CC ^I -E ^I	ND	ND	23,132; 2,13	-	-	-	45,0	-	≤15
**Mz-03	TE ^R -OX ^I -CC ^I -E ^I	-	ND	23,132	-	<0,625	-	45,0	7,0	≤15
**Pt-01	CIP ^I -CC ^I -OX ^I -E ^I	-	ND	33,219; 2,295	-	<0,625	-	10,31	-	≤15
**Pt-02	•	ND	ND	23,132	-	-	-	-	-	-
**Pt-03	P ^R -CIP ^R -VA ^I -CC ^I -OX ^I -E ^I	+	+	18,942	≤6	6,56	-	10,31	-	30,0

P: Penicilina; TE: Tetraciclina; CIP: Ciprofloxacina; C: Cloranfenicol; RA: Rifampicina; VAN: Vancomicina; CC: Clindamicina; OX: Oxacilina; E: Eritromicina; KN: Kanamicina; AK: Amikacina. R: Resistencia; I: Resistencia Intermedia; ? : Sensible a todos los antibióticos probados; +: Producción; -: No producción; ND: No determinado; •: Queso No pasteurizado; * : Queso pasteurizado.

De las cepas de *S. aureus* que mostraron resistencia completa e intermedia a Oxacilina en la prueba difusión disco-placa (TABLA I), sólo una aislada de un queso pasteurizado fue confirmada como *SARM* y estuvo asociada con resistencia a otros fármacos antiestafilocócicos no betalactámicos tales como: Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina y Ciprofloxacina (TABLA I), fenotipos adjuntos que han sido reportados ampliamente para este tipo de cepas y reconocida por primera vez como el clon Ibérico reportados en hospitales [8, 19, 35]. En este orden, se pudo encontrar que la CIM de Oxacilina para la cepa *SARM* fue de 6,56 µg/mL y para el resto de las cepas analizadas para este fenotipo las CIMs se enmarcaron en un rango desde < 0,625 hasta 5 µg/mL, considerando resistentes aquellas con CMI ≥ 4 µg/mL (TABLA I) [6].

Los fenotipos de resistencias a Oxacilina hallados son similares a los reportados por autores regionales, nacionales e internacionales en ambientes intrahospitalarios [1, 3, 17, 18, 28, 29, 32, 38]. Igualmente existe concordancia entre los resultados obtenidos respecto a lo reportados por otros autores para *S. aureus* aislados de manipuladores de alimentos [13, 33, 39]. Aunque en los últimos años también se han reportado *SARM* en granjas, la procedencia de las cepas halladas entre los quesos puede ser atribuida a sus manipuladores por su amplia diseminación en comunidad [34, 40] y se les ha asociado a brotes de toxiinfecciones alimentarias [18]. Por otro lado, cepas con estos fenotipos también se reportan en aislados de vacunos [10] por lo que no se descarta que las cepas Sdr-04 y PI-03 (TABLA I) sean de procedencia vacuna ya que éstas fueron aisladas de dos quesos de manufactura artesanal.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a Penicilina en el ensayo de difusión disco-placa resultaron tener CIMs oscilantes entre menos de 6 µg/mL hasta valores de 140 µg/mL. Un grupo de las mismas (Am-01; Md-01; Mn-03; Mn-05; PI-02; Pt-03, TABLA I) tuvieron la habilidad de producir enzimas β-lactamasas, capacidad fisiológica que señala la amplia capacidad de las cepas de resistir a antibióticos β-lactámicos; mientras que no fue detectable la producción de esta enzima para otro grupo de cepas. Estos fenotipos han sido reportados en aislados de *S. aureus* de ambientes clínicos a nivel mundial [3, 18, 32].

Se observó una CIM en común de 31,25 µg/mL para Amikacina en las cepas ensayadas (TABLA I), éstas pudieron ser categorizadas como cepas con resistencia intermedia a la Amikacina según lo establecido por el CLSI, (2009) [6]. No existen reportes que permitan comparar este resultado con los obtenidos en la región zuliana por otros autores. En el campo de la terapéutica. la Amikacina no es un fármaco de primera elección que se recomienda en paciente con infecciones cuyo agente etiológico sea *S. aureus* porque su efectividad sólo se ve favorecida por un efecto sinérgico cuando se combina con glicopéptidos; esto explica el por qué es poco frecuente encontrar cepas resistentes a tal fármaco [12]. Las CIMs para Clindamicina determinadas en las cepas estudiadas estuvieron enmarcadas entre 10,31 y 45 µg/mL (TABLA I), consideradas to-

das resistentes al antibiótico [6]. Estos rangos son comparables y están dentro de los que se reporta en cepas de *S. aureus* de ambientes nosocomiales [3, 18].

