

Resistencia a antimicrobianos de cepas de *Enterococcus* aisladas de agua, sedimento y almejas

Ricardo Silva*, Zoraida Medina, Marynés Montiel de M.

Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Recibido: 16-07-10 Aceptado: 15-11-10

Resumen

Los enterococos están ampliamente difundidos en la naturaleza. Son habitantes naturales del tracto intestinal de humanos y animales, por lo que es posible su ingreso a los ambientes naturales, a través de las descargas de agua no tratadas. Estos microorganismos se aíslan frecuentemente en infecciones intrahospitalarias incrementando los factores de resistencia a antimicrobianos. En Venezuela, estudios referentes a la sensibilidad antimicrobiana en cepas de enterococos procedentes de ambientes naturales son escasos. El objetivo de esta investigación fue determinar los patrones de resistencia de cepas de enterococos procedentes de agua, sedimento y almejas. Las cepas de *Enterococcus* spp., fueron identificadas por técnicas convencionales. Los patrones de resistencia a antibióticos fueron evaluados utilizando la técnica de difusión en disco, siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2007. Los porcentajes más elevados de resistencia se presentaron a los antibióticos estreptomycin (98%), rifampicina (75%) y gentamicina (56%); seguido de una resistencia intermedia a la ciprofloxacina (60%) y la eritromicina (55%). Para los antibióticos primarios y selectivos (vancomicina, penicilina y ampicilina), la sensibilidad se mantuvo por encima del 60%. Los resultados muestran altos porcentajes de cepas resistentes a los antibióticos en el ambiente, indicando la posibilidad de que una parte de la población está soportando la dosis activa de estas drogas.

Palabras clave: antibiótico, enterococos, resistencia, agua, ambiente.

Antimicrobial resistance in *Enterococcus* strains isolated from water, sediment and shellfish

Abstract

Enterococci are widely distributed in nature. Intestinal tract of humans and animals is the natural habitat of these organisms. They can entry in natural environments through untreated sewage water. These organisms are frequently isolated from hospital infection increasing antibiotic resistance factors. There is a little information available, in Venezuela, on the antibiotic resistance in *Enterococcus* strain isolated from natural environments. The aim of this work was, to determine the antibiotic resistance patterns in *Enterococcus* spp. Isolated from water, sediment, and shellfish samples. Microorganisms were identified using conventional techniques. Antibiotic resistance was evaluated using the diffusion technique by the CLSI, 2007 recommendation. The highest level of resistance was shown to streptomycin (98%), rifampicine

* Autor para la correspondencia: ricar757@gmail.com

(75%), and gentamicin (56%); follow by low resistance of ciprofloxacin (60%), and erythromycin (55%). For the primary and selective antibiotics (vancomycin, penicillin y ampicilline), sensibility was over 60%. Result showed high percentage of resistance *Enterococcus* strains in the environment being related with the antibiotic used by the population.

Key words: antibiotic, enterococci, resistance, water, environment.

Introducción

Los enterococos son bacterias esféricas que se agrupan en cadenas, comprenden una gran variedad de especies con hábitat muy diverso (1, 2). A pesar de formar parte de la flora intestinal de los individuos sanos, durante las últimas décadas, han sido considerados como uno de los principales patógenos nosocomiales en ascenso; una de las características notable de los enterococos es la capacidad de sobrevivir y crecer en microambientes que pueden ser tóxicos para muchas bacterias en particular zonas con altas concentraciones de sales (6,5% cloruro de sodio), temperaturas extremas (10-45°C) además de la habilidad que presentan en tolerar altas concentraciones de ácidos (3).

Estos organismos comensales actúan como patógenos oportunistas. Aun cuando son capaces de producir infecciones de origen comunitario, son más comunes en infecciones hospitalarias (4) y particularmente en pacientes adultos de edades avanzadas con enfermedades subyacentes graves y en personas inmunocomprometidas que han estado hospitalizadas por períodos prolongados (5).

En las décadas de 1970 y 1980 los enterococos se establecieron como importantes agentes causales de infecciones nosocomiales y de esta forma dejaron de ser considerados patógenos débiles. Actualmente, son los segundos agentes más frecuentemente recuperados, luego de *Escherichia coli*, en infecciones del tracto urinario e infecciones de heridas y son la tercera causa de bacteriemias intrahospitalaria (6).

