

Artículo original

Perfil de susceptibilidad de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas en animales destinados al consumo humano, criados en los estados Monagas y Anzoátegui

Lorena Abadía-Patiño

Laboratorio de Resistencia Bacteriana, Departamento de Biomedicina del IBCA. Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre. Venezuela.

Recibido 29 de noviembre de 2012; aceptado 10 de julio de 2013

Resumen: *Enterococcus* spp. es un género intrínsecamente resistente a varias familias de antimicrobianos de uso clínico humano. En vista de su difícil tratamiento cuando causa infecciones graves y su fácil diseminación a través de la cadena alimentaria, se determinó el perfil de susceptibilidad de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas en animales destinados al consumo humano, criados en los estados Anzoátegui y Monagas. Las muestras fueron recolectadas de forma no probabilística, intencional durante el año 2009. El perfil de susceptibilidad fue realizado por la prueba de difusión en disco para glicopéptidos, aminoglucósidos de alta carga, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, rifampicina y ampicilina. Por ser vancomicina uno de los antimicrobianos de mayor uso en medicina humana, se hizo la búsqueda de alto nivel de resistencia a glicopéptidos en todas las cepas. La mayoría de los aislados fueron enterococos móviles (*vanC*). Los antimicrobianos con mayor resistencia fueron aminoglucósidos y macrólidos. La detección de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos de uso clínico humano, en los animales de consumo humano, pudiera traducirse en una transmisión alimenticia de este tipo de cepas en el ambiente extrahospitalario, llegando a causar, bajo circunstancias apropiadas, infecciones graves en el hombre ya que son patógenos oportunistas.

Palabras clave: *Enterococcus* spp., resistencia antimicrobiana, animales, antibióticos.

Susceptibility profile of *Enterococcus* spp. strains isolated from animals destined for human consumption, raised at Monagas and Anzoátegui States

Abstract: *Enterococcus* spp. is a genus intrinsically resistant to several antimicrobial families clinically used in humans. Due to their difficult treatment when they produce serious infections and their easy dissemination through the food chain, the susceptibility profile of *Enterococcus* spp. strains isolated from animals destined for human consumption raised at Monagas and Anzoátegui States was determined. Samples were collected in a intentionally non-probabilistic form during the year 2009. The susceptibility profile was done using the disk diffusion test for glycopeptides, high charge aminoglycosides, erythromycin, chloramphenicol, cyprofloxacin, rifampicin and ampicillin. Since vancomycin is one the antimicrobials most used in human medicine, the high resistance level to glycopeptides was determined for all strains. Most of the isolates were mobile enterococci (*vanC*). The most resistant antimicrobials were aminoglycosides and macrolids. The detection of bacterial strains resistant to antimicrobials clinically used in humans in animals destined for human consumption could be translated into an a food transmission of these type of strains in extra-hospital environments, leading to originate, under appropriate circumstances, serious infections in man, since they are opportunistic pathogens.

Keywords: *Enterococcus* spp., antimicrobial resistance, animals, antibiotics.

* Correspondencia:
E-mail: labadia@udo.edu.ve

Introducción

El uso de antimicrobianos en la industria agroalimentaria ha generado muchas interrogantes, por lo que en los últimos años del siglo pasado, varias publicaciones refieren el impacto que tiene su utilización en animales, en el desarrollo de bacterias resistentes de interés clínico [1].

Los antimicrobianos con fines terapéuticos se consumen a dosis relativamente elevadas durante cortos periodos, pero existe la modalidad de emplearlos como promotores de crecimiento animal (PCA) y su uso es durante toda la vida del animal. Es conveniente revisar el impacto de su uso, el efecto residual en los productos de origen animal, las políticas de reglamentación, control y vigilancia en

diferentes sectores de la cadena alimenticia, con el fin de garantizar productos de calidad para el consumidor final [2]. La presión ejercida por los antimicrobianos sobre la microbiota intestinal de los animales en términos de mg/kg/año, podría ser de más de 10 veces que la ejercida por los antimicrobianos en los humanos; la presión de selección de cepas resistentes es alta teniendo en cuenta las bajas dosis administradas [3].

