

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA BIOANÁLISIS CLÍNICO



TRABAJO DE TESIS
PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS CLÍNICO

“IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y SUSCEPTIBILIDAD
ANTIMICROBIANA DE ESPECIES *ENTEROCOCCUS* EN GANADO
PORCINO”

Autoras

Bra. Hilda Petrona Altamirano Ramírez

Bra. Elizabeth Cristina Bárcenas Sánchez

Tutores

Dr. Daniel Reyes Navarrete. MD, MSc, PhD
Profesor Titular Departamento de Microbiología y Parasitología

Dr. Erick Amaya Mayorga. PhD
Profesor Titular Departamento de Microbiología y Parasitología

León, Febrero 2014

“A la libertad por la Universidad”

DEDICATORIA

A Dios por habernos dado la fortaleza para seguir adelante y la sabiduría para realizar este trabajo investigativo.

A nuestros padres por el apoyo incondicional, su comprensión, amor y abnegación a lo largo de nuestra vida estudiantil y el gran esfuerzo que han realizado por mantenernos en esta labor ya que sin ellos no lo hubiésemos podido lograr.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por existir y ser la luz que nos ilumina día a día y por brindarnos salud y las fuerzas necesarias para cumplir una de nuestras metas

A nuestros tutores Dr. Daniel Reyes y Dr. Erick Amaya por su valiosa orientación, colaboración y dedicación en el transcurso de la elaboración de este trabajo investigativo.

A los dueños de animales, que sin el consentimiento de ellos no podríamos haber llevado a cabo nuestro trabajo investigativo.

Al personal del Departamento de Microbiología y Parasitología, Campus Médico, especialmente a: Antonia Obando, Edwin Herrera y Cándida Hernández, por su amabilidad y disposición en la preparación de materiales durante el procesamiento de las muestras.

A nuestros amigos y compañeros de estudio, especialmente a: Nelson Rugama y Francisco Josiel Morales, los cuales nos ayudaron en la recolección de las muestras; y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma nos apoyaron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Los *Enterococcus spp.* son bacterias que forman parte de la flora gastrointestinal de los animales, por lo que es común encontrarlos en estos. Son resistentes de manera natural a muchos de los antibióticos y pueden adquirir resistencia a través de plásmidos; constituyen uno de los principales agentes etiológicos de infecciones oportunistas y más reciente de infecciones en la comunidad.

El propósito de este estudio fue identificar las especies, susceptibilidad antimicrobiana y fenotipos de *Enterococcus* aislados de muestras fecales de ganado porcino en cuatro comunidades del departamento de León; utilizando métodos convencionales, un sistema automatizado (*PhP-RF*) y métodos de difusión en disco (*Kirby-Bauer*).

Se recolectaron un total de 81 muestras fecales de cerdos, la mayoría de los animales se encontraban libres en el patio ($P < 0.001$) y se alimentaban de desperdicios ($P = 0.038$), se asociaron a un mayor número de aislamiento de *Enterococcus*. Del total de muestras fecales al 80% (65/81) se les aisló *Enterococcus*. De este grupo de aislados, se logró caracterizar un 57% (37/65), los cuales se dividieron en 6 especies de *Enterococcus*, siendo *E. gallinarum* (12/37) la especie aislada con mayor frecuencia, seguida de *E. hirae* (9/37) y *E. faecium* (8/37). A las especies identificadas se les realizó análisis fenotípico y de susceptibilidad antibacteriana. El análisis fenotípico de las especies mostró la presencia de 17 fenotipos bioquímicos, la mayoría de los cuales provienen de aislados obtenidos de la comunidad de Momotombo. El análisis de susceptibilidad indicó que la mayoría de los aislados mostraron un alto grado de sensibilidad a los antibacterianos ensayados; sin embargo, cierto grupo de aislados mostraron resistencia a eritromicina, ciprofloxacina y resistencia intermedia a vancomicina. Todos los aislados fueron sensibles a ampicilina.

Palabras claves: *Enterococcus spp.*, Ganado porcino, *PhP-RF*, Fenotipos bioquímicos, Susceptibilidad antibacteriana.

INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
INDICE	IV
ABREVIATURAS	VI
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	3
3 Justificación.....	6
4 Planteamiento del Problema.....	7
5 Objetivos.....	8
5.1 General.....	8
5.2 Específicos.....	8
6 Marco Teórico	9
6.1 Generalidades	9
6.2 Características Morfológicas y de Crecimiento de los <i>Enterococcus spp.</i>	9
6.3 Taxonomía y Clasificación del Género <i>Enterococcus spp.</i>	10
6.4 Hábitat y Rutas de Transmisión	10
6.5 Factores de Virulencia de <i>Enterococcus spp.</i>	12
6.6 Manifestaciones Clínicas causadas por <i>Enterococcus</i>	13
6.7 Identificación de <i>Enterococcus spp.</i>	15
6.7.1 Aislamiento e Inoculación.	16
6.7.2 Identificación de Género.	16
6.7.3 Identificación de las Especies de <i>Enterococcus spp.</i>	17
6.7.4 Fenotipificación de <i>Enterococcus spp.</i>	18
6.8 Antibióticos como Promotores de Crecimiento en Animales.....	19
6.8.1 Incremento en el uso de los Antibióticos	19
6.9 Resistencia Antimicrobiana	21
6.9.1 Resistencia de los <i>Enterococcus spp.</i> a los Antibióticos.	21
6.10 Detección de Resistencia de los <i>Enterococcus spp.</i> en el Laboratorio.	26
6.10.1 Método de Difusión en Discos o de Kirby-Bauer	27
6.10.2 Método de Dilución en Caldo o en Agar.....	28
7 Materiales y Métodos	31
7.1 Tipo y Área de Estudio.....	31
7.2 Muestra de estudio.....	31
7.3 Recolección y Procesamiento de las Muestras	31
7.3.1 Identificación de Género <i>Enterococcus</i>	32
7.3.2 Identificación de las especies de <i>Enterococcus</i>	32
7.3.3 Determinación de la Susceptibilidad Antimicrobiana.	34
7.4 Aspectos Éticos del estudio.....	34
7.5 Análisis de los Datos	34
7.6 Operacionalización de Variables	35

8	Resultados.....	36
8.1	Características Generales	36
8.2	Identificación y Distribución de especies	36
8.3	Perfil de Susceptibilidad.....	40
9	Discusión	42
10	Conclusiones.....	47
11	Recomendaciones.....	48
12	Referencias	49
13	Anexos	53

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Descripciones
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
ERI	Eritromicina
ERV	<i>Enterococcus</i> Resistentes a Vancomicina
EUA	Estados Unidos de América
GEH	Gentamicina
ICC	Infusión Cerebro Corazón
NaCl	Cloruro de Sodio
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Solución Buffer Fosfato
PhP	Phene Plate
PYR	L-Pirrolidonilo naftilamido
STH	Estreptomicina
UFC	Unidad Formadora de Colonia
VAN	Vancomicina

1 INTRODUCCIÓN

Los *Enterococcus* forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal del hombre y muchos animales; por lo que pueden ser liberados directamente al medio ambiente o a través de aguas servidas, donde pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo ⁽¹⁻³⁾. Son considerados microorganismos comensales ya que no fabrican ninguna toxina ni otro factor de virulencia definido, por lo que no se consideran patógenos primarios ⁽⁴⁾.

La frecuencia de aislamiento de las distintas especies de *Enterococcus* varía de acuerdo con el huésped, edad, dieta, región geográfica y otros aspectos relacionados con sus condiciones fisiológicas ⁽²⁾. Las especies aisladas con mayor frecuencia en el intestino humano son *E. faecalis* (80-90%), seguida por *E. faecium* (5-10%) ⁽⁵⁾. Por otra parte *E. faecium* es una de las especies que se encuentra con más frecuencia en pollos y cerdos sanos. En cambio *E. durans* puede ser encontrado en heces de aves, pero no en otras especies de granja. *E. gallinarum* se encuentra en aves, mientras que *E. avium* se aísla preferentemente de mamíferos ⁽⁶⁾.

Los *Enterococcus* constituyen la tercera causa más común de infección nosocomial (aproximadamente un 12% del total) implicados con mayor frecuencia en infecciones del tracto urinario, bacteriemias primarias y secundarias ⁽⁶⁾. También se aíslan a partir de infecciones de heridas pélvicas y abdominales, aunque en estos casos, generalmente se trata de infecciones mixtas ^(3,6). El incremento de las infecciones nosocomiales enterocócicas se debe a la resistencia natural que presentan a la mayoría de los antibióticos, representando un desafío terapéutico ⁽³⁾. Además se ha demostrado el aislamiento de ciertas cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) en infecciones nosocomiales y aguas residuales ⁽⁶⁻⁸⁾.

La ruta de transmisión de los genes de resistencia a vancomicina ha ocurrido desde los animales a los humanos, vía cadena alimentaria; debido al uso de los antibióticos como promotores de crecimiento; como es el caso de países europeos en donde se utilizan antibióticos como promotores de crecimiento. De igual forma la transmisión de genes se relaciona al uso indiscriminado de los antibióticos de amplio espectro y de vancomicina

en los Hospitales, y que posteriormente las cepas bacterianas sean diseminadas al medio ambiente por medio de las aguas residuales de estos ^(1,3).

En el presente estudio se pretende determinar la ocurrencia de las especies de *Enterococcus* aislados en muestras fecales de ganado porcino, así como identificar sus patrones fenotípicos de resistencia antimicrobiana.

2 ANTECEDENTES

En 1986 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EUA) (USA *Environmental Protection Agency*) consideró a los *Enterococcus* como un indicador de contaminación fecal de aguas recreacionales, basado en estudios que demostraron que los *Enterococcus* tienen una relación directa con las enfermedades asociadas a la natación ⁽⁹⁾.

Durante 1986-1987, se aislaron por primera vez en Europa (Francia y Reino Unido) las cepas ERV en pacientes británicos y franceses. Tres meses antes de este brote se había adoptado la terapia empírica con vancomicina más ceftazidime para el manejo de la sepsis sin foco aparente ⁽¹⁰⁾; aunque poco tiempo después se empezó a detectar ERV en EUA, Australia, Argentina, Japón ⁽¹¹⁾. Además, un estudio realizado en 1997 – 1999 en Estados Unidos demostró que la prevalencia de ERV en el ambiente hospitalario era mucho mayor, lo cual se relacionaba con un elevado consumo de este antibiótico en los últimos años ^(7, 12).

Un estudio realizado en 1998 – 2000, en cuatro países Europeos (Suecia, Reino Unido, Dinamarca y España); a partir de muestras de aguas, materia fecal de humanos, cerdos y bovinos se encontró que *E. faecium* fue la única especie con resistencia a vancomicina, además que los ERV que se encontraban en las heces de animales se asociaba al uso del promotor de crecimiento *avoparcina* principalmente en España, mientras que los ERV en heces de humanos se asociaba al uso frecuente del antibiótico en los hospitales. Por el contrario los ERV de aguas residuales en Suecia, España y el Reino Unido no se asociaron a ninguno de los factores mencionados ⁽¹²⁾.

En América Latina, datos del Programa SENTRY de vigilancia de resistencia los ubican en el octavo lugar como causa de bacteriemia y en el cuarto como causa de infección urinaria y de sitio quirúrgico. ⁽¹⁰⁾

Durante el período 2002 - 2003 se realizó un estudio por *Ronconi M y cols.* ⁽²⁾ en Argentina a partir de materias fecales de pacientes hospitalizados en donde se encontró una mayor prevalencia de *E. faecalis* y *E. faecium*. Además, *E. faecalis* tiene una

prevalencia mayor en la resistencia de alto nivel de aminoglucósidos, pero no se encontraron cepas resistentes a vancomicina ⁽⁶⁾.

De igual forma se han realizado estudios en aguas servidas y playas, como los realizados por *Silva J y cols.* ⁽¹⁾ en Chile 2005 y *Vergaray G y cols* ⁽¹³⁾ en Perú 2007, donde también se aislaron *E. faecalis* y *E. faecium* con mayor frecuencia. Sin embargo el estudio realizado por *Fry M* ⁽³⁾ en Chile 2004, en materias fecales de ganado bovino, demostró que las especies mencionadas anteriormente se aislaron con menor frecuencia, aislándose otras especies no identificadas por los métodos utilizados.

En Nicaragua, se tienen pocos reportes sobre la prevalencia de las especies de *Enterococcus* y su resistencia antimicrobiana. De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), las especies que con mayor frecuencia se aíslan son: *E. faecalis*, seguido de *E. faecium*. Estos datos han sido obtenidos a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en el marco de la vigilancia a la resistencia antibacteriana en dicho microorganismo ⁽¹⁴⁾.

En el año 2004 se reportó que *E. faecium* era resistente a ampicilina en un 89% ⁽¹⁴⁾, en cambio para el 2005, *E. faecium* era resistente a ampicilina, gentamicina, y tetraciclinas (100%, 50% y 33%, respectivamente) ⁽¹⁵⁾. Sin embargo, en el año 2006 y 2007, no se registró dato alguno ⁽¹⁶⁾; pero para el año 2008, se aisló *E. faecalis* con resistencia para gentamicina (50%) y *E. faecium* resistente a ampicilina, gentamicina y estreptomina (100%, 50% y 13%, respectivamente) ⁽¹⁷⁾. Para el año 2009, la resistencia de *E. faecium* a ampicilina y gentamicina fue de 100% y 72%, respectivamente, y para *E. faecalis* un 100% resistente a estreptomina ⁽¹⁸⁾.

