

## Especies, antibioresistencia y bandas plasmídicas en *Enterococcus* provenientes del Lago de Maracaibo, Venezuela

Ricardo Alonso Silva-Alvarado<sup>1</sup>, Marynes Montiel<sup>1</sup>,  
Jesús Alexander Núñez<sup>1</sup>, Zoraida Medina<sup>1</sup>, Lorena Atencio de G<sup>2</sup>,  
Jhoandry Rivera Salazar<sup>2</sup> y Velina Aranaga Natera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular,

Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia,

Maracaibo, Venezuela. ricar757@gmail.com; montielmarynes@gmail.com.

### Resumen

La resistencia a antibióticos en especies del género *Enterococcus* ha sido un tema de preocupación a nivel médico debido a los diferentes patrones de resistencia y la diseminación de cepas de este género, especialmente en *E. faecium* y *E. faecalis*, lo cual compromete el tratamiento de las infecciones causadas por los mismos. A nivel ambiental poco son los reportes relacionados con los patrones de resistencia y la presencia de bandas plasmídicas en cepas de *Enterococcus*. El presente estudio tuvo como objetivo identificar especies de *Enterococcus* aisladas del Sistema del Lago de Maracaibo y determinar los patrones de resistencia y la presencia de bandas plasmídicas. Se identificaron las especies de *Enterococcus* mediante pruebas bioquímicas convencionales, la determinación de resistencia a antibióticos se realizó por metodología clínica establecida y la extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo usando el protocolo reportado en la literatura. Se demostró la prevalencia de *E. faecalis* (65%) y *E. casseliflavus* (20%) mientras que *E. faecium*, *E. sanguinicola* y *Enterococcus* spp. se identificaron en un 5% de las muestras. Los valores más elevados de resistencia del género *Enterococcus* se presentaron a antibióticos suplementales tales como

rifampicina (58%) y eritromicina (23%). El 75% de las cepas de *Enterococcus* spp. presentaron entre 1 a 3 bandas plasmídicas, con tamaños entre 25,32kb y 14,52kb. El estudio demuestra que la especie con mayor prevalencia es microbiota propia del humano, indicando riesgo de contaminación fecal, así mismo expresa resistencia en ascenso en antibióticos de uso suplemental. La presencia de bandas plasmídicas constituye una amenaza relacionada a la transferencia horizontal de genes, los cuales pueden contribuir a una recirculación de los mismos entre los microorganismos presentes en el agua, los alimentos y los humanos.

**Palabras clave:** *Enterococcus*, contaminación fecal, resistencia a antibióticos, bandas plasmídicas, multiresistencia.

## Species, Antibiotic Resistance and Plasmid Band Detection in *Enterococcus* from Lake Maracaibo, Venezuela.

---

### Abstract

Antibiotic resistance in species of the *Enterococcus* genus has been a topic of concern among doctors due to different resistance patterns and the spread of strains from this genus, especially *E. faecium* and *E. faecalis*, which compromise treatment of the infections they cause. Environmental reports related to *Enterococcus* resistance patterns and plasmid band presences are limited. This study aimed to identify *Enterococcus* species isolated from the Lake Maracaibo system and determine resistance patterns and the presence of plasmid bands. *Enterococcus* species were identified by conventional biochemical tests; antibiotic sensitivity was determined by the disk diffusion technique; and plasmid DNA was extracted using protocol reported in the literature. The prevalence of *E. faecalis* (65%) and *E. casseliflavus* (20%) was demonstrated, while *E. faecium*, *E. sanguincola* and *Enterococcus* spp. were identified in 5% of the samples. *Enterococcus* presented higher resistance values to supplemental antibiotics such as rifampicin (58%) and erythromycin (23%). Seventy five percent of *Enterococcus* spp. strains presented between 1-3 plasmid bands, with sizes ranging from 25.32 to 14.52 kb. The study shows that the most prevalent species is characteristic of the human mi-

crobiota, indicating risk of fecal contamination as well as expressing increased resistance to supplemental antibiotics. The presence of plasmid bands constitutes a threat related to horizontal gene transfer, which can contribute to their recirculation among microorganisms present in the water, food and humans.

**Keywords:** *Enterococcus*, fecal contamination, antibiotic resistance, plasmid bands, multidrug resistance.

## Introducción

Los enterococos son habitantes naturales de la microbiota intestinal humana y de animales de sangre caliente, así como de otros ambientes naturales, tales como tierra, agua y alimentos (Facklam y Texeira 2002). A nivel taxonómico, estos microorganismos presentan más de veinte especies, las cuales se encuentran agrupadas en cinco grupos que van del I al V (Byappanahalli et al. 2012). Desde el punto de vista clínico, las especies aisladas con mayor frecuencia son *Enterococcus faecalis* (80-90%) y *Enterococcus faecium* (10-15%) (Togneri et al. 2005), presentándose otras especies tales como *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* (Murray et al. 2007).

En las últimas décadas, los avances científicos en relación a la patogenicidad de la infección enterocócica, han demostrado dos formas para adquirir un proceso infeccioso causado por *Enterococcus* spp: la vía endógena (a través de la microbiota natural del paciente) y la vía exógena (adquirido del ambiente); esta última es de gran importancia debido a la diseminación de clones multiresistentes (Ruiz-Garbajosa et al. 2006).

