



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DETECCIÓN DE ANTIBIOTIPOS DE CEPAS DE *Enterococcus* spp.,
PROVENIENTES DE LECHUGAS DE DIFERENTES ESPECIES Y DISTINTOS
LUGARES
(Modalidad: Tesis de Grado)

MARÍA FERNANDA BASTARDO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2018

**DETECCIÓN DE ANTIBIOTIPOS DE CEPAS DE *Enterococcus* spp.,
PROVENIENTES DE LECHUGAS DE DIFERENTES ESPECIES Y DISTINTOS
LUGARES**

APROBADO POR:

Dra. Lorena Abadía-Patiño
Asesora

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Muestras.....	7
Aislamiento y recuperación de <i>Enterococcus</i> spp., de lechugas de diferentes especies	7
Selección de cepas con morfología típica de enterococos y realización de pruebas convencionales para identificación de género	8
Pruebas convencionales	8
Producción de la enzima Catalasa.....	8
Crecimiento en presencia de NaCl al 6,5% a 45°C.....	8
Determinación de Motilidad	9
Producción de Pigmento	9
Identificación de las especies de <i>Enterococcus</i>	9
Pruebas bioquímicas para la identificación de especies.....	10
Detección de antibiótipos de cepas de <i>Enterococcus</i> spp., provenientes de lechugas a través de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	15
Concentración mínima inhibitoria	16
Análisis estadístico	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
HOJAS DE METADATOS	43

DEDICATORIA

A

Mi padre Antonio Bastardo (†) por siempre inculcarme el valor del estudio y el aprendizaje y por enseñarme que siempre hay que luchar por alcanzar las metas propuestas.

Mi madre Lorenza por siempre creer en mí, dándome su apoyo incondicional, su amor, paciencia y siempre respetar mis decisiones.

Mi hermana gemela María de los Ángeles, compañera de vida y de muchos momentos. Por su ayuda a lo largo de mi carrera y de esta tesis.

Mis hermanos y mis tíos por su apoyo e incentivo.

Mis compañeros del laboratorio Adny, Mariela, Dayana, Leonati, Oreana, Carlos y de forma muy especial Beatriz, Zuliannys y Francisco, gracias por su ayuda y por su apoyo y compañía a lo largo del camino.

Mis amigos de toda la carrera, Zomirca, Carlos, Louisiana y Andrea por todos esos momentos compartidos.

Mi mejor amigo de carrera y de vida David Senior, gracias por tu ayuda, compañía, tus consejos, tus regaños, tus chistes, por siempre darme aliento cuando quedo sin fuerzas. Simplemente gracias por estar ahí.

A Julio Prieto por su apoyo incondicional, por toda la paciencia que me ha tenido, por estar a mi lado a pesar de las dificultades, por ayudarme en todo, tratando de resolver las cosas de la mejor manera y por creer siempre en mí.

Demás familiares y conocidos que de alguna u otra forma me ayudaron a seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Dios Padre gracias por darme la fortaleza para seguir por el camino sin desfallecer a pesar de los obstáculos encontrados y que sin tu divina gracia no los hubiese vencido.

Mi asesora la Dra. Lorena Abadía-Patiño por aceptarme como su tesista, por brindarme todos sus conocimientos y por ayudarme en la realización de este trabajo. Gracias también por su amistad y buenos consejos.

El Instituto de Investigación en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO), por facilitarme sus instalaciones, sobre todo el Laboratorio de Resistencia Bacteriana.

Las profesoras Raquel Salazar y Patricia Velásquez de Biología Aplicada y al Licenciado José Luis Prin por ayudarme en la realización de uno de los objetivos de mi tesis.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP., SEGÚN EL TIPO DE LECHUGA ESTUDIADA.	18
TABLA 2. FRECUENCIA DE ESPECIES DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP., AISLADAS EN TODAS LAS LECHUGAS ESTUDIADAS.	20
TABLA 3. FRECUENCIA DE ESPECIES DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP., AISLADAS EN <i>LACTUCA SATIVA</i> VAR. <i>CAPITATA</i>	21
TABLA 4. FRECUENCIA DE ESPECIES DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP., AISLADAS EN <i>CICHORIUM INTYBUS</i> VAR. <i>FOLIOSUM</i>	22
TABLA 5. ANTIBIOTIPOS DE LAS CEPAS <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> AISLADAS DE DIFERENTES LECHUGAS EN CUMANÁ.	23
TABLA 6. ANTIBIOTIPOS DE LAS CEPAS DE <i>ENTEROCOCCUS CASSELI</i> VAR. <i>FLAVUS</i> AISLADAS DE DIFERENTES LECHUGAS EN CUMANÁ.	26
TABLA 7. ANTIBIOTIPOS DE LAS CEPAS <i>ENTEROCOCCUS GALLINARUM</i> AISLADAS DE DIFERENTES LECHUGAS EN CUMANÁ.	27
TABLA 8. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA ($\mu\text{g/L}^{-1}$) DE CEPAS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP., AISLADAS DE MUESTRAS DE LECHUGAS ESTUDIADAS.	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS CENTROS DE EXPENDIOS DE LECHUGAS ESTUDIADAS Y LA FRECUENCIA DE BACTERIAS AISLADAS.	19
FIGURA 2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS TIPOS DE LECHUGAS ESTUDIADOS Y LA FRECUENCIA DE BACTERIAS AISLADAS. BATAVIA: <i>LACTUCA SATIVA</i> L, ICEBERG: <i>LACTUCA SATIVA</i> VAR. <i>CAPITATA</i> , ROMANA: <i>LACTUCA SATIVA</i> VAR. <i>LONGIFOLIA</i> , ESCAROLA: <i>CICHORIUM INTYBUS</i> VAR. <i>FOLIOSUM</i> , ACHICORIA ROJA: <i>CICHORIUM</i> <i>ENDIVIA</i> VAR. <i>CRISPUM</i>	21

RESUMEN

Se evaluaron antibiotipos de cepas de *Enterococcus* spp., provenientes de lechugas de diferentes especies y distintos comercios de Cumaná, estado Sucre. De 52 lechugas adquiridas en centros de expendios de comida, se aislaron cepas de *Enterococcus* spp. (38%). Desde el punto de vista comercial, las lechugas de este estudio fueron Batavia, Iceberg, Achicoria roja, Escarola y Romana. Científicamente, las lechugas pertenecen a dos géneros, *Lactuca* y *Cichorium*. La variedad de lechuga más vendida en la ciudad de Cumaná fue *Lactuca sativa* L. pero la más contaminada por enterococos fue *Lactuca sativa* var. *capitata* (89%). Los sitios donde se compraron más lechugas fueron el Mercado Municipal y un Puesto Ambulante del centro de la ciudad. Solo dos sitios vendieron lechugas no contaminadas con enterococos. Se demostró la diseminación clonal de dos cepas de *E. faecalis* y una cepa de *E. faecium* por antibiotipificación, y estas cepas clonales fueron aisladas de lechugas compradas en el Mercado municipal, lo que hace suponer que la fuente de contaminación es la misma. Los antibiotipos de todas las especies de enterococos aisladas en este trabajo se realizaron mediante las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, con el fin de conocer si se trataban de la misma cepa o eran distintas. El perfil de susceptibilidad demostró que hay cepas resistentes a glicopéptidos, fluoroquinolonas, ansamicinas, macrólidos, fenicoles y tetraciclinas. Sin embargo la mayoría de las bacterias encontradas en estas lechugas presentaron resistencia a el antibiótico rifampicina, y susceptibilidad de intermedia a alta a ciprofloxacina. Estos resultados demuestran que la cadena alimenticia es una vía de diseminación de bacterias multirresistentes a la microbiota intestinal humana, convirtiendo el tracto gastrointestinal en un reservorio de bacterias intratables con los antibióticos disponibles.

