

# Detección de *Enterococcus* resistentes a altos niveles de aminoglucósidos y resistentes a glucopéptidos en *Lactuca sativa* (lechuga)

Maria Cristina Ronconi, Luis Antonio Merino y Gustavo Fernández

Área de Bacteriología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Las Heras 727. Resistencia. Chaco. República Argentina.

**FUNDAMENTO.** El objetivo de este estudio fue estimar la presencia de enterococos con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y con resistencia a glucopéptidos, en los alimentos consumidos sin cocción previa, con el fin de evaluar su posible papel como reservorio de resistencia a antimicrobianos.

**MÉTODOS.** Se aislaron 92 cepas de enterococos a partir de 79 muestras de lechugas cultivadas y comercializadas en la ciudad de Corrientes (Argentina). Su identificación se realizó por los métodos convencionales. Se determinó su sensibilidad a antimicrobianos mediante su crecimiento en caldo azida dextrosa suplementado con 500 µg/ml de gentamicina y 2.000 µg/ml de estreptomicina y por la técnica de difusión con el uso de discos de alta carga de aminoglucósidos, vancomicina y teicoplanina, en agar Müller-Hinton.

**RESULTADOS.** La especie más frecuentemente aislada fue *Enterococcus faecium* (32,61%), seguida por *E. faecalis* (21,74%), *E. gallinarum* (13,04%), *E. casseliflavus* y *E. mundtii* (7,60%), *E. hirae*, (6,52%), *E. durans* (4,35%), *E. raffinossus* y *E. saccharolyticus* (2,17%), *E. avium* y *E. malodoratus* (1,10%). Se encontró alto nivel de resistencia a estreptomicina y gentamicina en 2 cepas de *E. faecium*. Se detectó resistencia sólo a estreptomicina en 2 cepas de *E. faecium*, en tres de *E. hirae* y en una de *E. mundtii*. No se aislaron cepas sólo resistentes a gentamicina. No se encontraron cepas con resistencia a glucopéptidos, excepto en las especies intrínsecamente resistentes (*E. gallinarum* y *E. casseliflavus*).

**CONCLUSIÓN.** Estos resultados confirman la presencia en la comunidad de cepas con perfiles de susceptibilidad propios de las cepas hospitalarias.

**Palabras clave:** *Enterococcus*. Aminoglucósidos. Glucopéptidos. Resistencia antimicrobiana.

Detection of *Enterococcus* with high-level aminoglycoside and glycopeptide resistance in *Lactuca sativa* (lettuce)

**BACKGROUND.** The aim of this study was to assess the presence of enterococci highly resistant to aminoglycosides and glycopeptides in foods eaten uncooked, in order to evaluate their role as reservoirs of antimicrobial resistance.

**METHODS.** We isolated 92 strains of enterococci from 79 samples of lettuce grown on farms near the city of Corrientes (Argentina). Enterococci were identified by standard methods. Antimicrobial susceptibility was determined by growth in azide dextrose broth supplemented with 500 µg/ml of gentamicin and 2,000 µg/ml of streptomycin, and by disk diffusion technique using disks with high levels of aminoglycosides, vancomycin and teicoplanin, in Müller Hinton agar.

**RESULTS.** The most frequently detected species was *E. faecium* (32.61%), followed by *E. faecalis* (21.74%), *E. gallinarum* (13.04%), *E. casseliflavus* and *E. mundtii* (7.60%), *E. hirae*, (6.52%), *E. durans* (4.35%), *E. raffinossus* and *E. saccharolyticus* (2.17%), *E. avium* and *E. malodoratus* (1.10%). High-level resistance to streptomycin and gentamicin was found in 2 strains of *E. Faecium*. Resistance to streptomycin alone was observed in 2 strains of *E. faecium*, in 3 of *E. hirae* and in 1 of *E. mundtii*. Resistance only to gentamicin was not observed in any strain. None of the isolates showed glycopeptide resistance, except the intrinsically resistant species (*E. gallinarum* and *E. casseliflavus*).