Las infecciones causadas por los enterococos, se encuentran entre las diez primeras infecciones intrahospitalarias y su emergencia se relaciona al empleo de antimicrobianos de amplio espectro, uso de técnicas terapéuticas invasivas, estancias hospitalarias prolongadas, adquisición de factores de virulencia y fácil diseminación en el ambiente intra y extrahospitalario (Sood et al. 2008).

Desde el punto de vista ambiental, los enterococos, se reportan como indicadores de contaminación fecal (Montiel et al. 2011, Silva et al. 2011) en ambientes acuáticos a los cuales pueden llegar a través de las descargas cloacales (Montiel et al. 2011, Sarcos y Botero 2005). La presencia de los enterococos en ambientes extraintestinales, tales

como el agua, alimentos y el aire pudiesen estar relacionados a la transmisión de estos microorganismos con producción de enfermedades y en especial con diseminación de patrones de resistencia a antibióticos (Baldini y Selzer 2008).

Particularmente, el Lago de Maracaibo presenta zonas destinadas a la recreación, siendo un derecho desde el punto de vista social; mientras que por otra parte se encuentran organismos acuáticos que son importantes desde el punto de vista ecológico y económico. Dentro de estos organismos acuáticos destinados al consumo humano está presente como habitante del estuario la almeja *Polymesoda solida* (Bivalvia, Corbiculidae), la cual se consume cruda o con poca cocción por sus habitantes y turistas, representando de esta forma un problema de salud pública (Montiel et al. 2009).

La emergencia de los enterococos como patógenos nosocomiales en las últimas décadas, es en muchos aspectos atribuible a su resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados y a su facilidad de mantener y transferir genes de resistencia, lo cual ha dado como resultado la aparición de enterococos con un nivel alto de resistencia a aminoglucósidos y resistencia a glucopéptidos (Marothi et al. 2005).

Los enterococos presentan plásmidos conjugativos con capacidad transferible a especies del mismo grupo o especies de otros grupos bacterianos, por lo que se pueden considerar microorganismos reservorios de genes codificadores de resistencia transferible, permitiendo agudizar el factor de virulencia entre las especies del mismo grupo o grupos distintos (Eaton y Gasson 2001), que bajo ciertas circunstancias ambientales y alimenticias conducen a una resistencia con recirculación (Baldini y Selzer 2008). Esto último de gran importancia, ya que los estudios evidencian la existencia de bandas plasmídicas en especies de procedencia clínica, no existiendo el reporte relacionado a la detección de las mismas en aquellas especies de origen ambiental.

Los patrones de resistencia entre *E. faecalis* y *E. faecium* son diferentes a nivel clínico (Silva et al. 2005) razón por la cual es importante distinguir los patógenos hasta el nivel de especie (Byappanahalli et al. 2012) y realizar las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos respectivos, lo cual pudiese ser relevante a fin de reconocer estos patrones circulantes a nivel ambiental.

Los objetivos del presente estudio fueron: identificar especies de *Enterococcus* en muestras de agua, sedimento y almejas procedentes del sistema del Lago de Maracaibo; detectar la sensibilidad antimicrobiana en antibióticos de uso rutinario, selectivo y suplemental en las especies previamente identificadas y detectar la existencia de bandas plasmídicas en todos los aislamientos de *Enterococcus* spp.

## **Materiales y métodos**

**Toma de muestras:** durante un periodo de doce meses, se recolectaron 90 muestras de agua, sedimento y almejas del Sistema del Lago de Maracaibo, particularmente de la zona de Curarire municipio la Cañada de Urdaneta estado Zulia, Venezuela. El agua se recolectó en frascos de vidrio estéril (1000 mL) a 30 cm de profundidad, las almejas y el sedimento en bolsas plásticas de cierre hermético (APHA 2005).

**Preparación de la muestra:** se extrajeron 25 g del contenido interno de las almejas y se homogeneizaron en una licuadora, a alta velocidad por 2 min, en 225 mL de agua peptonada al 0,1% (p/v), de igual forma se pesaron 25 g de sedimento y se adicionaron en 225 mL de agua peptonada (0,1%), homogeneizándose por agitación manual durante 2 minutos (APHA 2005).

**Aislamiento e identificación de enterococos:** las muestras se inocularon en caldo azida dextrosa (Himedia, India) y se incubaron durante 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 (APHA 2005). Las colonias típicas de enterococos, se sembraron en caldo Infusión Cerebro Corazón (Himedia, India) (CICC) para su posterior identificación a través de pruebas tales como: tinción diferencial de Gram, catalasa, termotolerancia a 45 °C, crecimiento a 6,5% NaCl, hidrólisis en agar bilis esculina, manitol, sorbitol, arginina, arabinosa, rafinosa, sucrosa, telurito (0,04%), motilidad y producción de pigmentos (Mac Faddin 2000, Murray et al. 2007).

**Pruebas de difusión en disco:** la susceptibilidad a los antibióticos estudiados se realizó según la técnica de difusión por disco (CLSI 2011) utilizando los siguientes antibióticos: ampicilina (AMP) (30 ug), penicilina (PEN) (10 unid), vancomicina (VAN) (30 ug), cloranfenicol (CHL) (30 ug), eritromicina (E) (15 ug), tetraciclina (TET) (30 ug), rifampicina (RIF)

(5 ug), ciprofloxacina (CIP) (5 ug), levofloxacina (LVX) (5 ug) y nitrofurantoina (NIT) (300 ug). Los halos de inhibición fueron comparados con los descritos para *Enterococcus* spp., según el CLSI 2011.