INTRODUCCIÓN

Los enterococos son cocos Gram positivos, que se encuentran dispuestos aislados, en pares, o formando cadenas cortas. Ellos pertenecieron, clásicamente, a *Streptococcus* grupo D de Lancefield; sin embargo, a mediados de la década de 1980 fueron oficialmente clasificados como enterococos propiamente dicho. Son catalasa negativa, anaerobios facultativos, capaces de crecer en condiciones extremas. Entre las características bioquímicas sobresalientes se incluyen: habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y pH de 9,6. Tienen la capacidad de hidrolizar la esculina, crecer en presencia de 40% de bilis, sobrevivir 30 min. a 60°C e hidrolizar la L-pirrolidonil β -naftil-amida; esta habilidad ha sido usada como parte de una prueba rápida para detección de enterococos en el laboratorio, además, todas las especies producen leucina aminopeptidasa (LAP) (Koneman *et al.*, 2008).

Las especies de *Enterococcus* clínicamente importantes son: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. solitarius*, y *E. pseudoavium*. *E. faecalis* es el patógeno humano más frecuente, representa el 60 al 90% de los aislamientos clínicos. *E. faecium* es la segunda especie aislada con más frecuencia, representando de 5 a 16% de los aislamientos clínicos (Miller *et al.*, 2014).

Los enterococos forman parte de la microbiota intestinal del hombre y animales; pueden ser contaminante fecal de aguas residuales y eventualmente, aislarse en múltiples nichos ecológicos debido a su resistencia a los factores ambientales. Es responsable de una variedad de infecciones entre las que se citan, las del tracto urinario, heridas quirúrgicas, torrente sanguíneo, sistema nervioso central, endocarditis, intraabdominales, hepatobiliares, pélvicas y sepsis neonatal (Quiñones, 2010).

Desde el descubrimiento y empleo de los antimicrobianos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, el número de bacterias resistentes ha aumentado en forma notable. La vigilancia de la resistencia bacteriana se ha realizado, en la mayoría de los casos, con microorganismos aislados de muestras clínicas; no obstante, se debe estudiar a las bacterias aisladas de muestras ambientales a fin de conocer su posible papel como reservorio de genes codificadores de resistencia, y su capacidad para transferirlas horizontalmente a los microorganismos patógenos humanos (Ronconi *et al.*, 2002).

Enterococcus, a diferencia de *Streptococcus*, son resistentes a la mayor parte de los agentes antimicrobianos, los agentes activos como penicilina, ampicilina o vancomicina, no son bactericidas en la mayoría de las cepas. Para lograr una acción bactericida se propuso recurrir al efecto sinérgico de dos antimicrobianos. Este esquema resultó efectivo hasta el siglo pasado en la década del 70, cuando se empezaron a aislar las primeras cepas resistentes a altos niveles de aminoglucósidos (CIM > 500 µg·ml⁻¹ de gentamicina y 2 000 µg·ml⁻¹ de estreptomicina), debido a la presencia de enzimas modificadoras 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 enterococos refractarios al tratamiento con la asociación betalactámico/ aminoglucósido (Ronconi *et al.*, 2002).

Los agentes antimicrobianos que pueden ser usados en infecciones debidas a enterococos resistentes a múltiples drogas, son las estreptograminas (quinupristin/dalfopristin) o linezolide. Aunque quinupristin/dalfopristin pueden ser útiles para el tratamiento de infecciones debidas a *E. faecium*, no son activas contra *E. faecalis*. Linezolide tiene buena actividad contra *Enterococcus* vancomicino resistentes y permite la administración por vía oral (100% de

biodisponibilidad oral). Quinupristin/dalfopristin y linezolid son bacteriostáticos contra enterococos y ya fueron detectadas cepas resistentes para ambos antimicrobianos (Miller *et al.*, 2014).

Enterococcus vancomicino resistentes, a menudo son responsables de infecciones nosocomiales, tienden a ser aislados con frecuencia de alimentos de origen animal y vegetal. Su presencia en productos cárnicos podría estar asociada con el uso terapéutico de antimicrobianos en medicina veterinaria, o el uso de antibióticos en alimentación animal como promotores del crecimiento. Algunos autores también creen que el uso de agua o abono sin tratar en las tierras de cultivo, podría dar lugar a la propagación de la resistencia a las bacterias del suelo mediante transferencia horizontal (Torre *et al.*, 2010).

La resistencia a los agentes antimicrobianos puede surgir, ya sea desde mutaciones en el genoma bacteriano, o de adquisición de genes que codifican diversos mecanismos de resistencia. La resistencia se extiende verticalmente a través de la difusión clonal u horizontalmente entre diferentes aislados, especies, géneros y hasta reinos. La distribución de los genes de resistencia se facilita por la presencia de genes de resistencia en los elementos transferibles y el uso de antibióticos de manera que permita la selección directa. Existen, probablemente, diferentes vías de difusión de resistencia de las bacterias o sus genes de resistencia; la principal ruta es de los animales a los seres humanos a través de productos cárnicos. También, se utilizan en la agricultura grandes cantidades de antibióticos, lo que podría conducir a una selección de bacterias resistentes (Boehme, 2004).

Varios estudios han demostrado que las verduras cultivadas en países en vías de desarrollo pueden estar contaminadas con microorganismos patógenos, lo cual es muy probable cuando se utilizan aguas residuales en el riego. Otras fuentes de potencial riesgo para la salud son los abonos orgánicos,

especialmente los desperdicios de pollo, los métodos de transporte de productos a los mercados y la manipulación en los mercados y los puntos de consumo. A pesar de los riesgos asociados a la salud, la agricultura urbana y periurbana contribuyen significativamente a algunos de los objetivos de desarrollo del milenio, relacionados con la mitigación de la pobreza, la creación de empleo y la seguridad alimentaria (Amponsah *et al.*, 2010).

La inocuidad higiénica es un rasgo importante de la calidad, especialmente para las verduras que se consumen crudas que crecen cerca de la superficie del suelo. Debido a la posible contaminación con microorganismos patógenos en humanos, por el uso de estiércol de aves de corral, una práctica común no exclusiva de la agricultura ecológica, por lo tanto puede ser considerada como un riesgo para la salud. La supervivencia de estas bacterias en el suelo después de la aplicación de estiércol puede ascender hasta 100 días. La transferencia de patógenos puede ocurrir por efectos de salpicaduras causadas por las gotas de lluvia, riego por aspersión o por medio de transporte de las partículas del suelo en las cabezas de lechuga por escarda mecánica (Fischer, 2008).

El consumo de vegetales contaminados con microorganismos patógenos, sobre todo, en las zonas urbanas donde se utilizan aguas residuales para el riego de cultivos de hortalizas, se sospecha que es un factor en los brotes de algunas enfermedades de salud pública. La educación en el uso efectivo de métodos de descontaminación antes de comer, ayuda a reducir el riesgo asociado con el consumo de verduras contaminadas (Tiimub *et al.*, 2012).

Cuando la industria de comida quiere satisfacer las expectativas del consumidor, es probable que se incrementen los procesos para la producción de comidas preservadas. El uso de estas técnicas sencillas implica la suposición del siguiente aumento del riesgo microbiano. En algunas de las

comidas que se sirven en establecimientos públicos y privados se han detectado microorganismos, los cuales son transmitidos por los alimentos, debido a las incorrectas manipulaciones de procesamiento de alimentos o por la gestión de prácticas comunes en la agricultura (Soriano *et al.*, 2001; Aguirre *et al.*, 2007).

Debido a que la demanda de vegetales frescos ha aumentado en el mundo y que el consumo de comida rápida en puestos ambulantes es muy común por la actividad laboral, se han incrementado los problemas de salud asociados a la proliferación de microorganismos en alimentos lavados con procedimientos incapaces de reducir significativamente la carga microbiana, ocasionando problemas gastrointestinales (Cova, 2012).

Las comidas rápidas que se expenden en las calles, son potencialmente trasmisoras de enfermedades gastrointestinales, y de estos alimentos los más contaminados son los vegetales entre ellos la lechuga. En Argentina se hizo un estudio donde se demuestra que cepas de enterococos resistentes que se creían circunscriptas al ámbito hospitalario se encuentran en la comunidad, y que la lechuga puede ser el vehículo de transmisión de estas a los individuos sanos (Páez, 2009; Ronconi *et al.*, 2002).