Un estudio realizado por *Altamirano H y cols.*, en León 2011 (datos no publicados) en el departamento de Microbiología, identificaron *Enterococcus* en muestras fecales de ganado porcino; siendo la especie *E. avium* la de mayor prevalencia (36%), seguido de *E. faecalis* (12%), *E. durans* (8%), *E. faecium* (8%). Sin embargo, no se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana ⁽¹⁹⁾.

En el año 2012, un estudio realizado por *Fonseca M y cols.*, en la ciudad de León sobre susceptibilidad antibacteriana en *Enterococcus spp* aislados de aguas residuales

identificaron con mayor frecuencia a las especies *E. faecalis* (38%), *E. gallinarum* (18%), *E. raffinosus* (11%), *E. faecium* y *E. avium* (10%). *E. faecalis* mostró resistencia intermedia a vancomicina, ciprofloxacina y estreptomina, mientras que *E. faecium* presentó resistencia a la familia de penicilinas y resistencia intermedia a vancomicina y ciprofloxacina ⁽²⁰⁾.

3 JUSTIFICACIÓN

A pesar que los *Enterococcus* presentan poca patogenicidad, son considerados microorganismos que pueden desarrollar infecciones oportunistas, debido a que pueden encontrarse y a su vez diseminarse a través de aguas, alimentos y heces de los vertebrados. Siendo liberados en el medio ambiente principalmente por la materia fecal de humanos y de animales (cerdos, terneros, gallinas, etc.). Por otra parte, el uso y abuso de antibióticos, tanto en la medicina humana como veterinaria, ha constituido un factor importante en la aparición de diversas clases de resistencia antibacteriana que este agente microbiano ha desarrollado en las últimas décadas.

Por tanto, la transmisión de estas bacterias puede convertirse en un problema de salud pública, dado al potencial que tienen de adquirir y transmitir resistencia; así como también por su capacidad de formar grupos de *Enterococcus* dominantes con características idénticas dentro de la población bacteriana aisladas de cerdos y de esta manera facilitar la transmisión y colonización de este microorganismo en otros animales

Por lo antes descrito y debido a que en Nicaragua no existen reportes sobre la identificación de especies de *Enterococcus* y su resistencia a causa del uso de los antibióticos en ganadería porcina; este trabajo se orientó a investigar la frecuencia y patrones de susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus spp.* a través de materia fecal de cerdos en diferentes comunidades del departamento de León.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los *Enterococcus* han emergido como patógenos importantes de infecciones nosocomiales representando un problema de salud pública sobre todo a nivel hospitalario por su capacidad de sobrevivencia, transmisión y su facilidad de adquirir genes de resistencia a los antibióticos de amplio espectro. Además que se han aislados *Enterococcus* resistentes en el medio ambiente y en los animales asociado en estos últimos al uso de promotores de crecimiento combinados con antibióticos, por lo antes mencionado nos planteamos la siguiente inquietud para investigar.

¿Cuál es la distribución fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de especies *Enterococcus* aislados de muestras fecales de ganado porcino en cuatro comunidades rurales del departamento de León, durante Octubre-Noviembre 2013?

5 OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Identificar las especies, susceptibilidad antimicrobiana y fenotipos de *Enterococcus* aislados de muestras fecales de ganado porcino en cuatro comunidades del departamento de León, durante el período de Octubre a Noviembre 2013.

5.2 ESPECIFICOS

- ✓ Identificar las especies de *Enterococcus* presentes en las muestras de estudio y su distribución fenotípica, mediante análisis convencionales y el sistema PhP-RF.
- ✓ Determinar el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de las especies identificadas, utilizando el método de Kirby-Bauer.
- ✓ Correlacionar los hallazgos del aislamiento de *Enterococcus* con las características de la población animal en estudio.

6 MARCO TEÓRICO

6.1 GENERALIDADES

El término *Enterococcus* fue utilizado por primera vez en 1899 por *Thiercelin* para describir diplococos Gram positivos de origen intestinal que formaban pares o cadenas cortas. Estos microorganismos fueron clasificados dentro del género *Streptococcus* como *Streptococcus faecalis* por *Andrewes* y *Horder* en 1906. Un segundo microorganismo fecal, *Streptococcus faecium*, que presentaba características similares al anterior fue descrito por *Orla Jensen* en 1919⁽³⁾. *Sherman* en 1937 propuso un sistema de clasificación que separaba este género en cuatro divisiones: pyogenes, viridans, láctico y *Enterococcus*⁽²¹⁾.

Estas bacterias pertenecían clásicamente, a los *Streptococcus* grupo D de *Lancefield*. En el año 1970 fueron oficialmente clasificados por *Kalina* como un género independiente. A partir de esta fecha el género *Enterococcus* es considerado un género separado del género *Streptococcus*. La división de los géneros se basó en estudios taxonómicos y de ácidos nucleicos que demostraron su relación distante con *Streptococcus* y que permitieron considerarlos géneros diferentes⁽²²⁾.

6.2 Características Morfológicas y de Crecimiento de los *Enterococcus spp.*

El género *Enterococcus* son bacterias Gram positivas, generalmente de forma esférica u ovoide, de menos de 2 µm de diámetro, se encuentran solos, en pares o formando cadenas cortas y generalmente son inmóviles; aunque diferentes cepas de *Enterococcus* como *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, han demostrado movilidad por la presencia de un flagelo corto^(3, 22, 23). Son anaerobios facultativos, catalasa negativos, aunque algunas cepas de *E. faecalis* pueden ser positivas por la producción de una pseudocatalasa cuando crecen en medios que contienen sangre^(23, 24). No forman endosporas, hidrolizan la esculina, son quimioorganótrofos, fermentan los hidratos de carbono para producir principalmente ácido láctico, pero no gas⁽³⁾. Sus requerimientos nutricionales son complejos y variables; crecen usualmente en un caldo de cultivo a 10°C y 45°C, aunque el crecimiento óptimo es a 37°C. Pueden crecer a pH 9,6; con 6,5% de NaCl y con 40% de bilis⁽⁴⁾. Usualmente

fermentan la lactosa. Portan el antígeno D de Lancefield y sobreviven después del calentamiento a 60 °C durante 30 min ⁽²²⁾.

Los *Enterococcus* crecen con facilidad en medios no selectivos como el Agar sangre y el Agar chocolate. A pesar de que estas bacterias pueden confundirse microscópicamente con *S. pneumoniae* en las muestras teñidas con la tinción de Gram, estos microorganismos se pueden diferenciar fácilmente mediante reacciones bioquímicas sencillas, por ej., los *Enterococcus* son resistentes a la optoquina, no se disuelven cuando se exponen a la bilis y producen L-pirrolidonil arilamidasa (la prueba PYR se efectúa habitualmente como una prueba «de 5 minutos»). Son necesarias pruebas fenotípicas (p. ej., la producción de pigmento, la motilidad), bioquímicas y de secuenciación de ácidos nucleicos para distinguir entre *E. faecalis*, *E. faecium* y otras especies de *Enterococcus* ⁽⁴⁾.

6.3 Taxonomía y Clasificación del Género *Enterococcus* spp.

Familia	Streptococcaceae
Género	<i>Enterococcus</i>
Especies	
<i>E. faecalis</i> *	<i>E. cecorum</i>
<i>E. faecium</i> *	<i>E. gallinarum</i> *
<i>E. durans</i> *	<i>E. sulfureu</i>
<i>E. hirae</i> *	<i>E. mundtii</i> *
<i>E. dispar</i>	<i>E. raffinosus</i> *
<i>E. solitarius</i> *	<i>E. serializada</i>
<i>E. columbae</i>	<i>E. pseudoavium</i> *
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. avium</i> *
<i>E. casseliflavus</i> *	

* Especies de *Enterococcus* con importancia clínica para el hombre ⁽⁴⁾

6.4 Hábitat y Rutas de Transmisión

Los *Enterococcus* son bacterias entéricas que se aíslan normalmente a partir de las heces del ser humano a razón de 10⁵ a 10⁷ UFC/g y diversos animales ^(4, 11). Por lo que se encuentran dentro del grupo de microorganismos indicadores de la inocuidad de los alimentos, pues por su amplia distribución pueden encontrarse en estos productos, especialmente en los de origen animal ⁽⁶⁾.

Identificación y Susceptibilidad Antimicrobiana de *Enterococcus spp.*

Son considerados buenos indicadores, debido a que mueren más lentamente que los coliformes, y resisten condiciones extremas de temperatura a diferencia de los coliformes y como resultado sobreviven más que estos. Por ejemplo en los productos semiconservados, procesados por calor pero no estériles, *Enterococcus*, junto con microorganismos esporulados, son con frecuencia los únicos microorganismos sobrevivientes. Los productos mantenidos en el rango de temperatura entre 10-45 °C pueden contener cifras muy altas de estos microorganismos ⁽²²⁾.

También son prevalentes en el cuero, pelo, plumas y pezuñas de los animales y también se pueden encontrar en los equipos, manos de los trabajadores y productos alimenticios. ⁽³⁾

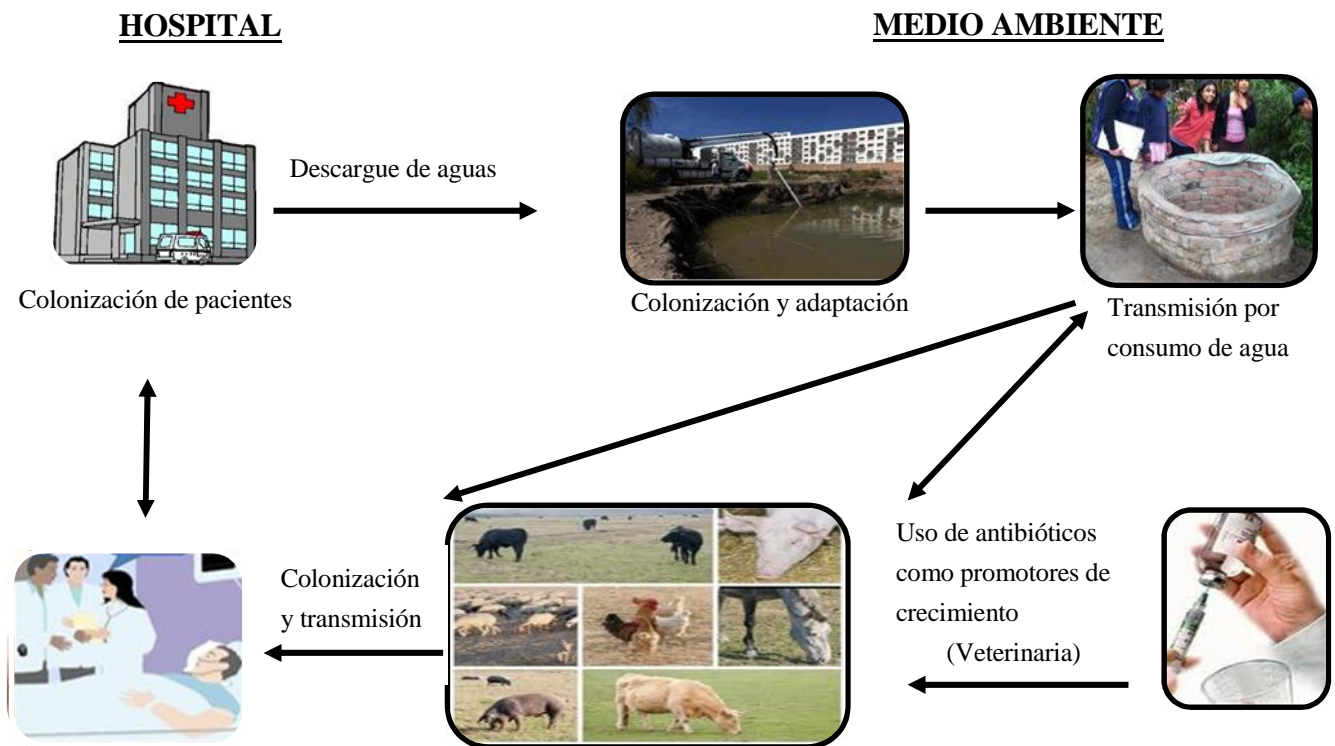


Figura 1. Posible rutas de transmisión de *Enterococcus spp.* La principal ruta de transmisión de *Enterococcus* resistentes, se produce por el uso continuo de antibióticos en pacientes hospitalizados; los depósitos de aguas servidas de los hospitales sirven como medio de adaptación y transmisión de genes; permitiendo así la colonización y transmisión de estos en el medio ambiente donde *Enterococcus* puede sobrevivir por mucho tiempo. De igual forma la diseminación puede ocurrir hacia los seres humanos favorecida por el uso indiscriminado de antibióticos en la crianza de animales, infectando al hombre vía cadena alimentaria. Adaptado de ^(1, 8, 32)

6.5 Factores de Virulencia de *Enterococcus spp.*

Entre los componentes descritos como posibles factores de virulencia cabe destacar proteínas de superficie implicadas en la adherencia como:

- **Sustancia de agregación (AS):** es una proteína localizada en la superficie de la bacteria que favorece la agregación de otras células bacterianas, facilitando así la transferencia de plásmidos que contienen genes de virulencia, como el gen *cyl*, y genes de resistencia a los antibióticos. También facilita la adherencia de *Enterococcus* a células epiteliales, renales, intestinales y cardíacas ⁽²⁵⁾. En concreto, la sustancia de agregación (AS) desempeña las siguientes funciones:
 1. Potenciación de la conjugación de plásmidos
 2. Adhesión a los tejidos del hospedero.
 3. Promoción de la internalización y la supervivencia en los fagocitos ⁽¹¹⁾.
- **Proteína de superficie (esp):** es una proteína localizada en la superficie bacteriana, relacionada con la colonización de *Enterococcus* al tracto urinario, por la adhesión al epitelio vesical. También, se relaciona con la formación de biopelículas y la evasión de la respuesta inmune. ⁽²⁵⁾
- **Antígeno A (Efa A):** constituye una adhesina de pared celular y se desconocen otros posibles roles que tengan que ver con la patogénesis de la infección enterocócica. ⁽²⁵⁾
- **Adhesina Ace y Acm:** son proteínas de superficie celular relacionadas con la adhesión a colágeno y a la endocarditis, en *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. Tiene propiedades antigénicas ⁽²⁵⁾.

