

**CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS Y DE LA
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS
DE *MICROCOCCUS* SP.**

LORENA ATENCIO-B.¹, JHOANDRY RIVERA-S.¹, VELINA ARANAGA-N.¹,
CARLOS NAVARRO¹ Y JORGE GUÍÑEZ-O.²

¹Laboratorio de Genética y Biología Molecular, ²
Laboratorio de Antígenos Bacterianos, Departamento de Biología, Facultad
Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia,
Apartado 526, Estado Zulia, Maracaibo, Venezuela
lbatencio@gmail.com

Resumen. Con la finalidad de profundizar sobre la genética y los fenotipos de interés en aislados de *Micrococcus* sp. en Maracaibo, estado Zulia, Venezuela, se caracterizaron los plásmidos y la susceptibilidad a antibióticos en 14 cepas de este microorganismo provenientes del cepario del LGBM-FEC. Luego de la extracción del DNA plasmídico y digestión con *EcoRI*, se determinó la susceptibilidad a antibióticos mediante antibiograma, así como la CIM a E y VA, y los fenotipos de resistencia a MLS_B. Las cepas presentaron una banda plasmídica de aproximadamente 23 kpb, mostrando luego de la digestión con *EcoRI* múltiples sitios de corte, con 13 patrones de digestión diferentes, siendo similares solo en dos cepas. Una cepa mostró un plásmido de 40,4 kpb. Se observaron 14 perfiles de resistencia diferentes, con multiresistencia a 3 ó más antibióticos, los fenotipos más frecuentes fueron cepas RA^R, VA^R, CB¹ y E¹. La CIM a E osciló entre 120 y >310 µg/mL, mientras que para VA, osciló entre 2 y 4 µg/mL, por lo cual no debe ser descartado que *Micrococcus* sp. esté también influenciando la aparición de fenotipos pre-VISA en *S. aureus*. Se hallaron seis fenotipos diferentes de resistencia MLS_B, incluyendo el fenotipo de resistencia MLS_B inducido y la presencia de una bomba de eflujo, mediada por el gen *msrA* en *S. aureus*, mecanismos que no han sido reportados en cepas de *Micrococcus* sp. aisladas en la región Zuliana. En vista de los resultados es necesario continuar indagando sobre la genética bacteriana autóctona. *Recibido: 14 mayo 2008, aceptado: 04 marzo 2009.*

Palabras clave. *Micrococcus* sp., plásmido, susceptibilidad a antibióticos, *EcoRI*, MLS_B, CIM.

PLASMIDS AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY
CHARACTERIZATION IN *MICROCOCCUS* SP. STRAINS

Abstract. To better know the genetics and important phenotypes of *Micrococcus* sp., isolated in Maracaibo, Zulia State, Venezuela, we characterized plasmids and antibiotic susceptibility in 14 strains of this microorganism (obtained from the LGBM-FEC strain collection). After plasmidic DNA extraction and digestion with *EcoRI*, antibiotic susceptibility was determined by antibiogram, as well as the MIC to E and VA, and phenotypes resistant to MLS_B. *Micrococcus* sp. strains showed a plasmidic band ~23 kpb, showing, after digestion with *EcoRI*, multiple cutting sites, with 13 different digestion patterns, being similar only in two strains. One strain showed a plasmid of 40.4 kpb. Fourteen different resistance profiles were observed, with multiresistance to three or more antibiotics. Most frequent phenotypes included RA^R, VA^R, CB^I, and E^I strains. The MIC to E oscillated between 120 and >310 µg/mL, whereas for VA it oscillated between 2 and 4 µg/mL. Thus, it should not be dismissed that *Micrococcus* sp. is also influencing occurrence of pre-VISA phenotypes in *S. aureus*. We found six different phenotypes with MLS_B resistance, including the MLS_B phenotype of induced resistance, and the presence of a efflux pump, codified by the *msrA* gene in *S. aureus* strains. These mechanisms have not been reported in strains of *Micrococcus* sp. isolated in the Zulia region. In view of the results, we recommend continued investigation on indigenous bacterial genetics. *Received: 14 May 2008, accepted: 04 March 2009.*

Key words. *Micrococcus* sp., plasmid, antibiotic susceptibility, *EcoRI*, MLS_B, MIC.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre el análisis de macro restricción del DNA genómico de *Micrococcus luteus* ATCC9341, mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE), demuestran la heterogeneidad del genoma completo de esta bacteria, calculándose su tamaño en aproximadamente 2,3 Mb (Murayama *et al.* 2003). Los recientes estudios genéticos moleculares en este grupo bacteriano no han aportado aún información concluyente sobre los mecanismos moleculares que regulan su resistencia a antibióticos.

Micrococcus es considerada una bacteria patógena para individuos inmunosuprimidos, siendo relacionada con la presencia de endocarditis. No obstante, la observación de determinantes de resistencia a antibióticos en algunas cepas de *Micrococcus*, como por ejemplo *M. luteus* (Gamboa *et al.*

2003), puede ser de importancia clínica, debido a que estos determinantes pueden ser transferidos a otras bacterias (Liebl *et al.* 2002).

El uso masivo e indiscriminado de los antibióticos durante las últimas décadas está ejerciendo una presión selectiva en las bacterias, desencadenando de modo alarmante, resistencia a numerosos antibióticos por parte de estos microorganismos (Lateef *et al.* 2005, Mujica *et al.* 2007). Como resultado, los tratamientos terapéuticos a diversos pacientes que en un principio fueron eficaces ahora resultan inocuos (Quintana 2002).

