

Multiresistencia a antibióticos y patrón de plásmidos en *Micrococcus* sp. aislados de quesos provenientes de expendios comerciales del estado Zulia, Venezuela

Isabel Mujica¹, Laugeny Díaz-Borrego¹, Jorge Guiñez-Ortega², Jhoandry Rivera-Salazar¹, Carlos Giménez-Alvarado³ y Lorena Atencio-Bracho^{1*}

¹Laboratorio de Genética y Biología Molecular (LGBM), ²Laboratorio de Antígenos Bacterianos, ³Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BioVeLUZ). Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, 4001-A Venezuela.

Recibido: 04-11-05 Aceptado: 30-05-07

Resumen

Micrococcus sp. es una bacteria ubicua en numerosos ambientes, pertenece a la flora normal en los mamíferos, y se ha encontrado en alimentos. Esta bacteria saprófita puede actuar como reservorio de genes de resistencia a antibióticos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la multiresistencia a antibióticos y el patrón plasmídico en cepas de *Micrococcus* sp. aisladas de quesos artesanales e industriales provenientes de establecimientos comerciales ubicados en los Municipios Maracaibo y San Francisco-Estado Zulia. Se identificaron 29 cepas de *Micrococcus* sp., obteniéndose el mayor número de aislados de queso duro artesanal (58,62%) consumido en alto grado en el Zulia, siendo el 37,93% de las cepas multiresistentes a los antibióticos ensayados. Los porcentajes de resistencia que se obtuvieron fueron E>RA>NEO>VA=OX. El 79,31 % de las cepas mostraron plásmidos, con tamaños entre 1,254 y > 23,130 kpb, observándose que el 62,07% de los aislados presentó sólo una banda plasmídica. Los resultados demuestran que existe un alto porcentaje de cepas de *Micrococcus* sp. aisladas de quesos con resistencia a los antimicrobianos, la cual podría diseminarse a otras poblaciones bacterianas. Esto genera un alerta en cuanto al uso inadecuado y extendido de los tratamientos con antimicrobianos contra infecciones ocasionadas por el consumo de alimentos contaminados.

Palabras clave: *Micrococcus*, plásmidos; quesos; resistencia antibiótica.

Antimicrobial multiresistance and plasmid profile in *Micrococcus* sp. isolated from cheeses for commercial establishments of Zulia State, Venezuela

Abstract

Micrococcus sp. is an ubiquitous bacterium in numerous environments, belongs to the normal flora in the mammals, and has been found in food. This saprophytic bacteria maybe acts a gene resistance plasmids reservoir. The aim of this research was the antibiotic multiresistance evaluation and the plasmidic profile in *Micrococcus* strains isolated of handcrafted and ma-

* Autor para la correspondencia. E-mail: lbatencio@yahoo.com

nufacturers cheeses of commercial establishments located in the Maracaibo and San Francisco Municipality, Zulia State. 29 *Micrococcus* strains were identified, the highest number being obtained of isolated of dry handcrafted cheese (58,62%) consumed in high degree in the Zulia State, being 37,93% of the strains multiresistant to the tested antibiotics. The percentages of resistance that was obtained were E>RA>NEO>VA=OX. 79,31% of the strains showed plasmids, with sizes between 1,254 and >23,130 kpb, being observed that 62,07% of the isolated showed a unique plasmidic band. The results demonstrate that exists a high percentage of Cheese *Micrococcus* strain with antimicrobial resistance, which might be spread to other bacterial populations. This generates an warning results for the inadequate and widespread use of the treatments with antimicrobial against infections caused by the consumption of contaminated food.

Key words: Antimicrobial resistance; cheeses; *Micrococcus* sp.; plasmids.