Los *Enterococcus* también producen fimbrias adhesivas (conocidas como fimbrias Ebp, o pilis de la endocarditis y biofilms), que podrían intervenir en la adherencia a los tejidos. Otros posibles factores de virulencia descritos incluyen la presencia de carbohidratos de la pared celular y la producción de citolisinas (Cyl) y de iones superóxido (O_2^-) producido por diversas cepas de *Enterococcus*, podría representar una herramienta eficaz para sobrevivir a la fagocitosis macrofágica ^(4, 6, 10, 11).

Al parecer, otro factor de virulencia de gran importancia reside en la Gelatinasa, enzima capaz de degradar a la gelatina, caseína, hemoglobina y a ciertos péptidos bioactivos, incluidas las feromonas quimiotácticas de *E. faecalis*, las cuales promueven la llegada

de neutrófilos a los tejidos colonizados por el microorganismo; en tal sentido, una de las posibles funciones de esta proteasa podría consistir en modular o modificar, junto con las feromonas quimiotácticas, la defensa del hospedero, induciendo alternativamente la ausencia o la acumulación de leucocitos en los tejidos colonizados ⁽¹¹⁾.

Uno de los rasgos más característicos del género *Enterococcus* radica en la eficacia con la que lleva a cabo la conjugación plasmídica; el proceso inicia cuando una clona que funge como potencial receptora libera al medio ciertos péptidos, denominados Feromonas, que promueven la aproximación de *Enterococcus* hacia ella y la secuencial transferencia de diversos plásmidos provenientes de las células bacterianas capaces de actuar como donadoras. Cabe señalar que una clona enterocócica que ya posee un determinado plásmido no elabora la feromona homóloga correspondiente, pero continúa sintetizando y excretando otras que inducen su apareamiento con las células que cuentan con moléculas plasmídicas de las que aquella carece ⁽¹¹⁾.

A tal respecto, entre los plásmidos inducibles por las feromonas, destacan el pCF10 que confiere resistencia a la tetraciclina y, desde luego, el pAD1, uno de los principales productores de AS la cual, entre otras funciones, suele participar precisamente en la formación de agregados constituidos por células donadoras y receptoras, para facilitar e intensificar la transferencia plasmídica ⁽¹¹⁾.

6.6 Manifestaciones Clínicas causadas por *Enterococcus*

Las infecciones enterocócicas son especialmente frecuentes en los pacientes que han permanecido hospitalizados durante períodos prolongados y han recibido antibióticos de amplio espectro ⁽²⁶⁾.

Infección del tracto urinario (ITU): En las mujeres jóvenes puede causar menos del 5% de ITU. Sin embargo, en aquellos pacientes, especialmente hombres mayores, que han tenido cateterización urinaria o algún tipo de instrumentación de las vías urinarias, tienen enfermedades del tracto urinario, o recibieron antibióticos, la tasa de ITU causada por *Enterococcus* aumenta dramáticamente ⁽²⁷⁾.

Los factores de riesgo para la infección del tracto urinario son: instrumentación del tracto urinario, cateterización, o enfermedad del tracto genitourinario. El uso previo de antibióticos, especialmente cefalosporinas, ha sido también asociado con ITU debida a *Enterococcus*. *E. faecalis* ocasiona cerca de 10% de las infecciones de vías urinarias entre la población general y es la segunda causa más prevalente de estas infecciones en pacientes hospitalizados. Los *Enterococcus* ocasionan pielonefritis o cistitis. Estas infecciones se caracterizan por poliuria y disuria; la pielonefritis también se vincula con fiebre, escalofrío y dolor en el costado y en ocasiones se acompaña de náusea y diarrea. La cistitis se relaciona con incomodidad supra púbrica y no se acompaña de fiebre ^(26, 27).

Bacteriemia: La bacteriemia debida a *Enterococcus* ocurre primariamente en pacientes que han sido hospitalizados por períodos prolongados. Las condiciones asociadas con bacteriemias incluyen: enfermedades malignas, cateterización uretral, dispositivos intravasculares, cirugías recientes, quemaduras, y terapia antimicrobiana previa. También influyen la colonización previa del tracto gastrointestinal con ERV, el uso de vancomicina y el uso de antianaeróbicos. Otros factores de riesgo son: gravedad de la enfermedad, forma de administración antibacteriana, neutropenia y mucositis ^(26, 27).

En las bacteriemias sin endocarditis el tracto urinario es el origen más común, siendo el responsable del 19-43% de los casos. Otro origen de las bacteriemias enterocócicas puede ser el tracto hepatobiliar y las infecciones intraabdominales. Los *Enterococcus* han sido informados como una causa importante de bacteriemias secundarias a procedimientos ginecológicos e infecciones de las heridas quirúrgicas. Las infecciones de tejidos blandos pueden ser la fuente de 15-30% de las bacteriemias ⁽²⁷⁾.

Las manifestaciones clínicas de las bacteriemias debidas a *Enterococcus* dependerán si se aísla este microorganismo solo o es parte de una bacteriemia polimicrobiana. Cuando está causada solamente por *Enterococcus*, la bacteriemia es indolente, caracterizada por fiebre solamente ⁽²⁷⁾.

Endocarditis: Los *Enterococcus* son el tercer patógeno aislado con mayor frecuencia en los pacientes con endocarditis, siendo los responsables del 5 al 20% de los casos. Los pacientes con endocarditis enterocócica son predominantemente hombres con un promedio de edad entre 56-59 años. En las mujeres la endocarditis enterocócica se

presenta durante la edad fértil. El foco de la infección por *Enterococcus* generalmente no se encuentra; sin embargo, en muchos casos está implicado el tracto genitourinario. Los pacientes con enfermedad valvular presentan mayor riesgo de padecer endocarditis por *Enterococcus* ⁽²⁷⁾.

Infecciones intraabdominales y pélvicas: Las manifestaciones clínicas de las infecciones abdominales debidas a *Enterococcus*, son similares a aquellas causadas por otros microorganismos. *E. faecalis* puede producir infecciones intraabdominales casi siempre como parte de una infección mixta por *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los *Enterococcus* son raramente aislados de las infecciones posquirúrgicas debidas a un trauma abdominal penetrante, a menos que haya perforación del tracto gastrointestinal. Cuando se produce una bacteriemia enterocócica desde un foco intra-abdominal la mortalidad es alta, con tasas por encima del 40%. Las infecciones intra-abdominales debidas a ERV son un problema en los pacientes sometidos a trasplante ^(3, 27).

Infecciones de piel y tejidos blandos: En las infecciones de piel y tejidos blandos el *Enterococcus* raramente es aislado como flora única. Sin embargo, se identifica frecuentemente en infecciones mixtas de heridas posquirúrgicas, úlceras de pie diabético, úlceras por decúbito y quemados. Los *Enterococcus* están asociados con el 12% de las infecciones del sitio quirúrgico. Las infecciones de piel y tejidos blandos han sido identificadas como la fuente del 15%-30% de las bacteriemias enterocócicas ⁽²⁷⁾.

Infecciones neonatales y pediátricas: Los *Enterococcus* son responsables de aproximadamente el 13% de los casos de sepsis neonatal y meningitis. *E. faecium* ha ocasionado epidemias esporádicas de meningitis neonatal enterocócica. Las infecciones son asociadas con un bajo peso al nacer, dispositivos intravenosos centrales (no umbilicales) ^(3, 27).

6.7 Identificación de *Enterococcus* spp.

Los *Enterococcus* y los *Streptococcus* poseen características iguales en determinadas pruebas de laboratorio que son utilizadas para su identificación; en la Tinción de Gram, son morfológicamente indiferenciables, ambos géneros son cocos Gram+ que se

encuentran en pares y/o cadenas, son catalasa negativo, PYR positivos principalmente *Streptococcus pyogenes* ⁽⁴⁾.

6.7.1 Aislamiento e Inoculación.

Las muestras bajo sospechas de contener *Enterococcus spp.* deben inocularse en Agar Sangre de Carnero al 5%, también se pueden inocular en otros medios como el Agar Chocolate, Agar Tripticasa-Soya, Agar Infusión Cerebro Corazón con 5% de sangre de carnero y Agar Bilis-Esculina. También existen medios específicos como: el medio Enterococel, Caldo para *E. Faecalis*, Caldo estreptocócico Kenner-Fecal y el Caldo Buffer-azida-glucosa-glicerol (BACG), para recuperar *Enterococcus* del agua, alimentos, orina y materia fecal. Los bacilos coliformes Gram- son inhibidos por la Azida de sodio y los *Enterococcus* crecen produciendo un pigmento de color visible, debido a la utilización de la glucosa ⁽²⁴⁾.

6.7.2 Identificación de Género.

- **Prueba de la Catalasa:** La Catalasa es una enzima que cataliza el Peróxido de Hidrógeno en Oxígeno y Agua, reacción que puede observarse a simple vista por la formación de burbujas. Los *Enterococcus* carecen de esta enzima por lo tanto no hay producción de burbujas ⁽²⁸⁾.
- **Prueba de Optoquina:** La sensibilidad a la optoquina es utilizada para diferenciar *Enterococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus grupo viridans*. Los *Enterococcus spp.* son resistentes a la optoquina; por lo que el halo de inhibición es menor de 14 mm ⁽²⁸⁾.
- **Prueba de Solubilidad en Bilis:** Las sales de bilis, específicamente el desoxicolato y el taurocolato de sodio tienen la capacidad de lizar selectivamente a *S. pneumoniae*, cuando una suspensión del microorganismo se agrega a una solución de las sales (suspensión realizada a partir de un cultivo fresco de 18-24 horas en agar sangre de carnero al 5%). *S. pneumoniae* produce enzimas autolíticas que son las responsables de la característica umbilicada de la colonia en cultivos viejos. La adición de sales biliares a la suspensión de la bacteria activa las autolisinas y acelera el proceso de

lisis, lo cual está asociado a la disminución de la tensión superficial entre el medio y la membrana celular bacteriana ⁽²⁸⁾.

Los *Enterococcus* carecen de las enzimas autolíticas por lo tanto al agregar el reactivo Desoxicocolato de Sodio al 0.5% no se activa la autólisis, se observa turbidez en el tubo ⁽²⁸⁾.

- **Prueba de Bilis Esculina:** Se basa en la capacidad que tienen los *Enterococcus spp*, de tolerar grandes concentraciones de bilis (40%). Para detectar esta alta tolerancia se agrega esculina, la cual es hidrolizada si la bacteria se desarrolla. La hidrólisis de la esculina da como resultado la formación de glucosa y un compuesto denominado esculetina. Esta a su vez reacciona con los iones férricos para formar un complejo negro. Los *Enterococcus spp* son tolerantes a las altas concentraciones de bilis, por lo tanto hidrolizan la esculina presente en el disco o en el medio de cultivo. Se observa ennegrecimiento del disco o del medio de cultivo, en este las colonias se observan de color café oscuro ⁽²⁸⁾.
- **Prueba de tolerancia a la sal:** se basa en la capacidad de los *Enterococcus spp*. de crecer a altas concentraciones de sal. En concentraciones de 6.5% de NaCl, la cual diferencia las especies de *Enterococcus spp* de los *Streptococcus del grupo D* no *Enterococcus* ⁽²⁸⁾.
- **Prueba de PYR (Determinación de la enzima Pirrolidonil Arilamidasa):** es utilizada como prueba rápida. El sustrato utilizado es la L-pirrolidonilo naftilamida (PYR por sus siglas en inglés). Este compuesto es hidrolizado por la enzima pirrolidonilopeptidasa. La hidrólisis del sustrato por esta enzima libera naftilamida libre, que se detecta al agregar el reactivo p-dimetil-dimetil-aminocinamaldehído. Si la hidrólisis se llevó a cabo, se forma un compuesto de color rojo cereza oscuro ⁽²⁸⁾.

6.7.3 Identificación de las Especies de *Enterococcus spp*

Existen 33 especies de *Enterococcus*, de las cuales *E. faecalis* y *E. faecium* predominan claramente como las especies más comúnmente encontradas en humanos; mientras que *E.*

equinus y *E. bovis* se aíslan con mayor frecuencia en el ganado bovino y porcino respectivamente ⁽²²⁾.

Las diferentes pruebas para la identificación de las principales especies de *Enterococcus* se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Pruebas para Identificación de *Enterococcus spp*

Pruebas*	Especies de <i>Enterococcus</i> **					
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>
Amigdalina	+	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	-	+	+	-	+	-
Arbutin	-	+	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+	+	+
D-Tagatosa	+	-	+	-	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	-	+	-
Ribosa	+	+	+	+	+	+
Melizitosa	+	-	+	-	+/-	-
Sorbitol	+	-	+	-	+/-	-
D.Raffinosa	-	+/-	-	-	+	-
Gluconato	+	+/-	+	-	+	-
Melibiosa	-	+	+/-	+/-	+	+
Sucrosa	+/-	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-
D-Xilosa	+/-	+/-	+/-	+	+	+

+/-, Positivo o Negativo; +, Positivo; -, Negativo. *Pruebas utilizadas con mayor frecuencia para la identificación de las especies de *Enterococcus*; **Especies de *Enterococcus* aislados comúnmente de animales. Modificado de Manero A. & Blanch A. ⁽²⁹⁾.

