

**PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS Y PLÁSMIDOS PRESENTES EN
CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AISLADAS DE
PORTADORES NASAL SANOS: ESTUDIO PRELIMINAR**

VELINA ARANAGA-N., JHOANDRY RIVERA-S., ISABEL MUJICA DE F.,
CARLOS NAVARRO-O., IRENE ZABALA-D. Y LORENA ATENCIO-BRACHO

*Laboratorio de Genética y Biología Molecular.
Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia, Apartado 526.
Maracaibo-Edo Zulia, Venezuela.
Correo electrónico: lbatencio@gmail.com*

Resumen. Los reportes de infecciones por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en la comunidad en general han aumentado. En 26 estirpes de *S. aureus* provenientes de fosas nasales de estudiantes sanos que asistieron al LGBM-FEC, Maracaibo-Venezuela; entre Marzo-Julio de 2007 se determinó la producción de β -lactamasas y la presencia de plásmidos, encontrándose 15 patrones distintos de resistencia a antibióticos, siendo los más comunes P^R (31%) y P^R - TE^R/P^R - OX^R con un 7,7% cada uno. El 12% de las cepas resultaron multiresistentes, mostrando la mayor resistencia a P^R (88,46%). Las bacterias fueron 100% C^S . Se comprobó la producción de β -lactamasas (65,21%) y la presencia de *SARM*. Todas fueron VA^S ($CMI \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$). El perfil plasmídico reveló entre 1 y 4 bandas de DNAp (22,31 kb-1,45 kb aprox.). La curación ocasionó la pérdida de la banda de 22,31 kb relacionándose con la pérdida de resistencia a P y la no producción de β -lactamasas. No se logró dilucidar la exacta ubicación genética de la resistencia a E, ya que desaparecieron simultáneamente las bandas de 1,78 y 1,45 kb. Este trabajo permitió ahondar en los fenotipos de resistencia a antibióticos, así como su posible ubicación en plásmidos en *S. aureus* aislados en la comunidad universitaria. *Recibido: 24 Febrero 2010, aceptado: 06 Diciembre 2010.*

Palabras clave. *Staphylococcus aureus*, plásmidos, resistencia a antibióticos, β -lactamasa, comunidad.

**β -LACTAMASES PRODUCTION AND PLASMIDS PRESENTS IN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS FROM HEALTHY NASAL CARRIERS:
PRELIMINARY STUDY**

Abstract. Reports of infections by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in general community have increased. In 26 strains of *S. aureus* isolated from nasal cavities of healthy students that attended to the LGBM-FEC, Maracaibo, Venezuela, from March to July 2007 were determined the production of β -lactamases and the presence of plasmids, it found 15 different patterns of resistance to antibiotics, being more common: P^R (31%) and P^R-TE^R/P^R-OX^R with 7.7% each. 12% of strains were multiresistant, showing the greatest resistance to P^R (88.46%). All bacteria were 100% C^S. It confirmed the production of β -lactamases (65.21%) and the presence of MRSA. All isolates were VA^S (MIC \leq 0.5 μ g/mL). Profiling plasmid revealed between 1 and 4 DNAP bands (22.31 kb-1.45 kb approx.). The curing caused the loss of the band of 22.31 kb associated with the loss of resistance to P and non- β -lactamase production. It was not possible to elucidate the exact genetic location of resistance to E, due to bands of 1.78 kb and 1.45 kb simultaneously disappeared. This research allowed to delving into the antibiotic resistance phenotypes and their possible location on plasmids in *S. aureus* isolated in the university community. Received: 24 February 2010, accepted: 06 December 2010.

Key words. *Staphylococcus aureus*, plasmids, antibiotics resistance, β -lactamase, community.

INTRODUCCIÓN

S. aureus forma parte de la microflora normal en humanos, encontrándose presente en varias zonas del cuerpo tales como: piel, fosas nasales, vagina y perineo; sin causar síntomas algunos. Sin embargo, dependiendo del estado inmunológico del portador, la edad y otros factores; estas bacterias pueden tener un comportamiento invasivo llegando a desencadenar fuertes infecciones que atentan contra su vida (Brooks *et al.* 2002). Dentro de las infecciones causadas por *S. aureus*, cuando colonizan tracto respiratorio, se pueden destacar las rinitis crónicas, alergias severas, bronquitis, neumonía entre otras (Harputluoglu *et al.* 2005), y estas son aun más graves cuando el agente etiológico responsable es una estirpe que presenta resistencia a los antibióticos, ya que dificulta su erradicación (Atencio *et al.* 2005).

Durante el siglo XX fue evidente la aparición y diseminación de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos β -lactámicos, debido a su amplio uso en ambientes nosocomiales, pero en la últimas décadas la epidemiología ha venido evolucionando hacia la aparición de *S. aureus* meticilino-resistente (*SARM*); no

estando ésta última limitada sólo a ambientes nosocomiales, sino que también han surgido en la comunidad (CA-SARM) (García *et al.* 2005, Harputluoglu *et al.* 2005, Castellano y Perozo 2010a).