Introducción

Pocos estudios han sido reportados sobre los genes involucrados en la resistencia a antibióticos en el género *Micrococcus*, a pesar de ser una bacteria muy abundante en la naturaleza, presente en polvo y agua, así como también en utensilios y equipos empleados en alimentación, que no han sido higienizados adecuadamente (1). También se les ha aislado de hortalizas secas, huevos desecados, cereales, leche cruda y leche pasteurizada, entre otros (2,3). Ocasionalmente pueden aislarse de muestras clínicas humanas, como bacteria oportunista, en infecciones de piel y membranas mucosas principalmente (4).

Algunos estudios realizados en alimentos, reportan cepas de *Micrococcus* sp. resistentes a antibióticos como carbenicilina, cloxacilina, cefaloridina, novobiocina y vancomicina, entre otros (5-6).

En Venezuela, y especialmente en la región zuliana, un 55% de la leche que se produce es destinada a la elaboración de quesos, y cerca de un 40% de ésta es usada de forma cruda para la producción de queso artesanal (7), por lo que es importante detectar la presencia de *Micrococcus* sp. y otros patógenos resistentes a los antibióticos en este tipo de muestras.

Por otra parte, la determinación de plásmidos en *Micrococcus* sp. aislados de muestras ambientales ha sido reportada,

indicando que el tamaño de los plásmidos involucrados en la resistencia antibiótica, pueden oscilar entre 2 y 51 kpb (6, 8-10).

El interés del estudio de los plásmidos presuntamente implicados en la resistencia antimicrobiana, yace en el hecho de que este microorganismo puede actuar como diseminador de genes de resistencia que pueden ser transferidos a otros microorganismos patógenos presentes en el queso, ocasionando un problema de salud pública. Los trabajos de Verma y col., 1989 (11) y Luna y col., 1999 (12) comprueban, mediante experimentos de transformación y conjugación, la transferencia de genes de resistencia a estreptomycin y eritromycin respectivamente, a partir de cepas de *Micrococcus* sp. a otros grupos bacterianos.

En base a lo expuesto anteriormente, el objetivo de esta investigación fue evaluar la multiresistencia a los antibióticos y el patrón de plásmidos en cepas de *Micrococcus* sp. aisladas de queso, como un trabajo preliminar que permitirá posteriormente indagar sobre la relación de estos elementos genéticos con la portación de resistencia a antibióticos y su diseminación en la población bacteriana.

Materiales y Métodos

Población de estudio: Se estudiaron cepas de *Micrococcus* sp., las cuales fueron aisladas a partir de 30 muestras de quesos procesados industrial y artesanalmente (Ta-

Tabla 1

Procedencia de los aislados de *Micrococcus* sp. a partir de diferentes tipos de quesos de procesamiento artesanal e industrial.

Tipo de Queso	Número de Cepas aisladas	% de Aislamiento
Queso Duro (A)	17	58,62
Queso Semi Duro (A)	1	3,45
Queso Palmita (A)	2	6,90
Queso de Matera (A)	3	10,34
Queso de Mano (I)	3	10,34
Queso Amarillo (I)	3	10,34

Queso Artesanal: A; Queso Industrial: I. Aislamiento en medio Agar Manitol Salado al 10% de NaCl.

bla 1) los cuales fueron obtenidos de diferentes establecimientos comerciales ubicados en los Municipio Maracaibo y San Francisco del Estado Zulia, Venezuela.

Colección de las muestras de quesos y aislamiento de las cepas: Las muestras de quesos (250 g aprox.) debidamente identificadas y refrigeradas fueron transportadas al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia para ser procesadas inmediatamente.

Se procesaron 10 g de cada uno de los quesos y se colocaron en 90 mL de agua peptonada al 0,1% (13). Una vez homogéneas las muestras, se sembraron en placas de agar manitol salado con NaCl al 10%, e incubaron a 37°C por 24 horas, hasta el crecimiento de las colonias bacterianas. Las colonias blancas y pequeñas presuntivas de *Micrococcus* sp., no fermentadoras del manitol (14), se inocularon en caldo nutriente a 37°C por 24 horas, para posteriormente ser almacenadas a -20°C en glicerol al 20% (15).