Las CIMs halladas para Tetraciclina en las cepas estudiadas fluctuaron entre 4 µg/mL hasta concentraciones que alcanzaron los 195 µg/mL del antibiótico (TABLA I), lo que las define como resistentes [6]. Las CIMs encontradas entre 60-195 µg/mL (TABLA I) son superiores a algunos reportes para aislados de *S. aureus* de ambientes intrahospitalarios [18], y en aislados de vacas mástíticas [32]. En el caso de la Eritromicina, las CIMs halladas fueron variables entre las cepas estudiadas, un grupo de éstas estuvieron por debajo de la concentración inicial evaluada (15 µg/mL) y otras mayores a la concentración final (210 µg/mL) (TABLA I). Las primeras no pudieron ser caracterizadas sus CIMs exactas, sin embargo el resto de las cepas se denominan resistentes ante Eritromicina [6]. Los valores hallados, son elevados si se compara con lo que reportan otros autores para cepas de *S. aureus* aisladas de ambientes nosocomiales y veterinarios [3, 18, 32].

El perfil de ADNp entre los aislados de *S. aureus* (FIG. 1) reveló cepas con sólo una banda plasmídica: 45,83%; con dos bandas: 33,33%; con tres bandas: 16,66% y con cuatro bandas: 4,16%. Los tamaños de estas bandas plasmídicas oscilaron entre 2,130 kpb y >34,00 kpb. Todos los aislados presentaron en común una banda plasmídica con un tamaño que oscilaba entre 23,00-27,82 kpb, y en al menos siete cepas de *S. aureus* se presentó una banda plasmídica con escasa movilidad en el gel de agarosa (cepas: Am-03; Md-02; Md-03, Mn-02, Mn-03, Mn-04, Mn-05 en FIG. 1) lo que dificultó calcular con exactitud su tamaño molecular, y por lo que se consideró como una banda con un peso >34 kpb tomando en cuenta una banda menor que ésta, cuyo peso estimado era de 34,357 kpb, la cual estuvo presente en tres cepas. Bandas plasmídicas muy pequeñas fueron observadas en nueve cepas cuyos tamaños estuvieron en el orden de 2,130 y 3,657 kpb, éstas además llevaban adjunta bandas de mayor tamaño que oscilaron entre 18,942 a 34,35 kpb. En otros casos, se detectaron cepas de *S. aureus* que portaban sólo una banda plasmídica y los pesos moleculares de estos plásmidos oscilaron entre 18,942 a 34,35 kpb (FIG. 1). Los perfiles plasmídicos obtenidos revelaron tamaños variables que han sido reportados en aislados clínicos que llevan consigo marcadores de resistencia a metales pesados, antibióticos, bromuro de etidio y amonios cuaternarios [1, 8, 20, 34, 36]. También en cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos implicadas en enfermedades mastíticas y aisladas en leches se han reportado plásmidos parecidos [9, 25, 27,].

De las cinco cepas de *S. aureus* sometidas a un crecimiento en condición de elevada temperatura (45°C), dos colonias derivadas de la cepa Mt-01 (identificadas como Mt-01.1 y Mt-01.2), perdieron el fenotipo P^R, mientras que la permanencia del fenotipo E^I se hizo presente en las mismas. En ambas colonias pudo observarse la pérdida de la capacidad de produ-