Se ha observado que en *S. aureus* la resistencia a los β -lactámicos, puede estar codificada en cromosoma, plásmidos, integrones, y/o transposones; se debe a varios mecanismos: 1.- Inactivación hidrolítica del antibiótico: por las denominadas enzimas β -lactamasas, un mecanismo generalmente inducido por el antibiótico, codificada por el gen *blaZ* pudiéndose ubicar en cromosoma y/o plásmidos. 2.- Modificación del blanco de acción: por alteraciones en las proteínas de unión a las penicilinas (PBP's), como las causadas por el gen *mecA* codificada en cromosoma y; 3.- Tolerancia a los β -lactámicos (Tenover *et al.* 2006, Castellano y Perozo 2010a).

Desde hace mucho tiempo varios autores en países, como Estados Unidos y Kuwait señalan la presencia de plásmidos de hasta 38 kb que le confieren a *S. aureus* resistencia a varios antibióticos (Tenover *et al.* 2006, Udo *et al.* 2006). En Venezuela, específicamente Maracaibo-Zulia, desde el 2002 se tiene evidencia de los perfiles plasmídicos en cepas *S. aureus* autóctonas procedentes de muestras clínicas y alimentos; determinándose plásmidos con tamaños oscilantes entre 2,10 y 37,59 kb, donde en algunos casos se les ha asociado con la resistencia a penicilina, eritromicina y tetraciclina (Alvarez *et al.* 2002, Atencio *et al.* 2005, Rivera 2005, Atencio *et al.* 2008, Fernández, 2010).

El objetivo de esta investigación se orientó a determinar la resistencia a antibióticos en *S. aureus* aisladas de portadores nasales sanos, así como la producción de β -lactamasas y su relación con plásmidos presentes en las mismas, debido al desconocimiento que actualmente se tiene sobre *S. aureus* provenientes de la comunidad zuliana sana.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA DE ESTUDIO

Se estudiaron 26 cepas de *S. aureus* provenientes de fosas nasales de estudiantes sanos que asistieron al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia (LGBM-FEC), Maracaibo-Venezuela; entre Marzo-Julio de 2007. Las muestras fueron tomadas mediante hisopado con solución fisiológica (0,85% p/v. de NaCl) y sembradas en agar Manitol Salado (HiMedia, India). Las

bacterias se identificaron como *S. aureus* según indicaciones de Mac Faddin (2000), y preservadas a -20° C en una solución Caldo Infusión Cerebro-Corazón (HiMedia, India)/Glicerol (Cole-Palmer, USA) al 20% v/v (Ausubel *et al.* 2002).

SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A VANCOMICINA

La actividad *in vitro* de los antibióticos a evaluar se determinó por la técnica estandarizada por Bauer-Kirby según recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S19 2009), siendo los antibióticos utilizados (Difco TM) Penicilina G (10 U) (P), Oxacilina (1 μ g) (OX), Vancomicina (30 μ g) (VA), Gentamicina (10 μ g) (GM), Eritromicina (15 μ g) (E), Tetraciclina (30 μ g) (TE), Ciprofloxacina (5 μ g) (CIP), Rifampicina (5 μ g) (RA), Trimetoprin-Sulfamethoxazol (1.25 μ g/23.75 μ g) (SxT), Clindamicina (2 μ g) (CC), Cloranfenicol (30 μ g) (C).

La CMI a Vancomicina (Sigma-Aldrich®, Alemania) se determinó a todas las cepas de *S. aureus*. Para esto último, las bacterias fueron sembradas en placas con Agar Müller-Hinton suplementado con Vancomicina, en concentraciones que oscilaron entre 0,5 μ g/mL y 8 μ g/mL (CLSI-M100-S19 2009). La cepa control de calidad utilizada para ambos ensayos fue *S. aureus* ATCC® 25923 (CLSI-M100-S19 2009).

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA OXACILINA (SARM) Y DE LA PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS

Las cepas de *S. aureus* con fenotipos presuntivos de resistencia o resistencia intermedia a Oxacilina, en el antibiograma, fueron crecidas sobre Agar Mueller-Hinton (HiMedia, India) hipertónicas (4% p/v de NaCl) suplementado con Oxacilina (Sigma-Aldrich®) cuya concentración en la placa resultara igual a 6 μ g/mL; se denominaron cepas *SARM* aquellas que crecieran en este medio a 35° C en términos de 24 horas. La detección de la producción de β -lactamasas entre las cepas, fue evidenciada por la hidrólisis de Nitrocefina cromogénica (OXOID, Inglaterra) (Mac Faddin 2000, García *et al.* 2001). Las cepas controles para ambos ensayos fueron las cepas *S. aureus* ATCC® 25923 (β -lactamasa negativa, sensible a oxacilina) y *S. aureus* ATCC® 43300 (resistente a oxacilina) (CLSI-M100-S19 2009).

EXTRACCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE BANDAS DE DNA PLASMÍDICAS (DNAP)

Fueron realizadas en cepas que resultaran resistentes a más de dos antibióticos, pertenecientes a familias diferentes. Se utilizó el protocolo de lisis

alcalina Macrina *et al.* (1980) modificada por Álvarez *et al.* (2002) con lisostafina [0,019 mg/mL] (Sigma-Aldrich®, Alemania). La separación de las bandas de DNAp se realizó por electroforesis en geles de agarosa D-1 LE GQT [0,7% p/v] (Conda, USA) sumergidos en buffer TBE [Tris 90mM (Sigma-Aldrich®, Alemania) – Borate 90mM (Amersham, Inglaterra) – EDTA 2mM (Promega®, USA)] con Bromuro de Etidio [0,5 μ g/mL] (Sigma-Aldrich®, Alemania) a 50 voltios 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 (Mujica *et al.* 2007).