Identificación y caracterización de los aislados: Se realizó una caracterización macro y micro-morfológica de las colonias bacterianas, así como su identificación taxonómica, para lo cual se emplearon pruebas bioquímicas reportadas en la literatura (14).

Sensibilidad a antibióticos: Para evaluar la sensibilidad a antibióticos, se utilizó el sistema de prueba de susceptibilidad de difusión de discos de antibióticos (16) empleando los siguientes antibióticos manufacturados por Difco (Dispens-O-Disc Susceptibility Test System). Para la selección de los antibióticos se siguieron las recomendaciones de Sharma y Anand (5) y Sharpes y Holt (17): Eritromicina (15 µg) (E), Estreptomina (10 µg) (S), Penicilina G (10 U) (P), Oxacilina (1 µg) (OX), Tetraciclina (30 µg) (TE), Carbenicilina (100 µg) (CB), Cloranfenicol (30 µg) (C), Neomicina (5 µg) (NEO), Vancomicina (30 µg) (VA), Kanamicina (30 µg) (K), Rifampicina (5 µg) (RA), Ceftriaxone (30 µg) (CRO), Polimixina B (300 U) (Pb). La cepa bacteriana utilizada para el control de calidad del antibiograma fue *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (18).

Extracción de los plásmidos: Se utilizó el protocolo de lisis alcalina modificada (19) empleando lisozima (0,5 mg/mL), para determinar el tamaño y número de las bandas plasmídicas presentes en las cepas bacterianas. La separación y observación de los plásmidos se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% con un marcador de corrida (Gel Loading, Buffer 6X Only High mas SyBr Green 100X) y el marcador de peso molecular (PM) lambda *Hind*III (Sigma), en

una cámara horizontal sumergida con buffer TBE 1X a 60 voltios durante 2 horas con 50 minutos. El ADN fue visualizado en un transiluminador UVP Chromato-Vue modelo TM-36 y fotografiado con una cámara digital FinePix S7000 de Fujifilm. El tamaño de los plásmidos se determinó según publicaciones previas, utilizando la aplicación Origin Lab, Origin Pro 7,5 para Windows (20-22).

Análisis estadístico: Se realizaron cálculos porcentuales para determinar el porcentaje de cepas bacterianas resistentes a los diferentes antibióticos y el porcentaje de los perfiles plasmídicos presentados por las mismas. La prueba de Correlación de Pearson a un nivel de significancia del 95%, se aplicó para comprobar si existe alguna relación entre la resistencia a los antimicrobianos que presenten las cepas con el tipo de quesos.

Resultados y Discusión

Fueron aisladas e identificadas 29 cepas de *Micrococcus* sp., caracterizándose como cocos Gram positivos, presentes principalmente en pares, tétradas o grupos irregulares, usualmente no móviles, ni formadores de esporas. Se caracterizaron por ser aerobios obligados y productores de pigmentos carotenoides, por crecer en presencia de NaCl al 5% con temperatura óptima entre 25°- 37°C. Igualmente, resultaron positivos para las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa (17).

El mayor porcentaje de aislamientos se obtuvo a partir de queso duro artesanal (Tabla 1), se presume que este microorganismo pudo acceder a la leche a través de diferentes fuentes como el agua contaminada, utensilios o equipos sin limpiar, así como mala manipulación por parte de los empleados al momento de procesar el queso, aunque no se descarta la posibilidad de que el queso pudo contaminarse una vez dentro del establecimiento comercial.

En el municipio Maracaibo y San Francisco, son muy frecuentes los establecimientos donde se venden los quesos artesanales, éstos por el tipo de procesamiento tienden a presentar mayor contaminación con algunos microorganismos, lo que pudiera explicar un mayor porcentaje de micrococos en el queso duro. No obstante, se encontraron cepas en quesos procesados industrialmente, lo cual indica que los quesos ya pasteurizados podrían contaminarse post-procesamiento por fuentes externas o que las cepas de *Micrococcus* sp. consideradas como termodúricas, hayan resistido el proceso de pasteurización de la leche.