La resistencia a antibióticos puede estar codificada genéticamente en el cromosoma o en los plásmidos de resistencia que constituyen un producto predecible de la selección natural e imponen límites significativos en la utilización a largo plazo de cualquier antibiótico como agente terapéutico (Madigan *et al.* 1998). La escasa información referente a la caracterización genética de los plásmidos de resistencia en aislados de *Micrococcus* es preocupante cuando se tiene indicios de cepas de *Micrococcus* resistentes a antimicrobianos, debido a que la transferencia de genes de resistencia es algo “promiscua” entre géneros bacterianos y esto conduce a la diseminación de estos marcadores de resistencia por vía genética horizontal y/o vertical, haciendo cada vez más complicado los intentos terapéuticos para el control y/o eliminación de agentes infecciosos en ambientes nosocomiales, veterinarios y comunitario.

En 1989 se reportó el plásmido pmqv10 de 6 MDa aislado de una cepa de *Micrococcus* que transportaba genes de resistencia a Eritromicina, y Estreptomina, siendo exitosamente transformados en la cepa de *Escherichia coli* K12c60 (Verma *et al.* 1989). También se estudió el plásmido pMEC₂ de aproximadamente 4,2 kb que confiere resistencia a Eritromicina, a otros Macrólidos y a Lincomisina, su curación resultó en la aparición del fenotipo de sensibilidad a la Eritromicina en la cepa estudiada (Liebl *et al.* 2002).

Por otra parte, en un estudio sobre la caracterización del perfil plasmídico bacteriano en cepas de *Micrococcus* sp. aisladas de sedimentos marinos en el estado Zulia, fueron reportados cuatro plásmidos cuyos tamaños oscilaron entre 2,09 y 22,59 kb (Díaz *et al.* 2006).

Por ultimo, el estudio realizado 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, mostró

que el 79,3% de las cepas presentaron plásmidos, con tamaños que oscilaron entre 1,254 y > 23,130 kb, observándose que el 62,1% de los aislados presentó sólo una banda plasmídica (Mujica *et al.* 2007).

En base a lo expuesto anteriormente, el objetivo de esta investigación es la caracterización preliminar de los plásmidos y de la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Micrococcus* sp. autóctonas de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron cepas de *Micrococcus* sp. provenientes del cepario del Laboratorio de Genética y Biología Molecular (LGBM) de la Facultad Experimental de Ciencias (FEC), Universidad del Zulia, las cuales fueron previamente aisladas y tipificadas en estudios previos (Mujica *et al.* 2007). Las cepas a estudiar debían cumplir con la condición de mostrar solo una banda plasmídica durante la extracción, permitiendo de esta forma realizar una digestión directa del DNA plasmídico con la enzima de restricción *EcoRI*.

Caracterización Bioquímica: Las cepas de *Micrococcus* sp. fueron nuevamente tipificadas mediante la bioquímica convencional, a partir de la muestra stock almacenada en glicerol al 20% a -20 °C (MacFaddin 2000, Seija 2002).

Aislamiento de DNA Plasmídico: La extracción del DNA plasmídico de las cepas confirmadas como *Micrococcus* sp. se realizó mediante el protocolo reportado por Mujica *et al.* (2007), con ciertas modificaciones. La lisis alcalina se realizó con lizosima (0,5 mg/mL). Previo a la precipitación con etanol frío al 100% se realizó una digestión con RNasa (1µL, 10 mg/mL) por 30 min a 37 °C y posteriormente se llevó a cabo una extracción con solución cloroformo-fenol-alcohol isoamílico (CPI: 24:25:1). La separación y observación de las bandas plasmídicas se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% (Ausubel *et al.* 1997). El tamaño de los plásmidos se determinó utilizando el programa computacional Origin versión 7,5 para Windows, basado en la migración de las bandas de DNA de la muestra en estudio, en comparación con las bandas del marcador de Peso Molecular (PM) Lambda *HindIII* (Promega®), reportado previamente (Mujica *et al.* 2007).

Determinación del tamaño plasmídico mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI: Se procedió a realizar la digestión con la enzima de

restricción *EcoRI* (15.000 12u/uL Promega). Esta consistió en una mezcla de reacción que contenía: DNA en estudio 10 μ L, Buffer 10X 2 μ L, *EcoRI* 3 μ L, H₂O destilada estéril 4,8 μ L, Albúmina de suero bovino (BSA) 0,2 μ L, Volumen final de reacción 20 μ L. La digestión se realizó a 37 °C durante una hora, el DNA digerido fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y visualizado en presencia de luz ultravioleta sobre un transiluminador UVP Chromato–VUE modelo TM-36 de 115 voltios, 60Hz y capacidad de 1,2 Amp; posteriormente se fotografió con una cámara digital Kodak Easy Share 10X zoom.

Caracterización fenotípica de las cepas de Micrococcus sp.: Con la finalidad de determinar si las cepas de *Micrococcus* sp. sometidas a la extracción de DNA plasmídico mostraban patrones de resistencia a antibióticos distintos, al igual que los diferentes patrones de bandeo de digestión con *EcoRI*, se procedió a determinar los perfiles de resistencia y resistencia intermedia (Tabla 1).

Susceptibilidad a los antibióticos: La actividad *in vitro* de los antibióticos se determinó mediante el método de difusión en discos de Kirby-Baüer (Baüer *et al.* 1966). Los antibióticos, manufacturados por Difco (Dispens-O-Disc Suceptibility Test System), fueron seleccionados según estudios previos (Sharpe y Holt 1986, Eady *et al.* 2000, Sharma y Anand 2002, Mujica *et al.* 2007), siendo los siguientes: Eritromicina (15 μ g) (E), Estreptomina (10 μ g) (S), Penicilina (10 μ g) (P), Oxacilina (1 μ g) (OX), Tetraciclina (30 μ g) (TE), Carbenicilina (100 μ g) (CB), Clindamicina (2 μ g) (CC), Cloranfenicol (30 μ g) (C), Neomicina (5 μ g) (NEO), Vancomicina (30 μ g) (VA), Kanamicina (30 μ g) (K), Rifampicina (5 μ g) (RA), Ceftriaxone (30 μ g) (CRO) y Polimixina B (300 U) (Pb). Se utilizó como control del antibiograma la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CLSI 2007).