**CONCLUSION.** These results confirm the presence of enterococci within the community having susceptibility profiles similar to those of strains found in hospitals.

**Key words:** *Enterococcus*. Aminoglycosides. Glycopeptides. Antimicrobial resistance.

## Introducción

Desde el descubrimiento y el empleo de los antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, el número de bacterias resistentes ha aumentado de forma notable. La vigilancia de la resistencia bacteriana se ha realizado, en la mayoría de los casos, con microorganismos aislados de muestras clínicas; sin embargo, se deben

Correspondencia: Dra. M.ª C Ronconi.  
Juan B Justo, 130, 3º C.  
3500 Resistencia. Chaco. República Argentina.  
Correo electrónico: mronconi@bib.unne.edu.ar

Manuscrito recibido el 14-01-2002; aceptado el 13-05-2002.

estudiar las bacterias aisladas de muestras ambientales con el fin de conocer su posible papel como reservorio de genes codificadores de resistencia y su capacidad para transferirlas horizontalmente a los microorganismos patógenos humanos<sup>1</sup>.

Los genes que codifican la resistencia a los antibióticos se pueden encontrar en el cromosoma bacteriano y/o en plásmidos. Los plásmidos sin genes de resistencia son comunes en todas las especies bacterianas, mientras que la resistencia plasmídica resulta de la inserción de secuencias de ADN en un plásmido ya existente. La diseminación de la resistencia a los antibióticos puede realizarse de varias formas que incluyen la circulación de bacterias entre los seres humanos y los animales, la transferencia de plásmidos entre las bacterias y la transferencia de transposones<sup>2,3</sup>.

Estas evidencias sustentan la afirmación de que las bacterias aisladas del medio ambiente desempeñan un papel importante en la diseminación de la resistencia antimicrobiana.

Si bien la significación clínica de los enterococos puede ser discutida, y algunos aislados se consideran contaminantes, en los últimos años se ha observado un incremento notable de las infecciones en las que estos microorganismos se presentan como flora única. La especie aislada con más frecuencia ha sido *Enterococcus faecalis*, en el 80 a 90% de los casos, seguido de *E. faecium* entre el 5 y el 10%, y, por otras especies, con frecuencias más bajas.

Los enterococos, a diferencia de los estreptococos, son resistentes a la mayor parte de los agentes antimicrobianos, incluyendo numerosos betalactámicos, clindamicina y aminoglucósidos. Los agentes que son activos, como penicilina, ampicilina o vancomicina, no son bactericidas en la mayoría de las cepas<sup>4</sup>.

Para lograr una acción bactericida se propuso recurrir al efecto sinérgico de dos antimicrobianos, uno cuyo sitio de acción fuera la pared celular, como los betalactámicos o los glucopéptidos, y otro aminoglucósido como gentamicina o estreptomicina, que actuaría a nivel de los ribosomas impidiendo la síntesis proteica. Este esquema resultó efectivo hasta la década de 1970 cuando se empezaron a aislar las primeras cepas resistentes a altas concentraciones de aminoglucósidos (concentración inhibitoria mínima [CIM] > 500 µg/ml de gentamicina; > 2.000 µg/ml de estreptomicina), debido a la presencia de enzimas inactivantes de aminoglucósidos que anulan el sinergismo. La producción de estas enzimas modificadoras está codificada por plásmidos transmisibles, por lo cual es previsible un aumento en la incidencia de los enterococos refractarios al tratamiento con la asociación betalactámico/aminoglucósido<sup>5</sup>.

En Argentina, la frecuencia de cepas de *E. faecalis* resistentes a gentamicina aisladas de muestras clínicas entre los años 1991 y 1992 osciló entre el 20 y el 23,2%, mientras que la resistencia a estreptomicina varió entre el 24,6 y el 47,3%. En las cepas de *E. faecium* se hallaron valores entre el 12,5 y el 33,3% para gentamicina y entre el 12,5 y el 50% para estreptomicina<sup>6-8</sup>.