La preocupación pública por la calidad y la inocuidad de los alimentos es cada vez mayor. Las características visuales de las verduras indican su frescura y se relaciona con su valor nutricional. La calidad nutricional incluye elementos beneficiosos para el consumidor, pero también existen elementos perjudiciales donde actúan elementos patógenos. En cuanto a la lechuga, la calidad comercial y nutricional depende en gran medida de la estrategia agronómica utilizada. La liberación rápida de nitrógeno (N) de los fertilizantes o un excedente de N puede conducir a un aumento en el contenido de nitrato en los tejidos de la planta, disminuyendo los beneficios de este vegetal (Sabine, 2005).

La realización de este trabajo tuvo como finalidad el estudio y comprensión acerca de la diseminación de cepas de enterococos con resistencia a diversos antibióticos, en muestras de lechugas, lo cual contribuyó a definir su posible papel como reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos. En los últimos años, se ha observado un incremento notable de las infecciones en las que estos microorganismos se presentan como microbiota única. Actualmente no se han realizado estudios donde a través de la antibiotipificación se determine la colonización de bacterias por la misma cepa, hoy en día se usan otras técnicas como es la reacción en cadena de la polimerasa o mejor conocida como PCR, sin embargo no deja de ser importante este trabajo donde se pretende detectar los antibiotipos que puedan estar presentes en cepas de *Enterococcus* spp., aisladas de muestras de lechugas de diferentes orígenes.

METODOLOGÍA

Muestras

Las muestras fueron 52 lechugas de diferentes especies las cuales se identificaron previamente como *Lactuca sativa* L. (Batavia), *Lactuca sativa* var. *longiofolia* (romana), *Lactuca sativa* var. *capitata* (icerberg), *Cichorium intybus* var. *foliosum* (achicoria roja) y *Cichorium endivia* var. *crispum* (escarola), fueron adquiridas en varios establecimientos comerciales de Cumaná (11 del Mercado Municipal, 16 del Puesto ambulante en frente del Parque Guaiquerí, seis de Nuevo Prica, cinco de Unicasa, cuatro de Francys, dos del Supermercado Mariño y ocho de Fashion Center), estado Sucre. El muestreo se realizó siguiendo la tabla de números aleatorios. En el Mercado Municipal se compraron cinco *Lactuca sativa* L, tres *Lactuca sativa* var. *longiofolia* y tres *Lactuca sativa* var. *capitata*; del Puesto Ambulante: 16 *Lactuca sativa* L., de Francys: dos *Lactuca sativa* var. *capitata* y dos *Cichorium intybus* var. *foliosum*, de Nuevo Prica: cuatro *Lactuca sativa* L. y dos *Lactuca sativa* var. *capitata*, de Supermercado Mariño: dos *Lactuca sativa* var. *capitata*, de Unicasa: tres *Lactuca sativa* var. *longiofolia* y dos *Cichorium endivia* var. *crispum*, de Fashion Center: tres *Cichorium intybus* var. *foliosum* y cinco *Cichorium endivia* var. *crispum*.

Aislamiento y recuperación de *Enterococcus* spp., de lechugas de diferentes especies

Se sembraron 10 g de hojas de lechugas de diferentes clases y orígenes en tubos con caldo infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) los cuales fueron previamente identificados; luego se procedió a incubar y agitar en baño de María a 35°C por 24 horas. Se tomó un inóculo de cada tubo y se sembraron en placas con agar *Enterococcus* Confirmatory (Biomark), luego fueron incubadas a 35°C por 24 horas con el fin de aislar cepas de *Enterococcus* (Ronconi et al., 2002).

Selección de cepas con morfología típica de enterococos y realización de pruebas convencionales para identificación de género

Una vez pasado el tiempo de incubación, se revisó si se obtuvo aislamiento en las placas de agar selectivo y se buscaron colonias con morfología típica para *Enterococcus* a las cuales se les hizo la prueba de la catalasa, y así verificar que no producen esta enzima. Las colonias seleccionadas en las placas fueron transferidas con palillo de madera a tubos de hemólisis con 1 mL de caldo BHI con 6,5 de NaCl y fueron colocadas en baño de María a 45°C por 24 horas para verificar la presencia *Enterococcus* (Koneman *et al.*, 2008).

Pruebas convencionales

Estas pruebas se realizaron de un cultivo puro crecido durante 24 horas, en agar infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en ingles).

Producción de la enzima Catalasa

Se basa en la capacidad del microorganismo para descomponer el peróxido de hidrogeno en agua y O₂. En una lámina portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 3%. Luego con palillo de madera estéril se tomó una pequeña cantidad de la colonia sospechosa de Enterococo y se colocó sobre la gota de agua oxigenada. En una reacción positiva se observa la presencia de burbujas. Para este género la prueba es negativa y permite diferenciarlo de *Streptococcus*.

Crecimiento en presencia de NaCl al 6,5% a 45°C

Mide la capacidad de las bacterias a desarrollarse en altas concentraciones de cloruro de sodio y a una temperatura de 45°C. Se rotularon los tubos de hemólisis que contenían 1 mL de caldo BHI con 6,5% de cloruro de sodio, luego se tomaron de 2 a 3 colonias del cultivo puro crecido durante 24 horas y se hizo una suspensión homogénea la cual se incubó a 45°C por 24 horas. La aparición

de turbidez en el caldo indica que la prueba es positiva. Esta prueba es positiva para este género.

Determinación de Motilidad

Determina si un microorganismo es móvil o inmóvil. Se realizó mediante preparaciones húmedas, se agregó una gota del líquido que contenía los microorganismos sobre un portaobjetos limpio, sobre el que se colocó un cubreobjetos, luego se llevó al microscopio y se observó en el objetivo de inmersión. Se utilizan para la investigación de caracteres de movilidad y morfología. En este género las especies móviles son *E. gallinarum* y *E. casseliflavus/flavescens*.

Producción de Pigmento

Algunas bacterias tienen la capacidad de producir pigmento, en el caso de enterococos producen un pigmento de color amarillo en agar BHI. Esta prueba se realizó observando el crecimiento de las colonias de enterococos aisladas en el agar BHI y sirve para identificar a *E. casseliflavus*.

Identificación de las especies de *Enterococcus*

Ya confirmada la presencia de cepas de *Enterococcus*, se identificaron las especies a través de la galería RAPID ID 32 STREP, dicha galería comprende un sistema de identificación en formato de tira que consta de 32 pruebas para estreptococos y bacterias similares a esta familia. A partir de un cultivo puro crecido en agar BHI se preparó una suspensión del microorganismo en agua estéril hasta una turbidez equivalente de un estándar 4 McFarland y 55 µL de la suspensión se colocaron en cada una de las cápsulas. La tira se incubó a 35°C y se hizo la lectura manualmente a las 4 horas mediante un libro de códigos.

Pruebas bioquímicas para la identificación de especies

Determinación de la enzima Arginina deshidrolasa

Se basa en la degradación de la glucosa por parte de la bacteria, lo cual hace que el pH disminuya, esa misma acidez induce a la descarboxilación del aminoácido arginina hasta amaginta que es luego hidrolizado a putrescina y urea, elevándose el pH y tornando el medio de color rojo para una reacción positiva. Se identifican a *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. hirae*.

Determinación de la enzima β -Glucosidasa

Determina la presencia o ausencia de la enzima β -glucosidasa la cual actúa sobre los enlaces β 1-4 que unen dos glucosas o moléculas con sustituyentes de glucosa. Una reacción positiva cambia el medio a rosa fluorescente o rojo-naranja. Con esta prueba se identifica a *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*.

Determinación de la enzima β -Glucoronidasa

Determina la presencia o ausencia de la enzima β -glucoronidasa que cataliza la hidrólisis de ácidos β -D-glucopiranosidúricos en sus correspondientes agliconas y ácido glucurónico. El medio se torna rosa fluorescente o rojo-naranja cuando la reacción es positiva, sin embargo para el género enterococos esta prueba es negativa. En un porcentaje muy pequeño da positiva para *E. gallinarum*.

Determinación de la enzima α -Galactosidasa

Determina la presencia o ausencia de la enzima α -galactosidasa que hidroliza los grupos α -galactosil, glicoproteínas y terminales de glicopéptidos. Cuando la prueba da positiva el medio se torna de color amarillo. Identifica principalmente a *E. saccharolyticus*, pero es variable para *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*.