Detección de la producción de enzima  $\beta$ -lactamasa: se empleó el método de la cefalosporina cromogénica, la cual consistió en rotar sobre el halo de inhibición (penicilina-*Enterococcus* spp.) un bastoncillo impregnado con nitrocefina (marca OXOID) que previamente fue humedecido con agua destilada estéril. Luego de impregnar el bastoncillo, se espero 1 hora para observar el cambio de coloración (rojo) el cual es indicativo de una prueba positiva (Mac Faddin 2000).

Extracción y visualización del ADN plasmídico: para la extracción del ADN plasmídico de las cepas de *Enterococcus* spp., se siguió el protocolo propuesto por Macrina *et al.* (1980). La digestión de la pared celular se realizó con lisozima (0,5 mg/L, p/v), para una posterior lisis alcalina. Se digirió el ARN con 1  $\mu$ L de ARNsA (10 mg/mL) y el ADN se extrajo con una solución Cloroformo-Fenol-Alcohol isoamílico (CPI: 24:25:1) para ser precipitado con etanol frío al 100%, la separación y observación de las bandas plasmídicas se realizó según lo propuesto por Ausubel *et al.* (1997), en una cámara de electroforesis horizontal con un gel de agarosa 0,7% (100 V por 10 m seguido de 70 V por 1,5 h). Finalizada la corrida, el gel de agarosa se tiño con Bromuro de Etidio a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/mL (Maniatis *et al.* 1982). El ADN se visualizó en un transiluminador UVP Chromato-VUE modelo TM-36 de 115 voltios, 60 Hz y capacidad de 1.2 Amp. La corrida fue fotografiada con una cámara digital Kodak Easy Share 10X zoom.

Determinación del peso molecular de las bandas plasmídicas: los tamaños aproximados de las bandas plasmídicas se obtuvieron comparando sus migraciones en el gel de agarosa y así mismo contrastando con la migración de las bandas estándar del marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII (Promega). La determinación del peso molecular en (kb) se determinó con ayuda del programa Microsoft Excel (Windows), los cuales se basan en calcular el peso molecular mediante una regresión lineal (Uchechi y Erinma 2007).

## Resultados

Se aisló un total de 60 cepas de *Enterococcus* provenientes de la zona de Curarire del Sistema del Lago de Maracaibo y se identificaron cuatro especies de este género, siendo *E. faecalis* la de mayor prevalencia: en agua (50%), sedimento (55%) y almejas (90%), seguido de *E. casseliflavus*, en agua (20%), sedimento (30%) y en almejas (10%). *E. sanguinicola* y *E. faecium*, por su parte, estuvieron presentes únicamente en las muestras de agua (15% respectivamente) mientras que *Enterococcus spp.*, solo se encontró en la muestra de sedimento (15%) (Tabla 1).

Las cepas de *Enterococcus* mostraron resistencia a seis de los diez antibióticos evaluados presentándose la resistencia más elevada a la rifamicina (58%), seguido por la eritromicina (23%). El resto de los antibióticos expresó resistencia con valores iguales y por debajo del 10% (Tabla 2).

A nivel de especies, la resistencia presentó variabilidad, encontrándose cepas altamente resistentes a antibióticos de uso suplemental (Tabla 3).

El perfil de multiresistencia es considerado como una práctica común, sencilla y rápida, la cual es accesible para el estudio de diferentes cepas bacterianas, la misma puede indicar clonalidad siempre y cuando las cepas en estudios sean geográficamente cercanas o de la misma zona (Lopez-Pueyo et al. 2011). En este estudio de forma general la multiresistencia se manifestó en el 80% de las especies analizadas. En *E. casseliflavus* hubo resistencia en 5 de los 10 antibióticos estudiados, representando un 50% de multiresistencia en la totalidad; seguido a ello *E. faecalis* con 40% de multiresistencia, *E. faecium* (30%) y finalmente *E. sanguinicola* (20%) (Figura 1).

**Tabla 1.** Especies de *Enterococcus* aisladas en muestras de agua, sedimento y almejas (n=60).

Especie de <i>Enterococcus</i>	Agua %	Sedimento %	Muestra de almeja %
<i>E. faecalis</i>	50	55	90
<i>E. casseliflavus</i>	20	30	10
<i>E. sanguinicola</i>	15	0	0
<i>E. faecium</i>	15	0	0
<i>Enterococcus spp</i>	0	15	0

% = Porcentaje

**Tabla 2.** Resistencia, resistencia intermedia y sensibilidad a antibióticos en cepas de *Enterococcus*, aisladas de muestras de agua, sedimento y almejas del Lago de Maracaibo (n=60)

Antibiótico	R	I	S
Rifampicina (5 µg)	58	23	19
Eritromicina (15 µg)	23	52	25
Tetraciclina (30 µg)	10	2	88
Ampicilina (10 µg)	5	0	95
Ciprofloxacina (5 µg)	3	65	32
Vancomicina (30 µg)	2	5	93
Nitrofurantoina (300 µg)	0	0	100
Penicilina (10 µg)	0	0	100
Cloranfenicol (30 µg)	0	0	100
Levofloxacina (5 µg)	0	17	83