6.7.4 Fenotipificación de *Enterococcus spp.*

La técnica de fenotipado bioquímico conocida como PhenePlate® System (PhPlate–<http://www.phplate.se>), es un sistema de fenotipificación para *Enterococcus* que se puede aplicar fácilmente a un gran número de aislamientos. Por tanto, es adecuado para una tipificación preliminar de varios aislados directamente ⁽⁸⁾. Es un método que se basa en el análisis de la cinética de varias reacciones bioquímicas (bioquímicos fingerprinting), realizado en microplacas pre-preparada. Se ha sugerido que sólo los aislados que parecen ser idénticas utilizando PhP necesitan ser sometida a pruebas de caracterización

genotípica con PFGE, qPCR. Además es un método útil para estudios ecológicos proporcionando una buena estimación en la diversidad de *Enterococcus* ⁽³⁰⁾.

6.8 Antibióticos como Promotores de Crecimiento en Animales

Los antibióticos son utilizados en los animales para prevenir y tratar las infecciones; pero también se utilizan con frecuencia en dosis subterapéuticas para promover el crecimiento, incrementando el aumento de peso y mejorando la utilización del alimento ⁽³¹⁾. Tienen un efecto que favorece el crecimiento porque: Inhiben bacterias entéricas de baja toxicidad disminuyendo la competencia biológica, sirven de nutrimentos accesorios a las células e incrementan la actividad enzimática para el metabolismo celular antibacteriano ⁽³²⁾.

Dentro de los antibióticos utilizados, ya sea como promotores de crecimiento o profilaxis, se incluyen agentes aprobados y no aprobados; Aminoglicósidos (gentamicina, kanamicina, neomicina y estreptomycin), bacitracina, cloranfenicol, Glicopéptidos (vancomicina), Macrólidos (eritromicina), Oligosacáridos y Tetraciclina. Muchos de estos antibióticos, por ejemplo los glicopéptidos como la vancomicina, pueden inducir la selección y amplificación de patógenos resistentes y dentro de ellos, se incluyen a bacterias como los *Enterococcus*. Estos microorganismos potencialmente resistentes pueden transmitirse a los seres humanos a través de las cadenas alimenticias y podrían causar enfermedades en las circunstancias apropiadas ⁽³¹⁾. Los promotores de crecimiento más utilizados en los cerdos son: Bacitracina, Bambermicina, Clortetraciclina, Eritromicina, Penicilina, Tiamulina, Tilosina y Virginianisina ⁽³³⁾.

6.8.1 Incremento en el uso de los Antibióticos

En el siglo XX el descubrimiento de los antibióticos se convirtió en la solución a las múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos. Las bacterias como todos los seres vivos exhiben mecanismos biológicos, que las facultan para adecuarse a diversas presiones ambientales. Aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente. El incremento

en el uso de antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia.⁽³⁴⁾

El uso de los agentes antimicrobianos se considera el factor más importante para el surgimiento, selección y difusión de resistencia a los antibióticos en las bacterias. Las bacterias que se encuentran en los intestinos de los humanos y los animales son sometidos con frecuencia a diferentes tipos y concentraciones de agentes antimicrobianos con el tiempo, la presión selectiva selecciona bacterias resistentes para los agentes antimicrobianos que se han utilizado⁽³⁵⁾.

Durante los últimos veinte años el uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares) desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad la acción de estos compuestos. Se calcula que más de 50% de las prescripciones médicas de antibióticos en los hospitales, se ordenan sin pruebas claras de infección o sin una indicación médica adecuada.⁽³⁴⁾

Otros factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia son:

1. Las medidas ineficientes para el control de infecciones en los centros hospitalarios:
2. La falta de campañas educativas en el uso y manejo de los medicamentos, debido a las condiciones de pobreza e ignorancia en las prescripciones.
3. La severidad de las enfermedades y el manejo de pacientes en las unidades de cuidados intensivos.
4. La colonización previa por microorganismos con resistencias múltiples.
5. Los procedimientos invasivos como cateterización y diálisis.
6. El uso de antibióticos en agricultura y acuicultura ocasiona la presencia de residuos de antibióticos en la carne de los animales y la selección de bacterias resistentes en los intestinos de los animales de consumo humano, llevan a una exposición directa de los consumidores a estos fármacos. Además, se pueden encontrar gérmenes resistentes en los alimentos de origen vegetal cuando se irrigan con aguas residuales o cuando se aplican antibióticos a los cultivos.
7. Factores del medio: La presencia de bacterias resistentes en nacimientos de agua. La resistencia se puede deber a la producción natural de antibióticos por bacterias del suelo,

que actúan como reservorios naturales de genes de resistencia y suministran el principio de genes transferibles ⁽³⁴⁾.

6.9 Resistencia Antimicrobiana

Las bacterias pueden adquirir resistencia a agentes antimicrobianos a través de elementos móviles, tales como plásmidos, que conducen a mutaciones en genes responsables de la absorción de agentes antimicrobianos o sitios de unión o activación de porciones de cromosomas bacterianos. Una vez adquiridos, los genes de resistencia se pueden transferir entre bacterias ⁽³⁵⁾. Esta capacidad de variación genética sumada a la presión de selección ejercida por el uso de antimicrobianos favorece la aparición de cepas resistentes ⁽³⁶⁾.

A pesar de que los *Enterococcus* no se consideran organismos altamente patógenos, son los microorganismos comúnmente encontrados en infecciones nosocomiales y se encuentran entre las bacterias más comunes en el ambiente con la capacidad de adquirir alto nivel de resistencia a los agentes antimicrobianos y capaces de difundir estos genes de resistencia a otras especies ^(4, 8).

La resistencia de los *Enterococcus* a múltiples agentes antimicrobianos le permite sobrevivir y proliferar en pacientes que reciben tratamiento antibacteriano de amplio espectro ⁽⁵⁾.

6.9.1 Resistencia de los *Enterococcus spp.* a los Antibióticos.

De igual forma que resisten condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad, estas bacterias poseen una resistencia a los antibióticos de uso común. La resistencia a antibióticos es un factor clave para la prevalencia de los *Enterococcus* en las infecciones nosocomiales, ya que dificultan su erradicación ⁽⁶⁾. En este género la resistencia antibiótica puede ser, generalmente, de dos tipos: **resistencia intrínseca y resistencia adquirida** ⁽³⁾.

La **Resistencia Intrínseca**, es aquella que está determinada genéticamente por la bacteria, es decir que los genes que codifican para dicha resistencia residen aparentemente, en el

cromosoma ⁽³⁷⁾. Este tipo de resistencia está presente en casi todas las cepas de *Enterococcus* ⁽³⁾. Los *Enterococcus* presentan una baja resistencia intrínseca a los antibióticos β -lactámicos como la penicilina, ampicilina, piperacilina e imipenem, que ejercen sobre ellos un efecto bacteriostático. ⁽⁶⁾

La **Resistencia Adquirida** resulta de una mutación en el ADN celular o de una adquisición de nuevos ADN, por medio de plásmidos (elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia). La resistencia es adquirida con cierta facilidad y los genes resistentes pueden ser transmitidos a otros géneros. Por ejemplo: *Enterococcus faecalis* ha transferido plásmidos de resistencia a otras especies de *Enterococcus* y a *Listeria monocytogenes* ⁽³⁾.

Resistencia a los Betalactámicos

Los principales mecanismos de resistencia adquirida a los antibióticos β -lactámicos implican la producción de proteínas de unión a penicilinas (PBPs) de baja afinidad, y en mucho menor grado, producción de β -lactamasas. En *E. faecium* se ha descrito un mecanismo adicional de resistencia a antibióticos β -lactámicos mediado por una transpeptidasa alternativa a la DD-transpeptidasa sensible a penicilina. ⁽⁶⁾

Resistencia a los Aminoglucósidos

La resistencia de alto nivel a los **aminoglucósidos** está mediada por enzimas que modifican las estructuras de los aminoglucósidos transformándolos en elementos inactivos frente a la célula bacteriana. Las enzimas más frecuentemente identificadas son: la Enzima bifuncional 2'' fosfotransferasa 6' acetil transferasa que inactiva a todos los aminoglucósidos, excepto a la estreptomina; la 3' fosfotransferasa que inactiva a la kanamicina y a la amikacina y la 6' adeniltransferasa que inactiva la estreptomina. La producción de estas enzimas modificadoras de los aminoglucósidos está codificada por plásmidos transmisibles por lo cual es previsible un aumento en la incidencia de *Enterococcus* refractarios al tratamiento con la asociación beta lactámico/aminoglucósido ^(2, 6).

Los *Enterococcus* pueden presentar al menos tres mecanismos de resistencia a aminoglucósidos:

- 1) Todos los *Enterococcus* presentan una resistencia intrínseca moderada debida a una baja permeabilidad celular. El tratamiento combinado con una penicilina facilita la entrada de los aminoglucósidos a la célula.
- 2) Elevados niveles de resistencia (CMI, 2.000 µg/ml), debidos a la producción de enzimas capaces de inactivar a los aminoglucósidos.
- 3) Elevados niveles de resistencia, debidos a mutaciones puntuales que afectan a una proteína de la subunidad 30S del ribosoma. ⁽⁶⁾

Resistencia a los Glicopéptidos

Otro tipo de resistencia mediada por plásmidos transmisibles es la que se refiere a los **glicopéptidos** como la vancomicina y la teicoplanina. Estos antibióticos son activos para un amplio rango de gérmenes Gram positivos, interactúan con el Grupo C terminal D-ala-D-ala de los precursores del peptidoglicano impidiendo la síntesis de la pared celular, más específicamente la formación normal del peptidoglicano, el cual constituye el armazón químico de las bacterias Gram+ por bloqueo del sitio de acción de las reacciones de transglicosilación y transpeptidación, respectivamente. En cepas resistentes a glicopéptidos, los precursores del peptidoglicano terminan en D-ala-D-lac o D-ala-D-ser en lugar de D-ala-D-ala ⁽²⁾.

La vancomicina se desarrolló en los años cincuenta como un antimicrobiano activo frente a gérmenes Gram+ y, sobre todo, frente a los *Staphylococcus* productores de -lactamasa. En los años ochenta se aislaron las primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a los glicopéptidos. Desde entonces, la resistencia a glicopéptidos se ha convertido en un factor importante en la infección y colonización por *Enterococcus*, sobre todo en ambientes hospitalarios. ⁽⁶⁾

Las pruebas de pigmento y motilidad son usualmente suficientes para diferenciar *Enterococcus* con resistencia adquirida a vancomicina (*E. faecalis* o *E. faecium*) de aquellos con resistencia intrínseca a vancomicina (*E. gallinarum* o *E. casseliflavus*) ⁽²²⁾

Resistencias a los Macrólidos y Lincosamidas

Los antibióticos macrólidos se emplean en el tratamiento de infecciones en humanos, siendo la eritromicina el antibiótico de primera elección en los pacientes alérgicos a las penicilinas. La resistencia a los macrólidos se basa en diferentes mecanismos

- Modificación de la diana por mutaciones puntuales de la subunidad 23S del ARN ribosómico.
- Metilación de la subunidad 23S del ARN ribosómico, impidiendo la unión a macrólidos (genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR*).
- Hidrólisis del anillo de lactona de la molécula de antibiótico.
- Bombas de exporte, que retiran el antibiótico del interior de la bacteria (genes *mefA*, *mefE*, *msrA*, *mreA*) ⁽⁶⁾.

Los genes de resistencia a macrólidos más frecuentes (*erm*) codifican para una metiltransferasa que actúa sobre residuos específicos de la subunidad 23S del ARN ribosómico. Este enzima provoca una N6-dimetilación de un residuo de adenina en la subunidad 23S del rRNA, inhibiendo la unión de la eritromicina. La modificación de la diana ribosómica provoca resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLSB), o bien a macrólidos y lincosamidas (ML), o a macrólidos, cetólidos y estreptogramina A y B (MKS). Se han descrito diversos genes *erm*, siendo *ermB* el predominante en *Enterococcus* (88%) ⁽⁶⁾.

En *E. faecium* se ha descrito un segundo mecanismo de resistencia a lincosamidas, mediado por una lincosamida nucleotidil transferasa (*linB*), que cataliza la 3-(5'-adenilación) de la lincomicina y la clindamicina ⁽⁶⁾.

También se han descrito mecanismos de exporte para los antibióticos macrólidos, en ausencia de resistencia a lincosamidas o a estreptogramina A. Los genes responsables (*mef*) presentan una elevada movilidad entre diversas especies Gram+. La elevada resistencia a macrólidos se ha asociado claramente al uso de la tilosina (y también de la espiramicina) para el tratamiento de infecciones en animales, y también como promotor del crecimiento. La resistencia a macrólidos se ha diseminado entre *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. La resistencia a macrólidos se puede transmitir de la

microbiota de animales a humanos, bien por diseminación de las bacterias resistentes o por transferencia horizontal a través de elementos genéticos móviles ⁽⁶⁾.

Resistencia a Tetraciclinas

Se estima que entre el 60 y el 65% de las cepas de *Enterococcus* de origen clínico muestran resistencia a tetraciclinas, aunque estos antibióticos no son empleados de forma rutinaria en el tratamiento de las infecciones por *Enterococcus*. También se ha descrito la presencia de cepas resistentes a tetraciclina en diversos alimentos de origen animal ⁽⁶⁾.

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas mediante interferencia con la unión de los aminoacil-t-RNAs al ribosoma. En *Enterococcus* existen dos mecanismos fundamentales de resistencia:

- Bombas de exporte.
- Protección del ribosoma, impidiendo la unión de las moléculas de antibiótico ⁽⁶⁾.