Determinación de la enzima Fosfatasa Alcalina

Identificación diferencial entre los géneros *Streptococcus* y *Corineformes*. El medio cambia a color amarillo cuando la reacción es positiva. Esta prueba resulta negativa para el género enterococos.

Determinación del carbohidrato Ribosa

Determina la capacidad del microorganismo de utilizar este carbohidrato con la producción final de ácido. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Identifica a *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*.

Determinación del alcohol polihídrico Manitol

Determina la capacidad del microorganismo de utilizar este carbohidrato con la producción final de ácido. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Identifica a *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium* y *E. faecium*.

Determinación del alcohol polihídrico Sorbitol

Determina la capacidad del microorganismo de utilizar este carbohidrato con la producción final de ácido. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Sirve para identificar a *E. saccharolyticus* y es variable para *E. avium* y *E. faecalis*.

Determinación del carbohidrato Lactosa

Determina la capacidad del microorganismo de utilizar este carbohidrato con la producción final de ácido. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Identifica a *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. saccharolyticus*.

Determinación del carbohidrato Trehalosa

Determina la capacidad del microorganismo de utilizar este carbohidrato con la producción final de ácido. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Esta prueba permite identificar a *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. saccharolyticus*.

Determinación del carbohidrato Rafinosa

Determina la capacidad del microorganismo de utilizar este carbohidrato con la producción final de ácido. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Permite identificar a *E. casseliflavus*, *E. faecium* y *E. saccharolyticus*.

Determinación del carbohidrato Sacarosa

Determina la capacidad del microorganismo de utilizar este carbohidrato con la producción final de ácido. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Esta prueba identifica principalmente a *E. saccharolyticus* luego a *E. faecium*, *E. hirae* y *E. gallinarum*.

Utilización de L-arabinosa

Determina la capacidad de la bacteria de utilizar la arabinosa como fuente de carbono. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Identifica principalmente a *E. faecium*, pero también da positiva para *E. avium*, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

Utilización de D-arabitol

Determina la capacidad de la bacteria de utilizar el arabitol como fuente de carbono. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. Con esta prueba se determina a *E. saccharolyticus* y *E. avium*.

Utilización de Cyclodextrina

Determina la capacidad de la bacteria de utilizar la ciclodextrina como fuente de carbono. Una reacción positiva hace que el medio se torne amarillo-naranja. La prueba permite identificar a *E. faecalis*, *E. saccharolyticus*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. gallinarum*.

Alanil-fenilalanil-proline Arilamidasa

Cuando la prueba es positiva el medio se torna naranja y sirve para la identificación de *E. avium*.

Determinación de la enzima β -Galactosidasa

La enzima lactasa es capaz de hidrolizar la lactosa, dando glucosa y galactosa. El medio se torna color purpura cuando la reacción es positiva. Con esta prueba se identifica a *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. hirae*.

Hidrólisis de Ácido Pyroglutamico Arylamidasa

Detecta la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa que actúa sobre el sustrato pirrolidonil- β -naftilamida. El medio cambia a un color naranja cuando la prueba es positiva. Con esta prueba se identifican las especies de *E. faecium*, *E. hirae* principalmente, pero también ayuda a la determinación de *E. durans*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*.

Hidrólisis de N- Acetil-beta Glucosaminidasa

Para una prueba positiva el medio se torna de color purpura. Con esta prueba se identifica a *E. saccharolyticus*, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

Hidrólisis de Glicil-Triptófano Arilamidasa

El medio es de color naranja cuando la reacción es positiva. Identifica principalmente a *E. saccharolyticus* pero también a *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

Hidrólisis del hipurato

Determina la capacidad enzimática de un microorganismo para hidrolizar el hipurato de sodio (ácido hipúrico) a ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hipurato hidrolasa. Para una reacción positiva el medio se torna azul. Sirve para identificar a *E. gallinarum*.

Utilización de Glicógeno y Pullulane

Determina la capacidad de la bacteria de utilizar estos compuestos como fuente de carbono. Esta prueba da negativa para el género enterococos.

Utilización del carbohidrato Maltosa

Determina si el microorganismo utiliza la maltosa como única fuente de carbono. El medio cambia de un color rojo a amarillo cuando la prueba es positiva. Para todas las especies del género enterococos esta prueba da positiva.

Utilización de la enzima Melibiosa

Determina si el microorganismo utiliza la melibiosa como única fuente de carbono. El medio se torna de color amarillo cuando la reacción es positiva. Con esta prueba se identifica a *E. faecium*, *E. saccharolyticus*, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

Utilización de la enzima Melezitosa

Determina si el microorganismo utiliza la melezitosa como única fuente de carbono. El medio es de color naranja cuando la prueba es positiva y sirve para la identificación de *E. saccharolyticus* y *E. avium*.

Hidrólisis de Metil-B-D Glucopiranosido

Cuando la prueba es positiva el medio se torna naranja, y sirve para la identificación de la mayoría de las especies del género enterococos.

Determinación del carbohidrato Tagatosa

Determina si la bacteria es capaz de utilizar este carbohidrato como fuente de carbono con la producción final de ácido. El medio cambia a naranja cuando la reacción es positiva. Con la prueba se identifica a *E. avium* y *E. faecalis*.

Utilización de la enzima β - Manosidasa

Determina la presencia o la ausencia de la enzima β -manosidasa. El medio se torna de un color amarillo cuando la prueba es positiva. Sirve para identificar a *E. casseliflavus* y *E. durans*.

Hidrólisis de Urea

Determina la capacidad de la bacteria de producir la enzima ureasa, que desdobla la urea formando amoníaco. Esta prueba da negativa para el género *Enterococcus*.

Detección de antibiotipos de cepas de *Enterococcus* spp., provenientes de lechugas a través de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966). A partir de un cultivo puro crecido durante 18 horas en agar BHI, se preparó una suspensión bacteriana en 5 mL de solución salina fisiológica estéril al 0,85%. Se incubó la suspensión a 35 °C hasta la aparición de la turbidez, comparándose luego con un patrón de cloruro de bario equivalente al patrón 0,5 McFarland, el cual contenía aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC·mL⁻¹). En caso de mayor turbidez de la misma, con relación al patrón McFarland, la concentración se arregló añadiendo solución salina fisiológica (SSF) a la suspensión.

Una vez obtenido el inóculo bacteriano, se procedió a impregnar un hisopo estéril, en la suspensión, se roto varias veces y se presionó con firmeza sobre las paredes del tubo para quitar el exceso.

Se inoculó una placa de agar Müller-Hinton (MH), pasando el hisopo tres veces por toda la superficie del agar, asegurando una distribución uniforme del inóculo. Antes de los 15 minutos se colocaron los discos de antibióticos de vancomicina (30 µg), teicoplanina (30 µg), gentamicina y estreptomicina de alta carga (120 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), linezolid (30 µg), norfloxacina (10 µg), tigeciclina (15 µg), nitrofurantoina (300 µg), rifampicina (5 µg).

Se invirtieron las placas e incubaron a 37°C por 24 horas, luego, se procedió a realizar la lectura de las zonas de inhibición alrededor del disco, con la ayuda de una regla milimetrada. Las medidas de las zonas de inhibición se correlacionaron con las tablas interpretativas 2D publicadas en el manual M100-S26 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), las cuales suministran un correlativo interpretativo (sensible, intermedio y resistente) (CLSI, 2016).

La antibiotipificación se realizó mediante las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana antes descritas, con la finalidad de distinguir a través de su perfil de susceptibilidad si las colonias que fueron encontradas en las lechugas se trataban de la misma cepa de *Enterococcus* o era una cepa distinta.

Concentración mínima inhibitoria

Se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar MH. Cultivos bacterianos líquidos incluyendo el control negativo *S. aureus* ATCC 25923 y control positivo *E. faecalis* 77904 VanB, fueron preparados al igual que el inóculo 0,5 McFarland para luego realizar diluciones 1:10. Colocando 2 mL de los antibióticos a los que la bacteria fue resistente (ampicilina, vancomicina y ciprofloxacina) en cada placa de Petri y vertiendo 18

mL del medio. Las placas de agar que contenían diferentes concentraciones de antibiótico ($0,5 - 512 \mu\text{g/mL}^{-1}$), luego fueron inoculadas con $2 \mu\text{L}$ del cultivo de la cepa a estudiar con 10^{-7} UFC por depósito e incubadas por 24 horas a 35°C , comenzando por la placa de menor concentración, después de transcurrido este tiempo se procedió a realizar la lectura de cada placa, la CMI es la primera concentración donde no hay crecimiento visible. La presencia de 1 a 3 colonias no se tomó en cuenta (CLSI, 2016).