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a Eritromicina y Vancomicina: Los antibióticos que se utilizaron fueron Estolato de Eritromicina (Abbott Laboratorios, USA) y Vancomicina (Sigma-Aldrich®, USA). Los rangos probados fueron los siguiente: Eritromicina 0,5 μ g/mL hasta 310 μ g/mL y Vancomicina desde 0,5 μ g/mL hasta 4 μ g/mL. Se utilizó la cepa sensible a antibioticos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control de calidad del principio activo de los antibióticos ensayado.

Tabla 1. Perfiles plasmídicos, de resistencia a antibióticos y CIM a Eritromicina y Vancomicina en *Micrococcus* sp.

No. Ceba	Perfil de Resistencia	Tamaño (pb) de la Banda Plasmídica	CIM E (µg/mL)	CIM VA (µg/mL)
1	RA ^R -NEO ^R -CB ^I -S ^I	40.424*	ND	ND
2	RA ^R -VA ^R -CRO ^R -K ^I -C ^I -OX ^I -CB ^I	> 23.00	ND	>4
4	NEO ^R -TE ^R -VA ^I -E ^I	> 23.00	120	3
5	CC ^R -OX ^R	> 23.00	ND	ND
7	E ^R -CRO ^R	> 23.00	>310	ND
8	RA ^R -NEO ^R -CB ^R -VA ^R -S ^I	> 23.00	ND	2
9	E ^R -RA ^R -CB ^I -Pb ^I	> 23.00	>310	ND
13	CC ^R -VA ^R -K ^R -E ^I	> 23.00	>310	>4
14	E ^R -NEO ^R -VA ^R -OX ^I -CRO ^I -K ^I	> 23.00	>310	2
15	-	> 23.00	ND	ND
23	E ^R -Pb ^R -OX ^I	23.00	>310	ND
24	RA ^R -C ^R -CB ^I -VA ^I	> 23.00	ND	ND
27	CC ^R -RA ^R -OX ^R -CB ^I -E ^I	> 23.00	>310	ND
29	CC ^R -RA ^R -VA ^R -S ^R -C ^R -E ^I	> 23.00	185	ND

Eritromicina (E), Estreptomina (S), Oxacilina (OX), Tetraciclina (TE), Carbenicilina (CB), Cloranfenicol (C), Neomicina (NEO), Clindamicina (CC), Vancomicina (VA), Kanamicina (K), Rifampicina (RA), Ceftriaxone (CRO), Polimixina B (Pb). R: Resistentes, I: Resistencia Intermedia, -: Sensible a todos los antibióticos probados. ND: No determinado.*: Tamaño calculado luego de digestión con *EcoRI*. CIM: Concentración inhibitoria mínima.

Determinación de fenotipos de resistencia a la familia macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B (MLS_B): Con el interés de profundizar los diferentes mecanismo de resistencia a los antibióticos en los aislados de *Micrococcus* sp. autóctonos, se estudio la capacidad de inducción de resistencia a la CC, en presencia de la E (Eady *et al.* 2000), mecanismo que ha sido ampliamente estudiado en *S. aureus* (Merino *et al.* 2007). La técnica fue realizada siguiendo las recomendaciones de la CLSI (2007). La cepa control fue *S. aureus* ATCC 25923 sensible a ambos antibióticos (No formadora de la zona D).

Análisis estadístico: Se realizó la determinación de los porcentajes de cepas resistentes, resistentes intermedios y sensibles a los distintos antibióticos probados, y a los que se les construyeron figuras representativas. Mediante análisis porcentuales se calcularon los valores de los diferentes fenotipos en la prueba de inducción de resistencia a la Clindamicina. Los análisis fueron realizados utilizando el programa EXCEL para Windows XP. Para el cálculo de los tamaños aproximados de las bandas plasmídicas de las cepas de *Micrococcus* sp. estudiadas se utilizó la aplicación Origin Lab, Origin Pro 7,5 para Windows (Mujica *et al.* 2007).

RESULTADOS

Las 14 cepas de *Micrococcus* sp. mostraron morfología esférica, siendo Gram positivas dispuestas en tétradas o grupos irregulares, caracterizándose bioquímicamente como Voges Proskauer negativo, Rojo Metilo, Catalasa, y Oxidasa positivo y capaces de oxidar glucosa en condiciones aeróbicas (MacFaddin 2000, Seija 2002).

Extracción y caracterización del ADN Plasmídico mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI: Las cepas mostraron solo una banda plasmídica cuyo tamaño aproximado sin digerir se ubicó entre 23 kpb y >23 kpb (Fig. 1, Tabla 1). Aunque todas las cepas mostraron similitud en la migración de la banda sin digerir, posterior a la digestión con *EcoRI* pudieron observarse varios patrones de digestión, obteniéndose un gran número de bandas de DNA plasmídico en el 92,9% de las cepas, ocasionando dificultades en el cálculo del tamaño de cada banda. Sin embargo, puede hacerse una descripción de algunas cepas cuyos resultados fueron muy ilustrativos, aportando información de interés sobre las cepas de *Micrococcus* sp. autóctonas de la región, ya que no existen reportes relacionados con el tema (Fig. 2).