LOCALIZACIÓN DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN DNAP

Fueron evidenciadas mediante la eliminación del DNAP al hacer crecer las cepas (St5, St11, St18) a elevadas temperaturas y con ella cambios en el fenotipo; como lo propone Asheschov (1966), con modificación en la temperatura de crecimiento descrita por Rivera (2005). Para ello cada una de las cepas seleccionadas fueron crecidas, como cultivos separados, en caldo nutritivo (HiMedia, India) a 45° C (por duplicado) por 24 horas y; transcurrido el tiempo, se hicieron diluciones (1:10) para tomar alícuotas de 0,1 mL y sembrarlas en agar nutritivo (HiMedia, India) a 37° C a fin de obtener colonias aisladas. Se tomaron cinco (5) colonias al azar para realizarles antibiogramas y determinación de la producción de β -lactamasas y en aquellas colonias que presentaron cambios fenotípicos, al ser comparadas con su cepa parental, se realizó la extracción de DNAP para verificar la pérdida o persistencia de las bandas plasmídicas (Atencio *et al.* 2008).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los fenotipos de susceptibilidad y bandas de DNA plasmídico presentes en los microorganismos estudiados fueron analizados a través de estadísticos descriptivos como frecuencias, y reportándose la distribución porcentual de la susceptibilidad a los diferentes fármacos ensayados en los *S. aureus* examinados, bajo la herramienta análisis de datos de Excel para Windows.

RESULTADOS

Entre las 26 cepas de *S. aureus* provenientes de los exudados nasales se obtuvo que el 92% de las bacterias estudiadas presentaron resistencia a 1 ó más antibióticos; de la cuales el 58% resultaron ser multiresistentes, considerando

este estudio como multiresistentes aquellas cepas que resisten a tres ó más antibióticos de diferentes grupos.

En la tabla 1, se pueden observar los quince (15) patrones de resistencia a antibióticos diferentes, siendo los más comunes el de P^R (31%) y P^R-TE^R/P^R-OX^R con un 7,7% cada uno. El resto de las cepas mostraron patrones únicos, la mayoría con resistencia a 2 ó más antibióticos, representando juntas el 63% de las muestras estudiadas y solo el 3,8% presentó resistencia a 6 familias de antibióticos.

Dentro de los diferentes grupos de antibióticos ensayados en el antibiograma se encontró que el 88,46% de los *S. aureus* resultaron resistentes a la P, detectándose la producción de β -lactamasas en el 65,21% de ellos. Así mismo para la OX, se obtuvo un 38,46% de cepas resistentes. Sin embargo, cuando estas resistencias fueron confirmadas en los respectivos ensayos sobre placas hipersalinas con OX, se evidenció que sólo el 50% de las mismas pueden denominarse cepas *SARM* al crecer en presencia de los 6 $\mu\text{g/mL}$ del antibiótico, lo que indica que para la caracterización del fenotipo OX^R es necesario realizar un cribaje (screening) con OX en presencia de NaCl, como se realizó en este estudio, ó ser interpretada con disco de cefoxitin como lo recomienda la CLSI, 2009.

Para los restantes antibióticos, pertenecientes a las distintas familias no-betalactámicos, se evidenció que el mayor porcentaje de estirpes de *S. aureus* eran resistentes a E (30,76%) y a TE (26,92%). Otro porcentaje considerable de las cepas resultaron resistentes a CC (15,38%), CIP (15,38%) y SxT (11,54%). Por su parte, fue baja la proporción de *S. aureus* resistentes a RA (7,69%); siendo aún más baja para GM con una representación del 3,85% de cepas resistentes.

Adicionalmente, se observó que el 100% de los *S. aureus* en este estudio resultaron sensibles al C. De la misma manera se evidenció que los mismos eran inhibidos *in vitro* en presencia de VA en los ensayos de determinación por CMI, aún a concentraciones por debajo de 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Dentro de las once (11) cepas de *S. aureus* seleccionadas se pudo observar que éstas llevaban entre 1 hasta 4 bandas de DN_{Ap}, y sus tamaños oscilaron entre 1,45 kb y 22,31 kb, siendo a su vez estas bandas las más frecuentes entre las cepas (Tabla 1, Figura 1A). Se observaron dos cepas con una banda de 11 kb en aislados que mostraban resistencia a uno ó dos antibióticos.

Tabla 1. Caracterización de la resistencia a antibióticos y perfil plasmídico en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de portadores nasal sano.