Análisis estadístico

Una vez comprobados los supuestos necesarios para los datos que se obtuvieron, se aplicó análisis de varianza (95,0%) a fin de obtener la posible existencia de diferencia en la frecuencia del grupo bacteriano entre los tipos de lechugas, almacenes comerciales y los tiempos de muestreo. Los resultados obtenidos fueron presentados en forma de tablas y figuras (Sokal, y Rohlf, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 52 lechugas, todas compradas en diversos establecimientos comerciales de la ciudad de Cumaná (Mercado municipal, Unicasa, Nuevo Prica, entre otros), resultando 20 muestras positivas para enterococos (38%), de las cuales, se obtuvo igual número de cepas de diferentes especies. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar en la tabla 1 que la mayor frecuencia de aislamiento de *Enterococcus* spp., se presentó en la lechuga *Lactuca sativa* var. *capitata* (89%; 8/9), seguida de *Cichorium intybus* var. *foliosum* (60%; 3/5). Las lechugas adquiridas en los establecimientos Unicasa y el Puesto Ambulante no estaban contaminadas con enterococos.

Tabla 1. Frecuencia de aislamientos de *Enterococcus* spp., según el tipo de lechuga estudiada.

Lechuga	Nº de muestras	Nº de cepas aisladas	Frecuencia (%)
<i>Lactuca sativa</i> L.	25	4	16
<i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>longifolia</i>	6	3	50
<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	9	8	89
<i>Cichorium intybus</i> var. <i>foliosum</i>	5	3	60
<i>Cichorium endivia</i> var. <i>crispum</i>	7	2	28

Nº: número, %: porcentaje

En un trabajo realizado en Corrientes, Argentina, en 79 muestras de *Lactuca sativa* se demostró la contaminación por cepas de enterococos (42%). Los autores no mencionan si tuvieron varias especies de lechugas; no obstante, las adquirieron de tres centros diferentes (Ronconi *et al.*, 2002). Como en esta investigación, se puede observar que la lechuga *Lactuca sativa* L. es la más predominante, sin embargo la que resultó más contaminada por enterococos fue *Lactuca sativa* var. *capitata* con 89% de frecuencia (Tabla 1), adquiridas en siete centros de expendios de comida, en Cumaná, estado Sucre.

Al aplicar la prueba ANOVA simple para comparar la cantidad de bacterias identificadas según el lugar de compra (Figura 1), si se determinaron diferencias significativas ($p < 0,05$), observándose el mayor promedio de bacterias en el Mercado Municipal y el mínimo promedio en el Puesto ambulante y Unicasa. La prueba *a posteriori* muestra la formación de dos grupos independientes, presentando un mayor promedio el grupo representado por el Mercado municipal.

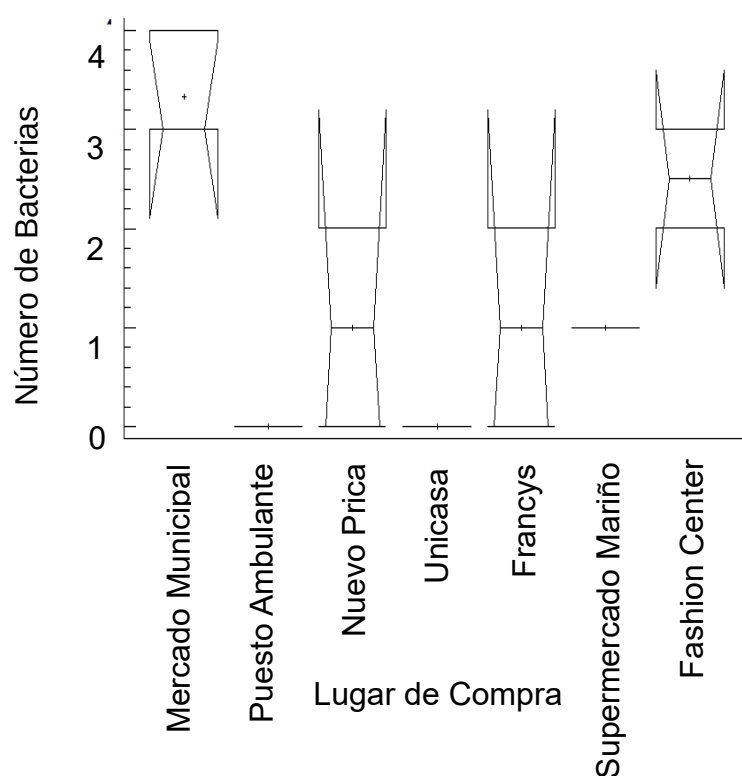


Figura 1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los centros de expendios de lechugas estudiadas y la frecuencia de bacterias aisladas.

No encontrar contaminación por enterococos en las lechugas compradas en Puesto ambulante y unicasa podría deberse a que provienen de sitios donde no utilizan aguas residuales para su riego, ni materia orgánica para su abono, pero también podría ser que los vendedores lavan bien las lechugas antes de

ponerlas en exhibición para su venta. Sin embargo, en el Mercado municipal y Fashion Center sucede lo contrario, las lechugas compradas en esos establecimientos, fueron las más contaminadas, pudieron haber adquirido esa contaminación en las tierras de cultivos, por los factores antes mencionados, pero también se pudo deber a las incorrectas técnicas de manipulación.

En los resultados expresados en la tabla 2 se demuestra que la especie de enterococos mayormente aislada en las muestras de lechugas fue *E. faecalis* (40%); las menos frecuentes fueron *E. gallinarum* (10%) y *E. avium* (5%).

La frecuencia de microorganismos en los vegetales, refleja la poca calidad sanitaria y las condiciones microbiológicas inadecuadas del producto crudo al momento de ser consumido (Jay, 1991). En Argentina, aislaron de muestras de lechugas 42% de cepas de *Enterococcus* y entre las especies más frecuentes se encontraron *E. faecium* y *E. faecalis* (Ronconi *et. al.*, 2002). Mientras que, en un estudio realizado en productos frescos cultivados al suroeste de Estados Unidos, de 185 cepas de *Enterococcus* spp., 52% fueron *E. faecium*, 21% *E. faecalis* y 27% de otras especies de *Enterococcus* (Johnston y Jaykus, 2004). Con respecto al presente trabajo *E. faecalis* fue siempre la especie predominante en estos alimentos.

Tabla 2. Frecuencia de especies de *Enterococcus* spp., aisladas en todas las lechugas estudiadas.

Especie	Nº de cepas aisladas	Frecuencia (%)
<i>E. faecalis</i>	8	40
<i>E. casseliflavus</i>	6	30
<i>E. gallinarum</i>	2	10
<i>E. faecium</i>	3	15
<i>E. avium</i>	1	5
Total	20	100

Nº: número, %: porcentaje

Tabla 3. Frecuencia de especies de *Enterococcus* spp., aisladas en *Lactuca sativa* var. *capitata*.

Especie	Nº de cepas aisladas	Frecuencia (%)
<i>E. casseliflavus</i>	6	75,0
<i>E. gallinarum</i>	1	12,5
<i>E. faecium</i>	1	12,5

Nº: número, %: porcentaje

Las especies de *Enterococcus* recuperadas en las muestras de lechugas *Lactuca sativa* L. fueron *E. faecalis* (75%) y *E. faecium* (25%). Con respecto a la lechuga *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* se aisló solamente, la especie *E. faecalis* (100%). En las lechugas *Lactuca sativa* var. *capitata* (tabla 3) la especie aislada con mayor frecuencia fue *E. casseliflavus* (75%).