R= Resistencia; I = Intermedia, S= sensible, µg = Microgramos

**Tabla 3.** Sensibilidad, resistencia intermedia y resistencia a antibióticos en las especies de *Enterococcus* sp.

Especie/ Antibiótico	S (%)	I (%)	R (%)	Especie/ Antibiótico	S (%)	I (%)	R (%)
<i>E. faecalis</i>				<i>E. sanguinicola</i>			
Ampicilina	97	0	3	Ampicilina	100	0	0
Penicilina	100	0	0	Penicilina	100	0	0
Vancomicina	98	2	0	Vancomicina	100	0	0
Tetraciclina	87	0	13	Tetraciclina	100	0	0
Cloranfenicol	100	0	0	Cloranfenicol	100	0	0
Ciprofloxacina	28	72	0	Ciprofloxacina	33	67	0
Levofloxacina	87	13	0	Levofloxacina	67	33	0
Nitrofurantoina	100	0	0	Nitrofurantoina	100	0	0
Rifampicina	13	28	59	Rifampicina	0	33	67
Eritromicina	21	54	26	Eritromicina	67	0	33
<i>E. casseliflavus</i>				<i>E. faecium</i>			
Ampicilina	92	0	8	Ampicilina	67	0	33
Penicilina	100	0	0	Penicilina	100	0	0

Tabla 3 (Continuación)

Especie/ Antibiótico	S (%)	I (%)	R (%)	Especie/ Antibiótico	S (%)	I (%)	R (%)
Vancomicina	92	0	8	Vancomicina	100	0	0
Tetraciclina	100	0	0	Tetraciclina	67	33	0
Cloranfenicol	100	0	0	Cloranfenicol	100	0	0
Ciprofloxacina	42	50	8	Ciprofloxacina	0	67	33
Levofloxacina	83	17	0	Levofloxacina	33	67	0
Nitrofurantoína	100	0	0	Nitrofurantoína	100	0	0
Rifampicina	33	17	50	Rifampicina	0	0	100
Eritromicina	17	58	25	Eritromicina	67	33	0
<i>Enterococcus spp.</i>							
Ampicilina	100	0	0				
Penicilina	100	0	0				
Vancomicina	33	67	0				
Tetraciclina	100	0	0				
Cloranfenicol	100	0	0				
Ciprofloxacina	67	33	0				
Levofloxacina	100	0	0				
Nitrofurantoína	100	0	0				
Rifampicina	67	0	33				
Eritromicina	33	67	0				

S= sensibilidad; I= resistencia intermedia; R= resistencia; (%)= porcentaje.

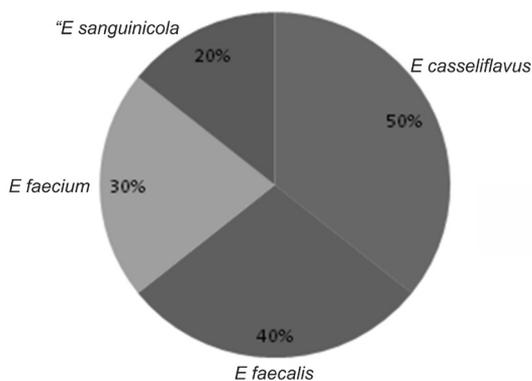


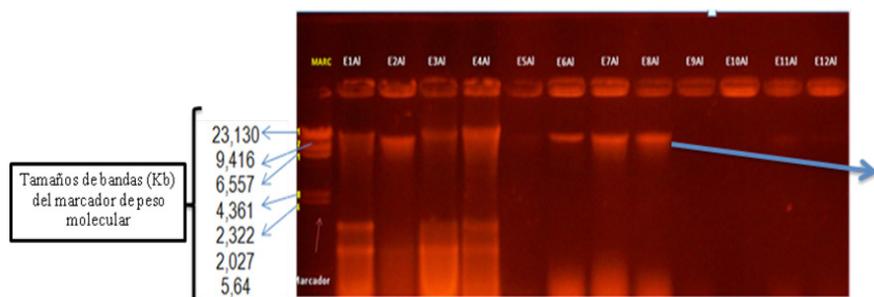
Figura 1. Porcentajes de multi-resistencia en las especies de *Enterococcus*.

En este estudio se hizo la prueba de producción de betalactamasas en 44 de 60 cepas, y de forma general los resultados fueron negativos, representando el 73,33% en la totalidad de las cepas analizadas.

Por otra parte, se evidenció la presencia de bandas plasmídicas en el 75% de los aislados (45/60), con tamaños que oscilan entre 25,32kb y 14,52kb (Tabla 5) (Figura 2).

**Tabla 5.** *Enterococcus* spp. aislados en las bandas plasmídicas

Número de bandas plasmídicas	Porcentaje
0	25%
1	53,33%
2	5%
3	16,66%



**Figura 2.** Bandas plasmídicas en cepas de *Enterococcus* aisladas de muestras de agua. Kb = kilobases.

## Discusión

El incremento en la resistencia a antibióticos en especies de *Enterococcus* a nivel mundial, ha llevado a la necesidad de entender este género no solo a nivel clínico sino también conocer su ecología, epidemiología y virulencia.