El estudio de susceptibilidad a antibióticos arrojó que un 37,93% de las cepas se comportaron como multiresistentes, ya que mostraron resistencia a 3 ó más antibióticos, seguido de un 41,38% de cepas resistentes, las cuales mostraron resistencia a 1 ó 2 antibióticos (Tabla 2). La multiresistencia no ha sido reportada previamente en aislados de *Micrococcus* provenientes de quesos.

Se obtuvieron 22 patrones de resistencia diferentes (Tabla 2), siendo muy común en estos patrones E^R con un 44,83%, y E^I con un 24,14%. Este alto porcentaje de cepas con resistencia a que este antibiótico quizás se debe a que es indicado en el tratamiento de infecciones en bovinos, potrillos, cerdos, ovejas, perros y gatos, el cual junto con la Amoxicilina, Tilosina, y Ampicilina tienen mejor difusión a través de la ubre, después de la infusión intramamaria (23).

Con respecto al resto de los antibióticos se observaron porcentajes de cepas resistentes que oscilaron entre 2 y 35% (Tabla 2), coincidiendo con reportes de varios autores (5, 8).

En Venezuela, no se dispone de una reglamentación específica para los límites permisibles de antimicrobianos en leche, tampoco se aplican programas de control, y peor aun, en muchos casos no se realiza la práctica común de retiro de la leche proveniente de animales que se encuentran bajo tratamien-

Tabla 2
Patrones de resistencia a antibióticos y perfiles plasmídicos de cepas de *Micrococcus* sp.
aisladas a partir de quesos.

Numeración de la Cepa	Patrón de resistencia	Tamaños aprox. En pb
1	RA ^R -NEO ^R -E ^I -CB ^I -S ^I	NP
2	E ^R -RA ^R -VA ^R -CRO ^R -K ^I -C ^I -OX-CB-VA ^I	21,572
3	E ^I	> 23,130
4	NEO ^R -TE ^R -VA ^I	NP
5	E ^R -OX ^R	NP
6	RA ^R -NEO ^R -TE ^R -K ^I	20,036
7	E ^R -CRO ^R	> 23,130
8	RA ^R -NEO ^R -CB ^R -VA ^R -S ^I	23,130
9	E ^R -RA ^R -CB ^I -Pb ^I	18,603
10	RA ^R -NEO ^R -E ^I	23,130
11	OX ^R	18,992, 1,870, 1,254
12	RA ^R -NEO ^R -VA ^R -CRO ^R -E ^I -S ^I	18,992, 1,870, 1,254
13	E ^R -VA ^R -K ^R	18,603
14	E ^R -NEO ^R -VA ^R -OX ^I -CRO ^I -K ^I	15,573
*15, 19, 22	E ^R	20,036 – 21,572 – NP
16	E ^R -NEO ^R -OX ^R -CB ^R	19,194, 3,072, 1,935
17	E ^I -RA ^I -CB ^I -S ^I	NP
18	E ^R -RA ^R -NEO ^R -K ^R -S ^R -C ^R	18,603
20	E ^I -RA ^I -CB ^I -S ^I	19,194
21	E ^I -OX ^I	NP
23	Pb ^R -OX ^I	20,036
24	RA ^R -C ^R -E ^I -CB ^I -VA ^I	15,573
25	RA ^R -NEO ^R -TE ^R -OX ^R -CB ^R -CRO ^R -K ^R -E ^I -S ^I	14,254
26	OX ^I	NP
27	RA ^R -OX ^R -CB ^I	> 23,130
28	E ^R -RA ^R -TE ^R -OX ^R -CB ^R -K ^R -S ^R	19,077, 3,310, 2,027
29	E ^R -RA-VA ^R -S ^R -C ^R	20,998