Los genes *tet* (K) y *tet* (L) codifican para bombas de exporte. Estas son grandes proteínas con al menos 14 dominios transmembrana, que bombean las moléculas de antibióticos al exterior de la célula. El gen *tet* (L) es el más frecuente en *Enterococcus*, pudiendo estar localizado tanto en el cromosoma como en plásmidos conjugativos.

Los genes *tet* (M), *tet* (O) y *tet* (S) codifican para proteínas que proporcionan resistencia a tetraciclina y minociclina mediante protección del ribosoma. Las proteínas que codifican se unen al ribosoma alterando su conformación de forma que impiden la unión de las moléculas de antibiótico al mismo. El gen *tet* (M) es el más común en *Enterococcus*. Está localizado generalmente en el cromosoma asociado a elementos transponibles de tipo Tn916, aunque también puede estar presente en plásmidos conjugativos ⁽⁶⁾.

Resistencia a Quinolonas y otros Antibióticos

Las quinolonas muestran una actividad baja o moderada frente a los *Enterococcus*, y muchas cepas muestran una resistencia intrínseca a ciprofloxacina. El empleo de fluoroquinolonas en aplicaciones clínicas ha provocado también un incremento de la resistencia en *Enterococcus*, habiéndose descrito mutaciones que afectan al gen *gyrA*

(que codifica para la subunidad GyrA de la ADN girasa), y, más frecuentemente, al gen *parC*, que codifica para la subunidad ParC de la topoisomerasa IV ⁽⁶⁾.

Entre los antibióticos oligosacáridicos destaca la avilamicina, que ha sido empleada como promotor del crecimiento en animales de granja en la Unión Europea durante varios años. Ello ha provocado la aparición de un elevado porcentaje de cepas de *E. faecium* resistentes a este antimicrobiano, así como la aparición de resistencia cruzada a la evernimicina (un antibiótico de potencial uso terapéutico cuyo desarrollo ha debido ser suspendido por esta causa). Este tipo de resistencia se ha detectado también en *E. faecalis*. Los estudios efectuados han demostrado que una mutación que altera la proteína ribosómica L16 es la responsable de la resistencia a estos antibióticos ⁽⁶⁾.

La linezolid es un inhibidor de la biosíntesis de proteínas perteneciente al grupo de las oxazolidinonas, con una elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (CMI 4 µg/ml). Se han detectado mutaciones en la subunidad 23S del ribosoma, que confieren resistencia a este antibiótico (CMI 8 µg/ml). En las cepas aisladas se ha detectado también co-resistencia a otros antibióticos tales como vancomicina, ampicilina, macrólidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, rifampina, gentamicina, nitrofurantoína y trimetropim/sulfametoxazol ⁽⁶⁾.

Los inhibidores de la dihidrofolato-reductasa, como el trimetropim-sulfametoxazol (TMP-SMX), muestran una eficacia limitada frente a los *Enterococcus*, debido a la capacidad de esta bacteria para usar timina y timidina así como dihidrofolato y tetrahydrofolato. Se han descrito mutaciones en la enzima diana (dihidrofolatoreductasa) que confieren una elevada resistencia, como *dfrE* ⁽⁶⁾.

6.10 Detección de Resistencia de los *Enterococcus spp.* en el Laboratorio.

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante diferentes técnicas de laboratorio las cuales incluyen el test de difusión por discos o método de Kirby-Bauer y los test de dilución en caldo y en agar cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a

uno o varios antimicrobianos, reflejando así la capacidad de los antibióticos para inhibir el crecimiento de la población bacteriana ^(38, 39).

6.10.1 Método de Difusión en Discos o de Kirby-Bauer

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Kirby-Bauer y cols., es uno de los métodos que el CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos ⁽⁴⁰⁾.

Es la técnica más utilizada para evaluar la sensibilidad antimicrobiana de patógenos de desarrollo rápido. Para obtener resultados confiables, los detalles técnicos deben ser cuidadosamente estandarizados y controlados. Este es el método que se ha descrito de manera más completa y para el cual se han desarrollado tablas de interpretación respaldadas por datos clínicos y de laboratorio ⁽³⁹⁾.

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobiano en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión en la escala de 0.5 McFarland esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UCF/mL. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo está indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, y el tamaño y fase de crecimiento del inóculo ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución ⁽³⁹⁾.

Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI (Ver Tabla 2) ⁽⁴⁰⁾.

Aunque la técnica de difusión con discos está reconocida por el CLSI y se han establecido puntos de corte específicos para *Enterococcus spp.*, para la correcta detección de las cepas ERV han de tenerse en cuenta una serie de consideraciones:

- a) Las placas deben incubarse durante 24 h completas.
- b) Los halos de inhibición deben examinarse usando una fuente de iluminación directa, a través de las placas.
- c) Cualquier crecimiento en el interior del halo de inhibición debe considerarse como resistencia.
- d) Las cepas con halos de inhibición de la categoría intermedia deben comprobarse mediante la determinación de la CMI ⁽⁴⁰⁾.

6.10.2 Método de Dilución en Caldo o en Agar

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 hs. a 35°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado ⁽³⁸⁾.

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar) ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (**macrodilución**). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización ⁽³⁹⁾.

La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de **dilución en agar**, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos ⁽³⁹⁾.

La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de **microdilución** con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste. Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida ^(38, 39).

Si solamente se desea detectar ERV, el CLSI recomienda la realización de la prueba de cribado de la resistencia a la vancomicina. Este método consiste en depositar entre 1 y 10 µl de una suspensión 0,5 MacFarland del *Enterococcus* en placas de Agar Infusión Cerebro-Corazón suplementadas con 6 µg/ml vancomicina. ⁽⁴⁰⁾

El crecimiento de al menos una colonia tras 24 h de incubación se considera resistencia presuntiva que debe ser confirmada posteriormente mediante la determinación de la CMI. Este sistema puede ser especialmente útil en aquellos laboratorios que no realizan de forma habitual pruebas cuantitativas en los *Enterococcus* ⁽⁴⁰⁾.

Tabla 2. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en *Enterococcus spp.*

Método	Antibiótico	Concentración	Criterios		
			S	I	R
Difusión con discos	Ampicilina	10 µg	17		16
	Vancomicina	30 µg	17	15-16	14
	Eritromicina	15 µg	23	14-22	13
	Ciprofloxacina	5 µg	21	16-20	15
	Gentamicina	120 µg	10	7-9	6
	Estreptomicina	300 µg	10	7-9	6
Dilución en Agar o Caldo	Ampicilina	10 µg	8		16
	Vancomicina	6 µg	4	8-16	32
	Eritromicina	15 µg	0,5	1-4	8
	Ciprofloxacina	5 µg	1	2	4
	Gentamicina	500 µg	500		500
	Estreptomicina	1000 µg	1000		1000

*S, sensible; I, intermedio; R, resistencia.

Adaptado del CLSI⁽⁴⁰⁾

Un factor importante en la detección en el laboratorio de la resistencia a la vancomicina, sobre todo desde el punto de vista epidemiológico, es la correcta identificación de la especie⁽³⁸⁾. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, y *E. flavescens* pueden confundirse, en la práctica diaria, con las cepas clínicas de *E. faecium*, si no se les realiza el estudio del pigmento y de la movilidad. Resulta importante distinguir estas especies de *Enterococcus*, con resistencia intrínseca, de *E. faecalis* y *E. faecium* con resistencia adquirida; ya que las primeras se aíslan generalmente de pacientes ambulatorios y presentan una escasa repercusión hospitalaria, las segundas representan potencialmente un grave problema para el control de la infección nosocomial⁽⁴⁰⁾.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tipo y Área de Estudio

El presente estudio es de tipo Descriptivo de Corte transversal, el cual fue realizado en las comunidades de Momotombo (Municipio de La Paz Centro), Mercedes Varela, Talchocote y El Arbolito (Municipio de León), durante el período de Octubre a Noviembre 2013.

7.2 Muestra de Estudio

Para la realización de este trabajo se recolectaron un total de 81 muestras de materia fecal de cerdos entre las edades de 1 a 9 meses. Las muestras fueron recolectadas mediante un método no probabilístico, por conveniencia, de acuerdo a la facilidad de acceso a dichas comunidades.

7.3 Recolección y Procesamiento de las Muestras

Para la recolección de las muestras se visitaron las viviendas, solicitando el consentimiento (verbal y/o escrito) a los dueños de los cerdos, previa explicación del propósito del trabajo. Las muestras fecales fueron tomadas por hisopado rectal, los cuales se colocaron en tubos conteniendo Solución Buffer Fosfato (PBS) estéril, pH 7.2 debidamente etiquetadas. Todas las muestras se transportaron en termos temperados (4-8°C) al Laboratorio de Microbiología de la UNAN, León (Campus Médico) para su análisis. Aquellas muestras que no fueron analizadas posteriormente a su recolección se mantuvieron en refrigeración (16-18 hrs) a 8°C hasta su debido procesamiento.

Para el aislamiento bacteriano se tomaron 10 µl de muestra fecal contenidas en PBS, previamente homogenizadas utilizando un vórtex, para ser inoculadas en placas de Agar m-*Enterococcus* e incubadas aeróbicamente durante 24 a 48 horas a 37 °C. Posteriormente se seleccionaron de 2 a 3 colonias, tanto de las muestras que sugirieron presencia de *Enterococcus* (N=65) (colonias con coloración café metálico, pequeñas y cóncavas); así como aquellas (N=16) con diferentes características a las antes mencionadas para su confirmación.

7.3.1 Identificación de Género *Enterococcus*

A todas las colonias seleccionadas de las placas con crecimiento bacteriano se les realizó la tinción de Gram, que permitió una diferenciación morfológica de las bacterias, (cocos Gram+ en pares o cadenas cortas). Así como también, se les realizó prueba de la Catalasa, en el caso del *Enterococcus* resulta en una reacción Negativa, porque carecen de esta enzima.

Además, se les realizó prueba de tolerancia a la sal y temperatura. Para ello, fueron inoculadas en microplacas (fondo U) conteniendo Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) con 6.5% de NaCl e incubadas a 44°C y en microplacas con solo NaCl al 6.5% a 37°C por 24 horas, ambas por duplicado. Se consideraron como positivas (sugiriendo crecimiento), las muestras que presentaron una precipitación blanquecina en el fondo del pocillo. Posteriormente se tomó 1 µl de la suspensión con crecimiento y se procedió a cultivar en medio de Agar Bilis Esculina incubándose a 37°C por 24 horas; confirmando su positividad por el ennegrecimiento del medio y la formación de un halo café alrededor de las colonias.

7.3.2 Identificación de las especies de *Enterococcus*

De las muestras que crecieron en Agar Bilis Esculina, se tomó 1 colonia para la identificación de especies, utilizando microplacas *PhP-RF* del sistema *PhenePlate* (<http://www.phplate.se>) las cuales están diseñadas para la identificación y el fenotipado bioquímico de aislados *Enterococcus* ⁽⁸⁾.

Este sistema (*PhP-RF*) consiste en reacciones bioquímicas que se realizan en microplacas de 96 pocillos con 11 reactivos deshidratados dispuestos en filas paralelas de 8 pocillos (Figura 2), lo que permite una rápida discriminación entre aislados de *Enterococcus* posterior a la incubación aeróbica durante 16, 40 y 64 horas; midiendo la reacción metabólica de cada aislado (colonias), mediante un viraje de color del medio en las pruebas. Posteriormente todas estas reacciones fueron comparadas con una base de datos de cepas seleccionadas y almacenadas en el sistema automatizado del software *PhPWin*, (<http://www.phplate.se>) ⁽⁸⁾.

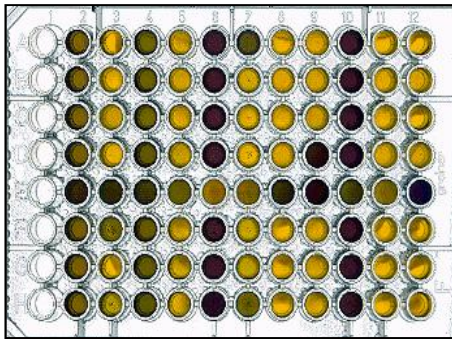


Figura 2. Representación de una microplaca PhP-RF.

Las filas A-H son reacciones de ocho aislados bacterianos ante once reactivos de la microplaca. Contenido de los pocillos (Columnas 1-12): 1: Pozos de inoculación, 2: L-Arabinosa, 3: Lactosa, 4: Melibiosa, 5: Melezitosa, 6: Raffinosa, 7: Inositol, 8: Sorbitol, 9: Manitol, 10: Gal-lacton, 11: Amigdalina, 12:Gluconato

7.3.2.1 Procedimiento del método utilizando el sistema PhP-RF

1. Preparación de un medio de suspensión bacteriana conteniendo 0.1% de peptona, 0.0016M de buffer fosfatado y 0.011% de azul de bromotimol.
2. Distribución de 350µl del medio en pocillos de la primera fila (pozos de inoculación) y 150µl en el resto de los otros pocillos del plato (columnas 2-12, con reactivos).
3. Inoculación de colonias bacterianas, seleccionadas aleatoriamente, de cada plato de siembra (una colonia para cada pocillo) en la primera columna de cada microplaca.
4. Posteriormente, se transfirió un volumen 15µl de la suspensión bacteriana a las columnas conteniendo los reactivos de prueba (columnas 2-12), colocando todas las microplacas en cámara húmeda (utilizamos contenedor plástico con tapa y papel toalla humedecida) e incubando a temperatura de 37°C.
5. Realización de las mediciones colorimétrica de las reacciones bioquímicas generadas por cada aislado bacteriano, durante el período de incubación (16, 40 y 64 horas). Utilizando para este paso un Scanner (HP-Scanjet 4389), para capturar imágenes, que fueron convertidas a datos numéricos utilizando el sistema automatizado de computación (PhPWin- Software versión 6.0; <http://www.phplate.se>).