*E. faecalis* fue la especie aislada en mayor porcentaje en todas las muestras analizadas, Tabla 1, (65% en promedio). La distribución de las especies de *Enterococcus* varían a nivel mundial, siendo *E. faecalis* y *E. faecium* las especies más comúnmente aisladas, tanto en muestras clí-

nicas como ambientales en España y Reino Unido, mientras que Suiza presenta la incidencia más baja de *E. faecium* y la tasa de aislamiento más alta de *E. hirae* (Kuhn et al. 2005). Asimismo, estudios realizados en la Bahía Blanca en Argentina reportan a *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas en mayor porcentaje en muestras de agua con valores entre 18% y 48%, respectivamente (Baldini y Selzer 2008). En Venezuela, la presencia de *E. faecalis* y *E. equinus* ha sido reportada en muestras de agua y sedimentos de la zona de la Isla de Margarita en porcentajes del 2% al 10% del total de cepas aisladas (Castañeda et al. 2009).

El alto porcentaje de *E. faecalis* se relaciona probablemente con las altas descargas cloacales en la zona de estudio e indica riesgo de contaminación fecal, ya que el mismo forma parte de la microbiota propia del hombre y de animales de sangre caliente (Byappanahalli et al. 2012). Trabajos previos han reportado, a nivel cuantificable, *Enterococos Fecales* (EF) en distintos puntos del sistema del Lago de Maracaibo, los cuales se encuentran por encima de los valores permisibles en lugares destinados a la pesca y la recreación (Sarcos y Botero 2005, Montiel et al. 2009), sin embargo, no se ha descrito la prevalencia de especies existentes.

*E. casseliflavus* fue otra de las especies predominantes en las muestras estudiadas (20% en promedio) lo cual se ha relacionado a ambientes con concentraciones elevadas de cromo (metal tóxico relacionado a la metalurgia). En el sistema del Lago de Maracaibo se reportó cromo (Cr) atribuido a las descargas industriales y por la actividad petrolera (producción y transporte de crudo, procesamiento de gas y extracción de carbón) (Ávila et al. 2007), lo cual pudiera explicar la presencia de *E. casseliflavus* en estos ambientes. Por otra parte, es importante indicar, que esta especie ha sido aislada en raras ocasiones de ambientes hospitalarios y se ha relacionado con la posible transferencia horizontal de genes, permitiendo de esta manera agudizar el factor de resistencia a múltiples drogas (Salas-Vargas et al. 2004).

Por otra parte, *Enterococcus sanguinicola* aparece como una nueva especie de *Enterococcus* en base a estudios moleculares (ADN), con proteínas celulares e identificación ID 32 strep, lo cual ha permitido ubicarla en el grupo II de clasificación taxonómica, debido a sus características fenotípicas, sin embargo su papel patogénico y su presencia en el ambiente aún no está bien definido (Shewmaker et al. 2011). Sin embar-

go, en esta investigación se encontró esta especie en un 15%, sólo en las muestras de agua, considerando ésto como un nuevo hallazgo ya que la misma no se ha reportado en ambientes extrahospitalarios.

En el ámbito clínico, la segunda especie que se aísla con frecuencia corresponde a *E. faecium*, el cual se relaciona con infecciones complicadas del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis, infecciones pélvicas e intraabdominales, de heridas y tejidos blandos (Perozo *et al.* 2011); en este caso *E. faecium* se observó en muestras de agua en un 15%.

La Rifampicina y la Eritromicina en los enterococos son de uso suplemental, su resistencia esta mediada por mutaciones génicas (Velázquez *et al.* 2002) y metilaciones en su sitio blanco mediada por genes *erm* o los genes *msr A* (Cavallieri 2005), respectivamente. Las cepas de *Enterococcus* mostraron la más alta resistencia a los antibióticos Rifampicina (58%) y Eritromicina (23%). Este último antibiótico, es reflejo de la rápida emergencia de cepas resistentes sobre todo cuando se utiliza en monoterapia, por lo cual ha sido propuesto al igual que la Ciprofloxacina como antibiótico suplemental (Cavallieri 2005). Este mismo comportamiento se observa a nivel de las diferentes especies aisladas donde los valores de resistencia a la Rifampicina se encuentran entre 33% y 100%. En otro estudio realizado en ambientes clínicos en Chile, se determinó resistencia a Rifampicina en especies de *E. faecium* (92,2%), *E. gallinarum* (50%) y *E. faecalis* (80%) (Boletín ISP 2013). Velásquez *et al.* (2002), reportaron, en un laboratorio clínico de microbiología en Perú, resistencia a rifampicina en el 100% de las cepas de *Enterococcus* spp., aisladas y estudios realizados en el sistema del Lago de Maracaibo, han reportado 70% de resistencia al mismo en cepas de *Enterococcus* spp., aislados de muestras de agua, sedimento y almejas procedentes de la zona de Nazareth, municipio Mara del estado Zulia y un 92% de resistencia frente a este mismo antibiótico en *Enterococcus* spp., aislados de muestras de agua de la Ciénaga de los Olivitos, municipio Miranda del mismo estado (Silva *et al.* 2011), este último estudio presenta resultados similares a los encontrados en esta investigación, permitiendo establecer que estos microorganismos se consideran un riesgo relacionado a la recirculación entre alimentos de consumo y aguas destinadas a la recreación.