De las infecciones por *Enterococcus* en el hombre la mayoría son originadas por *E.*

faecalis (80 al 90%), seguido por *E. faecium* (10 al 20%). Sin embargo, esta diferencia parece estar disminuyendo en los últimos años debido a la diseminación hospitalaria de los clones de *E. faecium* resistente a ciertos antibióticos (6).

La trascendencia clínica de los enterococos se debe fundamentalmente a su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos y a su habilidad natural para adquirir, acumular y compartir elementos extracromosomales que codifican factores de virulencia o genes de resistencia a los agentes antimicrobianos, dándoles de esta forma ventajas para sobrevivir en condiciones inusuales de estrés ambiental (7). Estudios previos han sugerido la transmisión de resistencia entre enterococos aislados de animales y humanos (8).

Silva y col. (2005), reportaron una alta prevalencia de cepas de enterococos resistentes a los aminoglucósidos aisladas de aguas servidas en el Norte de Chile (9). De la misma manera se ha reportado que el aporte de cepas de enterococos provenientes de aguas residuales contaminadas con desechos fecales podría contribuir a la diseminación de la resistencia a los antibióticos (9-11).

Intrínsecamente los enterococos son resistentes a un gran número de antibióticos incluyendo β -lactámicos, lincosamidas, aminoglucósidos y trimetropim-sulfametoxazol y además presentan una gran capacidad para adquirir nueva resistencia (12). De forma natural son altamente resistentes a las cefalosporinas y penicilina resistente a la penicilinasa, hecho que ha favorecido enormemente su selección en los ambientes hospitalarios. A diferencia de *E. faecium*, *E. fae-*

calis es generalmente sensible a la penicilina y ampicilina (13).

El estudio de la resistencia a los antibióticos en bacterias de origen ambiental se hace importante ya que la vigilancia de la resistencia a los antibióticos se ha realizado, en la mayoría de los casos, con microorganismos aislados de muestras clínicas, siendo las bacterias de origen ambiental un posible reservorio de genes codificadores de resistencia, capaces de transferirlos horizontalmente a los microorganismos patógenos humanos que compartieran el mismo hábitat (14).

En los últimos años, los enterococos han recibido una creciente atención siendo propuestos como indicadores alternativos de contaminación en las aguas estuarinas, ya que pueden perdurar en ellas por un lapso de tiempo mayor en comparación con otras bacterias indicadoras (14, 15). Países como Canadá, Estados Unidos y de la región europea actualmente, utilizan este microorganismo como indicador de contaminación fecal en aguas naturales (16).

Estudios previos realizados en el sistema del Lago de Maracaibo, ubicado en el estado Zulia, Venezuela, han demostrado la presencia de enterococos en cantidades variables en el agua y otros componentes del mismo, tales como: sedimentos, almejas, agua y camarones (17).

En Venezuela, reportes previos han evaluado la sensibilidad antimicrobiana en cepas de enterococos aisladas de muestras procedentes de pacientes hospitalizados y de comunidades (18). Sin embargo, no se tienen reportes en muestras aisladas del ambiente, específicamente del Lago de Maracaibo, en relación a la sensibilidad a los antimicrobianos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los patrones de resistencia a antibióticos en cepas de enterococos aisladas de muestras de agua, sedimento y almejas provenientes del Lago de Maracaibo.

Materiales y métodos

Área de estudio

Nazareth está ubicado en San Rafael de El Moján, capital del municipio Mara, es una playa que recibe numerosas descargas de desechos; la misma se encuentra rodeada de palafitos y asentamientos urbanos y rurales. Presenta un alto grado de pobreza, hacinamiento, falta de servicios públicos y educación sanitaria (19). La Ciénaga de Los Olivitos se encuentra ubicada en la parte nor-oriental del estrecho del Lago de Maracaibo, al norte colinda con el Golfo de Venezuela; al sur, con la población de Ancón de Iturre y por el este, con la vía que conduce a la población de Quisiro y la población de la Boca del Palmar. Ésta última es un área protegida por el estado (20).

Muestras

Se recolectaron muestras de agua, sedimento y almejas por un período de cinco meses comprendidos desde enero-mayo de 2007, con dos muestreos mensuales recolectando un total de 10 muestras, cinco de la zona de Nazareth municipio Mara, estado Zulia y cinco muestras de aguas procedentes de la Ciénaga de los "Olivitos", municipio Miranda, estado Zulia.