Los residuos de antimicrobianos (RA) presentes en los productos de origen animal, son el resultado de su alta ingesta durante la alimentación como PCA y los suministrados por metafilaxia o para tratamiento de animales clínicamente enfermos. Se definen los RA como sustancias farmacológicamente activas (principio activo, metabolitos o excipientes), presentes en los líquidos y/o tejidos animales después de la administración de medicamentos y susceptibles de ser encontrados en la carne o los productos alimenticios [2]. Su presencia tanto en el animal como en el humano que los ingiere, tiene consecuencias ecológicas importantes sobre la microbiota bacteriana comensal o saprófita. Al verse disminuida la microbiota bacteriana, se debilita la barrera ecológica intestinal, la cual evita que las bacterias patógenas colonicen, se instalen y produzcan cuadros diarreicos importantes; al romperse el equilibrio intestinal, los patógenos oportunistas aprovechan para ocasionar trastornos digestivos [4]. La resistencia bacteriana se genera, en la población existente, en el sistema digestivo tanto de animales como de humanos, por ser uno de los ecosistemas más grandes del cuerpo. La presión selectiva del antimicrobiano, favorece que las bacterias con mutaciones naturales persistan en su presencia, o que sean capaces de adquirir mecanismos de resistencia a través de elementos genéticos móviles presentes en el medio. Su condición de saprófitas, no representaría ningún problema, pero, en pacientes inmunodeprimidos, las infecciones oportunistas ocasionadas por estas bacterias resistentes son de difícil tratamiento [5]. En vista de que *Enterococcus* spp. es un habitante del tracto gastrointestinal, tanto de humanos como de animales, y que a través de las aguas negras no tratadas se elimina al ambiente, se decidió estudiar el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de uso clínico en humanos, en cepas aisladas de animales destinados al consumo, criados en el oriente del país.

Materiales y métodos

Población y muestra: El estudio prospectivo se realizó en haciendas y avícolas de los estados Anzoátegui y Monagas. Se muestrearon diferentes ganados (bovino, ovino, caprino y porcino) y aves de corral (pollos) bajo condiciones apropiadas de cuidado y mantenimiento y con personal calificado para tal fin. Durante los meses de abril y junio de 2009, a 78 ejemplares de ganado bovino, 66 de aves de corral, 10 de ganado caprino, 11 de ganado ovino y 15 ejemplares porcinos, se les realizó la toma de muestras mediante hisopados rectales. Las muestras fueron colocadas en medio de transporte Stuart para luego remitirlas al laboratorio. El muestreo fue, intencional no probabilístico.

Al inicio de la recolección de las muestras del ganado y las aves de corral fue aplicada una encuesta a los capataces de las haciendas y avícolas, quienes manifestaron no utilizar antimicrobianos en los animales sino en caso de presentarse algún proceso infeccioso.

Prueba de cribado de vancomicina: Las muestras fueron sembradas en agar *Enterococcus* (DIDACTA), en presencia y ausencia de $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de vancomicina e incubadas por 24-72 h a 35°C . A todas las colonias características de *Enterococcus* spp. se les realizó la coloración de Gram, la prueba de la catalasa y se guardaron a -80°C . *E. faecalis* V583 (genotipo *vanB*) fue la cepa utilizada como control positivo para el cribado de vancomicina.

Identificación molecular de la especie y genotipos de resistencia a glicopéptidos: Las colonias de *Enterococcus* spp. se identificaron a nivel de especie y se amplificaron las ligasas de resistencia mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [6]. Las cepas de control de calidad fueron *E. faecium* BM4147 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* (*vanC1*).

Determinación fenotípica del perfil de susceptibilidad: Los patrones de sensibilidad de *Enterococcus* se determinaron según las normas establecidas por el Manual M100-S19 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, CLSI [7]. Se probaron los discos de vancomicina, teicoplanina, gentamicina y estreptomina de alta carga, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, rifampicina y ampicilina. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por el método de dilución estandar del CLSI en agar Müeller-Hinton. Fueron utilizadas como controles las cepas de *E. faecalis* ATCC29212 (control negativo, sensible a vancomicina) y *E. faecium* BM4147 (control positivo de resistencia).

Análisis estadístico: Los resultados de esta investigación de tipo descriptivo se presentan en tablas y figura.