Cepas de <i>S. aureus</i>	Producción de β -lactamasas	Crecimiento en placas con Oxacilina *	Patrón de resistencia a antibióticos según antibiograma	Perfil plasmídico (kb)
St 9	NA	NA	♦	ND
St 10	NA	NA	♦	ND
St 24	+	NA	P ^R	ND
St 25	+	NA	P ^R	ND
St 27	-	NA	P ^R	ND
St 21	-	NA	P ^R	ND
St 22	+	NA	P ^R	ND
St 18	+	NA	P ^R	22,31-11,24-1,67-1,45
St 19	-	NA	P ^R	ND
St 6	-	NA	P ^R	ND
St 26	+	NA	P ^R -TE ^R	ND
St 13	+	NA	P ^R -TE ^R	ND
St 20	+	SARM	P ^R -OX ^R	ND
St 11	+	SARM	P ^R -OX ^R	22,86 -11,24-1,67-1,45
St 14	+	NA	P ^R -TE ^R -CIP ^R	ND
St 5	-	NA	P ^R -E ^R - SxT ^R	22,31-1,78-1,45
St 8	+	SASM	P ^R -OX ^R -E ^R	22,31-11,24-1,67-1,45
St 1	+	NA	P ^R -TE ^R -CC ^R	22,31-1,71-1,08
St 16	-	SARM	P ^R -OX ^R -E ^R -CIP ^R	22,31-1,67-1,45
St 17	-	SARM	P ^R -OX ^R -E ^R -CIP ^R	1,67-1,45
St 28	+	SASM	P ^R -OX ^R -E ^R -CC ^R	22,31
St 4	-	SASM	P ^R -OX ^R -TE ^R -CIP ^R	ND
St 7	+	SASM	P ^R -OX ^R -TE ^R -E ^R	22,31-1,78-1,45
St 23	+	NA	P ^R -E ^R -RA ^R -CC ^R	1,67-1,45
St 3	+	SASM	P ^R -OX ^R -RA ^R - SxT ^R -CC ^R	ND
St 15	-	SARM	P ^R -OX ^R -TE ^R -E ^R -GM ^R - SxT ^R -CC ^R	22,31-1,67-1,45

SASM: *S. aureus* sensible a Meticilina, SARM: *S. aureus* resistente a Meticilina, * suplementadas con 6 μ g/mL de OX + 4% de NaCl, NA: No aplica la prueba señalada por ser OX ó P sensible. ND: No determinado. ♦: Sensibles a todos los antibióticos probados. P: Penicilina, OX: Oxacilina; TE: Tetraciclina; E: Eritromicina; GM: Gentamicina; RA: Rifampicina; VA: Vancomicina; SxT: Trimetoprin-Sulfamethoxazol; CIP: Ciprofloxacina; CC: Clindamicina; ^R: Resistente.+: Producción de la enzima, -: No producción de la enzima.

Tras el crecimiento de las cepas de *S. aureus*, resistentes antibióticos y portadoras de plásmidos, a temperaturas muy por encima de su óptimo se pudo observar que cultivos derivados de la St 5, mostraron cambios en la resistencia a antibióticos (90%), manifestándose la aparición del fenotipo E^S (Tabla 2). Solo la colonia St 5.2.5 expuso el fenotipo P^SE^S. Se obtuvo entre estas colonias

la pérdida de las tres (3) bandas plasmídicas presentes en su cepa parental (Figura 1B).

Tabla 2. Comparación de los fenotipos de las cepas silvestres de *Staphylococcus aureus* y las colonias tratadas con elevada temperaturas.

Fenotipo <i>S. aureus</i> Silvestres			Fenotipo <i>S. aureus</i> Curadas		
Cepa	Patrón de resistencia	Tamaño de las bandas plasmídicas (kb)	Colonia	Patrón de resistencia	Tamaño de las bandas plasmídicas (kb)
St 5	P ^R -E ^R -SxT ^R	22,31;1,78; 1,45	St 5.1.1	P ^R -E ^R -SxT ^R	22,31; 1,78 1,45
			St 5.1.2- 3-4-5	P ^R -E ^S -SxT ^R	-
			St 5.2.1- 2-3-4		
			St 5.2.5	P ^S -E ^S -SxT ^R	-
St 11	P ^R -OX ^{R*}	22,86;11,24; 1,67;1,45	St 11.1.1- 2-3-4-5	P ^R -OX ^{R*}	22,86
			St 11.2.1- 3	P ^R -OX ^{R*}	22,86
			St 11.2.2- 4-5	P ^R -OX ^{R*}	-
St 18	P ^{R*}	22,31;11,24; 1,67;1,45	St 18.1.1- 2-3-4-5	P ^{R*}	-
			St 18.2.1- 2-3-5	P ^{R*}	-
			St 18.2.4	P ^{R*}	22,31

*productora de β-lactámase; P: Penicilina, OX: Oxacilina; E: Eritromicina; SxT: Trimetoprim/sulfametoxazol, ^R: Resistente.

Entre las colonias procedentes de la cepa parental St 11, no se observaron cambios en el fenotipo original de resistencia (P^R-OX^R, β-lactamasas positiva). Sin embargo, se percibieron cambios en el perfil de las bandas de DNAP, en el que se destaca la pérdida de las dos (2) bandas plasmídicas pequeñas que portaba la cepa silvestre y conservándose la banda de 22,86 kb (Tabla 2 y Figura 1C).