Las muestras de almejas fueron recolectadas de forma manual y las de sedimento utilizando un envase de vidrio; ambas muestras fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético. Las muestras de agua, fueron recolectadas a 30cm de profundidad en frascos de vidrio de 1000 mL, previamente esterilizados. Todas las muestras fueron recolectadas aproximadamente a 6 metros de la costa y colocadas en una cava provista de hielo para su traslado al laboratorio y posterior análisis, en un lapso no mayor a 6 h (21).

Preparación de las muestras

Se extrajeron 25 g del contenido interno de las almejas y se homogeneizaron, utili-

zando una licuadora, a alta velocidad por 2 min, en 225 mL de agua peptonada al 0,1% (p/v) (14), de igual forma se tomaron 25 g de sedimento y se adicionaron en 225 mL de agua peptonada (0,1%), homogeneizando la muestra por agitación manual durante 2 min (21).

Aislamiento de enterococos

Las muestras de agua, sedimento y almejas fueron inoculadas en caldo azida dextrosa (Himedia, India) e incubadas por 24-48 h a 37°C. Los tubos positivos (aparición de turbiedad en el medio), se sembraron en medio agar KF (Himedia, India) y se incubaron 24-48 h a 37°C. Las colonias aisladas fueron inoculadas en agar infusión cerebro corazón (AICC) (Himedia, India), incubadas durante 18-24 h a 37°C y posteriormente en caldo infusión cerebro corazón (Himedia, India) (CICC), incubado bajo las mismas condiciones.

Identificación de enterococos

A partir del CICC se realizó una bioquímica convencional para la identificación de *Enterococcus* spp (21,22).

Susceptibilidad a antimicrobianos

La susceptibilidad a los antibióticos estudiados se realizó según la técnica de difusión por disco (20), utilizando los siguientes antibióticos: ampicilina (30 µg) penicilina (10unid), vancomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomina (10 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), rifampicina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg) y Nitrofurantoina (300 µg). Los halos de inhibición fueron comparados con los descritos para *Enterococcus* spp., según el CLSI, 2007.

Controles

Se utilizó una cepa control ATCC de *Enterococcus faecalis* 29212 para la identificación de género y una de *Staphylococcus aureus* 25923 para la difusión en disco, la cual es la sugerida por el CLSI, 2007.

Resultados y discusión

Se seleccionaron 25 cepas de *Enterococcus* spp., de cada una de las muestras estudiadas (agua, sedimento y almeja de la zona del Nazareth y agua de la Ciénaga de los Olivitos) para un total de 100 cepas a analizar.

Los porcentajes más elevados de resistencia se presentaron a la estreptomina (98%), rifampicina (75%) y gentamicina (56%), seguido por la eritromicina (32%), ciprofloxacina (26%) y tetraciclina con un 23% (tabla 1). Los valores de resistencia intermedia a este grupo de antibióticos oscilaron en un rango del 10 al 60% (tabla 1).

Reportes previos en muestras de pacientes hospitalizados y provenientes de comunidades de Maracaibo, estado Zulia, demuestran una alta resistencia a la eritromicina (95,24%), rifampicina (91,30%) y tetraciclina (39,13%), en cepas de *E. faecium*. Por su parte, para *E. faecalis* se reportó alta resistencia para rifampicina (82%), tetraciclina (44%) y eritromicina (32%). No obstante se encontró una resistencia menor para la penicilina con un 11,54% (18).

Estudios previos han reportado valores altos de resistencia (>57%) a la eritromicina, kanamicina y estreptomina en cepas de *E. avium*, *E. raffinosus* y *E. faecium* aisladas de aguas costeras en el norte de Grecia (23).

De forma natural, los enterococos muestran baja resistencia a antibióticos como la estreptomina, pudiendo pasar a una resistencia de alto nivel de tipo adquirida, por mutaciones ribosomales, específicamente en los genes *rstA* los cuales son los responsables de los altos niveles de resistencia a este antibiótico (14). Es por esta razón, que el CLSI a partir del año 2008, en su boletín anual, propone la aplicación de la estreptomina en los enterococos con discos de altas cargas o con la aplicación sinérgica de otro antibiótico (24, 25).