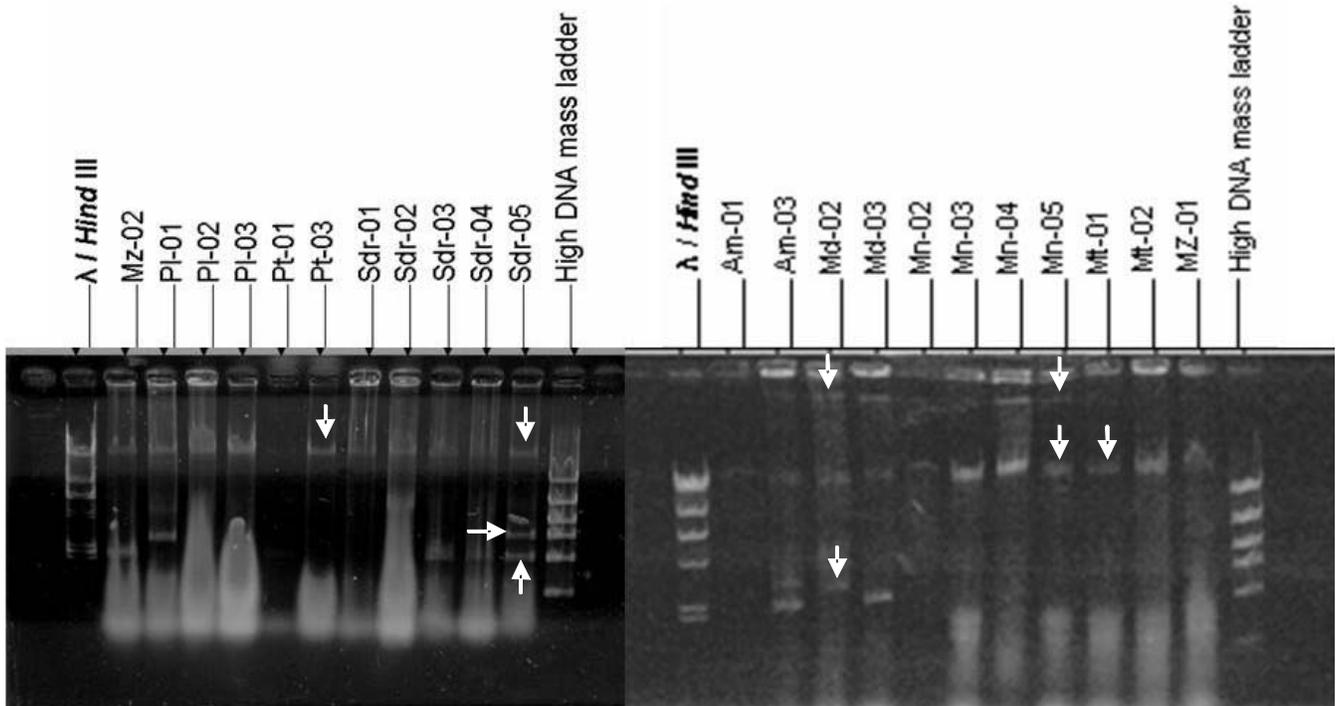


FIGURA 1. PERFIL DE DNA PLASMÍDICO OBSERVADOS EN LAS CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS DE LOS QUESOS. LAS FLECHAS SEÑALAN LOS DNAP QUE FUERON OBSERVADAS EN LAS CEPAS PARENTALES SOMETIDAS A ELIMINACIÓN DE DNAP.

cir la enzima β -lactamasa, lo que se correlaciona directamente con el nuevo fenotipo de sensibilidad a la Penicilina. Al mismo tiempo se precisó un cambio en el perfil plasmídico de estas colonias, observándose la pérdida de la única banda plasmídica (de 27,821 kpb, FIG. 2) que llevaba la cepa silvestre Mt-01 antes del tratamiento térmico, lo cual sugiere que el marcador molecular que confería la capacidad de producir β -lactamasas y por consiguiente el fenotipo de P^R , estaba ubicado en esa banda plasmídica perdida, mientras que para el fenotipo E^R el elemento molecular responsable aparentemente estuvo ubicado a nivel cromosomal [20]. La localización en plásmidos de genes que confieren resistencia a Penicilinas, como el gen *blaZ*, por ejemplo, muchas veces están relacionados con elementos transponibles que son ampliamente reportados en cepas de *S. aureus* [8, 30].