Un estudio realizado con cepas aisladas en distintos hospitales de las ciudades de Resistencia y Corrientes entre los años 1996 y 1998, reveló que el 28,7% de las cepas de *E. faecalis* presentaban resistencia a altas

concentraciones de gentamicina, el 28,7% a estreptomicina y el 37,6% a kanamicina, mientras que *E. faecium* demostró el 50, 40 y 60% de resistencia, respectivamente, a estos agentes<sup>9</sup>.

La vancomicina y la teicoplanina son glucopéptidos activos frente a la mayoría de los microorganismos grampositivos. Desde 1997, comenzaron a aislarse en Argentina enterococos resistentes a glucopéptidos como colonizantes del tracto intestinal de pacientes hospitalizados<sup>10</sup>.

Este trabajo tiene como objetivo aportar conocimientos acerca de la diseminación de cepas de enterococos con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y resistencia a glucopéptidos, entre muestras de vegetales de consumo sin cocción previa, lo que contribuiría a definir su posible papel como reservorio de resistencia a antimicrobianos.

## Material y métodos

Durante el período comprendido entre agosto de 2000 y agosto de 2001 se analizaron bacteriológicamente 79 muestras de *Lactuca sativa* (lechuga) cultivadas y comercializadas en la ciudad de Corrientes. Las muestras se procesaron como sigue: se colocaron 100 g de hojas del vegetal, cortadas en pequeños trozos, en un recipiente estéril con 90 ml de agua peptonada estéril; se homogeneizó con agitador Vortex durante 2 min, y se sembró 1 ml del producto en 3 tubos con caldo azida dextrosa (Difco), uno suplementado con 500 µg de gentamicina, otro con 2.000 µg de estreptomicina y un tercero sin antibióticos. Los tubos se incubaron 48 h a 35 °C. Los medios de cultivo suplementados con antibióticos se controlaron mediante el uso de las cepas: *E. faecalis* ATCC 29212 (sensible) y *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente)<sup>11</sup>.

Los cultivos positivos se sembraron en agar bilis esculina. Las colonias aisladas se identificaron por su morfología, tinción de Gram, ausencia de catalasa, prueba de la L-pirrolodonil-β-naftilamida, pigmento, movilidad, fermentación de lactosa, sorbitol, arabinosa, sacarosa, ribosa y rafinosa y la descarboxilación de L-arginina<sup>12</sup>.

Para confirmar la resistencia de la cepa frente a los antibióticos antes mencionados se realizó antibiograma utilizando el método de difusión en placa con discos de 120 µg de gentamicina, estreptomicina de 300 µg, amikacina de 120 µg, vancomicina de 30 µg y teicoplanina de 30 µg según normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>13</sup>. En este caso también se utilizaron las cepas de control antes mencionadas.

## Resultados

Se estudiaron 79 muestras de lechuga de las cuales 54 (42,66%) resultaron contaminadas con enterococos, y se obtuvieron en total 92 cepas (1,7 cepas promedio por muestra positiva). Del total de cepas, 84 cepas (91,3%) resultaron sensibles a los aminoglucósidos y se aislaron a partir del caldo no suplementado con antibióticos. No se encontraron cepas resistentes a glucopéptidos, excepto las intrínsecamente resistentes como *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*.

Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *E. faecium* (32,61%) y *E. faecalis* (21,74%). Otras especies halladas con menor frecuencia fueron: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, *E. avium* y *E. malodoratus* (tabla 1).

Se detectó resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en el 8,7% del total de las cepas estudiadas, que se

TABLA 1. Frecuencia de las especies de enterococos aisladas de muestras de vegetales en la ciudad de Corrientes (Argentina)

Microorganismo	Número de aislados	Porcentaje
<i>E. faecium</i>	30	32,61
<i>E. faecalis</i>	20	21,74
<i>E. gallinarum</i>	12	13,04
<i>E. casseliflavus</i>	7	7,60
<i>E. mundtii</i>	7	7,60
<i>E. hirae</i>	6	6,52
<i>E. durans</i>	4	4,35
<i>E. raffinosus</i>	2	2,17
<i>E. saccharolyticus</i>	2	2,17
<i>E. avium</i>	1	1,10
<i>E. malodoratus</i>	1	1,10
<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>100</b>