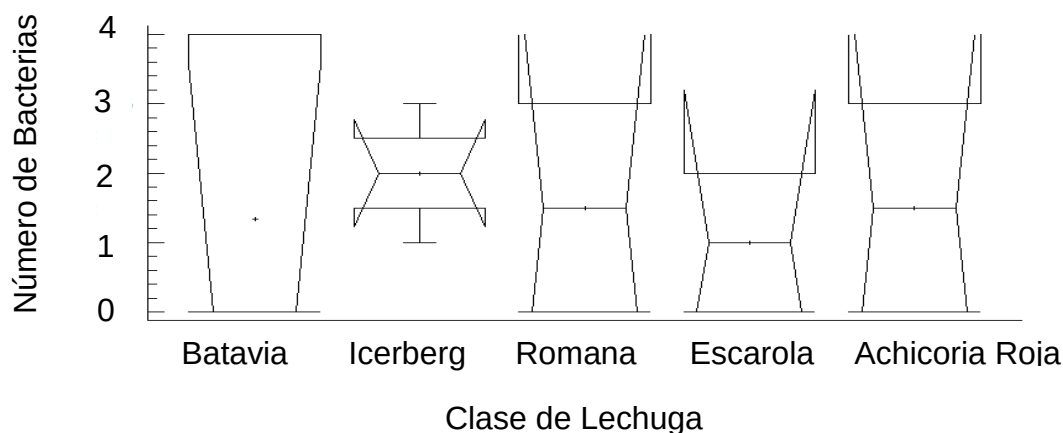


Figura 2. Análisis de Varianza (ANOVA) de los tipos de lechugas estudiados y la frecuencia de bacterias aisladas. Batavia: *Lactuca sativa* L, Iceberg: *Lactuca sativa* var. *capitata*, Romana: *Lactuca sativa* var. *longifolia*, Escarola: *Cichorium intybus* var. *foliosum*, Achicoria roja: *Cichorium endivia* var. *crispum*.

Al aplicar la prueba ANOVA simple para comparar la cantidad de bacterias identificadas según la clase de lechuga (Figura 2), no se determinaron

diferencias significativas ($p > 0,05$). Esto se debe a que la mayoría de los tipos de lechugas presentan promedios similares en cuanto a frecuencia de bacterias aisladas.

En la lechuga *Cichorium intybus* var. *foliosum* se aislaron tres especies en igual frecuencia (Tabla 4). En la lechuga *Cichorium endivia* var. *crispum* se aislaron dos especies, *E. faecalis* y *E. faecium* en igual porcentaje (50%).

La mayoría de las infecciones por *Enterococcus* en humanos están causadas por *E. faecalis*, sin embargo *E. faecium* es el responsable de las infecciones por cepas multirresistentes y es la especie causante de la mayoría de las muertes. Las infecciones producidas por otras especies de enterococos no son muy frecuentes y tampoco presentan problemas de multirresistencia (Cercenado, 2011). Los resultados de este estudio revelan que la mayoría de las lechugas están colonizadas con *E. faecalis* así como lo indican muchas publicaciones. Se aislaron tres cepas de *E. faecium* resistentes a todos los antibióticos probados.

Tabla 4. Frecuencia de especies de *Enterococcus* spp., aisladas en *Cichorium intybus* var. *foliosum*.

Especie	Nº de cepas aisladas	Frecuencia (%)
<i>E. gallinarum</i>	1	33,3
<i>E. faecalis</i>	1	33,3
<i>E. avium</i>	1	33,3

Nº: número, %: porcentaje

En la tabla número 5 se observa la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Enterococcus faecalis* donde se puede ver que todas las cepas son 100 % sensibles a nitrofurantoína. En dado caso, de que una persona adquiriera esta cepa a través de la cadena alimenticia y haga una infección urinaria por dicha cepa, es posible tratarla con nitrofurantoína.

Tabla 5. Antibiotipos de las cepas *Enterococcus faecalis* aisladas de diferentes lechugas en Cumaná.

ANTIBIÓTICOS											
N	AMP	VAN	TEC	CIP	NOR	LZD	ERY	TET	C	RIF	F/M
1	S	S	S	R	R	S	I	S	R	R	S
3	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S
1	S	S	S	I	I	S	I	S	S	R	S
2	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S

N: número de cepas, AMP: ampicilina, VAN: vancomicina, TEC: teicoplanina, CIP: ciprofloxacina, NOR: norfloxacina, LZD: linezolid, ERY: eritromicina, TET: tetraciclina, C: cloranfenicol, RIF: rifampicina, F/M: nitrofurantoina

Con respecto al perfil de susceptibilidad de las cepas de *E. faecium*, aisladas de productos frescos en Estados Unidos, presentaron alto nivel de resistencia a ciprofloxacina, tetraciclina y nitrofurantoina. En total, 91% de estas cepas fueron resistentes al menos a un antibiótico probado, así como 32% de las cepas de *E. faecalis*. Sin embargo, las cepas de *E. faecalis*, del mismo origen, tuvieron menor prevalencia de resistencia a los antibióticos clínicos humanos y a los de relevancia agrícola (Johnston y Jaykus, 2004). Estos datos reflejan el grave problema de transmisión de patógenos resistentes a los antibióticos a través de la cadena alimenticia.

Dentro de las infecciones más comunes causadas por el género *Enterococcus* se encuentran las bacteriemias y sepsis, en pacientes hospitalizados generalmente con condiciones subyacentes, y en los últimos años esto ha adquirido importancia porque en muchos estudios se han aislados estas cepas causantes de infecciones graves por este género a nivel clínico en muestras provenientes del ambiente. En un estudio realizado en España con 3 469 cepas de *Enterococcus* aisladas de sangre durante el período 2001-2006, la mayoría de las cepas reportadas fueron de *E. faecalis* (80%) y el porcentaje de

resistencia de esta bacteria para ampicilina fue 1%, muy similar a los resultados de este trabajo donde la mayoría de las cepas mostraron sensibilidad para este antibiótico (Cercenado, 2011).

Ronconi *et al.* (2002), reportaron 21% cepas de *E. faecalis* en lechugas; la mayoría de estas cepas eran resistentes a alto nivel a los aminoglucósidos. No encontraron cepas resistentes a glicopéptidos, al igual que en este estudio donde todas las cepas de *E. faecalis* son sensibles a estos antibióticos.

En Bélgica, en un estudio en alimentos realizado por Franz *et al.* (2001), encontraron que las cepas de *E. faecalis* no presentaron resistencia a vancomicina. Si se compara esto con los resultados aquí obtenidos, se observa que todas las cepas de *E. faecalis* presentaron sensibilidad tanto a vancomicina como a teicoplanina.

Encontrar cepas de *Enterococcus* spp., resistentes a glicopéptidos en el ambiente, es sugestivo del uso de estos antibióticos en la producción de animales y en la agricultura (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000). Esta, es la primera vez que se aíslan cepas de *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos en Venezuela fuera de los hospitales. En 2009, se hicieron muestreos de hisopados rectales en animales de granjas y avícolas de los estados Anzoátegui y Monagas y no se aislaron *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos, a excepción de las cepas de *Enterococcus* móviles, las cuales son intrínsecamente resistentes a vancomicina (Abadía-Patiño, 2013). La presencia de estas cepas de *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos en las lechugas, sería una forma de diseminar este tipo de resistencia, fuera de los hospitales en Venezuela.

El hecho de que la comida sea el vehículo para la transmisión de *Enterococcus* a los humanos, o sea reservorio para la transferencia horizontal de

determinantes de resistencia entre cepas ambientales y humanas, es un problema de salud pública, ya que esta especie sobrevive al pasar la barrera gástrica, se multiplica y coloniza el tracto intestinal, por largos períodos (Sørensen *et al.*, 2001). Pacientes con factores predisponentes pueden desarrollar infecciones por cepas colonizantes de su intestino, ya con mecanismos de resistencia a los antibióticos de uso clínico humano.

En Chile, aislaron *Enterococcus* con resistencia a antibióticos en aguas servidas, mostrando que la especie con mayor frecuencia fue *E. faecalis* (65%); ninguna presentó resistencia a vancomicina, muy parecido a este trabajo que todas las cepas de *E. faecalis* fueron sensibles a este antibiótico (Silva *et al.*, 2005).