Pudo calcularse el tamaño aproximado de la banda plasmídica original, a la cepa 1, debido a que mostró 10 bandas de DNA diferentes distinguibles cuyos tamaños aproximados fueron, 8.912,31; 6.256,58; 4.316,26; 4.097,95; 3.626,2; 3.136,99; 2.898,2; 2.576,42; 2.406,07 y 2.197,86 pb, con un tamaño total aproximado de 40,4 kb (Fig. 2), siendo el primer reporte del cálculo del tamaño plasmídico en cepas de *Micrococcus* aisladas en el estado Zulia.

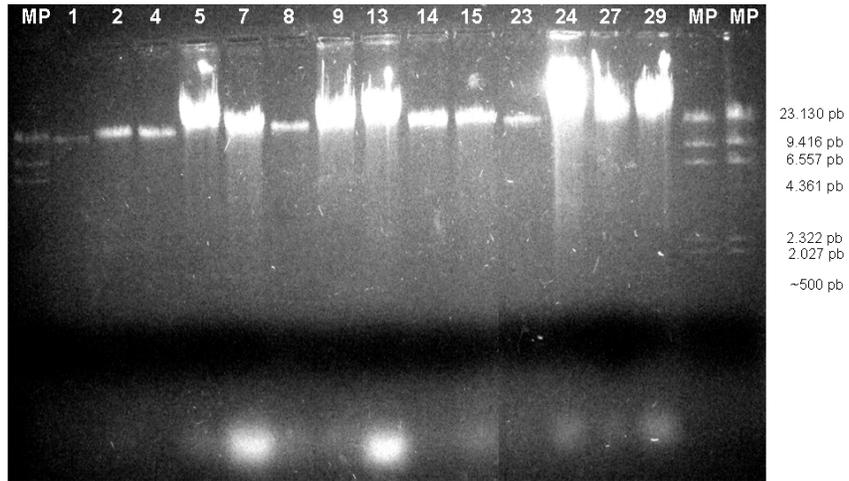


Figura 1. Electroforesis del DNA plasmídico presente en cepas de *Micrococcus* sp. MP: marcador de peso molecular λ /*Hind*III.

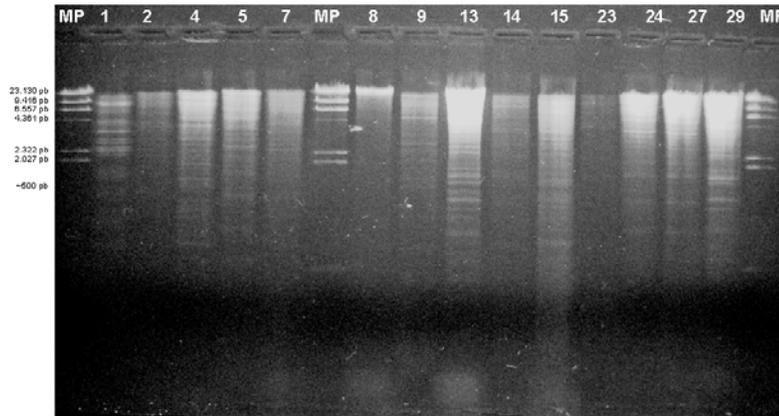


Figura 2. Electroforesis de la digestión del DNA Plasmídico con *Eco*RI en cepas de *Micrococcus* sp. MP: marcador de peso molecular λ /*Hind*III.

En la cepa 8 no se observó la presencia de bandas de digestión (Fig. 2). Las bandas de DNA plasmídico obtenidas al digerir con *EcoRI* en las cepas 24 y 27 fueron muy numerosas impidiendo el cálculo del tamaño de la banda plasmídica original. Sin embargo, pueden observarse 4 bandas de digestión comunes para ambas cepas, una con un tamaño aproximado de 3.653,5 pb, y 3 con tamaños menores a la banda de 2.027 pb del marcador de peso molecular utilizado para las corridas (Fig. 2).

Caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos en cepas de Micrococcus sp.: Luego de determinar los perfiles de resistencia y resistencia intermedia de cada una de las cepas de *Micrococcus* se estableció la presencia de 14 perfiles de resistencia diferentes, obteniéndose que el 78,6% de las cepas mostró multiresistencia a los antibióticos probados, lo que indica una resistencia a más de tres antibióticos de grupos diferentes (Tablas 1 y 2). La multiresistencia a 3 antibióticos se obtuvo en un 7,2% de las cepas, a 4 antibióticos en un 35,7%, a 5 y 6 antibióticos en un 14,3% cada uno, y a 7 antibióticos en un 7,1% de las cepas.

El mayor porcentaje de cepas fue RA^R con un 50%, seguido de un 35,7 % de cepas VA^R, y un 28,6% con fenotipos E^R y CC^R. Se obtuvo que un 35,7% de las cepas exhibió el fenotipo CB^I, seguido de un 28,6% E^I y 21,42% OX^I. El 30,8% de las cepas no presentó resistencia intermedia a TE, CC, NEO ni a RA. En este trabajo el 100% de las cepas se mostraron P^S. Al resto de los antibióticos se observó una resistencia y una resistencia intermedia que osciló entre 14,3 % y 7,1 % (Tabla 2).

Determinación de CIM a E y VA: Las cepas de *Micrococcus* sp. 4, 7, 9, 13, 14, 23, 27 y 29 fueron E^R en el antibiograma por lo que se les determinó la CIM a este antibiótico, y se obtuvo que el 75% de ellas mostró una CIM > 310 µg/mL de E, razón por la cual a estas cepas no se les determinó la CIM ya que crecieron a la mayor concentración de antibiótico probada en este estudio. A las cepas 4 y 29 se logró determinar la CIM a E, la cual fue de 120 y 185 µg/mL, respectivamente (Tabla 1).