Una vez obtenidos los datos numéricos se analizó la base de datos con las lecturas, que sirvió para agrupar los aislados de *Enterococcus* dentro de un grupo determinado según especies. Esto fue logrado, al comparar los patrones bioquímicos de los aislados de *Enterococcus* con patrones de cepas conocidas, que han sido previamente caracterizadas y guardadas como biblioteca (referencias contenidas en base de datos del programa) en el programa PhP-WIN. (Software PhPWin, <http://www.phplate.se>).

7.3.3 Determinación de la Susceptibilidad Antimicrobiana.

A las especies de *Enterococcus* identificadas se les determinó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de Kirby-Bauer (difusión por disco), para los siguientes antibióticos: Vancomicina (VAN, 30 µg), Ampicilina (AMP 10µg), Eritromicina (E 15µg), Gentamicina (GEH 120µg), Estreptomina (STH 300µg), Ciprofloxacina (CIP 5µg); considerando las recomendaciones del Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica del MINSA 2004 y CLSI 2011^(28, 40). Utilizando como controles cepas de referencias ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis*) y ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*).

7.3.3.1 Procedimiento del método

Con un asa recta se tomaron unas UFC del cultivo para hacer una suspensión homogénea en un tubo de ensayo conteniendo 3mL de solución salina estéril al 0.85%. Ajustando la turbidez a un estándar 0.5 de McFarland. Luego se inocularon en medio Agar Muller-Hinton de manera que se cubra uniformemente toda la superficie del medio. Dejando secar el medio por un período de 10 minutos, se colocaron los discos ejerciendo una ligera presión sobre el medio. Se incubaron los medios a temperatura de 37°C por 24 horas. Posterior a este período se procedió a realizar lectura e interpretación del resultado^(28, 40).

7.4 Aspectos Éticos del Estudio

Para este estudio se trabajó con aislados bacterianos encontrados en materia fecal de cerdos por lo tanto no fue necesaria la aprobación del Comité de Ética para las Investigaciones Biomédicas en la Facultad de Ciencias Médicas. Sin embargo, se realizó solicitud a los dueños de los animales para poder acceder a los sitios del muestreo. A quienes se les entregó el informe de los análisis, así como mantener la privacidad de la información sólo para efectos del estudio y posible publicación de los resultados bajo codificación según corresponda.

7.5 Análisis de los Datos

Los datos fueron procesados en programas de computación: SPSS v17, PhPWin-Software versión 6.0 (<http://www.phplate.se>) y WHONET versión 5.6. La información se agrupó en tablas y gráficos de acuerdo a la distribución de variables.

7.6 Operacionalización de Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADOR	VALORES
Comunidad	Nombre que caracteriza a los sitios de toma de muestra	Ficha recolectora de datos	Mercedes Varela Talchocote El Arbolito Momotombo
Edad	Tiempo transcurrido, desde el nacimiento hasta el momento en que se tomó la muestra.	Ficha recolectora de datos	1-3 Meses 4-6 Meses 7-9 Meses
Sexo	Carácter o cualidad biológica que distingue al macho de la hembra	Ficha recolectora de datos	Macho Hembra
Hábitat	Lugar donde el animal permanece durante el día.	Ficha recolectora de datos	Corral Libre
Alimentación	Tipos de alimentos suministrados a los animales para su crecimiento y desarrollo	Ficha recolectora de datos	Concentrado Desperdicios Ambos
Fuente de agua	Origen del agua consumida por los cerdos	Ficha recolectora de datos	Pozo Rio Agua Potable
Antibióticos como promotores de crecimiento	Sustancia natural o sintética con actividad farmacológica administrada a los animales para incrementar peso y la eficiencia alimenticia	Ficha recolectora de datos	Vancomicina Ampicilina Eritromicina
Chequeo veterinario	Revisión médica del estado general de salud del cerdo.	Ficha recolectora de datos	Si No
Tratamiento de infecciones bacterianas	Antibiótico utilizado para eliminar el agente causante de una infección.	Ficha recolectora de datos	Si No
Especies de Enterococcus aisladas	Grupo de cepas bacterianas que pertenecen a un mismo género, diferenciadas por reacciones bioquímicas	Análisis de Laboratorio: Sistema PhP-RF (Phene Plate)	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. hirae</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. cecorum</i>
Patrón de susceptibilidad antimicrobiana	Perfil de sensibilidad a los antibióticos de las especies aisladas mediante métodos estandarizados	Análisis de Laboratorio: Método de Kirby-Bauer	Sensible Intermedio Resistente

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERISTICAS GENERALES

De los 81 cerdos incluidos en el estudio, solamente a 65 de estos se les aisló *Enterococcus*, su aislamiento se correlaciona con cada una de las variables de acuerdo a las condiciones de vida de los cerdos (ver Tabla 3).

8.2 IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES

Del total de muestras fecales (N=81) incluidas en el estudio, al 80% (65/81) se les aisló e identificó bacterias del género *Enterococcus* siguiendo los criterios bacteriológicos recomendados por MINSA ⁽²⁸⁾. Sin embargo, en el 20% (16/81) de estas no se aisló *Enterococcus*, probablemente debido a un almacenamiento inadecuado (10 muestras estuvieron en refrigeración por 16-18 hrs después de su recolección, hasta su debido procesamiento en el laboratorio).

Al realizar la identificación de especies a este grupo de aislados, utilizando el sistema de *PhP-RF*, se logró caracterizar un 57% (37/65) de los aislados en seis especies diferentes de *Enterococcus* (Tabla 4). Entre las especies identificadas con mayor frecuencia se encontró *E. gallinarum* (12/37), aislada en las 4 comunidades incluidas en el estudio; *E. hirae* (9/37) y *E. faecium* (8/37), ambas pertenecientes a las comunidades de Momotombo y Talchocote. Un 43% (28/65) de los aislados solo pudieron ser determinados como género *Enterococcus*, los cuales fueron excluidos del resto de los análisis (Tabla 4).

Una vez identificados estos grupos bacterianos se realizó un análisis de comparación fenotípica entre ellos, en el cual se encontraron un total de 17 fenotipos bioquímicos, distribuidos en 10 fenotipos comunes (FBc 1-10) que agrupan el 81% (30/37) de todos los aislados identificados y 7 fenotipos no comunes (FBsi) que representan el 19% (7/37) de los aislados; con un índice de diversidad poblacional global de 0.95 a un nivel de identidad de 0.975 (índice que indica la similitud o correlación entre los aislados bacterianos ensayados) (Fig. 3).

Un análisis intra-grupo de aislados bacterianos, según comunidad, demostró una distribución mayor de fenotipos en la comunidad de Momotombo (37/65), [FBc=7, (12

aislados); FBsi=12], 13 de los aislados se identificaron hasta género, siendo la distribución de especies de *Enterococcus* fue: *E. hirae* (8/24), *E. faecium* (7/24), *E. gallinarum* (6/24), *E. faecalis* (3/24). En cambio, en la comunidad de Talchocote (10/65), se identificaron 3 especies diferentes de *Enterococcus*, determinados como FBsi. (Tabla 4 y Fig.3).

Tabla 3. Condiciones de vida de los cerdos y su correlación con el aislamiento de *Enterococcus*

Variable	Categoría	n	%	Aislamiento de <i>Enterococcus</i>		Odds ratio 95% IC	Valor P (F)
				Si	No		
Sexo	Macho	33	41	27	8	0.8 (0.45-1.15)	0.574
	Hembra	48	59	38	8	1.2 (0.71-2.04)	
Edad	1-3 meses	36	44	26	6	NA	0.959
	4-6 meses	41	51	36	9		
	7-9 meses	4	5	3	1		
Hábitat	Corral	31	38	18	13	6.98 (2.16-22.58)	<0.001
	Libre	50	62	47	3		
Alimentación	Concentrado	11	14	6	5	1.32 (0.94-1.9)	0.038*
	Desperdicios	43	53	36	7	1.5 (0.90- 2.4)	0.053**
	Ambos	27	33	23	4	1.78 (0.84- 3.8)	0.088***
Agua de consumo	Pozo	40	49	30	10	NA	0.309
	Rio	33	41	29	4		
	Potable	8	10	6	2		
Veterinario	Si	2	2.5	2	--	1.25 (1.12-1.40)	1.000
	No	79	97.5	63	16		
Tratamiento antibiótico	Si	3	4	3	--	1.25 (1.12-1.40)	1.000
	No	78		62	16		

Valores P para Aislamiento de *Enterococcus spp.* en dependencia del tipo de Alimentación: *Concentrado vs Desperdicio+Ambos; ** Concentrado vs Desperdicio; *** Concentrado vs Ambos. IC: Intervalo de Confianza; NA: No Aplicable

Tabla 4: Distribución de Especies *Enterococcus* aislados de materia fecal de cerdos

Comunidad	N°	Fenotipos*		Aislados de <i>Enterococcus</i> (N=81)								
		FBc	FBsi	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. spp</i> ***	NAE**	
Momotombo	37	7	12	3	7	8	6			13	11	
Talchocote	10	--	3		1	1	1			7	2	
Mercedes Varela	7	2	2				3		1	3	2	
El Arbolito	11	1	5				2		2	2	5	1

*FBc, Fenotipo bioquímico común; FBsi, Fenotipo bioquímico no común.

**NAE: No Aislamiento de *Enterococcus*, realizando todas las pruebas para la identificación del género.

****E. spp. Enterococcus spp.*

Suplemento de información en Anexo (Figura 4).

8.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD

El análisis de susceptibilidad antimicrobiana fue realizado a todas las especies de *Enterococcus* identificadas (n=37). Se observó menor susceptibilidad para eritromicina (21/37), en general la mayoría de los aislados de *Enterococcus* fueron susceptibles a ampicilina (37/37), gentamicina (36/37) y a vancomicina (35/37), dos de los aislados presento un fenotipo intermedio de susceptibilidad.

La especie que demostró menor susceptibilidad fue *E. gallinarum*, para eritromicina (3/12) y ciprofloxacina (3/12); seguida de *E. faecalis* con baja susceptibilidad a eritromicina (0/3). Ambas especies presentaron un aislado intermedio para vancomicina. Cabe destacar que la especie con mayor susceptibilidad fue *E. hirae*, observándose únicamente un aislado intermedio a ciprofloxacina (Ver Tabla 5, Figura 4)

Tabla 5. Perfil de susceptibilidad de las especies de *Enterococcus* identificadas

Especies	Aislado	Antibióticos																	
		AMP			CIP			ERI			STH			GEH			VAN		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>E. gallinarum</i>	12	12			3	9		3	5	4	12			12			11	1	
<i>E. hirae</i>	9	9			8	1		9			9			9			9		
<i>E. faecium</i>	8	8			1	6	1	2	5	1	8			8			8		
<i>E. faecalis</i>	3	3			1	2			1	2	2	1		2		1	2	1	
<i>E. malodoratus</i>	3	3			2	1		2	1		3			3			3		
<i>E. cecorum</i>	2	2				2			2		2			2			2		

AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacina; ERI, Eritromicina; STH, Estreptomina; GEH, Gentamicina; VAN, Vancomicina; S, Sensible; I, Intermedio; R, Resistente.

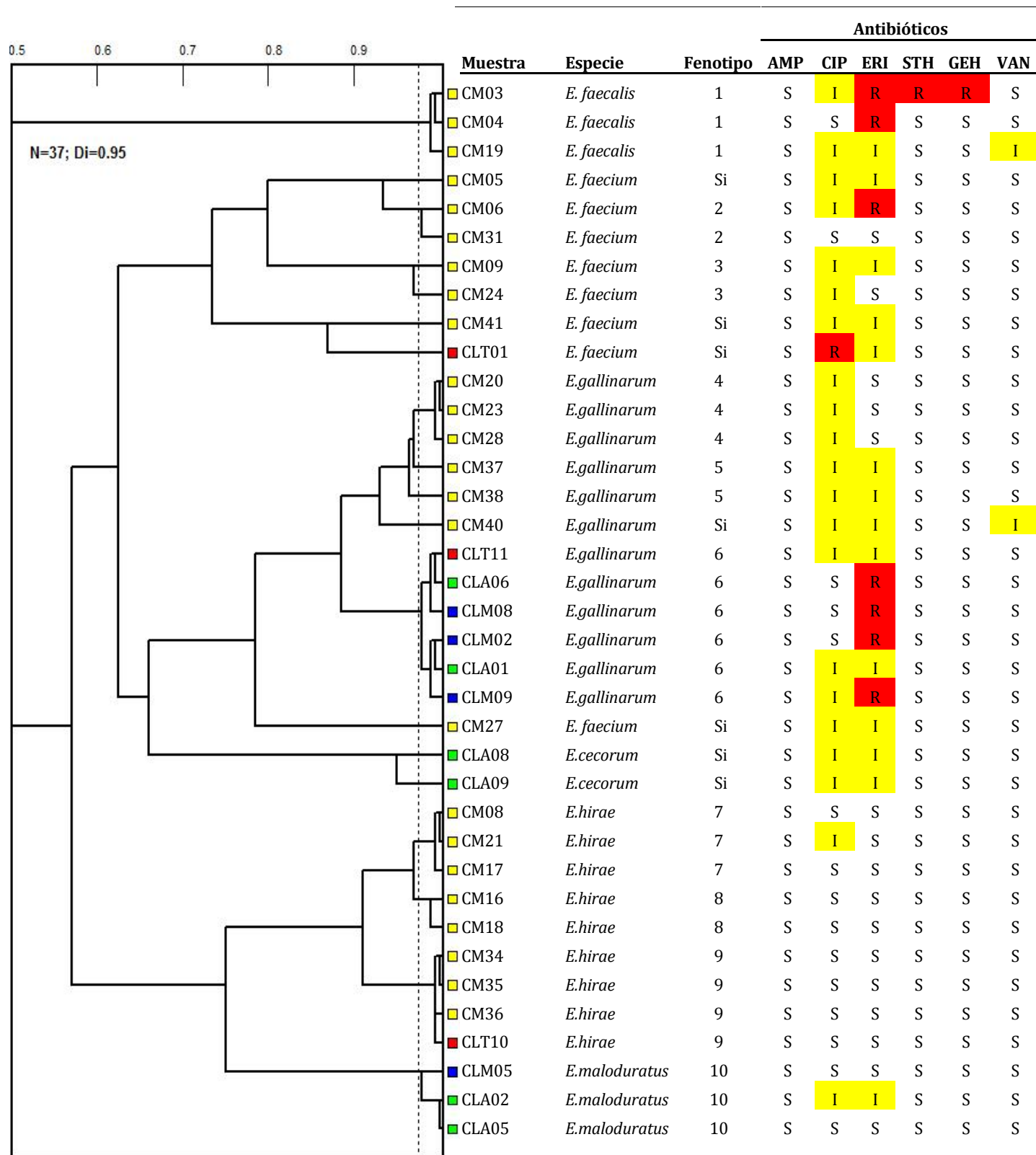


Figura 3. Dendrograma representando la distribución de aislados de *Enterococcus* identificados en materia fecal de cerdos y cuadro de susceptibilidad antimicrobiana. CM, Cerdos Momotombo (cuadros amarillos); CLT, Cerdos León Talchocote (cuadros rojos), CLM, Cerdos León Mercedes Varela (cuadros azules), CLA, Cerdos León Arbolito (cuadros verdes). La línea punteada vertical continua indica el nivel de identidad (ID=0.975) determinado en la reproducibilidad del método para encontrar fenotipos (comunes, números arábigos; Si, no comunes). AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacina; ERI, Eritromicina; STH, Estreptomina; GEH, Gentamicina; VAN, Vancomicina.