La resistencia intermedia a la eritromicina se determinó en el 52% de las cepas aisladas, con niveles entre 0% y 67% en las diferentes especies. Estos resultados son comparables con los de Silva *et al.* (2011)

donde reportó 55% de resistencia intermedia a la eritromicina en cepas de *Enterococcus* spp., aisladas de muestras ambientales.

A pesar de que el porcentaje de resistencia a ciprofloxacina fue de un 3%, el valor de resistencia intermedia a este antibiótico fue de un 65% oscilando en las diferentes especies entre un 30% y un 72%, siendo *E. faecalis* la que presentó el valor más elevado. Estudios previos en cepas de *Enterococcus* spp., aisladas de otros ambientes del Sistema de Maracaibo, reportaron un 60% de resistencia intermedia a la ciprofloxacina por lo que se puede estimar de que existe una recirculación entre estos espacios (Silva et al. 2011). Estudios realizados en Chile reportan valores similares en cepas de esta especie aisladas de agua servida en Antofagasta-Chile (Silva et al. 2005).

La tetraciclina, generalmente es otro de los antibióticos de uso suplemental para inhibir a los enterococos y básicamente, su mecanismo de acción reside en inhibir la síntesis de proteínas al unirse de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma y disminuir la penetración de la droga al interior de la bacteria (Cavallieri 2005, Perozo et al. 2011). En esta investigación, el 10% de las cepas de *Enterococcus* presentaron resistencia a la tetraciclina, siendo sólo las cepas de *E. faecalis* resistentes a este antibiótico. Otros estudios han reportado valores altos de resistencia (>50%) a tetraciclina en cepas de *Enterococcus* aisladas de muestras de heces, lo cual se ha relacionado con los antibióticos utilizados en explotaciones animales (Pantozzi et al. 2010).

La resistencia a la ampicilina en los enterococos reduce marcadamente las opciones terapéuticas de las infecciones. El 5% de los *Enterococcus* spp. aislados en este estudio resultó resistente a la ampicilina, presentando los valores más elevados *E. faecium* (con un 33%) y menores *E. casseliflavus* y *E. faecalis*, 8% y 3%, respectivamente. Existen por lo menos dos mecanismos de resistencia a la ampicilina en los enterococos, comunes en *E. faecium*, y se correlacionan con la disminución de la afinidad de las proteínas ligadoras para la ampicilina y la producción de  $\beta$ -lactamasas (Cavallieri 2005). Estos resultados son comparables con un estudio realizado en el sistema del Lago de Maracaibo, en el cual se reportó un 4% de resistencia a la ampicilina en la totalidad de las cepas de *Enterococcus* spp. analizadas (Silva et al. 2011). Sin embargo, Silva et al. (2005), en muestras de agua servida en la Ciudad de Antofagasta-

Chile, reportaron resistencias a *E. faecalis* (17%) y *E. faecium* (44%), superiores a las encontradas en este estudio.

La producción de  $\beta$ -lactamasas, considerado el segundo camino de resistencia a la ampicilina, fue negativa. Este resultado es similar al obtenido por Palavecino (2001), con *Enterococcus* clínicos aislados en la Universidad Católica de Chile, con cepas resistentes a ampicilina, pero sin producción de betalactamasas.

La vancomicina en los enterococos es un antibiótico de uso primario (CLSI 2011); en estos organismos su efecto es bacteriostático y actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular en proceso de división, por lo que afecta la síntesis del peptidoglicano en su segunda fase (Cavallieri 2005). En esta investigación, el 2% de las cepas de *Enterococcus* presentó resistencia a vancomicina, siendo la especie de *E. casseliflavus* la que registró un 8,33% de resistencia. La resistencia intermedia a vancomicina se detectó en *E. faecalis* y las cepas de *Enterococcus* spp. Estos resultados, son comparables a cepas de estos mismos microorganismos, aisladas de muestras de agua, sedimento y almejas provenientes de otras zonas del sistema del Lago de Maracaibo donde se reportó un 9% de resistencia intermedia a vancomicina con 3% de resistencia (Silva et al. 2011). A nivel clínico en Maracaibo, Venezuela, en cultivos de rutina realizado a pacientes, se reportó 48,81% de resistencia frente a este antibiótico (Perozo et al. 2011). Algunos investigadores, sostienen que la resistencia a la vancomicina, en países de Latinoamérica se ha convertido en un problema emergente, debido a que este agente antimicrobiano es de selección primaria (Díaz et al. 2010).

Los enterococos poseen una única y gran capacidad de intercambiar material genético entre sí mismos y con otros géneros, involucrando así la transferencia de genes de virulencia, de resistencia a metales pesados y de resistencia a los antimicrobianos de selección primaria y de uso suplemental (Novais et al. 2005).

La conjugación de plásmidos en los enterococos es la vía más eficiente en la transferencia horizontal de genes y es considerada una de las mayores razones del incremento de bacterias multiresistentes a antibióticos (Kurenbach et al. 2003). Terreros et al. (2010), evidenciaron bandas plasmídicas en cepas de *Enterococcus* mediante un kit comercial PCR multiplex y registraron bandas plasmídicas que oscilaron entre 475pb y 1091pb usando un marcador molecular Introgen-Brasil. Por su

parte, Clewell *et al.* (1974), diagnosticaron tres plásmidos en cepas de *E. faecalis* donde uno de ellos era portador de resistencia a eritromicina.