En países como Argentina, Chile e incluso Venezuela, hay muy pocos estudios o antecedentes de susceptibilidad antibiótica de *Enterococcus* que se hayan realizado en cepas procedentes de alimentos, con excepción de aquellos que causan infecciones gastrointestinales; por tal motivo se hace muy difícil comparar estos resultados. Es necesaria una continua vigilancia para conocer si la transmisión de estas bacterias ocurre vía cadena alimenticia o se genera en el medio ambiente (Silva *et al.*, 2005).

Los pacientes inmunosuprimidos son aquellos que pueden desarrollar infecciones intrahospitalarias debido a cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, causando bacteriemias, endocarditis, septicemia o infección urinaria (Reid *et al.*, 2001). Lo peligroso de adquirir una infección por una de estas cepas aisladas en este trabajo, es que algunas son resistentes a los antibióticos de uso clínico humano, como es el caso de una cepa de *E. faecalis* resistente a eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol y rifampicina. Más preocupante es, que cepas de *E. casseliflavus* sean resistentes a fluoroquinolonas, linezolid y ampicilina. Esta cepa debe ser estudiada para determinar si es productora de penicilinasa, ya

que se observó una diferencia mayor de 5 mm cuando se colocó el disco de ampicilina-sulbactam, en comparación con el disco de ampicilina. Habitualmente, son cepas colonizantes e infrecuentes en infecciones humanas (Mazzulli *et al.*, 1992).

En la tabla 6, se muestra la susceptibilidad antimicrobiana de la especie *E. casseliflavus* presente en las muestras de lechugas de la especie *Lactuca sativa* var. *capitata*. Según estos resultados estas cepas son 100% sensibles a los antibióticos teicoplanina y nitrofurantoína, 100% resistentes a rifampicina y susceptibilidad intermedia a eritromicina.

Tabla 6. Antibiotipos de las cepas de *Enterococcus casseliflavus* aisladas de diferentes lechugas en Cumaná.

ANTIBIÓTICOS											
N	AMP	VAN	TEC	CIP	NOR	LZD	ERY	TET	C	RIF	F/M
1	S	S	S	S	S	S	I	I	I	R	S
1	S	S	S	I	I	S	I	S	S	R	S
1	R	I	S	R	R	R	I	S	S	R	S
1	S	S	S	I	I	S	I	S	S	R	S
1	S	I	S	I	I	S	I	S	S	R	S
1	S	S	S	I	S	R	I	S	I	R	S

N: número de cepas, AMP: ampicilina, VAN: vancomicina, TEC: teicoplanina, CIP: ciprofloxacina, NOR: norfloxacina, LZD: linezolid, ERY: eritromicina, TET: tetraciclina, C: cloranfenicol, RIF: rifampicina, F/M: nitrofurantoína

En un estudio realizado por Baldini (2008), en muestras de aguas estuarinas, se detectaron cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*, entre otras especies de *Enterococcus*, como *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. dispar* y *E. gallinarum*. La mayoría de las cepas presentaron resistencia de intermedia a alta a fluoroquinolonas, esto es delicado, ya que estas cepas tienen una posible participación como reservorio ambiental de genes de resistencia.

En la tabla 7, se muestra la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. gallinarum* recuperadas de las lechugas de las especies *Lactuca sativa* var. *capitata*, *Cichorium intybus* var. *foliosum* y *Cichorium endivia* var. *crispum* en la que se puede observar 100% de resistencia a rifampicina.

Tabla 7. Antibiotipos de las cepas *Enterococcus gallinarum* aisladas de diferentes lechugas en Cumaná.

ANTIBIÓTICOS											
N	AMP	VAN	TEC	CIP	NOR	LZD	ERY	TET	C	RIF	F/M
1	S	R	S	R	I	R	I	I	S	R	S
1	S	S	S	I	S	I	I	S	S	R	S
1	S	S	S	I	I	S	I	S	S	R	S

N: número de cepas, AMP: ampicilina, VAN: vancomicina, TEC: teicoplanina, CIP: ciprofloxacina, NOR: norfloxacina, LZD: linezolid, ERY: eritromicina, TET: tetraciclina, C: cloranfenicol, RIF: rifampicina, F/M: nitrofurantoina

En Venezuela no se han reportado cepas de *Enterococcus* spp., resistentes a rifampicina en infecciones humanas, alimentos, ni el ambiente. Este estudio demuestra que casi todas las cepas son resistentes a este antibiótico. En Estados Unidos, hay 66% de cepas de *E. faecium* resistentes a rifampicina y 68% en Europa, es más común de lo esperado (Deshpande *et al.*, 2007). Se sabe que la fuente de contaminación de determinantes de resistencia en el ambiente, viene del uso de los antibióticos (bacitracina, flavomicina, penicilina, salinomicina, tetraciclina, lincomicina y tilosina) para favorecer el crecimiento de los animales de consumo humano (Miller, 2000).

E. gallinarum y *E. casseliflavus* no son frecuentemente aislados en muestras clínicas, pero hay que saber que pueden causar enfermedad invasiva grave. La experiencia clínica con tales cepas ha sido limitada. Una revisión de la literatura revela que *E. gallinarum* o *E. casseliflavus/flavescens* pueden aislarse en una variedad de pacientes que padecen enfermedades crónicas o están inmunosuprimidos. Principalmente, se aíslan de casos de bacteriemia en pacientes con condiciones subyacentes, como insuficiencia renal, diabetes

mellitus, malignidad hematológica, trasplantados de órganos o de médula ósea entre otras afecciones (Reid *et al.*, 2001).

Enterococcus está involucrado principalmente en endocarditis, bacteriemia, sepsis e infecciones urinarias. Es muy raro aislarlo en otras infecciones. Sin embargo, hay escasos reportes de endoftalmitis por cepas de *E. casseliflavus*; hay un caso de un trabajador de una granja, luego de una patada de un caballo en la cara (Khurana *et al.*, 2009) otro reporte de endoftalmitis por un objeto metálico incrustado en el ojo de un herrero (Akar *et al.*, 2015), por último, a un niño de cuatro años le cayó agua de estanque en el ojo al estar jugando con una pistola de agua (Berenger *et al.*, 2015). Todos los pacientes anteriores perdieron la visión del ojo con endoftalmitis por *E. casseliflavus*, al ser tratados con antibióticos sistémicos; en este reporte de 2017, el tratamiento fue intravítreo y le salvaron la visión al paciente (Nguyen y ME Hartnett, 2017). Todos los casos fueron tratados con gentamicina, linezolid y ampicilina. En este trabajo se aisló una cepa de *E. casseliflavus* resistente a linezolid y ampicilina. En dado caso de que un agricultor se frote los ojos con las manos sucias de cultivar lechugas y con el agua de riego, puede desarrollar endoftalmitis si sufre un accidente laboral, con el riesgo de perder el ojo, ya que la bacteria es resistente al tratamiento de elección.

Se aislaron 3 cepas de *E. faecium* en este trabajo; cada una de lechugas diferentes (*Lactuca sativa* L., *Lactuca sativa* var. *Capitata*, *Chichorium endivia* var. *crispum*) resultando resistentes a alto nivel a todos los antibióticos probados, mientras que la única cepa de *E. avium* fue totalmente resistente a linezolid y rifampicina y sensibilidad intermedia a ciprofloxacina, eritromicina y cloranfenicol. Esto último se ve reflejado en un estudio en el que se analizaron bacterias del género *Enterococcus* aisladas de carne de distintos animales. Todas fueron resistentes a glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina), generalmente aquellas cepas aisladas de muestras de carne de pollo (Pavia *et al.*, 2000). En un estudio realizado por Schell *et al.*, en el año 2010 se aislaron

cepas de *E. faecium* (62%), *E. gallinarum* (12%) y *E. raffinossus* (25%) de alimentos de origen animal. La cepa de *E. faecium* resultó resistente a alto nivel a teicoplanina y vancomicina, similar a lo que ocurrió en este estudio en el que las tres cepas de *E. faecium* resultaron resistentes a alto nivel a glicopéptidos.

En este estudio no fue posible demostrar el perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas, a los aminoglucósidos, debido a la no disponibilidad de discos de alta carga a estos antibióticos en el país, sin embargo, es interesante resaltar que en muchas literaturas refieren la importancia que ha adquirido en los últimos tiempos *Enterococcus* con respecto al alto nivel de resistencia a aminoglucósidos, ya que son intrínsecamente resistentes a bajo nivel. Por ejemplo en el trabajo de Silva *et al.* (2005) detectaron cepas de *E. faecalis* (68%) y *E. faecium* (88%) resistentes a gentamicina y ambas especies 100% resistentes a estreptomicina, un hallazgo muy interesante ya que estas cepas fueron recuperadas de aguas servidas, de ahí la importancia del estudio de las bacterias ambientales.