Los valores de resistencia registrados para la gentamicina estuvieron por encima

Tabla 1
Porcentajes de susceptibilidad de cepas de *Enterococcus* spp., aisladas del Lago de Maracaibo, estado Zulia

Antibiótico	R (%)	RI (%)	S (%)
Estreptomina (15 µg)	98	2	0
Rifampicina (5 µg)	75	17	8
Gentamicina (15 µg)	56	21	23
Eritromicina (15 µg)	32	55	13
Ciprofloxacina (5 µg)	26	60	14
Tetraciclina (30 µg)	23	10	67
Penicilina (10unid)	12	0	88
Ampicilina (10 µg)	7	0	93
Vancomicina (30 µg)	3	9	88
Nitrofurantoina (30 µg)	2	6	92
Levofloxacina (5 µg)	1	24	75
Cloranfenicol (30 µg)	0	8	92

R= Resistencia. RI= Resistencia Intermedia. S= Susceptible.

del 50% (tabla 1); este antibiótico ejerce mayor efecto en los enterococos cuando se aplica en combinación con otros tipos de drogas. En países como Argentina se han reportado cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* con altos valores de resistencia que superan el 40% en cepas aisladas del tracto urinario, cavidad abdominal, heridas quirúrgicas, absceso y pie diabético (26).

La alta resistencia encontrada a la estreptomina y a la gentamicina, básicamente se debe a la adquisición de marcadores de resistencia, los cuales se expresan una vez que la cepa se somete consecutivamente a la acción de estos agentes antimicrobianos (26).

También se ha observado que algunos enterococos producen enzimas que modifican a los aminoglucósidos (gentamicina y estreptomina), no permitiendo su transporte al interior de la célula, lo que les confiere altos niveles de resistencia a los mismos. Estas enzimas incluyen las adenil-transferasas de aminoglucósidos (AAC, por sus siglas en inglés) y las fosfotransferasas de

aminoglucósidos (ACC, por sus siglas en inglés) (11).

Se encontró un alto porcentaje de cepas *Enterococcus* spp., con resistencia intermedia a la ciprofloxacina (60%) y la eritromicina (55%) (tabla 1). Reportes indican que la ciprofloxacina solo posee baja actividad sobre los enterococos y, por lo general, no son bactericidas a la concentración obtenida con la dosis habitual, limitándose por tanto su uso al tratamiento de infecciones urinarias (25). La resistencia intermedia a ciprofloxacina ha sido asociada a la presencia de las topoisomerasas II y IV o a un sistema de eflujo activo de la droga y puede estar codificada a nivel cromosomal y plasmídico (18). La resistencia intermedia manifestada en los enterococos frente a la eritromicina, fundamentalmente se debe a una metilación o modificación de su sitio blanco en el ribosoma, lo cual está mediado por los genes *erm* o los genes *msr A* (25).

Se encontró una alta resistencia (> 50%) a estreptomina y rifampicina en los enterococos aislados en todas las mues-

tras analizadas (agua, sedimento y almejas) (figura 1).