En nuestra investigación, no se relacionó la detección de bandas plasmídicas a la resistencia antimicrobiana encontrada. No obstante, se consideró un nuevo hallazgo, ya que los estudios en cepas de origen ambiental, no reportan la prevalencia de especies existentes ni la detección de bandas plasmídicas, por lo que se hace necesario realizar estudios abocados a la existencia de genes para determinar si estos pueden relacionarse de una forma más directa con la transferencia horizontal innata que presentan los enterococos.

## Conclusiones

Se evidenció la presencia de *E. faecalis* en el sistema del Lago de Maracaibo, como indicativo de contaminación fecal, sin embargo, se detectaron otras especies como *E. casseliflavus*, asociada a la alta concentración de cromo en los sistemas acuáticos, y *E. sanguicola*, especie recién descrita solo en ambientes clínicos, como un nuevo hallazgo en un ambiente extrahospitalario.

Se evidenció la resistencia a la vancomicina, como un problema de salud pública ya que la misma se ha reportado bajo vigilancia epidemiológica en las cepas procedentes de espacios clínicos.

La detección de bandas plasmídicas es un hallazgo de relevancia sobre todo en cepas procedentes del ambiente, ya que los enterococos se consideran dentro de los indicadores de contaminación fecal, un grupo bacteriano con buena capacidad de soportar condiciones inusuales en el ambiente, tales como, metales pesados y temperaturas moderadamente altas.

## Literatura citada

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Editorial. Washington. D.C. (U.S.A). 2005.
- AUSUBEL, F., R. BRENT, R. KINGSTONE, D. MOORE, J. SEIDMAN, J. SMITH. Y K. STRUHL. 1997. Short Protocols In Molecular Biology. Fifth Edition. A Compendium of Methods from Currents Protocols in Molecular Biology. Wiley Published by Jhon Wiley & Sons, Inc. Printed in the United States of America. 2/13-14.

- ÁVILA, H., A. SOTO, J. TORRES, M. ARAUJO, E. GUTIÉRREZ Y R. PÍRELA 2007. Metales pesados en la lenteja acuática (*Lemna* sp). de la Zona Costera del Lago de Maracaibo. Bol. Centro Invest Biol. 41(1): 114-122.
- BALDINI, M. Y P. SELZER. 2008. Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas. Revista Argentina de Microbiología. 40: 48-51.
- BOLETIN INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. 2013. Vigilancia de *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina Chile, 2010-2012. Boletín ISP. 3(10): 1-21.
- BYAPPANAHALLI, M., M. NEVERS, A. KORAJKIC, Z. STALEY Y V. HARWOOD. 2012. Enterococci in the environment. Microbiol Mol Biol Rev. 76(4): 685-706.
- CASTAÑEDA, Y., P. LÓPEZ, R. FIGUEROA Y J. FUENTES. 2009. Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la Isla de Margarita, Venezuela. Saber 21(1): 12-19.
- CAVALLIERI, J. 2005. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American society for Microbiology. Editorial Marie Coyle. 119-134.
- CLEWELL, D., Y. YAGI, G. DUNNY Y S. SCHULTZ. 1974. Characterization of Three Plasmid Deoxyribonucleic Acid Molecules in a Strain of *Streptococcus faecalis*: Identification of a Plasmid Determining Erythromycin Resistance. J Bacteriol. 117(1): 283-289.
- CLSI "Instituto Estándar de Clínica y Laboratorio". 2011. Cockerill, F. M. Wikler. K. Bush. Y M. Dudley. G. Eliopoulos. D. Hardy. D. Hecht. J. Hindler. J. Patel. M. Powell. R. Thomson. J. Turnidge. M. Weinstein. B. Zimmer. M. Ferraro. Y J. Swenson. JM. M100-S21. 31(1): 84-86. (9).
- DÍAZ, M., C. RODRÍGUEZ, Y R. ZHURBENKO. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Rev Cubana Hig. Epidemiol. 48 (2): 147-161.
- EATON, T. Y M. GASSON. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol. 67: 1628-35.
- FACKLAN, R. Y L. TEXEIRA. 2002. History, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. Washington. D.C. 1-54. 3.
- KÜHN, I., A. IVERSEN, M. FINN, C. GREKO, LG. BURMAN, AR. BLANCH, X. VILANOVA, A. MANERO, H. TAYLOR, J. CAPLIN, L. DOMINGUEZ, IA. HERRERO, MA. MORENO Y R. MÖLLBY. 2005. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. Appl Environ Microbiol. 71(9):5383-90.
- KURENBACH, B., C. BOHN, J. PRABHU, M. ABUDUKERIM, U. SZEZYK Y E. GROHMANN. 2003. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its tra region. Plasmid. 50(1): 86-93.