Por su parte, entre las colonias resultantes de la parental St 18 se observó un comportamiento similar a la St 11, para las cuales tampoco se detectó cambios en el fenotipo de resistencia y sí la pérdida de todas las bandas en el patrón plasmídico de su cepa original, a excepción de la colonia resultante 18.2.4, en la cual permaneció la banda plasmídica de 22,31 kb (Tabla 2, figura no mostrada, ya que igual a la St11).

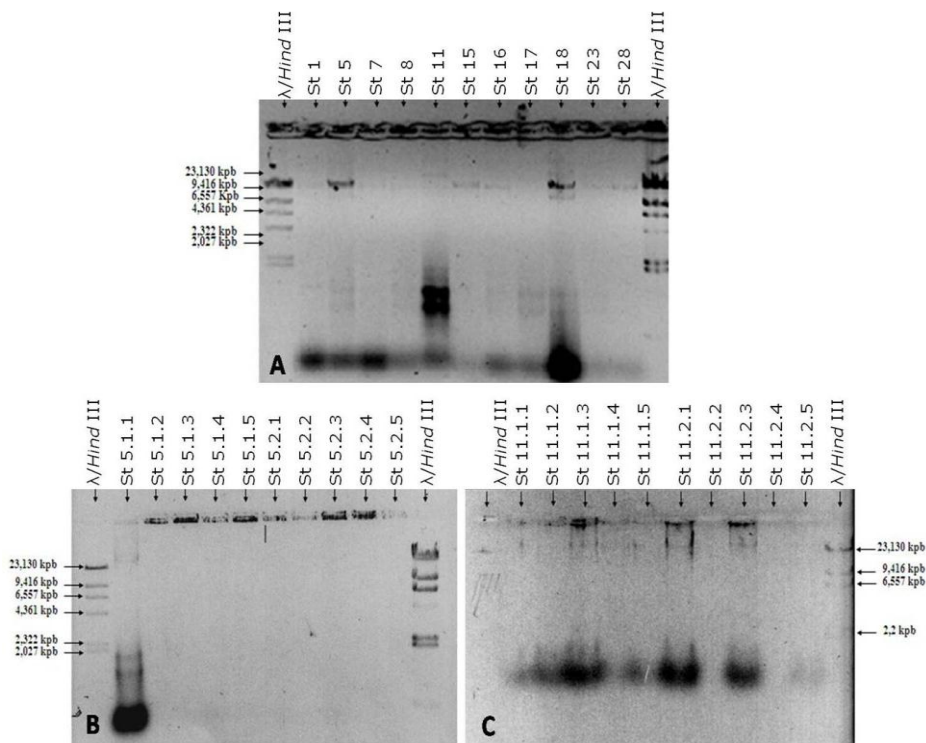


Figura 1. A.- DNA plasmídico de las cepas de *S. aureus* aisladas de portador nasal sanos, se señala la banda de 11 kb (flechas blancas). B.- DNA plasmídico de las colonias seleccionadas de la cepa de *S. aureus* St 5 sometida a curación donde se observa las tres bandas plasmídicas (flechas negras). C.- DNA plasmídico de las colonias seleccionadas de la cepa de *S. aureus* St 11 sometida a curación.

DISCUSIÓN

El hallazgo de alta frecuencia de cepas de *S. aureus* resistentes a P, mediada por las enzimas β -lactamasas entre los aislados estudiados, es un evento similar a los reportados en aislados para la misma especie bacteriana procedentes de alimentos y fosas nasales de personal de enfermería en el estado

Zulia, Venezuela (Rivera 2005, Castellano *et al.* 2005). Sin embargo, los resultados evidencian un hallazgo de importancia clínica al detectarse cepas P^R no productoras de β -lactamasas, lo que hace presumir que se deba a un mecanismo por modificación de PBP's (Borraz 2006).

La detección de *SARM* en particular, coinciden con la aparición evidente de clones *SARM* en infecciones comunitarias y en personas portadoras sanas (Metzler *et al.* 2004, Pastila *et al.* 2004), mostrándose un porcentaje considerable de cepas OX^R; un hallazgo que resulta de gran interés debido a la gran alarma mundial que actualmente se tiene sobre la presencia de este fenotipo en la comunidad, precisamente por la multiresistencia colateral que estas tienden a adquirir (Castellano *et al.* 2005, King *et al.* 2006, Palombarani *et al.* 2007).

En este sentido la resistencia a OX aquí reportada, con manifestación de resistencia a otros grupos de antibióticos (Tabla 1), demuestra la diversidad que existe entre las *SARM* diseminadas en la población sana analizada. Esta última situación hace aún más preocupante su presencia y diseminación entre la comunidad; ya que su alta heterogeneidad para resistir a otros antibióticos las convierte en un potencial patógeno difícil de erradicar y controlar en caso de ser el agente etiológico de algunas infecciones (O'Brien *et al.* 2004, Palombarani *et al.* 2007).

La alta frecuencia de cepas de *S. aureus* aquí señaladas con resistencia a TE, E, SxT y CIP son muy similares a los reportados en Venezuela en cepas provenientes de muestras clínicas (Castellano *et al.* 2005, Atencio *et al.* 2005, Guzmán y Lozada 2007, Atencio *et al.* 2008, Fernández 2010) así como en reportes internacionales (Hong *et al.* 2004, King *et al.* 2006, Palombarani *et al.* 2007, Khatoon *et al.* 2010).