Las cepas 2, 4, 8, 13, 14, 24 y 29 se mostraron VA^R en el antibiograma determinándoseles la CIM a este antibiótico (Tabla 1). El 42,9% de las cepas exhibieron una CIM a la VA de 2 µg/mL, mientras que 28,6% expresó una CIM de 3 µg/mL. En dos cepas (28,6%) no se logró determinar la CMI, debido a que las cepas crecieron a la mayor concentración de antibiótico probada (4 µg/mL) (Tabla 1).

Tabla 2. Porcentaje de resistencia y resistencia intermedia a antibióticos en cepas de *Micrococcus* sp.

Antibiótico	% Resistencia	% Resistencia Intermedia
E	28,57	28,7
VA	35,71	14,28
K	7,14	14,28
TE	7,14	0
CC	28,57	0
C	14,28	7,14
CRO	14,28	7,14
OX	14,28	21,42
NEO	28,57	0
Pb	7,14	7,14
CB	7,14	35,71
S	7,14	14,28
RA	50	0
P	0	0

E: Eritromicina; VA: Vancomicina; K: Kanamicina; TE: Tetraciclina; CC: Clindamicina; C: Cloranfenicol; CRO: Ceftriaxone; OX: Oxacilina; NEO: Neomicina; Pb: Polimixina B; CB: Carbenicilina; S: Estreptomina; RA: Rifampicina; P: Penicilina.

Determinación de fenotipos MLS_B: Del total de cepas de *Micrococcus* sp., una cepa (7,1%) fue positiva a la prueba de D-Test (Fig. 3), prueba realizada para determinar la capacidad de las cepas de inducir la resistencia a CC en presencia de E, y se halló 6 fenotipos diferentes de susceptibilidad a estos antibióticos, incluyendo el fenotipo de resistencia MLS_B inducido (D-test +). Se encontró que los fenotipos con mayor porcentaje de aparición fueron: E^R-CC^S; E^S-CC^S y E^L-CC^R con 21,4%, 35,7% y 21,4 %, respectivamente (Tabla 2).

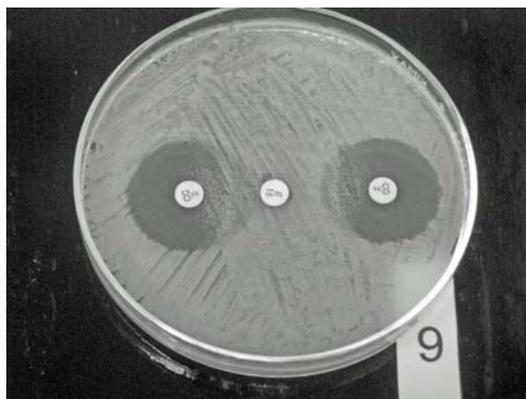


Figura 3. D-Test positivo en la cepa 9 de *Micrococcus* sp. Técnica de aproximación de discos de Clindamicina (2 µg)-Eritromicina (15 µg), la aparición de un halo de crecimiento en forma de "D" dentro de la zona inhibitoria del disco de Clindamicina será interpretada como resistencia a Clindamicina inducida por macrólidos.

DISCUSIÓN

La extracción de DNA plasmídico permitió la detección de una sola banda cuyo tamaño sin digerir coincide con varios reportes, que han estudiado cepas de *Micrococcus* sp. autóctonas del estado Zulia (Díaz *et al.* 2006, Mujica *et al.* 2007).

En vista que no existen reportes en la literatura consultada en referencia a la determinación del tamaño de las bandas plasmídicas en cepas de *Micrococcus* sp., se seleccionó la enzima de restricción *EcoRI*, la cual ha sido ampliamente utilizada para el estudio de plásmidos tanto en bacterias de la familia Micrococaceae como para otras familias bacterianas (Liebl *et al.* 2002, Stemper *et al.* 2004, Udo *et al.* 2006).

La exposición del DNA plasmídico, proveniente de las cepas de *Micrococcus*, a *EcoRI* permitió el calculo del tamaño de la banda plasmídica original sin digerir de la cepa 1 (40.424 pb). Sin embargo, la información obtenida permite reconocer que a pesar de observarse en dichas cepas, perfiles de resistencia a antibióticos diferentes, y una banda de DNA plasmídico común sin digerir de aproximadamente 23 kb, la misma aparentemente no corresponde a un mismo DNA plasmídico al observar los diferentes patrones de digestión.

El que en la cepa 8 no se observó la presencia de bandas de digestión (Fig. 2) pudiera indicar la presencia de un solo punto de corte, ocasionando la linearización del plásmido, visualizándose una sola banda, o la falta de digestión de la banda plasmídica al utilizar *EcoRI*, indicando que no está presente la secuencia GAATTC en dicho DNA.

Las características de la digestión con *EcoRI* de las cepas 24 y 27 pudiera indicar que se está ante la presencia del mismo DNA plasmídico. Para el resto de las cepas no se pueden realizar comparaciones ya que el número de bandas fue muy numeroso y variado, tanto en cantidad como en tamaño. No obstante, se puede decir que en las muestras de DNA plasmídico provenientes de las cepas de *Micrococcus* sp. existen múltiples sitios de corte para esta enzima de restricción, mostrando que a excepción de las cepas 24 y 27 el resto de las cepas estudiadas contiene plásmidos diferentes. En vista de los resultados obtenidos se debe considerar la utilización de otras enzimas de restricción que permitan la determinación del tamaño, así como la construcción de un mapa de restricción de cada uno.