Resultados y discusión

Especies predominantes colonizantes: En este estudio, utilizando el agar *Enterococcus* enriquecido con $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de vancomicina se analizaron 180 hisopados rectales de animales de granja que no usaban técnicas de producción intensiva, para recuperar de forma selectiva las cepas de *Enterococcus* spp. presentes. El 82% del ganado ovino y el 97% de las aves de corral estaban colonizadas con *E. gallinarum* (Tabla 1). En total, 107 cepas fueron *vanC1* y 63 *vanC2*, no se detectaron cepas portadoras de operones *vanA*, *vanB* ni *vanD*. En Brasilia, Brasil, utilizando caldo enterococcosel suplementado con $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de vancomicina, incubados por 48 horas a 35°C , de 47 cepas animales, solo detectaron por PCR las cepas de enterococos móviles [8]. La mayoría de los estudios de vigilancia realizados con medios selectivos para enterococos resistentes a glicopéptidos

Tabla 1. Especies de *Enterococcus* spp. aisladas en el cribado de vancomicina de acuerdo al tipo de especie animal analizada. Estados Anzoátegui y Monagas, Venezuela. Abril y junio de 2009.

Especie	Bovino (%)	Ovino (%)	Caprino (%)	Porcino (%)	Aves de corral (%)
<i>E. gallinarum</i>	7 (9)	9 (82)	9 (90)	13 (87)	69 (97)
<i>E. casseliflavus</i>	59 (76)	—	1 (10)	2 (13)	1 (1.5)
<i>E. faecium</i>	—	—	—	—	1 (1.5)
NC	12 (15)	2 (18)	—	—	—
TC	66 (84)	9 (82)	10 (100)	15 (100)	71 (100)

NC: no colonizados. TC: total colonizados.

(ERG) aíslan especies intrínsecamente resistentes, es decir, cepas de enterococos móviles, como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* las cuales no revisten ninguna importancia clínica, a menos que adquieran mecanismos de resistencia como los fenotipos VanA o VanB.

Determinación fenotípica del perfil de susceptibilidad:

Se estudiaron los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de uso clínico humano para tratar infecciones graves causadas por *Enterococcus* spp., ya que la diseminación de bacterias resistentes o sus determinantes de resistencia ocurre a través de la cadena alimenticia [9]. El tratamiento de elección en pacientes con infecciones por *E. faecium* o *E. faecalis* es la terapia combinada de un antimicrobiano inhibidor de la pared conjuntamente con un inhibidor de la síntesis de proteínas. En la figura 1 se observan los antibiogramas de las cepas aisladas con altos niveles de resistencia (67%). Las cepas provenientes de ganado porcino y aves de corral fueron las que presentaron resistencia a varias familias de antimicrobianos (Tabla 2).

En este estudio se aislaron 189 cepas de enterococos, a partir de 180 muestras tomadas por hisopado rectal; se analizaron 171, eliminando los dobles. Se congelaron 142 enterococos obtenidos en el medio sin vancomicina ($6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 47 *Enterococcus* capaces de crecer en presencia de vancomicina,

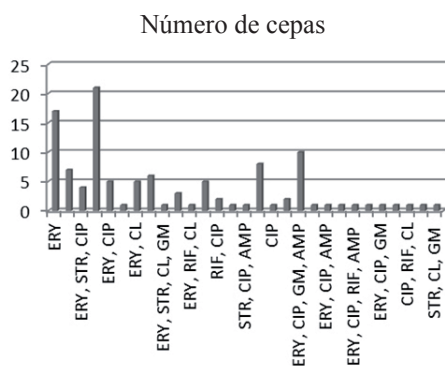


Figura 1. Antibiogramas de resistencia de las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de hisopados rectales. Estados Anzoátegui y Monagas, Venezuela. Abril y junio de 2009. AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina, CL: cloranfenicol, ERY: eritromicina, GM: gentamicina de alta carga. STR: estreptomicina de alta carga, RIF: rifampicina.

Tabla 2. Prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos, por el método de Kirby-Bauer, de las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de hisopados rectales, obtenidos de distintos animales destinados a consumo humano. Estados Anzoátegui y Monagas, Venezuela. Abril y junio de 2009.