TABLA 2. Alto nivel de resistencia a estreptomicina y a gentamicina entre las cepas de enterococos aisladas a partir de vegetales en la ciudad de Corrientes (Argentina)

Antibiótico	Número de cepas resistentes (%)		
	<i>E. faecium</i> (n = 30)	<i>E. hirae</i> (n = 6)	<i>E. mundtii</i> (n = 7)
Estreptomicina	2 (6,6)	3 (50)	1 (14)
Gentamicina	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gentamicina y estreptomicina	2 (6,6)	0 (0)	0 (0)

aislaron a partir del caldo suplementado con antibióticos, incluyendo el 6,5% de las cepas con resistencia a estreptomicina y un 2,2% de cepas con resistencia a estreptomicina y gentamicina. No se aislaron cepas sólo resistentes a gentamicina. Los aislados resistentes correspondieron a las especies *E. faecium*, *E. hirae* y *E. mundtii* (tabla 2).

No se encontraron cepas de enterococos con resistencia a glucopéptidos, excepto las intrínsecamente resistentes como *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*.

## Discusión

Los microorganismos resistentes a antimicrobianos, así como los que forman parte de la flora normal de los animales, pueden ser transportados con los alimentos y colonizar el intestino humano, causando infecciones extraintestinales<sup>14</sup>. Además, una bacteria resistente a determinado antibiótico alojada en el intestino puede transferir sus genes de resistencia a otras bacterias<sup>15</sup>.

Los resultados obtenidos en los estudios realizados sobre los perfiles de resistencia de enterococos aislados a partir de alimentos derivados de ganado bovino, porcino y aves, revelan que éstos varían de acuerdo con la metodología y el lugar de realización de los mismos.

En España, se detectó el 27,2% de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en productos derivados de pollo, pero no en carne cocida de cerdo ni pavo<sup>16</sup>, de forma similar, en otro trabajo realizado en Italia la mayor prevalencia de ERV se aisló a partir de carne de pollo (76,5%) y el 30% de cepas resultaron ser resistentes a teicoplanina. En el mismo estudio se detectaron el 88,9% de cepas con alto nivel de resistencia a estreptomicina<sup>17</sup>.

En Alemania, Klein et al<sup>18</sup> aislaron 8,3% de cepas resistentes a vancomicina a partir de carne vacuna y porcina y la prevalencia de enterococos con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos resultó variable. En las cepas resistentes a vancomicina, la prevalencia fue del 34,2% a estreptomicina, mientras que en las cepas sensibles, los valores disminuyeron al 1%, y no se aislaron cepas resistentes a gentamicina<sup>17</sup>. En Francia, la prevalencia de ERV resultó ser significativamente alta, ya que se aislaron a partir de carne de cerdo y pollo en el 100% y el 60% de las muestras estudiadas, respectivamente<sup>19</sup>. En Holanda, Van Den Braak et al<sup>20</sup> aislaron ERV con una prevalencia del 79% en productos derivados de criaderos de pollos.

En Bélgica, Franz et al<sup>21</sup> en un estudio realizado con alimentos, en su mayoría quesos, detectaron el 4,4% de *E. faecium* resistentes a estreptomicina, el 2,1% a gentamicina y 2,1% a vancomicina, mientras que las cepas de *E. faecalis* resultaron ser más resistentes, el 46,8% a estreptomicina, el 25,5% a gentamicina y no se encontró resistencia a vancomicina<sup>21</sup>.

Nuestros resultados no coinciden con los encontrados en Europa, ya que la incidencia de cepas resistentes resultó menor. En Argentina no se encuentran disponibles antecedentes sobre perfiles de susceptibilidad antibiótica de microorganismos aislados de alimentos, a excepción de aquellos que son causa de infecciones gastrointestinales, por lo que no fue posible comparar nuestros datos.