En dos de las colonias seleccionada post-tratamiento térmico de la cepa Sdr-05 el fenotipo TE^R fue permanente en la colonia Sdr-05.1, mientras que la colonia Sdr-05.2 lo perdió. A su vez, los fenotipos CIP^I y CC^I y la pérdida de E^I se observó en ambas colonia. El perfil plasmídico de estas colonias tratadas reflejó la pérdida de dos bandas plasmídicas pequeñas, con tamaños de 2,791 y 2,130 kpb (FIG. 2). La inserción del determinante de resistencia a Tetraciclina al cromosoma en la colonia Sdr-05.1 puede explicar la permanencia de la resistencia a Tetraciclina, mientras que el mismo determinante pudo haber estado ubicado en una de las bandas plasmídicas perdidas durante el tratamiento con la elevada temperatura en la colonia Sdr-05.2, la cual se sensibilizó a la Tetraciclina.

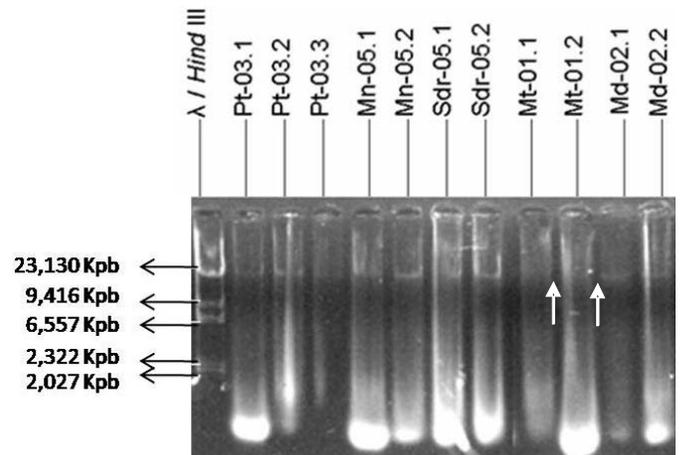


FIGURA 2. VISUALIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS EXTRAÍDOS DE LAS CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS DE LOS QUESOS Y CRECIDAS A ALTA TEMPERATURA (45°C). LAS FLECHAS SEÑALAN LA AUSENCIA DEL PLÁSMIDO DE 27,821 kb. Y QUE FUERON OBSERVADAS EN LA CEPA PARENTAL Mt-01.

En cepas Gram positivas, como *S. aureus*, se ha reportado que los genes *tetK* y *tetL* intervienen en los mecanismos de resistencia a Tetraciclinas en aislados de humanos y bovinos, los cuales además residen en plásmidos pequeños de la familia pT181, que pueden ser incorporados a grandes plásmidos o al mismo nucleoide, probablemente por transposición mediada por el elemento de inserción IS257 [15, 31, 41]. Estos

eventos moleculares pueden explicar por qué permanece o no la resistencia a Tetraciclina en las dos colonias antes mencionada, aún cuando desaparecen las mismas bandas plasmídicas pequeñas. El efecto de la pérdida de la resistencia a Eritromicina también pudiera estar asociado con la pérdida de una de las dos bandas plasmídicas pequeñas ya mencionadas, ya que en citas anteriores se reportan plásmidos con tamaños similares a los aquí reportados como moléculas portadoras de algún gen que codifica para mecanismos de resistencia a Eritromicina [37].

Las dos colonias evaluadas de la cepa Md-02 (Md-02.1 y Md-02.2), luego del tratamiento térmico perdieron su fenotipo E^R, mientras que se mantuvieron los fenotipos AK^I y TE^R en ambas colonias. El perfil plasmídico de estas cepas evidencia la pérdida de una banda plasmídica cuyo tamaño era de 3,65 kpb (FIG. 2), la cual se correlacionó en ambos casos con la pérdida del fenotipo de resistencia a Eritromicina en las cepas sometidas a la eliminación de plásmidos. Este resultado coincide con lo reportado por Udo y col. [37], quienes consiguieron un plásmido de 3 kpb movilizado, donde residía un marcador molecular que confiere resistencia a Eritromicina en *S. aureus*, luego de un ensayo por conjugación.