Tipo de ganado	Cantidad de cepas bacterianas	Perfil de resistencia a antimicrobianos (%)						
		VA	TC	AMP	GEM	STR	CL	ERY
Bovino	66	7	—	—	—	—	—	1
Aves de corral	71	—	—	8	18	42	32	84
Caprino	10	—	—	—	—	10	—	10
Ovino	9	—	—	—	—	—	—	18
Porcino	15	—	—	27	—	47	7	40

VA: vancomicina, TC: teicoplanina, AMP: ampicilina, GEM: gentamicina de alta carga, STR: estreptomicina de alta carga, CL: cloranfenicol, ERY: eritromicina.

lo cual representa 26% de posibles enterococos resistentes a glicopéptidos. *E. faecalis* y *E. faecium* se encuentran tanto en heces humanas como animales, siendo, este último, el indicador más importante, por ser considerado el reservorio de genes de resistencia más significativo en las clases de antimicrobianos anti grampositivos usados como PCA y como agentes terapéuticos en humanos [10].

Las CMI de vancomicina de este estudio estuvieron distribuidas en un rango de 0.5 a $16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La CMI modal de las cepas estudiadas fue $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se obtuvo un solo genotipo (*vanC*) con dos subtipos (*vanC1* y *vanC2*) en el total de cepas aisladas. No se evidenció, en ninguna de las cepas, genotipos de alto riesgo epidemiológico como *vanA*, *vanB* ni *vanD*. En Venezuela no hay reportes de que se utilice avoparcina para la cría de animales. En Nueva Zelanda han reportado animales colonizados con cepas de ERG en ausencia de este antimicrobiano [11], lo cual sugiere que la presión selectiva del mismo no es prerequisite para el mantenimiento de ERG en la filial aviar.

Se ha demostrado que ERG aislados de la filial porcina pertenecen a una misma cepa que se disemina entre la población aviar y que los genes que codifican resistencia a glicopéptidos y macrólidos se encuentran en el mismo plásmido, sugiriendo, que la presencia de este tipo de cepas pudo haber sido mantenida por la coselección del uso del macrólido tilosina [12]. No obstante, en este estudio hay una alta tasa de resistencia a macrólidos (84%) en cepas aisladas de aves de corral (Tabla 2), lo cual pudiese generar una alarma para la aparición de cepas animales con resistencia a glicopéptidos, sugiriéndose la necesidad de estudios de vigilancia epidemiológica de la resistencia bacteriana en cepas de origen animal en Venezuela.

La industria porcina utiliza un estimado de más de 163 millones de dólares en antimicrobianos, tales como ampicilina, eritromicina, bacitracina, lincomicina, virginiamicina y tetraciclina. Todos están aprobados para su uso como PCA en Estados Unidos, excepto avoparcina, un glicopéptido ampliamente utilizado en Europa. Estos reportes concuerdan perfectamente con hallazgos de

bacterias resistentes en haciendas porcinas [13].

En este estudio las cepas aviares presentaron alto nivel de resistencia a ambos aminoglucósidos; el más afectado fue estreptomina (Tabla 2). En una investigación realizada en Argentina, se muestrearon 50 ejemplares de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aviares y caninos. Las cepas de enterococos fueron sensibles a la mayoría de los antimicrobianos probados; las provenientes de ejemplares porcinos y aviares fueron las que presentaron altos niveles de resistencia a tetraciclinas y macrólidos. En Argentina las cepas con alto nivel de resistencia a gentamicina no superan el 6% [14]. De los aislamientos de animales de granja, el 2% de las cepas fueron resistentes únicamente a estreptomina; las cepas de fuentes veterinarias, presentaron resistencia a estreptomina (7%) o a gentamicina (11%), pero no a ambos de forma simultánea, como fue el caso en las cepas provenientes de Anzoátegui y Monagas (Figura 1). La enzima bifuncional AAC(6')-APH(2''), crea alto nivel de resistencia a gentamicina [15]. Esta resistencia puede estar en plásmidos y ser transferida *in vivo* [16]. La resistencia a estreptomina puede ser debido a la presencia de la enzima ANT(6) o a mutaciones ribosómicas [17].