Adicionalmente, los resultados evidencian un incremento en la frecuencia de cepas de *S. aureus* resistentes a RA y CC cuando los valores son contrastados a los reportes descritos en otros países y en Venezuela en aislados de *S. aureus* provenientes de muestras clínicas (Hong *et al.* 2004, Castellano *et al.* 2005, Atencio *et al.* 2005, Atencio *et al.* 2008) así como también lo reporta Rivera (2005) en cepas aisladas de quesos.

En Venezuela y en otros países de América del Sur es poco frecuente el uso de GM para el control de infecciones causada por *S. aureus* (Palombarani *et al.* 2007, Otth *et al.* 2008) y es precisamente esto, lo que hace el aislamiento poco frecuente de cepas resistentes a ése agente; tal como lo demuestra esta

investigación y los descritos por Hong *et al.* (2004), Castellano *et al.* (2005) y Atencio *et al.* (2005) y Atencio *et al.* (2008).

La sensibilidad a C y VA para el total de las cepas de *S. aureus* estudiadas han sido fenotipos descrito en países como Chile y Venezuela (Pinto *et al.* 2002, Atencio *et al.* 2005, Atencio *et al.* 2008, Otth *et al.* 2008). No obstante, reportes nacionales e internacionales no concuerdan con los resultados encontrados, ante el C, ya que se señalan cepas de *S. aureus* resistentes a éste antimicrobiano en ambientes clínicos (Hong *et al.* 2004, O'Brien *et al.* 2004, Palombarani *et al.* 2007).

Particularmente, el hallazgo de cepas de *S. aureus* sensibles a VA, es de suma importancia al considerarse el antibiótico de selección para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus* resistentes a ME u OX (Castellano y Perozo 2010b). Sin embargo, en los últimos años este evento se ha convertido en una alarma mundial por la proliferación de cepas con resistencia intermedia y completa a la VA, denominadas VISA y VRSA respectivamente; ya aisladas en países como Brasil, Corea, Japón, EE.UU y Sur África (Hiramatsu *et al.* 2004, Castellano y Perozo 2010b).

El alto porcentaje de resistencia entre las cepas de *S. aureus* estudiadas, para los diferentes grupos de antibióticos ensayados *in vitro*, revelan la diseminación de cepas resistentes entre la población sana. Esto resulta alarmante al considerar a *S. aureus* como un potencial patógeno que puede desencadenar infecciones severas en tracto respiratorio; lo que llegaría a ser un evento difícil de controlar tratándose de cepas resistentes a múltiples antibióticos.

Los tamaños de las bandas plasmídicas aquí reportados, en su mayoría, coinciden con estudios previos del entorno occidental de Venezuela para *S. aureus* provenientes de muestras clínicas y de alimentos (Velazco *et al.* 2002, Atencio *et al.* 2005, Rivera 2005, Atencio *et al.* 2008, Fernández 2010); sin embargo, la banda plasmídica correspondiente al peso estimado de 11 kpb. no coincide con tales reportes. Éste elemento extracromosomal, por primera vez descrito en la región, pudiera corresponder a nuevas adquisiciones de plásmidos que pueden conferir fenotipos de resistencia a agente antimicrobianos, que hoy día se utilizan en la terapéutica para la erradicación de *S. aureus*, no contemplados en este estudio.

La multiresistencia a antibióticos ha sido atribuida, en la mayoría de los casos, a la presencia de plásmidos en microorganismos del mismo género y/o

especie bacteriana alrededor del mundo, siendo el más común el de 23,13 kb (Daini y Akano 2009, Akinjogunla y Enabulele 2010); tal y como fue observado en los aislados de la presente investigación.

Los resultados de curación plasmídica permiten sugerir que el determinante genético de resistencia a la P, específicamente el de la producción de enzimas β -lactamasas que causan la hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico de las penicilinas y; que dejan inactiva su acción de asociación sobre la proteínas de unión a las penicilinas (conocidas como PBP's) e inhibiendo el paso de transpeptidación durante la síntesis de pared celular en *S. aureus* y otras bacterias, podría estar ubicado en los *S. aureus* estudiados en la banda de 22,31 kb, tal como ha sido reportado en estudios previos (Rivera 2005, Udo *et al.* 2006, Tenover *et al.* 2006, Atencio *et al.* 2008, Akinjogunla y Enabulele 2010).

Se ha reportado la existencia en plásmidos de 15 a 40 kb y en los transposones Tn551, Tn552 y Tn4001 de un gen que codifica para una β -lactamasa extracelular en *S. aureus*, denominado *blaZ*, que suelen integrarse al cromosoma sin que su expresión se vea afectada (Jensen *et al.* 2008, Castellano y Perozo 2010a). Esto explica, aún más, la sospecha de que el marcador genético para la producción de β -lactamasa entre las cepas analizadas se localiza en la banda de 22,31 kb y éste se comporta como un plásmido episomal, o que el mismo elemento genético móvil que lleva el gen se integra al cromosoma, conservando su resistencia tras la curación de sus plásmidos como lo señala Rivera (2005).