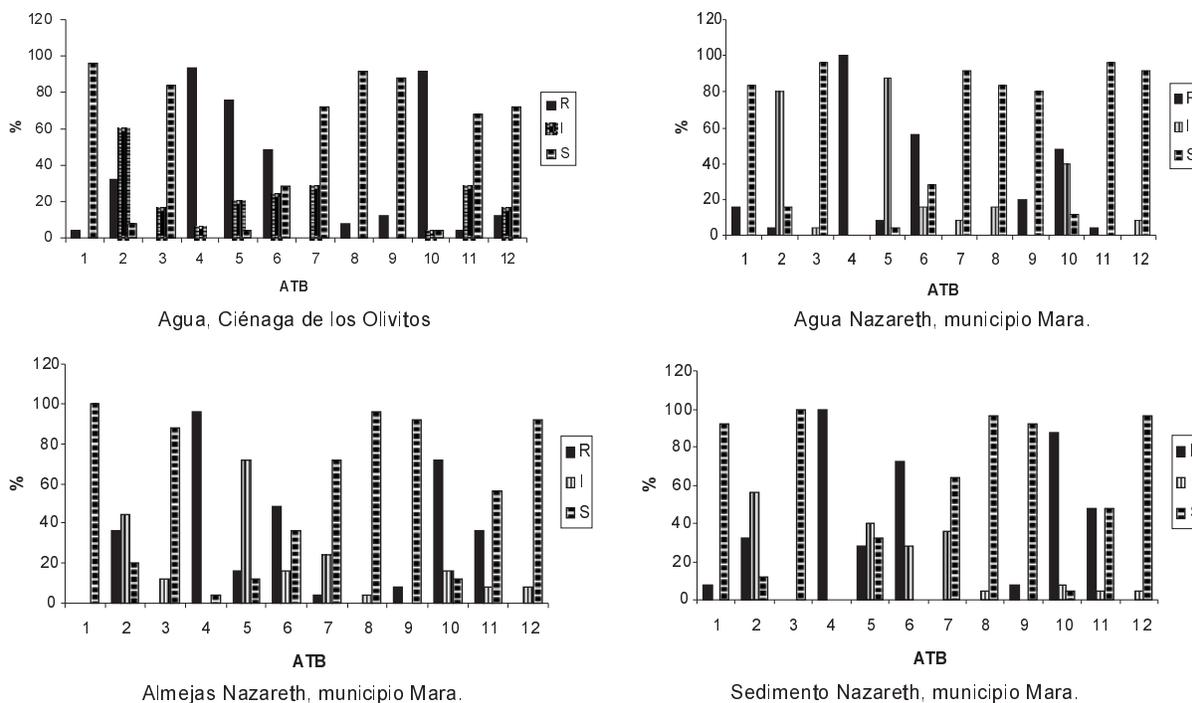
En otros países de Latinoamérica como en Perú, se han registrado cepas de *Enterococcus* resistentes a la rifampicina con valores cercanos al 100%; aisladas de pacientes que presentan diversas infecciones enterocócicas (22).

Se encontró, en todos los tipos de muestras analizadas, alta sensibilidad a los antibióticos primarios y selectivos como la ampicilina (93%), penicilina (92%), vancomicina (88%) y a los antibióticos suplementales como nitrofurantoina (92%), cloranfenicol (92%) y levofloxacina (75%) (figura 1) (tabla 1). Los resultados obtenidos coinciden con los reportados en muestras de origen humano en Venezuela (17, 21). Este hallazgo demuestra la posibilidad de que existe una relación entre los enterococos aislados

en infecciones humanas y los encontrados en el ambiente del sistema del Lago de Maracaibo. Otros países como Uruguay, Argentina y Brasil en cepas de enterococos han reportado valores de resistencia a antibióticos selectivos y primarios (vancomicina, penicilina y ampicilina), que superan el 40% (12).

Conclusiones

Enterococcus spp., soporta la dosis activa de drogas como la estreptomocina, rifampicina y gentamicina, ya que, tanto en Nazareth como en los Olivitos se observaron porcentajes de resistencia elevados para estos tres agentes antimicrobianos. Los patrones de sensibilidad a los antimicrobianos fueron similares en ambas zonas, reportándose altos valores en antibióticos primarios y selectivos como la ampicilina, penicilina y vancomicina para el género *Enterococcus*



%= porcentaje; ATB= antibióticos; R= resistente; I= intermedio; S= sensible; 1= ampicilina; 2= cloranfenicol; 3= ciprofloxacina; 4= estreptomocina; 5= eritromicina; 6= gentamicina; 7= levofloxacina; 8= nitrofurantoina; 9= penicilina; 10= rifampicina; 11= tetraciclina; 12= vancomicina.

Figura 1. Porcentajes de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* spp., aislados de muestras ambientales.

spp. Los valores de resistencia y sensibilidad detectados en este estudio en las cepas procedentes de muestras ambientales son similares a los de reportados para cepas de procedencia clínica, similitud que sugiere una conexión estrecha entre ambos grupos y una posible asociación con un problema de salud pública.

Agradecimientos

A la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias por su apoyo financiero.