En la cepa Mn-05, las dos colonias derivadas del tratamiento térmico (Mn-05.1 y Mn-05.2), no mostraron cambios en sus fenotipos: P^R, RA^R y E^R, al igual que los fenotipos KN^I y AK^I. Asimismo, estas colonias posteriores al tratamiento térmico mantuvieron su capacidad de producir β -lactamasas. El perfil plasmídico de estas colonias mostró la permanencia de la banda de ADNp de 23,268 kpb (FIG. 2), esta persistencia de banda plasmídica ha sido observada en ensayos de curación por Álvarez y col. en cepas clínicas [34], mientras que la resistencia a Eritromicina igualmente se encuentra a nivel cromosomal, como lo reportan otros autores [20]. De la misma manera, también se infiere que las colonias Mn-05.1 y Mn-05.2 contienen determinantes de resistencia para los aminoglicósidos, ubicados éstos en el cromosoma bacteriano, aunque no se descarta que la banda plasmídica de 27,821 kpb., pueda estar asociada también a otros marcadores como los de resistencia a aminoglicósidos, tal como se ha descrito [20]. La desaparición de la banda plasmídica >34,00 kpb no tuvo ningún efecto sobre los fenotipos de resistencia estudiados, pudiendo estar involucrados en otras actividades fisiológicas no consideradas en este estudio.

La transferencia genética horizontal es un evento donde las bacterias en proximidad estrecha entre sí pueden compartir información genética a través de mecanismos tales como conjugación, transducción o transformación [34, 37]. Tales eventos pueden servirles para adquirir capacidades que les permitan resistir el efecto bactericida o bacteriostático que suelen tener los antibióticos de uso común para erradicarlos. Es por ello que hoy se reconoce esta transferencia horizontal como un medio importante para el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos entre bacterias patógenas. Actualmente se sabe que la transmisión de genes de resistencia puede ocurrir

incluso entre especies bacterianas no emparentadas lo que hace aún más preocupante el problema de diseminación de genes sobre todo cuando la transferencia ocurre entre el patógeno y bacterias con conocidos efectos benéficos para el hombre generalmente presentes en alimentos. Estas interacciones permiten entonces que bacterias inocuas se conviertan en agentes reservorios de genes que pueden desencadenar la diseminación desmedida de éstos mecanismos de resistencia [30, 34].

Los resultados mostrados en este estudio hacen presumir que los eventos antes mencionados ocurren en el entorno, y hasta hoy han sido ignorados, por lo cual es necesario hacer programas de vigilancia debido a que son fenómenos que comprometen la salud pública. Usualmente, para el tratamiento de una infección causada por un germen resistente probablemente requiere que el paciente sea internado en un recinto hospitalario antes que ocurra una sepsia, y por lo general se recurre a la aplicación de fármacos antimicrobianos muy costosos y tóxicos para el paciente lo que se traduce en un incremento de los gastos de atención a la salud que algunas veces son costeadas por la nación y otras por sus propios familiares.

CONCLUSIONES

Los resultados evidencian que los quesos estudiados actúan como vehículos de transmisión de cepas de *S. aureus* foráneos resistentes a antibióticos hacia quienes los manipulan y/o consumen, causando gran impacto a la salud pública si se toma en cuenta la capacidad que tiene éstas de resistir a altas concentraciones de antibióticos. Por otro lado, se revela que bandas de ADNp presentes en algunas cepas de *S. aureus* analizadas portan marcadores moleculares que son responsables de la resistencia a algunos de los antibióticos ensayados contra éstas; esto se debe considerar de relevante atención cuando se entiende que los plásmidos son elementos extracromosomales que pueden ser transmisibles de manera vertical u horizontal (intra e inter especies bacterianas) y contribuyen con la diseminación de genes que confieren resistencia a antibióticos.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el financiamiento de esta investigación (CC-0157-07).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVAREZ, M.; ATENCIO, L.; GUIÑEZ, J.; SUÁREZ, J. Análisis del perfil plasmídico de cepas de *S. aureus* multiresistentes a antibióticos y metales pesados. **Bol. del Centro de Invest. Biol.** 36: 79-93. 2002.