Con respecto a los fenotipos de resistencia a antibióticos obtenidos, se observa la presencia de cepas de *Micrococcus* sp. multiresistentes a antibióticos. Tomando en cuenta que las mismas son consideradas inocuas al hombre no debe descartarse que pudieran comportarse como reservorios y transmisoras de genes de resistencia entre la flora normal y la patógena (Popova *et al.* 2005). Verma *et al.* (1989) y Luna *et al.* (1999) comprueban, mediante transformación y conjugación, la transferencia de genes de resistencia a S y E respectivamente, entre cepas de *Micrococcus* sp. La multiresistencia a antibióticos obtenida en este estudio coincide con la reportada por Mujica *et al.* (2007), en aislados de *Micrococcus* sp. provenientes de quesos.

Se obtuvo un bajo o ningún porcentaje de cepas CB^R, OX^R y P^R, los cuales constituyen la familia de antibióticos más utilizada en la práctica clínica (Lorian 2005) (Tabla 2). Sin embargo, se observa que el porcentaje de resistencia intermedia a CB y OX es uno de los más altos obtenidos, pudiendo indicar un incremento cercano de la resistencia a estos antibióticos en cepas de *Micrococcus* autóctonas. Los resultados coinciden con los reportado por otros autores quienes señalan bajos porcentajes de resistencia a CB, OX y P (Mujica *et al.* (2007). Los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos en *Micrococcus* sp. no han sido muy estudiados.

El mayor porcentaje de cepas fue RA^R, sin presencia de resistencia intermedia. Este fenotipo está codificado a nivel cromosomal en los diferentes microorganismo reportados (Quintana 2002), por tal razón se asume una transferencia vertical de genes, es decir, transferencia de genes de resistencia de células madres a células hijas en este grupo bacteriano.

En el caso de CRO, perteneciente al grupo de las cefalosporinas de tercera generación, se obtuvo tanto una resistencia como una resistencia intermedia baja (Tabla 2), coincidiendo con los reportes de Mujica *et. al.* (2007). Sin embargo, Díaz (2001) y Szczerba (2003) reportan cepas de *Micrococcus* CRO^S aisladas de ambientes impactados con derrames petroleros y de piel, manos y antebrazos respectivamente, recomendando este antibiótico para el tratamiento de pacientes infectados con este microorganismo.

Se obtuvo un elevado porcentaje de cepas VA^R (35,7%), siendo el segundo mayor valor obtenido (Tabla 2). Estos resultados son sutilmente mayores a los reportados por Mujica *et al.* (2007) quienes señalan un 20,7% de cepas resistentes. Por su parte, Duppont (2000), obtuvo que de las tres cepas de *Micrococcus* sp. aisladas de muestras ambientales solo una cepa fue VA^R. Díaz (2001), reporta cepas de *Micrococcus* sensibles a este antibiótico, aisladas de ambientes contaminados con petróleo. Aunque estos datos no coinciden con los reportados en este trabajo, cabe la posibilidad de que las cepas seleccionadas en este estudio sean más tolerantes en comparación con las cepas aisladas de ambiente, por tanto hay una mayor resistencia a este antibiótico producto de una alta circulación de genes o a la aparición de mutaciones en las cepas estudiadas.

Para los aminoglicósidos estudiados (K, NEO y S) los valores de cepas con fenotipos de resistencia y resistencia intermedia también fueron bajos (Tabla 2). Duppont (2000), reporta que las cepas de *Micrococcus* fueron 100% sensibles a K y solo un 34,5% de las cepas fueron resistentes a la NEO, con valores muy similares en el caso de la S.

Para el Macrólido E, se obtuvo igual valor porcentual de cepas con resistencia y con resistencia intermedia (28,6%) (Tabla 2), los cuales estuvieron ligeramente por debajo a los reportados por Mujica *et. al.* (2007). Así mismo, Perrin-Guyomard *et al.* (2005), reportan un 65% de E^R y otros macrólidos en bacterias de la familia *Micrococcaceae* aisladas de la leche pasteurizada en Francia. Liebl *et al.* (2002), señalan un plásmido presente en *Micrococcus luteus*, de 4,2 kb que está involucrado en la resistencia a

macrólidos. En el caso de las cepas de *Micrococcus* estudiadas en este trabajo, no se observaron plásmidos pequeños que pudieran señalar una similitud en el genotipo reportado previamente. Sin embargo, existe la posibilidad que dicha resistencia esté ubicada en transposones que bien puede encontrarse a nivel del único plásmido presente o sobre el cromosoma bacteriano.

El porcentaje de cepas de *Micrococcus* sp. TE^R fue bajo, y no se reportó resistencia intermedia (Tabla 2). Estos resultados concuerda con los reportes de Mujica *et al.* (2007) y Dupontt (2000), quienes señalan que el número de cepas de *Micrococcus* resistentes fue bajo o que la totalidad de las cepas fueron sensibles a este antimicrobiano respectivamente. No obstante otros autores señalan un alto porcentaje de cepas de *Micrococcus* resistentes a la tetraciclina (Eady *et al.* 2000).

En el caso de C se observaron valores porcentuales bajos de cepas con resistencia o con resistencia intermedia a este antibiótico al igual que el fenotipo Pb^R, a pesar de que su actividad está restringida a los Gram negativos. Los mismos coinciden con lo reportado por Mujica *et al.* (2007).

Por último, para la CC, se obtuvo un porcentaje de cepas con el fenotipo CC^R cercano al 30%. No se observó en estas cepas el fenotipo de resistencia intermedia. En la literatura consultada no se encontraron reportes que estudiaran el efecto de la CC en cepas de *Micrococcus*, por tal razón se considera un estudio pionero en esta área, sobre todo en la región zuliana.