- LÓPEZ PUEYO, M. R. BARCENILLA-GAITE, R. AMAYA-VILLAR. Y J. Garnacho-Montero. 2011. Multirresistencia antibiótica en unidades de crítico. Med. Intensiva. 35(1): 41-53.
- MAC FADDIN J. 2000. Pruebas para la identificación bacteriana. Editores. Médica Panamericana S.A. Baltimore, Stated United of America. 39-40.
- MACRINA, F., P. WORD Y K. JONES. 1980. Simple method for demonstrating small plasmid deoxyribonucleic acid molecules in oral streptococci. Appl. Environ. Microbiol 39(5): 1070-1073.
- MANIATIS, T., E. FRITSCH Y J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd edition. Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1-545.
- MAROTHI, Y., H. AGNIHOTRI Y D. DUBEY. 2005. Enterococcal resistance: an overview. Indian J Med Microbiol. 23: 214-9.
- MONTIEL, M., R. SILVA, J. NUÑEZ, N. ESPINOZA Y F. MORALES. 2011. Indicadores bacterianos y materia inorgánica en la almeja *Rangia cuneata* y su relación con el agua y sedimento. Revista de la Universidad del Zulia 66-78.
- MONTIEL, M., Y. GARCÍA, H. SEVEREYN Y F. MORALES. 2009. Depuración bacteriana y física de la almeja *Polymesoda solida* a pequeña escala. Rev. Cient. 19(5): 533-538.
- MURRAY, P., K. ROSENTHAL Y M. PFALLER. 2007. Microbiología Médica Quinta Edición. Editorial. GEA. Versión Español Impreso en España Graficas Muriel, S.A. 259-264.
- PALAVECINO, E. 2001. Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. Rev. Chil. Infectol. 18:95-100.
- PANTOZZI, F., F. MOREDO, G. VIGO Y G. GIACOBONI. 2010. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. Rev. argent. Microbiol. 42(1): 49-52.
- PEROZO, A., M. CASTELLANO, M. GINESTRE. Y G. RINCÓN. 2011. Resistencia a vancomicina en cepas de *E. faecium* aisladas en un hospital universitario. Kasmera. 39(1): 7-17.
- NOVAIS, C., T. COQUE, H. FERREIRA, J. SOUSA, Y L. PEIXE. 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. Appl Environ Microbiol. 71: 3364-8.
- RUÍZ GARBAJOSA, P. BONTEN, M. ROBINSON, D. TOP, J. NALLAPAREDDY, S. Y TORRES, C. 2006. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. J. Clin Microbiol. 44: 2220-8.
- SALAS VARGAS, A., R. BOZA-CORDERO, W. BUSTAMANTE-GARCÍA, F. GARCÍA-SANTAMARÍA Y E. Barrantes-Valverde. 2004. Prevalencia e identificación genotípica de *Enterococos vancomicina* resistentes en pacientes en un medio hospitalario. Acta Méd. Costarric. 46(1): 19-26.

- SARCOS, M. Y BOTERO L. 2005. Calidad microbiológica de la almeja *Polymesoda sólida* recolectada en playas del municipio Miranda del estado Zulia. *Ciencia*. 13(1): 34-43.
- SHEWMAKER, P., A. STEIGERWALT, A. NICHOLSON, M. CARVALHO, R. FACKLAM, A. WHITNEY Y L. TEXEIRA. 2011. Reevaluation of the taxonomic status of recently described species of *Enterococcus*: Evidence that *E. thailandicus* is a senior subjective synonym of "*E. sanguinicola*" and confirmation of *E. cacciae* as a species distinct from *E. silesiacus*. *Journal of Clinical Microbiology* 49(7): 2676.
- SILVA, R., M. MONTIEL Y Z. MEDINA. 2011. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* aisladas de agua, sedimento y almejas. *Ciencia* 19(1): 17-24.
- SILVA, J., S. LOYOLA, J. GALLEGUILLOS, Y. RODRÍGUEZ, P. COLQUE, R. MÖLLBY Y I. KÜHN. 2005. Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev. méd. Chile*. 133:1201-1210.
- SOOD, S. MALTHOTRA, M. DAS, B. Y KAPIL, A. 2008. Enterococcal infection and antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*. 128: 111-21.
- TERREROS, M., M. GRIJALVA Y P. JIMÉNEZ. 2010. Implementación de un ensayo PCR Multiplex para detección de genes VanA, VanB y VanC relacionados con resistencia a Glucopéptidos en *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. *Revista CIENCIA*. 13(2): 141-150.
- TOGNERI, A. CORSO, A. GONZÁLEZ, J. LOPARDO, H. PODESTÁ, L. GAGETTI, P. PÉREZ, M. RODRÍGUEZ, V. RODRÍGUEZ, M. RÍOS, L. Y DINERSTEIN, E. 2005. Análisis clínico-epidemiológico de la portación intestinal de enterococos resistentes a vancomicina en una unidad de terapia intensiva. *Revista Argentina de Microbiología*. 37: 26-33.
- UCHECHI, N. Y K. ERINMA. 2007. Investigation of plasmid DNA and antibiotic resistance in some pathogenic organisms. *African Journal of Biotechnology*. 6(7): 877-880.
- VELÁSQUEZ, J., F. LIZARASO, N. ZETOLA, O. PAMNO, L. SÁNCHEZ, W. WONG Y R. HERNÁNDEZ. 2002. Vigilancia de la resistencia de *Enterococcus* sp., a la vigilancia y evaluación *in vitro* de nuevas alternativas terapéuticas. *Rev. Soc. Perú. Med. Interna* 15(2): 66-72.