- [2] ASHESHOV, E. Loss of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* resulting from growth at high temperature. **J. Gen. Microbiol.** 42: 403-410. 1966.
- [3] ATENCIO, L.; ÁLVAREZ, M.; GUIÑEZ, J.; MONTIEL, X.; BRACHO, M. *Staphylococcus aureus*: sensibilidad a antibióticos, metales pesados y patrón plasmídico. **Cien.** 13: 5-13. 2005.
- [4] AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D.; SEIDMAN, J.; SMITH, J.; STRUHL, K. Short Protocols in molecular Biology. **A Compendium of Methods from Currents Protocols in Molecular Biology**. 5th Ed. Wiley Published by Jhon Wiley & Sons, Inc. 2/13-2/14 pp. 2002.
- [5] CHARTONE, E. Las bacterias resistentes, una guerra casi perdida. **Cien. Hoy.** 9: 30-36. 1999.
- [6] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard-10th Ed. Document M02-A10. Wayne, PA. 52 pp. 2009.
- [7] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. (COVENIN). ALIMENTOS. AISLAMIENTO Y RECuento DE *Staphylococcus aureus*. COVENIN 1292-04. Ministerio de Fomento. Editorial FONDONORMA. 13 pp. 2004.
- [8] DOMÍNGUEZ, M.; PUJOL, M. Cambios en la epidemiología de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Recomendaciones para el control de su diseminación. Control de Calidad del Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Bellvitge y Hospital de Llobregat. 8 pp. 2004.
- [9] DOS SANTOS N., J.; DOS SANTOS, KR.; GENTILINI, E.; SORDELLI, D.; DE FREIRE BASTOS, C. Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. **Vet. Microbiol.** 85: 133-44. 2002.
- [10] DUIJKEREN, E.; BOX, A.; HECK, M.; WANNET, W., FLUIT, A. Methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from animals. **Vet. Microbiol.** 103: 91-97. 2004.
- [11] FARÍA, J.; GARCÍA, A.; IZQUIERDO, P.; ALLARA, M.; VALERO, K. Aislamiento de bacterias Gram positivas de leche cruda con residuos antibacterianos. **Arch. Latinoam. de Nutr.** 52: 68-73. 2002.
- [12] FARIÑA, M.; ÁLVAREZ, L. Tratamiento antibiótico de la infección grave de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina. **Rev. Electr. de Med. Intens.** 4: 1-5. 2004.
- [13] FIGUEROA, G.; NAVARRETE, P.; CARO, M.; TRONCOSO, M.; FAUNDEZ, G. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. **Ver. Med. Chil.** 130: 859-864. 2002.
- [14] GACETA OFICIAL DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA. Resolución 604 del Ministerio de Sa-
- lud. AÑO CXXXIII MES III. Número 38.348. Caracas-Venezuela. 2006.
- [15] GILLESPIE, M.; LYON, B.; LOO, L.; MATHEWS, P.; STEWART, P.; SKURRAY, R. Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. **FEM Microbiol. Lett.** 43:165-171. 1987.
- [16] GONZÁLEZ, M. Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt. Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación/Autoridad de la Micro, Pequeña y Mediana Empresa. Soná, Veraguas-República de Panamá. Suplemento del SENACYT. 16 pp. 2002.
- [17] HSUEH, P.; TENG, L.; CHEN, W.; PAN, H.; CHE, M.; CHANG, S.; LUH, K.; LIN, F. Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing nosocomial infections at a University Hospital in Taiwan from 1986-2001. **Antimicrob. Agents and Chemoth.** 48: 1361-1364. 2004.
- [18] JONES, T.; KELLUM, M.; PORTER, S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerg. Infect. Dis.** 8: 82-84. 2002.
- [19] LARENAS, C. Evaluación de susceptibilidad *in Vitro* de *Staphylococcus* spp. **Rev. Chil. de Infect.** 19: 116-118. 2002.
- [20] LYON, B.; SKURRAY, R. Resistance of *S. aureus*: genetic basis. **Microbial Rev.** 51: 88-134. 1987.
- [21] MACFADDIN, J. β -lactamase test. In: **Biochemical test for identification of medical bacteria**. 3rd Ed. United State of America. Editorial Lawrence McGrew. 254-272 pp. 2000.
- [22] MACRINA, F., WOOD, P.; JONES, K. Simple method for demonstrating small plasmid deoxyribonucleic acid molecules in oral Streptococci. **Appl. Environ. Microbiol.** 39: 1070-3. 1980.
- [23] MANIATIS, T.; FRITSCH, E.; SAMBROOK, J. **Molecular Clonig: A Laboratory Manual**. Vol I. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 545. pp. 1982.
- [24] MUJICA, I.; DÍAZ, L.; GUIÑEZ, J.; RIVERA, J.; GIMÉNEZ, C.; ATENCIO, L. Multiresistencia a antibióticos y patrón de plásmidos en *Micrococcus* spp. aislados de quesos provenientes de expendios comerciales del Estado Zulia, Venezuela. **Cien.** 15: 349-356. 2007.
- [25] OMBUI, J.; KIMOTHU, A.; NDUHIU, J. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. **East African Med. J.** 77: 463-467. 2000.
- [26] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN/ ORGANIZA-

- CIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Codex Alimentarius**. Vol. 1-7. Secretaria del programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, FAO. Roma. 123 pp. 1994.
- [27] PICCINI, R.; ZECCONI, A. Relationship among plasmids recovered from *Staphylococcus aureus*, milk leukocytes, and antimicrobial resistance. **J. Dairy Sci.** 84: 2641-2648. 2001.
- [28] PINEDA, M.; BONILLA, X.; VARGAS, J. **Boletín sobre etiología y resistencia bacteriana**. 5^{ta} Ed. Centro de Referencia Bacteriológica-Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo – Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social. 68 pp. 2002.
- [29] PINEDA, M.; BONILLA, X.; VARGAS, J. **Boletín sobre etiología y resistencia bacteriana**. 2^{da} Ed. Centro de Referencia Bacteriológica-Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. 68 pp. 2001.
- [30] RAHMAN, M.; KHAN, A.; SHAHJAHAN, M.; DIPAK, K.; PERVEZ, H. Antibiotic susceptibility and R-plasmid mediated drug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Med. J. of Islam. World Acad. of Sci.** 15: 111-116. 2006.
- [31] ROUCH, D.; SKURRAY, R. *IS257* from *Staphylococcus aureus*: member of an insertion sequence superfamily prevalent among Gram-positive and Gram negative bacteria. **Gene**. 76: 195-205. 1989.
- [32] SADER, H.; JONES, R.; ANDRADE-BAIOCCHI, S.; BIEDENBACH, D. Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. **Diag. Microbiol. and Infect. Dis.** 44: 273-280. 2003.
- [33] SCHULTZ, P.; SMITH, K.; HOGAN, J.; LOVE, B. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Vet. Microbiol.** 102: 33-42. 2004.
- [34] SILBERGELD, E.; DAVIS, M.; LEIBLER, J.; PETERSON, A. One reservoir: Redefining the community origins of antimicrobial-resistant infections. **Med. Clin. N. Am.** 92: 1391-1407. 2008.
- [35] TORROBA, L.; RIVERO, M.; OTERMIN, I.; GIL, A.; IRUIN, A.; MARAVÍ-POMA, E.; GARCÍA, J. Resistencia antimicrobiana y política de antibióticos: SARM, GISA y VRE. **Anal. Sist. Sanit. de San Navarra.** 23: 69-80. 2000.
- [36] UDO, E.; JACOB, L.; MATHEW, B. Genetic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing high- and low-level mupirocin resistance. **J. Med. Microbiol.** 50: 909-15. 2001.
- [37] UDO, E.; JACOB, L. Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance and the mobilization of non-conjugative plasmids in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resist.** 4: 185-93. 1998.
- [38] VELAZCO, E.; NIEVES, B.; ARAQUE, M.; CALDERAS, Z. Epidemiología de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en una unidad de alto riesgo neonatal. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.** 20: 321-325. 2002.
- [39] VINTOV, J.; MØLLER, F.; ELSBERG, C.; ELMERDAHL, J. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Vet. Microbiol.** 95:133-147. 2003.
- [40] WITTE, W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. **Infect. Genet. and Evolut.** 4: 187-191. 2004.
- [41] YAZDANKHAH, S.; SØRUM, H.; OPPENGAARD, H. Comparison of genes involved in penicillin resistance in staphylococci of bovine origin. **Microbiol. Drug Resist.** 6: 29-36. 2000.