Con todo lo antes expuesto se puede considerar que la obtención de distintos patrones de resistencia, concuerda con la obtención de diferentes patrones de digestión del DNA plasmídico, por lo que se sugiere que se está en presencia de cepas de *Micrococcus* sp. diferentes. También es importante mencionar que aun cuando existen similitudes de bandeo en dos de las cepas estudiadas (24 y 27) estas no transportan la misma información genética debido a que muestran diferentes patrones de resistencia a antibióticos (Tabla 1). Se debe considerar la posibilidad de que las cepas de *Micrococcus* compartan marcadores moleculares tanto en plásmidos como en el cromosoma, ubicados probablemente en transposones.

Con respecto a la CIM determinada para la E y la VA, son los primeros datos aportados en la región Zuliana. Al considerar los valores de CIM para E obtenidos por Eady *et al.* (2000) en cocos Gram positivos y los valores obtenidos en este trabajo (> 310 µg/mL), tomando en cuenta que dichos rangos

no se han estimado para *Micrococcus* (bacteria catalogada como no patógena para el hombre), se puede inferir que la mayoría de las cepas seleccionadas para esta prueba son E^R (Tabla 1), debido a que crecieron a concentraciones que se encuentran por encima de los valores reportados.

Los datos de CIM para la VA obtenidos en este trabajo no pueden ser utilizados para caracterizar los fenotipos de susceptibilidad a este antibiótico en *Micrococcus* ya que no existen reportes previos. Sin embargo, es importante hacer referencia a la posible capacidad de estas bacterias de servir como transmisores de la resistencia a VA a cepas de *S. aureus*. Hasta ahora, solo ha sido reportada la transferencia de los genes involucrados en la resistencia a VA desde *Enterococcus*, portador natural de dichos genes, hacia *S. aureus*, ocasionando la preocupante aparición de las cepas de *S. aureus* resistentes a la VA (Rodríguez y Vesga 2005).

Una de las cepas de *Micrococcus* sp. seleccionadas resultó D-test positiva (Tabla 3, Fig. 3), lo cual indicaría una resistencia inducida ocasionada por una modificación del sitio blanco del antibiótico, también conocida como resistencia MLS_B, la cual es mediada por el gen *erm* en *S. aureus*. Hasta ahora no hay reportes de este fenotipo, ni de los genes involucrados, en cepas de *Micrococcus* sp. Sin embargo, Luna *et al.* (1999), reportaron la presencia de los genes *mefE*, y *ermB* en cepas de *Micrococcus luteus*, que codifican proteínas de membrana involucradas en el flujo de sustancias fuera de la bacteria, ocasionando el fenotipo E^R.

En este estudio se hallaron diferentes fenotipos de susceptibilidad a E y CC en los aislados de *Micrococcus* sp. Un porcentaje de las cepas mostraron el fenotipo E^R-CC^S (Tabla 3), que coincide con la presencia de una bomba de eflujo la cual es mediada por el gen *msrA* en las cepas de *S. aureus* (CLSI 2007). No se encontró el fenotipo de resistencia constitutiva a E y a CC. Sin embargo, los estudios de determinación de fenotipos MLS en cocos Gram positivos, incluyendo a los *Micrococcus*, realizados por Eady *et al.* (2000), señalan una alta variabilidad en dichas susceptibilidades que pueden estar interviniendo en el desarrollo de fenotipo de resistencia en *S. aureus* (Merino *et al.* 2007).

Tabla 3. Porcentajes de fenotipos de susceptibilidad a Eritromicina y Clindamicina en cepas de *Micrococcus* sp.

Fenotipo	Numero de Aislados (Cepa)	Porcentajes (%)
E = R CC = S	3 (7,14 y 23)	21,43
E = R CC = R	0	0
E = R CC = I	0	0
E = S CC = S	5 (1, 2, 8, 15 y 24)	35,71
E = I CC = I	0	0
E = I CC = S	1 (4)	7,14
E = S CC = I	0	0
E = I CC = R	3 (13, 27 y 29)	21,43
E = S CC = R	1 (5)	7,14
E = R, CC = S (D-Test: +)	1 (9)	7,14
Total	14	99,99 %

E: Eritromicina; CC: Clindamicina; R: Resistente; S: Sensible; I: Resistente intermedio. D-test: +: resistencia a Clindamicina inducida por macrólidos.

CONCLUSIONES

La digestión de los plásmidos con *EcoRI* de las cepas de *Micrococcus* sp. estudiadas, permitió el cálculo real del plásmido observado en una de estas. Adicionalmente, se caracterizó la variabilidad genética plasmídica entre las cepas al observarse la generación de múltiples fragmentos de restricción con pesos moleculares muy heterogéneos y patrones de bandeos con grandes disimilitudes entre las cepas. Todas las cepas de *Micrococcus* sp. fueron sensibles a Penicilina y mostraron variabilidad en la expresión de resistencia múltiple entre los antibióticos ensayados, particularmente resistencia a altas concentraciones de Eritromicina y Vancomicina. Los fenotipos de resistencia MLS_B observados aquí pueden señalarse como posibles mecanismos de resistencia que no han sido estudiados en *Micrococcus* aislados en la región, estos deberán ser confirmados mediante técnicas moleculares y genéticas.