Referencias bibliográficas

1. PALAVACINO, E. *Rev chil infectol* 16:95-100. 2001.
2. DÍAZ M., RODRÍGUEZ C., ZHURBENKO R. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 48 (2): 147-161. 2010.
3. PARDI G., GUILLARTE C., CARDOZO E. *Acta odontol venez, mar* 47(1): 110-121. 2009.
4. ZANELLA R., BRANDILEONE M., BOKERMANN S., ALMEIDA S., VALDELARO F., VITORIO F. *Microb Drug Resistance* 9(3): 283-91. 2003.
5. OSPINA S., ROBLEDO J., GOMÉZ C., MEJÍA G., SERNA L., OVIEDO C., PATIÑO, L. *Infectio* 5:1. 2001.
6. SUÁREZ M. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 40(1): 38-43. 2002.
7. SUÁREZ M. *Rev argent Microbiol* 36(1): 31-35. 2004.
8. BOGAARD A., WILLEMS R., LONDON N., TOP J., STOBBERINGH J. *J Antimicrob Chemother* 49:497-505. 2002.
9. SILVA J., LOYOLA S., GALLEGUILLOS J., RODRÍGUEZ Y., COLQUE P., MÖLLBY R., KÜHN I. *Rev méd Chile* 133:1201-1210. 2005.
10. NOVAIS C., COQUE T., FERREIRA T., SOUSA J., PEIXE L. *American Society for Microbiology* 71(6): 3364-68. 2005.
11. TEJEDOR M., GONZALEZ M., TOLEDO L., GÓMEZ P. *Int J Hyg Environ Health* 203(4): 363-68. 2001.
12. TOLEDO C., PÉREZ M., ROCCHI M., GRIBAUDO G., MANGIATERRA S., MONTERISI, A. *Rev argent Microbiol* 36(1): 31-35. 2004.
13. CAVALLIERI S., HARBECK R., McCARTER Y., ORTEZ J., RANKIN I., SAUTHER R., SHARP S., SPIEGEL C. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. (Eds. Marie Coyle). Washington (Stated United of America). 119-134. 2005.
14. BAZET C., BLANCO J., SELJA V., PALACIO R. *Rev Med Urug* 21:151-158. 2005.
15. NODARSE R. *Rev Cub Med Mil* 34:4. 2005.
16. BALDINI M., SELZER P. *Rev argent Microbiol* 40(1): 48-51. 2008.
17. SILVA R. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de enterococos aislados de muestras de agua, sedimento y almejas del Lago de Maracaibo (para obtener el título de Licenciado en Biología). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo. 65 pp. 2007.
18. PINEDA M., BONILLA X., PEROZO A. *Centro de Referencia Bacteriológica (CRB-S.A.H.U.M)*. Eds SAHUM-MSDS. Maracaibo (Venezuela). 192 pp. 2007.
19. RIVERA C. Depuración virológica de *Polyemesoda solida* (Philippi, 1846), provenientes de los municipios Mara y Páez (para obtener el título de Licenciado en Biología). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo. 61 pp. 2008.
20. BALZÁN E. Evaluación microbiológica del sistema hidrodinámico del refugio de fauna silvestre y reserva de pesca Ciénaga de los Olivitos (para obtener el título de Licenciada en Biología). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo. 61 pp. 2007.
21. **AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION**. Editorial Washington. D.C. (U.S.A). 2001.

-
22. MAC FADDIN J. **Pruebas para la identificación bacteriana**. Médica Panamericana S.A. Baltimore (Stated United of America). 17:39-40. 2000.
 23. ARVANITIDOU M., KATSOUYANNOPOULOS V., TSAKRIS A. **J Med Microbiol** 50(11): 1001-5. 2001.
 24. WIKLER M., COCEEN F., CRAIG W., DUDLEY M., ELIOPOULOS G., HECHT D., HINDLER J., LOW D., SHEENA D., TENOVER F., TURNIDGE J., WEINSTEIN M., ZIMMER B. **CLSI**, Documento M100-S19. 27(3): 22. 2009.
 25. PEROZO A., CASTELLANOS M. **Rev Soc Ven Microbiol** 1:4-11. 2005.
 26. VELÁSQUEZ J., LIZARASO F., ZETOLA N., PAMNO O., SANCHEZ L., WONG W., HERNÁNDEZ R. **Rev Soc Peru Med Interna** 15:2. 2002.
 27. COMEGNA M., GUZMÁN M., CARMONA B., MOLINA M. **Rev Soc Ven Microbiol** 20(1): 88. 2000.