9 DISCUSIÓN

El estudio de los *Enterococcus* se ha convertido en un tema central de interés epidemiológico y clínico debido a que juegan un papel importante en la diseminación de enfermedades. Así como también puede contribuir a la resistencia de agentes antimicrobianos en los seres humanos al ser adquiridos a través de la cadena alimenticia, debido a que en la crianza de animales (cerdos), se utilizan antimicrobianos para combatir infecciones bacterianas y subterapéuticas para estimular el crecimiento^(31,33).

En nuestro estudio se aislaron especies de *Enterococcus* que se encuentran en las heces de animales y que son de mayor interés por la posibilidad de transmisión de enfermedades zoonóticas⁽³³⁾, estas especies de *Enterococcus* pudieron ser identificadas utilizando pruebas convencionales⁽²⁸⁾ y un método bioquímico, que además es útil para determinación de fenotipos (sistema *PhP-RF*)⁽⁸⁾.

De acuerdo al hábitat de los animales la mayoría se encontraban libres en el patio correspondiente al 62% (50/81), de los cuales al 94% (47/50) de estos cerdos se les aisló *Enterococcus* ($P < 0.001$), lo que indica que los animales que se encontraban libres presentan un riesgo de 6.98 de ser colonizados por *Enterococcus* en comparación con los animales que se encontraban en corrales donde el aislamiento de *Enterococcus* fue menor con un 58% (18/31); lo que podría facilitar la transmisión y colonización de esta bacteria con otros animales, debido a que, tenían contacto con gallinas, perros, vacas, caballos, gatos y patos. De igual forma la mayor parte de estos consumían agua de pozo con un 49% (40/81), de acuerdo a esta condición al 75% (30/40) de los cerdos se les aisló *Enterococcus*; dichos datos podrían indicar la posibilidad de que los animales fuesen contaminados por alguna especie encontrada comúnmente en el medio ambiente acuático o en el suelo, como lo reportan *Manero, A. y cols.*⁽²⁹⁾. Además esto hace posible que se produzca una transmisión de *Enterococcus* entre diferentes especies de animales y a la vez a los seres humanos^(1, 8, 32).

Un dato importante encontrado en nuestro estudio es que tanto en los animales que se alimentaban de desperdicios de comida que corresponden al 53% (43/81) ($P=0.038$), como en los que se alimentaban con concentrado y desperdicios correspondiente al 33%

(27/81) se les aisló *Enterococcus*; con frecuencias similares 84% (36/43) y 85% (23/27) respectivamente. Sin embargo de los animales que consumían solamente concentrado que representan el 14% (11/81) la frecuencia de aislamiento de *Enterococcus* fue menor en comparación a los anteriores con un 55% (6/11). Lo que podría indicar que los animales que se alimentan de desperdicios presentan mayor riesgo de ser colonizados por *Enterococcus*.

Además a ninguno de los animales incluidos se les administró antibióticos como promotores de crecimiento. Sin embargo, solo un 4% (3/81) de los animales recibieron tratamiento antibiótico contra infecciones bacterianas, cabe destacar que tanto en los cerdos que recibieron antibióticos como en los que no, se aisló *Enterococcus* lo que podría deberse a que los antibióticos suministrados en los cerdos no tenían efecto bacteriostático sobre este microorganismo, o que la terapia antibiótica administrada no era la adecuada para la eliminación de los *Enterococcus*. (Tabla 3).

Otro dato importante encontrado en nuestro estudio es que se identificó 17 fenotipos bioquímicos, de los cuales 10 fueron identificados como fenotipos comunes (FBc 1-10); lo que significa que se aislaron *Enterococcus* con características idénticas según este patrón de análisis dentro de la población bacteriana de la flora de los cerdos; así como también que existen aislados de *Enterococcus* heterogéneos (FBsi 7) este resultado es opuesto al encontrado en el estudio realizado por Kühn y cols., sobre Ocurrencia y relación de *Enterococcus* resistentes a vancomicina en animales, seres humanos y medio ambiente en Europa en el 2005, en el cual solo se identificó un fenotipo común y un gran número de aislados heterogéneos. Lo cual a su vez se confirma porque su nivel de diversidad fue de 0.92 mientras que en nuestro estudio la diversidad fue de 0.95 esta diferencia pudo deberse a que el sistema de fenotipado que se utilizó en nuestro estudio fue diferente (*PhP -RF*) y el de ellos fue (*PhP-FS*) ⁽¹²⁾. Aunque ambos métodos son eficaces para identificar especies y fenotipos de *Enterococcus*.

Con respecto a la identificación de especies *E. gallinarum* y *E. hirae* fueron las aisladas con mayor frecuencia (12/37 y 9/37, respectivamente), observándose para la primera una distribución en las cuatro comunidades incluidas en el estudio y la segunda solamente en dos de ellas (Tabla 4). Datos que difieren con los resultados de un estudio realizado por Altamirano H. y cols., en el año 2011, donde la mayor frecuencia correspondió para *E.*

avium, *E. faecalis* y *E. faecium* ⁽¹⁹⁾; esto podría ser explicado por las diferencias en la época del muestreo, diferente animal y la dieta de los mismos, que en el caso del presente estudio se reporta la alimentación con desperdicios, mientras en el estudio del 2011, fue basada en concentrados.

Por otro lado, estas especies de *Enterococcus*, se consideran patógenos potenciales al ser humano ⁽⁴⁾, y podrían verse involucrados en un proceso zoonótico entre los habitantes de dichas comunidades donde fueron encontrados. Sin embargo, durante la recolección de las muestras no se observaron manifestaciones clínicas de animales, ni personas que cohabitan en los lugares muestreados.

En nuestro estudio también se identificaron, aunque en menor frecuencia, las especies de *E. faecium* y *E. faecalis*, consideradas las especies con mayor aislamiento en muestras de humanos ^(5,6). Sin embargo, estos datos difieren, en relación a la frecuencia de su aislamiento, al estudio realizado por Kühn y cols., en su estudio sobre la epidemiología y ecología de *Enterococcus* en muestras de animales, ambiente y humanos en Europa en el año 2000, donde *E. faecium* se aisló con mayor frecuencia en la mayoría de las muestras, seguido por *E. hirae* y *E. faecalis* ⁽⁸⁾.

E. malodoratus y *E. cecorum* se aislaron en menor número en nuestro estudio; especies que son poco común de aislamiento; sin embargo, este hallazgo podría estar relacionado a la posibilidad de inter-convivencia entre los animales (ej., gallinas, cerdos, vacas e incluso gatos) ^(21, 24). También dichas especies se encuentran entre las de menor significado clínico para el ser humano ⁽⁴⁾.

Hasta donde se sabe, no existen estudios de susceptibilidad antibiótica en *Enterococcus spp* aislados de muestras de animales que hayan sido realizados en Nicaragua, los estudios sobre *Enterococcus* y susceptibilidad antibiótica que pueden encontrarse han sido realizado de muestras clínicas de pacientes hospitalizados ⁽¹⁴⁻¹⁸⁾. En nuestro estudio se pudo observar que de todas las especies identificadas de *Enterococcus* todavía la mayoría son susceptibles a los antibióticos ensayados, en especial a betalactámicos (ampicilina), aminoglucósidos (estreptomina y gentamicina) y glicopéptidos (vancomicina), que están entre las alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo

⁽⁴⁰⁾. Sin embargo, es importante señalar que dos aislados de *Enterococcus* (*E. gallinarum* y *E. faecalis*) mostraron susceptibilidad intermedia para vancomicina, que también debe sugerir atención dentro de la vigilancia de resistencia.

Se encontró que por lo menos un aislado de cada especie de *Enterococcus* identificada presentó baja susceptibilidad a ciprofloxacina y/o eritromicina. *E. gallinarum*, fue la especie que presentó menor grado de susceptibilidad a eritromicina y ciprofloxacina, en comparación con las otras especies identificadas. Además se observó un aislado intermedio a vancomicina, este dato debe ser considerado de suma importancia no solamente por la menor susceptibilidad de esta especie, la cual presenta resistencia intrínseca a los glicopéptidos ^(22, 40). Sino porque puede facilitar la adquisición de genes de resistencia en otras especies de *Enterococcus* de gran importancia clínica para el hombre como lo es *E. faecium* o *E. faecalis*, las cuales adquieren genes de resistencias con gran facilidad ^(22, 36).

Nuestros resultados difieren del estudio realizado por Kühn y cols., *Enterococcus* resistentes a antibióticos en muestras de animales, ambiente y humanos en Europa en el año 2000. En el cual se observó un alto nivel de resistencia a los antibióticos testados, donde *E. faecium* y *E. faecalis* presentaron resistencia a vancomicina, lo que indica la presencia de ciertas especies de *Enterococcus* circulantes en los diferentes ambientes resistentes a este glicopéptido; a diferencia de nuestros resultados donde ninguna de las especies aisladas, principalmente *E. faecium* y *E. faecalis* presentaron resistencia a vancomicina ⁽¹²⁾.

Por otro lado, se observó similitud con el estudio realizado por Poeta P. y cols., sobre *Enterococcus* con resistencia a antibióticos en muestras fecales de animales salvajes en Portugal en el año 2005, debido a que en su estudio y en nuestros resultados se encontró que todas las especies de *Enterococcus* aisladas fueron sensibles a ampicilina lo que demuestra que estas bacterias presentan baja resistencia intrínseca a los betalactámicos.

Además en el estudio realizado por Poeta P. y cols., *E. faecalis* (2/45) y *E. faecium* (27/73) presentaron un alto grado de resistencia a eritromicina, datos que concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio *E. faecalis* (3/3) y *E. faecium* (6/8) con la discrepancia

que en nuestros resultados *E. gallinarum* (9/12) también mostró resistencia a dicho antibiótico a diferencia del estudio de Poeta P. y cols. Otro dato de importancia es la resistencia intermedia a vancomicina observada en *E. gallinarum* (2/2) en su estudio, semejante a nuestros resultados donde se observó que *E. gallinarum* (1/12) y *E. faecalis* (1/3) presentaron resistencia intermedia a vancomicina, estos datos representan un hallazgo de importancia debido a que a los cerdos no se les suministraban antibióticos como promotores de crecimiento o como terapia frente a infecciones, sugiriendo así, que dicha especie, es capaz de crear una significativa resistencia antimicrobiana sin previo contacto con antibióticos; lo cual podría facilitar en un momento determinado la amplia diseminación de especies resistentes en la comunidad debido a su difícil erradicación por la falta de alternativa de tratamiento antibacteriano en posibles infecciones bacterianas que presenten los animales ⁽⁴¹⁾.

Es importante destacar que se encontraron aislados de *Enterococcus* con menor susceptibilidad a quinolonas y macrólidos; sin embargo, esto se debe a que son intrínsecamente menos susceptibles a ambos grupos de antibióticos ⁽⁶⁾, lo que podría explicar esta observación.

10 CONCLUSIONES

En nuestro estudio, la especie *E. gallinarum* (12/ 37) fue la más predominante, seguida de *E. hirae* (9/37) y *E. faecium* (8/37). Sin embargo 28 aislados no pudieron ser identificadas, sugiriendo utilizar métodos moleculares para su identificación.

En relación a la susceptibilidad antibacteriana, *E. gallinarum* y *E. faecalis* fueron las especies que presentaron menor susceptibilidad a los antibióticos utilizados. Mientras que *E. hirae* fue la especie con mayor sensibilidad.

Un total de 17 fenotipos bioquímicos fueron identificados utilizando el sistema *PhP-RF*, siendo la comunidad de Momotombo donde se identificó un mayor número de fenotipos comunes como no comunes.