Resultan preocupantes los fenotipos de resistencia observados porque *Micrococcus* podría estar comportándose como reservorio de genes de resistencia y transferirlos a patógenos como *S. aureus*; tal es el caso de la aparición de cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a Vancomicina (VISA). Queda por definir en estudios posteriores la información genética codificada en las bandas plasmídica presentes en estas bacterias, lo que

permitirá dilucidar su participación activa en la diseminación de fenotipos de resistencia en grupos bacterianos de interés clínico.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, Maracaibo, por el financiamiento de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- AUSUBEL, F. M., R. BRENT, R. KINGSTONE, D. MOORE, J. SELDMAN, J. SMITH Y K. STRUHL. 1997. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology (3 ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, pp. 2–13.
- BAÜER, A., W. KIRBY, J. SHERRY Y M. TORCK. 1966. Antibiotics susceptibility testing by standardized simple disk method. American J. Clinical Pathology 45: 2352–2358.
- (CLSI) CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement M100-S17, Vol. 27(1). Replaces M100-S16, Vol. 26(3), 179 pp.
- DÍAZ, L. 2001. Caracterización del perfil plasmídico, susceptibilidad a antibióticos y a metales pesados en bacterias hidrocarbonoclasticas aisladas de sedimento marino. Tesis de Maestría en Microbiología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, 263 pp.
- DÍAZ, L., J. DUPONTT Y L. ATENCIO. 2006. Perfil Plasmídico de bacterias aisladas de sedimento contaminado con petróleo, Estado Zulia, Venezuela. Bol. Centro Invest. Biol. 40: 133–148.
- DUPONTT, J. 2000. Resistencia a metales pesados y a antibióticos en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aisladas de la playa “Caimare Chico”. Trabajo Especial de Grado, Dpto., Facultad Experimental de Ciencias, Univ. del Zulia. Maracaibo, 120 pp.
- EADY, A., P. COATES, J. ROSS, H. RATYAL Y J. COVE. 2000. Antibiotic resistance patterns of aerobics coryneforms and furazolidone-resistance Gram-positive cocci from the skin surface of the human axilla and fourth toe cleft. J. Antimicrobial Chemotherapy 46: 205–213.
- GAMBOA, M., E. RODRÍGUEZ Y M. ROJAS. 2003. Bacterias de importancia clínica en respiradores y aires acondicionados de hospitales de San José, Costa Rica. Rev Biomed. 14: 143–151.
- LATEEF, A., J. OLOKE Y F. GUEGUIMKANA. 2005. The prevalence of bacterial resistance in clinical, food, water and some environmental samples in southwest Nigeria. Environ Monit Assess 100(1-3): 59–69.
- LIEBL, W., W. KLOSS Y W. LUDWIG. 2002. Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*. Microbiology 148: 2479–2487.

- LORIAN, V. 2005. Antibiotics in laboratory medicine (5 ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp 441–508.
- LUNA, V., P. COATES, E. EADY, J. COVE, T. NGUYEN Y M. ROBERTS. 1999. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 44(1): 19–25.
- MACFADIN, J. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria. Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 78–97, 321–326, 368–377, 439–450.
- MADIGAN, T., J. MARTINKO Y J. PARKER. 1998. Brock biología de los microorganismos (10 ed.). Prentice Hall, Madrid, España, pp. 410–417, 716–719, 874–875.
- MERINO, L., A. CANTOS DE LA CASA, M. TORRES Y J. AZNAR. 2007. Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25(2): 77–81.
- MUJICA, I., L. DÍAZ, J. GUIÑEZ, J. RIVERA, C. GIMÉNEZ Y L. ATENCIO. 2007. Multiresistencia a antibióticos y patrón de plásmidos en *Micrococcus* sp. aislados de quesos provenientes de expendios comerciales del Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia* 15(3): 1–8. Universidad del Zulia.
- MURAYAMA, O., M. MATSUDA Y J. MOORE. 2003. Studies on the genomic heterogeneity of *Micrococcus luteus* strains by macro-restriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Basic Microbiol.* 43(4): 337–40.
- PERRIN-GUYOMARD, A., C. SOUMET, R. LECLERCQ, F. DOUCET-POPULAIRE Y P. SANDERS. 2005. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from pasteurized milk and characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance genes. *J. Food Prot.* 68(2): 347–52.
- POPOVA, L., T. KARGATOVA, E. GANUSOVA, T. LOBOVA, A. BOYANDIN, O. MOGILNAYA Y N. PECHURKIN. 2005. Population dynamics of transgenic strain *Escherichia coli* Z905/pPHL7 in freshwater and saline lake water microcosms with differing microbial community structures. *Adv. Space Res.* 35(9): 1573–1578.
- QUINTANA, A. 2002. Antibióticos, bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. Extraído de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2028.pdf>. Visitado el 24 de agosto de 2007.
- RODRÍGUEZ, C. Y O. VESGA. 2005. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica* 25: 575–587.
- SHARMA, P. Y S. ANAND. 2002. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology* 19: 627–636.
- SHARPE, M. Y J. HOLT. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2 ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp. 1003–1007.
- SELJA, V. 2002. COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>.
- STEMPER, M., S. SHUKLA Y K. REED. 2004. Emergence and spread of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rural Wisconsin, 1989

- to 1999. J. Clinical Microbiology 42(12): 5673–5680.
- SZCZERBA, I. 2003. Susceptibility to antibiotics of bacteria from genera *Micrococcus*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Kitococcus* and *Dermacoccus*. Med. Dosw. Mikrobiol. 55(1): 75–80.
- UDO, E., N. AL-SWEIH, E. MOKADDAS, M. JOHNY, R. DHAR, H. GOMAA, I. AL-OBAID Y V. ROTIMI. 2006. Antibacterial resistance and their genetic location in MRSA isolated in Kuwait hospitals, 1994-2004. BMC Infectious Diseases 6: 168–175.
- VERMA, V., G. QAZI, R. PAROHAD Y C. CHOPRA. 1989. Introduction of a *Micrococcus* plasmid in *E. coli*. Plasmid 22(3): 265–267.