Eritromicina (15 µg) (E), Estreptomicina (10 µg) (S), Oxacilina (1 µg) (OX), Tetraciclina (30 µg) (TE), Carbenicilina (100 µg) (CB), Cloranfenicol (30 µg) (C), Neomicina (5 µg) (NEO), Vancomicina (30 µg) (VA), Kanamicina (30 µg) (K), Rifampicina (5 µg) (RA), Ceftriaxone (30 µg) (CRO), Polimixina B (300 U) (Pb). NP: No presentaron plásmidos. *Las tres cepas mostraron el mismo fenotipo de resistencia, sin embargo cada una mostró un patrón diferente de bandas plasmídicas, cada uno fue separado por el símbolo -.

to, siendo por tanto, probable que una parte importante de la leche cruda producida en el país se encuentre contaminada con residuos de antimicrobianos. Estos agentes podrían estar ejerciendo una presión selectiva hacia la prevalencia de bacterias patógenas antibiótico-resistentes en productos alimenticios (7).

Los análisis estadísticos revelaron que no se encontró correlación entre el tipo de queso analizado y la resistencia a los antimicrobianos, ni diferencias significativas entre estas variables, lo que indica que las cepas aisladas de los diferentes tipos quesos y las cepas resistentes pertenecen a una misma población bacteriana.

Durante la realización de este trabajo, se logró la extracción y observación de bandas de DNA plasmídico en el 79,31 % de las cepas estudiadas (Figuras 1, 2 y 3). El número de bandas plasmídicas osciló entre 1 y 3 (Tabla 2) observándose que en el 62,07% de las cepas se presentó una sola banda de DNA. Los tamaños de las bandas plasmídicas observadas oscilaron entre 1,254 y > 23,130 kpb (Tabla 2). Los perfiles plasmídicos obtenidos se encuentran entre los rangos de tamaño reportados para *Micrococcus* sp. a nivel mundial (6, 8-10,23, 24). Aunque no se demostró durante este estudio que estos elementos extracromosomales estén involucrados con la resistencia a los antimicrobianos, no se descarta esta posibilidad, ya que la resistencia para muchos de los antibacterianos ensayados, se hayan codificadas a nivel plasmídico (25).

Se obtuvieron por lo menos 5 perfiles plasmídicos diferentes: *perfil 1*: cepas con una banda plasmídica cuyo tamaño fue > 23.130 pb, la banda de mayor tamaño que muestra el marcador de peso molecular empleado; *perfil 2*: cepas con una banda plasmídica cuyo tamaño se ubicó aproximadamente entre 23.130 y 15.573 pb; *perfil 3*: cepas con tres bandas plasmídicas cuyos tamaños aproximados fueron 18.992, 1.870, 1.254 pb; *perfil 4*: cepa con tres ban-

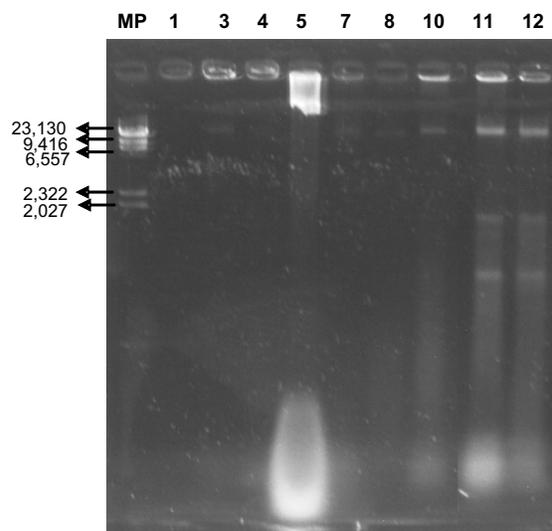


Figura 1. Perfil plasmídico de las cepas 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 de *Micrococcus* sp. MP: marcador de peso molecular, lambda *Hind*III, electroforesis en gel de agarosa