El uso de apramicina, higromicina y neomicina, todos aminoglucósidos, está aprobado por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) como PCA y en medicina veterinaria. En un estudio realizado en Detroit, Estados Unidos, se muestrearon por un período de 6 años, 36 ejemplares de ganado bovino, 18 de ganado porcino y 21 de aves de corral [18]. Las cepas de *E. faecalis* aisladas del ganado bovino, fueron resistentes a gentamicina (24%), así como las de ganado porcino (37%), pollos (32%) y pavos (29%). La resistencia bacteriana fue común entre los aislamientos de origen animal tanto de granjas que usan antimicrobianos, como en las que no usan, aunque en estas últimas, la tasa de resistencia era mucho menor [18]. Esto trae consecuencias en el tratamiento refractario antimicrobiano, ya que tanto los aminoglucósidos, como las quinolonas se utilizan en clínica humana.

Como se puede apreciar en el perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas de animales en haciendas y avícolas de los estados Anzoátegui y Monagas, las que presentaron altas tasas de resistencia fueron las recuperadas de aves de corral, seguidas por las de ganado porcino; animales alimentados con PCA para aumentar su eficiencia productiva. Es necesario tomar medidas para que este tipo de hábito alimenticio sea prohibido, en aras de eliminar la presión selectiva antibiótica en la vida del animal, la cual genera la aparición y selección de bacterias resistentes que luego pudieran ser transmitidas al humano a través de la cadena alimenticia.

Conclusión

La presencia de enterococos resistentes a antimicrobianos de uso clínico humano, en animales destinados a consumo humano, demostrada en este estudio, representa un peligro para la salud, por la posible transmisión al hombre a través

de la cadena alimentaria.

Agradecimientos

Al Prof. José Enrique Fendel[†] (exdirector del Instituto de Investigaciones Agropecuarias del Núcleo de Monagas de la UDO), por su colaboración incondicional para hacer los contactos con todas las haciendas y granjas avícolas para realizar el muestreo. Así mismo, a la Br. Sophy Nazaret (estudiante de biología del Núcleo de Sucre de la UDO), por su ayuda en la toma de muestras de los animales y al Sr. Orlando Gómez por su gentileza en conducirnos hasta cada uno de los sitios de destino. Y a todo el personal de las diferentes haciendas y granjas avícolas quienes estuvieron siempre dispuestos a traer los animales para su muestreo.

Referencias

1. Ngoune LT, Tanedjeu KS, Mbofung CMF. Impact de l'utilisation des antibiotiques sur la sensibilité des bactéries pathogènes de poules dans la ville de Ngaoundéré. Cameroon. J Exp Biol. 2009; 5:52-61.
2. Stoltz R. Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale: évaluation et maîtrise de ce danger. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. Université Claude-Bernard. Lyon. France; 2008.
3. Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents. 2000; 14:327-35.
4. Cerniglia CE, Kotarski S. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. J Vet Pharmacol Therap. 2005; 28:3-20.
5. Sanders P. L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. Bull Acad Vét France. 2005; 158:137-43.
6. Depardieu F, Périchon B, Courvalin P. Detection of *van* alfabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004; 42:5857-60.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Document M02-A10 and M07-A8. Pensilvania, USA; 2009.
8. Xavier DB, Moreno FE, Titze-de-Almeida. Absence of VanA- and VanB-containing enterococci in poultry raised on nonintensive production farms in Brazil. Appl Environ Microbiol. 2006; 72:3072-3.
9. Aarestrup F, Wegener H, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6:733-50.
10. Bywater R, McConville M, Phillips I, Shryock T. The susceptibility to growth-promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. J Antimicrob Chemother. 2005; 56:538-43.
11. Manson JM, Smith JMB, Cook MG. Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:5764-8.
12. Aarestrup F, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen

- L. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 37:127-37.
13. Aarestrup F, Kruse H, Tast E, Hammerum A, Jensen L. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microb Drug Resist.* 2000; 6:63-70.
 14. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2010; 42:49-52.
 15. Simjee S, Manzoor S, Fraise A, Gill M. Nature of transposon mediated high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolated in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45:565-75.
 16. Lim S-K, Tanimoto K, Tomita H, Ike Y. Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 6544-53.
 17. Bismuth R. Aminocyclitol et bactéries à Gram positif. In: Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. *Antibiogramme.* Paris, France: Editions ESKA; 2006. p. 205-25.
 18. Hershberger E, Oprea S, Donabedian S, Perri M, Bozigar P, Bartlett P, Zervos M. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55:127-30.