Sin embargo aquellas cepas que mantienen la resistencia a P luego del curado del mencionado plásmido, y son a la vez resistentes a la oxacilina, la razón puede fundamentarse por la baja afinidad a las penicilinas que caracterizan a ciertas PBP modificadas, como las PBP2a codificadas por el gen *mecA* (Udo *et al.* 2006, Castellano y Perozo 2010a).

La resistencia a diversos antimicrobianos que se introdujeron en los años 1940 y 1950 tales como: tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin, neomicina y kanamicina se le han adjudicado a plásmidos pequeños (en el rango de los 3,5 kb) en *S. aureus* y otras especies bacterianas, lo que ha proporcionado una clara evidencia de su transferencia horizontal; a estos plásmidos escasamente se les ha establecido asociaciones con elementos transponibles y suelen llevar un único marcador de resistencia para tales antibióticos, raramente hasta dos determinantes genéticos (Jensen *et al.* 2008).

Entre los plásmidos pequeños hallados en *S. aureus*, los que pertenecen a la familia pSN2, son mediadores de resistencia al grupo de antibióticos MLS_B (Macrólido, Lincosamida, eStreptogramina B) (Novick 1990, O'Brien *et al.* 2004). Por tal razón, en este estudio se le atribuye la pérdida de resistencia a E entre los aislados (St 5.1.2-3-4-5 y St 5.2.1-2-3-4) a la pérdida de las bandas plasmídicas pequeñas con tamaños de 1,78 kpb. y 1,45 kpb. (Tabla 2, Figura 1B) tal como ha sido señalada en otras investigaciones (O'Brien *et al.* 2004, Rivera 2005, Tenover *et al.* 2006).

CONCLUSIONES

En este estudio preliminar se hace evidente la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, así como la presencia de cepas SARM íntimamente relacionada con fenotipos de multiresistencia y la producción de β -lactamasas entre la población sana muestreada, lo que debe alertar tanto a la comunidad médica como a la comunidad en general sobre la dificultad en la elección de una antibiótico terapia adecuada en el tratamiento en casos de infecciones causadas por éstos microorganismos.

Sin embargo, los resultados evidencian un hallazgo de importancia clínica al detectarse cepas P^R no productoras de β -lactamasas, lo que hace sospechar que se deba a un mecanismo por modificación de algunas PBP's. Por otro lado, se demostró la presencia de plásmidos entre las cepas estudiadas que se relacionaron con algunos fenotipos de resistencias, convirtiéndose esto en un indicio genético que puede explicar la diseminación de algunos genes de resistencia entre las bacterias, mediada por plásmidos, en la población zuliana.

AGRADECIMIENTOS

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

LITERATURA CITADA

- AKINJOGUNLA O.J., Y I. ENABULELE. 2010. Virulence Factors, Plasmid Profiling and Curing analysis of Multi-drug Resistant *Staphylococcus aureus* and Coagulase negative *Staphylococcus* spp. isolated from Patients with Acute Otitis Media. *Journal of American Science*. 6(11): 1022-1033.
- ALVAREZ M., L. ATENCIO, J. GUIÑEZ Y J. SUÁREZ. 2002. Análisis del perfil plasmídico de cepas *Staphylococcus aureus* multiresistentes a antibióticos y metales pesados. *Bol. Centro Invest. Biol.* 36(1): 79-93.

- ASHESCHOV E. 1966. Loss of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* resulting from growth at high temperature. *Journal Genetic Microbiology* 42: 403-410.
- ATENCIO L., M. ÁLVAREZ, J. GUÍÑEZ, X. MONTIEL Y M. SALAS. 2005. *Staphylococcus aureus*: sensibilidad a antibióticos, metales pesados y patrón plasmídico. *Revista Científica Ciencia* 13(1): 5-13. Universidad del Zulia.
- ATENCIO L., M. ÁLVAREZ, L. DÍAZ, J. GUÍÑEZ, X. MONTIEL Y J. RIVERA. 2008. Efecto del bromuro de etidio sobre el fenotipo y perfil plasmídico de *Staphylococcus aureus*: Estudio preliminar. *Revista Científica Ciencia* 16(2): 167-175. Universidad del Zulia.
- AUSUBEL F., R. BRENT, R. KINGSTONE, D. MOORE, J. SELDMAN, J. SMITH, Y K. STRUHL. 2002. *Short protocols in Molecular Biology*. Third Edition. A compendium of Methods from Currents Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Son, Inc. Edition, New York, United States, pp. 2-13.
- BORRAZ O.C. 2006. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. p. 21-24.
- BROOKS G., J. BUTEL Y S. MORSE. 2002. *Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Décima séptima edición. Editorial Prentice Hall. Santafé de Bogotá-Colombia, pp. 246-247
- CASTELLANO M., E. BERMÚDEZ, A. PEROZO, L. CAMACHO, B. HARRIS Y M. GINESTRE. 2005. *Staphylococcus aureus*: Estado de portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad antimicrobiana. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 25(2): 72-78.
- CASTELLANO M., Y A. PEROZO. 2010a. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*. 38(1): 1-35.
- CASTELLANO M., Y A. PEROZO. 2010b. Mecanismos de resistencia a Glicopéptidos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*. 38(1): 36-44.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard-Tenth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, document M100-S19-27 29(3), p52.
- DAINI O., Y S. AKANO. 2009. Plasmid-mediated antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* from patients and non patients. *Scientific Research and Essay*. 4: 346-350.
- FERNÁNDEZ R. 2010. Determinación de genes de resistencia a antimicrobianos *mecA* y *blaZ* en *Staphylococcus aureus* aislados en el Edo. Zulia. Trabajo Especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología. Universidad del Zulia, pp. 87.
- GARCÍA J., R. CANTÓN, J. GARCÍA, M. GÓMEZ, L. MARTÍNEZ, C. RODRÍGUEZ Y J. VILA. 2001. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España. Capítulo 12: 1-41.