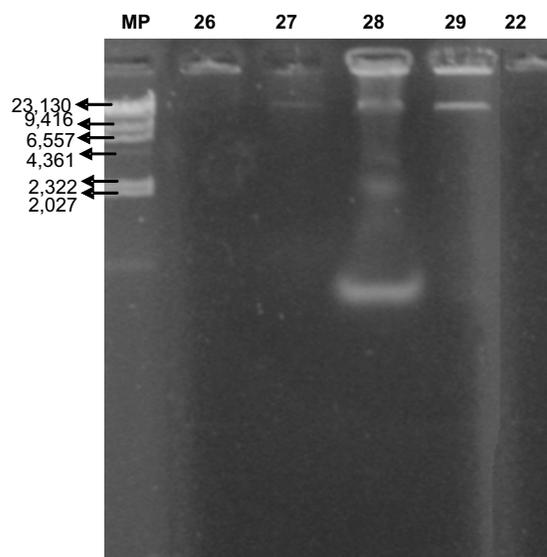


Figura 2. Perfil plasmídico de las cepas 26, 27, 28, 29, 22 de *Micrococcus* sp. MP: marcador de peso molecular, lambda *Hind*III, electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

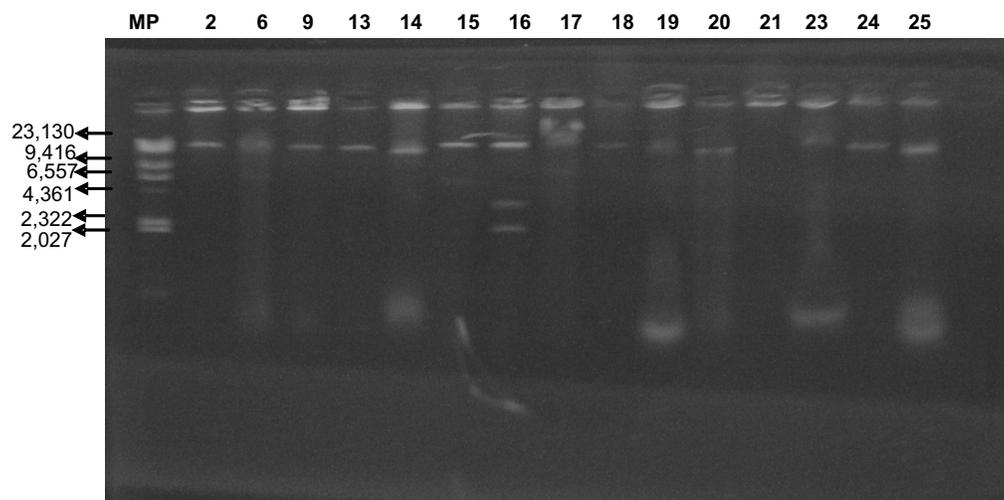


Figura 3. Perfil plasmídico de las cepas de *Micrococcus* sp 6, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25. MP: marcador de peso molecular, lambda *Hind*III, electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

das plasmídicas cuyos tamaños aproximados fueron 19.194, 3.072, 1.935 pb y *perfil* 5: cepa con tres bandas plasmídicas cuyos tamaños aproximados fueron 19.077, 3.310, 2.027 pb (Tabla 2).

Hasta ahora no existen reportes de plásmidos en *Micrococcus* sp. aislados de alimentos en Venezuela, por lo que se considera un estudio pionero dentro del área de la genética microbiana de alimentos, aportando datos preliminares significativos de gran utilidad para otros investigadores orientados en esta área. Por esta razón se recomiendan estudios que permitan caracterizar la función de los plásmidos en los *Micrococcus* sp. aislados de muestras de quesos.

Conclusiones

El alto porcentaje de cepas de *Micrococcus* multiresistentes a antibióticos y la presencia de bandas plasmídicas en la mayoría de los aislados, permite presumir una gran diseminación de genes de resistencia en este grupo bacteriano no patógeno. Es importante resaltar que las cepas estudiadas fueron frecuentemente aisladas a partir de queso duro artesanal, altamente consumido en nuestra región, siendo la mayor resistencia registrada hacia la Eritromicina, lo

cual se traduciría en la ineffectividad de este antibiótico como terapia contra infecciones causadas por *Micrococcus* sp. y otras bacterias patógenas emparentadas, presentes en los quesos.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por el financiamiento de esta investigación (Proyecto CC-381-05).