El aislamiento de *Enterococcus* fue con mayor frecuencia en los cerdos que se alimentaban de desperdicios de comida y se encontraban libres en el patio, lo cual sugiere que estos animales están más propensos a ser portadores de *Enterococcus* al estar expuestos a dichos factores.

11 RECOMENDACIONES

Realizar seguimiento de este tipo de estudio, donde se amplié el número de muestras tanto a nivel local como en otras zonas del país, con la posibilidad de utilizar métodos que ayuden a determinar especies de *Enterococcus*, aun no diferenciados.

Aunque no fue notable la resistencia antimicrobiana en este estudio, es pertinente mantener siempre una vigilancia con el fin de informar la situación epidemiológica en este sentido.

A los dueños de los cerdos, mantener a estos animales en corral, alimentarlos con concentrado y que consuman agua potable, para erradicar la transmisión y colonización de *Enterococcus* con otros animales, medio ambiente y a los seres humanos.

12 REFERENCIAS

1. Silva J, Loyola P, Galleguillos J, Rodríguez Y, Colque P, et. al. Prevalencia de *Enterococcus* resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. Rev Méd Chile. 2005; 133: 1201- 1210.
2. Ronconi M, Merino L. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), estreptomycin (EST) y vancomicina (VAN), aislados de materia fecal de pacientes pediátricos hospitalizados. 2004. [Internet] [Citado 18 Mayo 2011]. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/3-Medicina/M-022.pdf>.
3. Fry M P. Aislamiento de *Escherichia coli* y de *Enterococcus spp* desde el contenido rectal de bovinos. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario]. Universidad de Valdivia, Chile. 2004. [Internet] [Citado 22 Mayo 2011] Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fvf946a/doc/fvf946a.pdf>.
4. Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. Microbiología médica. 5ª Ed. Elsevier; 2006: 259 – 262
5. Rodríguez G. Géneros: *Streptococcus* Y *Enterococcus*. [Internet] [Citado 09 Octubre 2011] Disponible en: http://www.educa2.madrid.org/c/document_library/get_file?p_l_id=194476&groupId=34663&folderId=206039&name=DLFE-5442.pdf
6. Abriouel H, Ben N, Lucas R, Gálvez A. La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. [Internet] [Citado 09 Octubre 2011] Disponible en: http://www.insacan.org/racvao/anales/2008/03_ANALES_2008_abriouel.pdf
7. Palomo AO. Resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus*. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca. [Internet] [Citado 09 Octubre 2011] Disponible en: <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/Vre.pdf>
8. Kuhn I, Iversen A, Burman LG, Olsson B, Franklin A, et. al. Epidemiology and ecology of *Enterococci*, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment Example of an ongoing project within the European research programme. Int J Antimicrob Agents 2000; 14:337–342
9. Arcos M, Ávila S, Estupiñán S, Gómez A. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. NOVA 2005; 3 (4): 1-116

10. Bazet C, Blanco J, Palacio R, Seija V. *Enterococcus* resistentes a vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. Rev. Med. Uruguay 2005; 21: 151 – 158.
11. Garza R, Hernández K, Mejía A. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. UNAM. México. [Internet] [Citado 31 Mayo 2011] Disponible en: <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Enterococcus.pdf>.
12. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman L, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant *Enterococci* in animals, humans and the environment in different European regions. AEM 2005; 71(9): 5383-5390
13. Vergaray G, Méndez C, Morante H, Heredia V, Béjar V. *Enterococcus* and *Escherichia coli* Like indicators of fecal pollution in coastal beaches of Lima.
14. OPS. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Organización Panamericana de la Salud 2004:65.
15. OPS. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Organización Panamericana de la Salud. 2005:115.
16. OPS. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Organización Panamericana de la Salud 2006:91.
17. OPS. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Organización Panamericana de la Salud 2008:129.
18. OPS. Informe Anual de la Red de Monitoreo/ Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Organización Panamericana de la Salud 2009:124.
19. Altamirano H, Barcenás E, Reyes D. Aislamiento de *Enterococcus spp* en muestras fecales de cerdos de tres comunidades del sector sur de León. Trabajo de JUDC. UNAN, León. 2011.
20. Fonseca M, Galeano G. Fenotipificación bioquímica y susceptibilidad antibacteriana en *Enterococcus spp*. aisladas de aguas residuales de León, junio-septiembre 2012 [Tesis para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico]. UNAN, León. 2013
21. Suárez M. Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. Rev Cubana Hig Epidemiol 2002;40(1):38-43
22. Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Rev Cub Hig Epidemiol. 2010; 48(2)147-161.

23. Domig K, Mayer H, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp.* Pheno and genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology. 2003; 88: 165-188
24. Quiñonez D. Enterococos. [Internet] [Citado 03 junio 2011]. Disponible en: http://mvz.unipaz.edu.co/textos/biblioteca/microbiologia/microbiologia_y_parasitologia_medicas_-_tomo_i/microcap20.pdf
25. Quiñones D. *Enterococcus* aislados en cuba: Resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. [Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas] Habana, Cuba. 2010.
26. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol. 2012;10(4):266-78.
27. Acosta S. *Enterococcus*. [Internet] [Citado 12 diciembre 2012]. Disponible en: <http://www.codeinep.org/control/Enterococcus.pdf>.
28. López R, Calderón V, Matute J, Videa T, Baltodano A, et. al. Manual de procedimientos de bacteriología médica. CNDR. 2004; 79-86
29. Manero A, Blanch A. Identification of *Enterococcus spp.* With a Biochemical Key. Catalonia, Spain. 1999. American Society Of Microbiology. Vol. 65; 10: 4425-4430
30. Saeedi B, Tarnberg M, Gill H, Hallgren A, Jonasson J, et al. A screening method for epidemiological typing of enterococcal isolates. APMIS 2005; 113: 603-612.
31. Araya M, Davidovich G, Chavez C, Arias M. Identificación de *Enterococcus spp.* en muestras de leche cruda del Área Metropolitana de Costa Rica y evaluación del patrón de sensibilidad a antibióticos. Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales. [Internet] [Citado 07 junio 2011]. Disponible en: http://www.alanrevista.org/ediciones/2005-2/identificacion_enterococcus_leche_cruda.asp
32. Dávila R. Determinación de presencia de residuos de antibióticos en carnes bovinas en el matadero industrial nuevo CARNIC, Managua. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario]. Universidad Nacional Agraria, Nicaragua. 2007
33. Ortisi F. Breve revisión sobre los promotores de crecimiento. [Internet] [Citado 07 julio 2011]. Disponible en: <http://www.Cevasa.com.ar/en/pdf/Bambermicina.pdf>.

34. Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med* 2007; 38(2): 149-158
35. Sayah R, Kaneene J, Johnson Y, Miller R. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *AEM* 2005; 71 (3): 1394-1404
36. Quintana A. Antibióticos. Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. [Internet] [Citado 28 febrero 2013] Disponible en: www.educa2.madrid.org/cms_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b.4553dfefcd53/27.
37. Sussman OA, Mattos L, Restrepo A. Resistencia bacteriana. [Internet] [Citado 09 Octubre 2011]. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
38. Malbrán C. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires, Argentina. 2001
39. García J, Cantón R, García JE, Gómez M, Martínez L, et al. Procedimientos de microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2000. [Internet] [Citado 23 marzo 2013]. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap11.htm>.
40. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI 2011; 31(1). Documento M100-S21.
41. Poeta P, Sáenz Y, Klibi N, Costa D, Ruiz-Larrea F, et al. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in *Faecal Enterococci* of Wild Animals in Portugal. *J. Vet Med* 2005; 52: 396 – 402

13 ANEXOS

FICHA RECOLECTORA DE DATOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA –LEÓN

Aislamiento y Susceptibilidad Antimicrobiana de especies *Enterococcus* en Ganado porcino

León, Octubre – Noviembre 2013

Ficha N°: _____

Nombre del Dueño: _____

Dirección: _____

Edad cerdo:

Sexo:

1. Hábitat del animal

Corral:

Libres en el patio de la casa:

2. Tipo de Alimentación

Desperdicio de comida:

Concentrado para cerdos:

3. Origen del agua consumida:

Agua potable:

Río:

Pozo:

4. ¿Utilizan Antibióticos como promotores de crecimiento en los animales?

Si:

No:

¿Cuáles?

5. ¿Cada cuántos meses se les realizan chequeos de salud a los animales?

6. ¿Qué tratamiento se les aplica a los animales cuando tienen una infección bacteriana?

CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA –LEÓN

Aislamiento y Susceptibilidad Antimicrobiana de especies *Enterococcus* en Ganado porcino

León, Octubre – Noviembre 2013

Los *Enterococcus spp.* son bacterias que forman parte de la flora gastrointestinal de los animales, por lo que es común encontrarlas en estas. Son resistentes de manera natural a muchos de los antibióticos y pueden adquirir resistencia a través de plásmidos.

Los *Enterococcus* resistentes a antibióticos constituyen uno de los principales agentes etiológicos de infecciones oportunistas (por disminución de la inmunidad) y ahora de infecciones en la comunidad. Por lo que se considera de mucha importancia el estudio de estas bacterias en los animales, ya que estos juegan un papel crítico en la adquisición y diseminación de enfermedades debido a resistencia a determinados antibióticos.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

Identificar las especies y susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus* aislados de muestras de materia fecal de ganado porcino.

Yo _____ como dueño del cerdo estoy de acuerdo con lo que se me plantea y deseo participar en el estudio.

Nombre

Firma

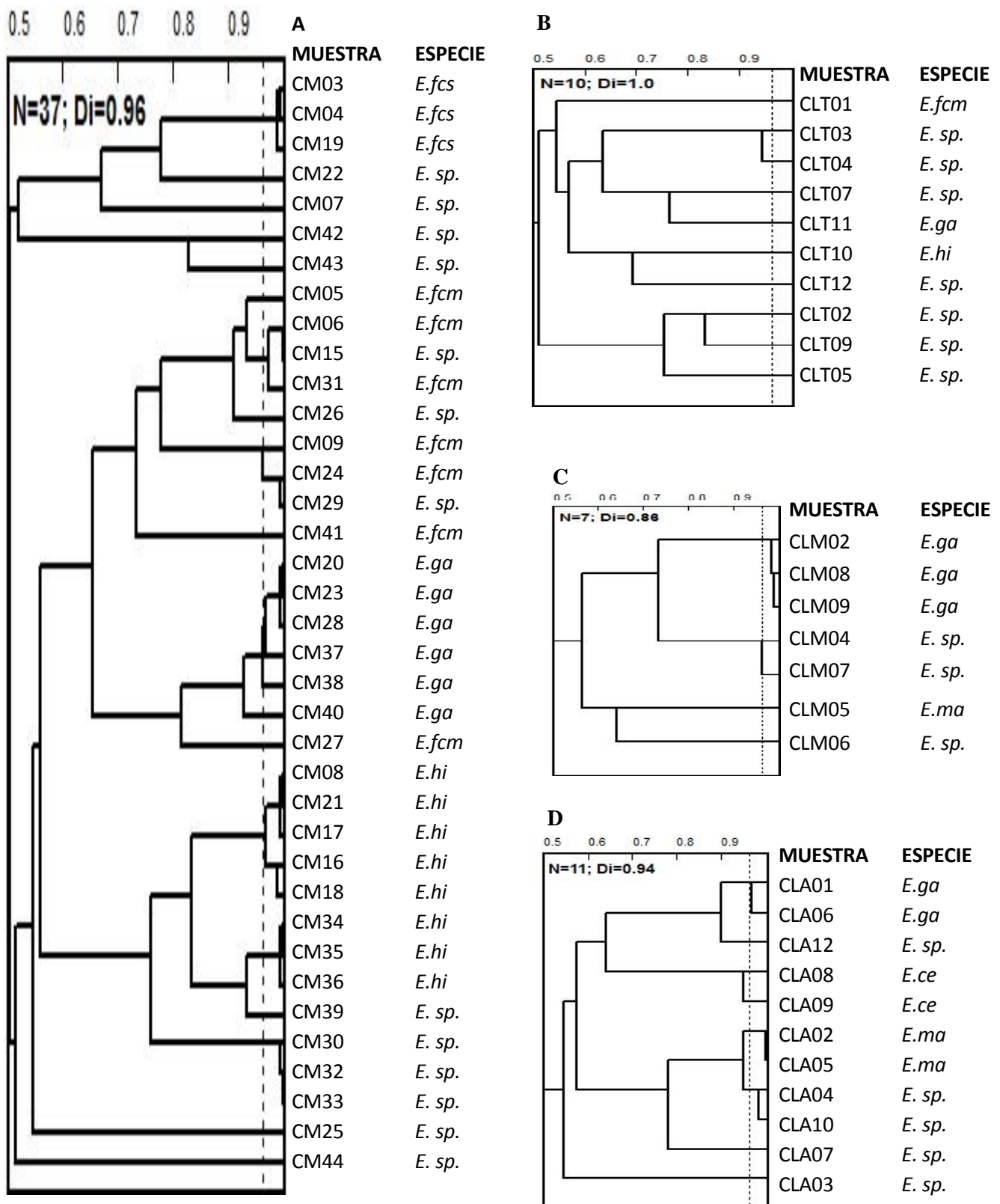


Figura 4. Dendrogramas que representan la distribución de especies de *Enterococcus* entre diferentes fenogrupos según el sitio de muestreo: A, Momotombo (19 fenotipos); B, Talchocote (10 fenotipos); C, Mercedes Varela (4 fenotipos); D, El Arbolito (8 fenotipos). *E. fcm*, *E. faecium*; *E.fcs*, *E. faecalis*; *E. ga*, *E. gallinarum*; *E. ce*, *E. cecorum*; *E. ma*, *E. malodoratus*; *E. hi*, *E. hirae*; *E. sp*, *Enterococcus spp.*