- GARCÍA O., R. YUSTE, B. MIRABET, N. ABAD, A. MORAL Y B. VILLA. 2005. Cribado nasal del *Staphylococcus aureus* en una unidad de hemodiálisis. Revista de la Sociedad Española de Enfermería Nefrológica 8 (4): 81-83.
- GUZMÁN M., Y R. LOZADA. 2007. Detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes aislados de pacientes con infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 27(1): 349-363.
- HARPUTLUOGLU U., E. EGELI, I. SAHIN, F. OGHAN Y O. OZTURK. 2005. Nasopharyngeal aerobic bacterial flora and *Staphylococcus aureus* nasal carriage in deaf children. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 69: 69-74.
- HIRAMATSU K. 2004. Reviews: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. The Lancet. Infectious diseases. 1: 147-155
- HONG B., J. HEE-CHANG, H. HEE, L. YEONG, K. BONG, P. WAN , L. KI, C. YOUNG, P. SANG, O. MYOUNG_DO, K. EUI Y C. KANG. 2004. In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(4): 1124-11127.
- JENSEN S., S. KWONG, B. LYON Y N. FIRTH. 2008. Evolution of multiple drug resistance in staphylococci. Microbiology Australia. 29(3): 120-124.
- KHATOON A., M. KAMAL, S. HUSSAIN, W. ALAM, O. RAUF Y S. SHAID. 2010. Antimicrobial susceptibility patterns and identification of plasmid-borne methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 7(2): 139-145.
- KING M., B. HUMPHREY, Y. WANG , E. KOURBATOVA, S. RAY Y H. BLUMBERG. 2006. Emergence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 Clone as the Predominant Cause of Skin and Soft-Tissue Infections. Annals of Internal Medicine 144(5): 309-18.
- MAC FADDIN J. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, United States of America. Pp: 78-97, 321-326, 368-377, 439-450.
- MACRINA F., P. WOOD Y K. JONES. 1980. Simple method for demonstrating small plasmid deoxyribonucleic acid molecules in oral Streptococci. Appl. Environ. Microbiol 39: 1070-1073.
- METZLER K., G. HANSEN, P. HEDLIN, E. HARDING, K. DRLICA Y J. BLONDEAU. 2004. Comparison of minimal inhibitory and mutant prevention drug concentrations of 4 fluoroquinolones against clinical isolates of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents 24:161-67. Disponible en: www.ischemo.org.
- MUJICA I., L. DÍAZ, J. GUÍÑEZ, 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. Revista Científica Ciencia 15(3): 1-8. Universidad del Zulia.

- NOVICK R. 1990. The *Staphylococcus* as a molecular genetic system. Molecular biology of the staphylococci :7-37. VCH Publishers, Inc., New York.
- O'BRIEN F., T. LIM, F. CHONG, G. COOMBS, M. ENRIGHT, D. ROBINSON, A. MONK, B. SAÏD-SALIM, B. KREISWIRTH Y W. GRUBB. 2004. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. Journal of Clinical Microbiology 42(7): 3185-90.
- OTTH L., M. WILSON, N. BUSTAMANTE, H. FERNÁNDEZ Y C. OTTH. 2008. Susceptibilidad antimicrobiana y patrones de resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes y portadores en la ciudad de Valdivia, Chile. Rev Chil Infect 25(3):175-178.
- PALOMBARANI S., N. GARDELLA, A. TUDURI, S. FIGUEROA, G. SLY, R. CORAZZA, G. GUTKIND, M. ALMUZARA Y M. MOLLERACH. 2007. Infecciones adquiridas en la comunidad por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un hospital de agudos. Revista Argentina de Microbiología 39: 151-155.
- PASTILA S., K. SAMMALKORPI, J. VUOPIO-VARKILA, S. KONTIAINEN Y M. RISTOLA. 2004. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak involving several hospitals. Journal of hospital infection, 58:180-86.
- PINTO M. 2002. Resistencia antimicrobiana en Chile hoy. Rev Chil Infect; 19 (3): 4.
- RIVERA J. 2005. Patrón de resistencia a antibióticos y perfil Plasmídico en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos. Trabajo Especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología. Universidad del Zulia, pp. 115.
- TENOVER F., L. MCDUGAL, R. GOERING, G. KILLGORE, S. PROJAN, J. PATEL Y P. DUNMAN. 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. Journal of Clinical Microbiology 44: 108–118.
- 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.
- VELAZCO E., B. NIEVES, M. ARAQUE Y Z. CALDERAS. 2002. Epidemiología de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en una unidad de alto riesgo neonatal. Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica 20(7): 321-25.