Referencias Bibliográficas

1. LATEEF A., OLOKE J., GUEGUIMKANA E. *Environ Monit Assess* 100: 59-69, 2005.
2. NICKELSON R., MCCARTHY, FINNE G. *Fish, Crustaceans, and Precooked Seafood. Compendium of method for the Microbiological Examination of Food*. Edited Amer Public Health Assn Published. New York (United States of America), 497-505, 2001.
3. AAKU E., COLLISON E., GASHE B., MPUCHANE S. *Food Control* 15: 181-186, 2004.
1. FUENMAYOR A.; HARRIS, B., MARTÍNEZ, A. *Manual práctico: Cocos Gram positivos y gram negativos aerobios* Unidad II. Maracaibo (Venezuela), p. 2-22, 1998.

2. SHARMA P., ANAND S. **Food Microbiology** 19: 627-636, 2002.
3. LIEBL W., KLOSS W., LUDWIG W. **Microbiology** 148: 2479-2487, 2002.
4. FARIA J., GARCIA A., IZQUIERDO P., ALLARA M., VALORO K. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición** 52: 68-73, 2002.
5. DÍAZ L. Caracterización del perfil plasmídico, susceptibilidad a antibióticos y a metales pesados en bacterias hidrocarbonoclasticas aisladas de sedimento marino (Tesis de Magister). Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), p. 263, 2001.
6. DÍAZ L., DUPONTT J., ATENCIO L. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas** 40: 133-148, 2006.
7. ZHONG Z., CASPI R., MINCER T., HELINSKI D., KNAUF V., BOURMAND K., WILKINSON J., SHEAT T., DELOUGHERY C., TOUKDARIAN A. **Plasmid jan** 47: 1-9, 2002.
8. VERMA V., QAZI G., PARSHAD R., CHOPRA C. **Plasmid** 22: 265-267, 1989.
9. LUNA V., COATES P., EADY E., COVE J., NGUYENT., ROBERTS M. **J Antimicrob Chemother** 44: 19-25, 1999.
10. IRIARTE M. **Manual de prácticas laboratorio de Microbiología de Alimentos**. Fundación la Salle de Ciencias Naturales. Caracas (Venezuela), pp. 77-87, 1993.
11. MAC FADDIN J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Chapter 19. Lippincott Williams Williams. Philadelphia (United States of America), pp. 254-272, 2000.
12. MANIATIS T., FRITSCH E., SAMBROOK J. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. New York (United States of America), pp. 62, 1984.
13. BAUER A., KIRBY M., SHORRIS J., TURK C. **American Journal Pathology** 45: 493-496, 1966.
14. SHARPE M., HOLT J. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (United States of America), p. 1003-07, 1986.
15. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved Standard**. 5th ed. Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS document M7-A4, 2000.
16. MACRINA F., WOOD P., JONES K. **Appl Environ Microbiol** 39:1070-1073, 1980.
17. ÁLVAREZ M., ATENCIO L., GUIÑEZ J., SUÁREZ J. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas** 36: 79-93, 2002.
18. ATENCIO L., ÁLVAREZ M., GUIÑEZ J., MONTIEL X., SALAS M. **Ciencia** 13(1): 5-13, 2005.
19. NARVÁEZ E., ÁLVAREZ M., GUIÑEZ J., ATENCIO L. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas** 39: 55-66, 2005.
20. PERRIN A., SOUMET C., LECLERCQ R., DOUCET F., SANDERS P. **Food Prot** 68: 347-352, 2005.
21. VERMA V., FELDER M., REDENBACH M., QAZI G., CULLUM J. **Plasmid** 30: 281-283, 1993.
22. STUART WALKER T. **Microbiologia**. McGraw-Hill Interamericana 1^o Edición. México, D.F (Mexico). pp. 80-85, 1998.