En conclusión, la aparición de enterococos con alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos, en alimentos de consumo crudo, como es el caso de la lechuga, señalan la circulación dentro de la comunidad de cepas cuyo perfil de sensibilidad se creía circunscrito al ámbito hospitalario, y estos vegetales pueden ser el vehículo de transmisión de éstas a los individuos sanos. Consideramos que los hallazgos de este trabajo contribuyen al conocimiento de la ecología de estas bacterias y que su presencia en vegetales para el consumo crudo en humanos posibilitaría la diseminación de la resistencia a los antibióticos.

## Bibliografía

1. Información de APUA Alliance for the Prudent use of Antibiotics. Disponible en: <http://www.healthci.tutts.edu/apua/slayerschapter.htm>.
2. Datta N. Bacterial resistance to antibiotics. Cyba Found Symp 1984;102: 204-18.
3. Nikolic M, Hong G, Shoemaker N, Slayers A. Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. Appl Environ Microbiol 1994;60: 3255-60.
4. Del Valle Ortiz O, Gallés C, Codina G, Cano A. Enterococos: alto nivel de resistencia a aminoglucósidos. Enferm Infect Microbiol Clin 1989;7:535-41.
5. Saham DF, Gilmore MS. High-level gentamicin resistance among enterococci. Dev-Biol-Stand 1995;85:99-105.
6. Bantar C, Rojas A, Reloso S, Smayeuksy J, Bianchini H. Identificación de *Enterococcus spp.* en materiales clínicos. Incidencia de resistencia de alto nivel a aminoglucósidos. Infectol Microbiol Clin 1991;3:84-9.
7. Pedari SC, Gutierrez MA, Ribas C, Molinari GS, Santoiani JE. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* to twelve antibiotics, time kill assays, and high level aminoglycoside resistance in university hospital in Argentina. Rev Argent Microbiol 1999;2:67-7.
8. Sarachian B, Mikaelian L. Epidemiological distribution and susceptibility pattern of *Enterococcus spp.* 92.<sup>nd</sup> General Meeting of American Society for Mycrobiology. New Orleans, 1992.
9. Ronconi MC, Merino LA. Prevalencia de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en las ciudades de

- Resistencia y Corrientes. Rep. Arg. Enferm Infect Microbiol Clin 2000;18:71-3.
10. Ronconi MC, Usandizaga G, Yrigoyen B, Coleff M, Marques I, Redondo C. Factores de riesgo en la colonización de *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos en un hospital de adultos. Enferm Infect Microbiol Clin 2001;19:79.
11. Rossi A. Curso de Microbiología Clínica. Módulo 4. Antimicrobianos. Asociación Argentina de Microbiología y Colegio de Bioquímicos de Entre Ríos, 1996.
12. Facklam RR, Sham DF, Teixeira LM. *Enterococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover F, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology, 7.<sup>a</sup> ed. Washington: AMS Press, 1999;297-305.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test Tests, 6.<sup>a</sup> ed. NCCLS Documents M2-A6, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania; 1998.
14. Kluytmans J, Van Leeuwen W, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwald Bruining H, et al. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. J Clin Microbiol 1995;33:1121-8.
15. Teubers M, Perreten V, Wirsching G. Antibiotic resistant bacteria: A new dimension in food microbiology (in German). Institut für Lebensmittelwissenschaft, ETH -Zurich Lebensmittel- Technologie 1996;29:183-99.
16. Robledo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. Int J Food Microbiol 2000;3:197-204.
17. Pavía M, Nobile CG, Salpietro L, Angelillo IF. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. J Food Prot 2000;7:912-5.
18. Klein G, Pack A, Reuter G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. Appl Environ Microbiol 1998;5:1825-30.
19. Gambarotto K, Ploy MC, Dupron F, Giangiobbe M, Denis F. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. J Clin Microbiol 2001;39:2354-5.
20. Van Den Braak N, Van Belkum M, Van Keulen J, Vliegenthart H, Verbrugh A, Endtz HP. Molecular characterization of vancomycin resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands. J Clin Microbiol 1998;36:1927-32.
21. Franz CMAP, Muscholl-Silbehorn AB, Yousif NMK, Vancrenheit M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Appl Environ Microbiol 2001;67:4385-9.