Con respecto a la clonalidad de las cepas, se pudo observar que en la especie *E. faecalis* hay tres cepas clonales, dos provenientes de *Lactuca sativa* L. (9E5 y 9E8) y una de *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* (9E10), de tres lechugas diferentes, compradas en distintos puestos el mismo día en el Mercado Municipal. Luego se detectaron dos cepas más de *E. faecalis* (9E6 y 9E9), una de *Lactuca sativa* L. y de *Lactuca sativa* L. var. *longifolia*, también del Mercado Municipal del mismo día, pero con otro antibiotipo (Tabla 5). Con respecto a la especie *E. faecium*, se encontraron dos cepas clonales (9G8 y 11H8), aisladas en días diferentes, de dos lechugas (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* y *Lactuca sativa* L.). Vale resaltar, que las cepas clonales estuvieron solamente en las lechugas compradas en el Mercado Municipal, lo cual hace suponer, que la fuente es la misma, es decir, el proveedor de las lechugas a los vendedores del Mercado de Cumaná, estado Sucre.

Una vez consumidas estas cepas a través de la cadena alimenticia, son capaces de sobrevivir a la acidez estomacal y pasar al intestino para colonizarlo, convirtiéndose en reservorio humano de cepas potencialmente patógenas, resistentes a los antibióticos de uso clínico humano, para tratar infecciones graves. Esta colonización puede durar de varios meses a un año y cuando las condiciones estén dadas, autoinfectarse con cepas intestinales (Lai *et al.*, 1997), como son largas estadías hospitalarias, uso de cefalosporinas de tercera generación, hospitalizados en terapia intensiva, pacientes trasplantados, trastornos hematológicos (Edmond *et al.*, 1995).

Las especies del género *Enterococcus*, son importantes patógenos intrahospitalarios debido a la dificultad de tratamiento condicionada por su multirresistencia intrínseca y a la adquisición de nuevos genes de resistencia. Asimismo, a lo largo de los años han adquirido determinantes de resistencia a múltiples antibióticos, bien por la adquisición de genes de resistencia en plásmidos o en transposones, o por mutaciones espontáneas que aumentan el nivel de resistencia a algunos antibióticos. Su importancia clínica es mayor en el caso cepas resistentes a betalactámicos-aminoglucósidos y glicopéptidos-aminoglucósidos, por constituir el tratamiento de elección de las infecciones enterocóccicas graves (Cercenado, 2011).

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/l}^{-1}$) de cepas de *Enterococcus* spp., aisladas de muestras de lechugas estudiadas.

CMI	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
VAN	5	1	6	5	2	0	0	1	0
CIP	10	0	2	4	3	0	1	0	0
AMP	7	0	3	3	6	0	0	0	1

CMI: concentración mínima inhibitoria, VAN: vancomicina, CIP: ciprofloxacina, AMP: ampicilina

En este trabajo no se pudo realizar la CMI a todos los antibióticos a los que las

bacterias presentaron resistencia, debido a falta de presupuesto y a la dificultad de conseguir estos medicamentos en casas comerciales y farmacias del país por la situación de escases.

Las infecciones producidas por *Enterococcus* en su mayoría están causadas por *E. faecalis* (80%). No obstante, la especie *E. faecium* es la que con mayor frecuencia presenta porcentajes más altos de resistencia adquirida a varios antimicrobianos (multirresistencia). En las dos últimas décadas, *E. faecium* ha surgido como un importante patógeno intrahospitalario debido, principalmente, a la expansión del complejo clonal 17 (CC17), muy adaptado al medio hospitalario y que se disemina con mucha facilidad, a lo que se ha unido el aumento de su resistencia transferible a glicopéptidos y de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos (Cercenado, 2011).

En Korea, un estudio realizado por Choi *et al.* (2004) obtuvieron 13 891 hemocultivos positivos, de los cuales, 7% fueron *Enterococcus*, teniendo una incidencia de 3,26 casos de bacteriemia enterocócica por cada 1 000 admisiones. Las especies aisladas en este estudio fueron *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Por otra parte, encontraron que la resistencia a vancomicina fue más significativa en las cepas de *E. gallinarum* que en las de *E. casseliflavus*.

La CMI de ampicilina frente a *Enterococcus* oscila entre 1 y 16 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ y las CMI de ampicilina frente a aislados clínicos de *E. faecalis* son generalmente más bajas que aquellas frente a cepas de *E. faecium*. Los aislados clínicos de enterococo, principalmente de *E. faecium* y rara vez de *E. faecalis*, han desarrollado cada vez mayor resistencia a ampicilina. Este alto nivel de resistencia se asocia con una CMI de ampicilina de 256 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ o superior. En algunos hospitales, más de 90% de las cepas de *E. faecium* son resistentes a ampicilina (CMI $\geq 32 \mu\text{g/mL}^{-1}$). La resistencia de alto nivel a penicilinas se debe principalmente a la hiperproducción de PBP5 (Proteínas de Unión a Penicilinas), que tiene una baja afinidad natural por las penicilinas y capacidad para sustituir

las funciones de las PBP sensibles a los betalactámicos, pero también a mutaciones en el gen *pbp5* que implican una menor afinidad por las penicilinas. En este último caso, no hay hiperproducción de PBP5, pero las cepas presentan sustituciones de aminoácidos cerca del sitio activo de las PBP que son las responsables del aumento de la resistencia (Cercenado, 2011).

Los enterococos resistentes a los glicopéptidos se han diseminado ampliamente por el mundo; en algunos hospitales de Estados Unidos más de 60% de los aislados de *E. faecium* son resistentes a glicopéptidos. Por el contrario, en Europa es frecuente la presencia de enterococos resistentes a glicopéptidos en animales de granja, alimentos y aguas residuales, y como colonizadores en humanos sanos, pero es menos frecuente en pacientes hospitalizados, aunque variable según los países, lo que probablemente haya sido debido al amplio uso que se hizo del glicopéptido avoparcina como promotor del crecimiento en animales de granja, hoy en día prohibido en Europa (Cercenado, 2011).

Aunque la emergencia y diseminación de estas cepas en humanos se puede atribuir, en parte, al amplio uso de vancomicina en la práctica clínica y a la utilización de avoparcina en animales de granja, la variedad de genotipos y la variabilidad de las secuencias entre ellos sugiere que el proceso no se debió a la diseminación de un solo clon, por lo que es muy probable que los enterococos adquirieran estos genes de otros microorganismos. No obstante, es destacable el hecho de que las cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina y aisladas en el medio hospitalario pertenecen en su mayoría a la cepa CC17, que está diseminada mundialmente (Cercenado, 2011).

El National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) reporta los enterococos como la tercera causa de infecciones nosocomiales, mientras América Latina reporta la infección por enterococo en octavo lugar como causa de bacteriemia y, en cuarto lugar, como causa de infección urinaria y heridas quirúrgicas. La

incidencia de bacteriemias nosocomiales, debida a enterococos se está incrementando, siendo más frecuente en pacientes hospitalizados por períodos prolongados. *Enterococcus* constituye el tercer patógeno más frecuente como causa de endocarditis, responsable de 5 a 20% de los casos de endocarditis, principalmente, en válvulas nativas (Ortega, 2010).

El foco primario nosocomial de la infección por enterococo generalmente no se encuentra, pero con frecuencia está involucrado el tracto genitourinario. Los pacientes con enfermedad valvular presentan mayor riesgo de padecer endocarditis por enterococo que la población sana. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad endocárdica por esta causa no difiere de las producidas por otros microorganismos como son: fiebre, taquicardia, presencia de soplo o modificación de uno ya existente, astenia, anorexia, sudoraciones, dolor torácico, disnea, edemas, manifestaciones de insuficiencia cardíaca, entre otros (Ortega 2010).

El tratamiento de infecciones sistémicas por enterococos es principalmente un inhibidor de pared unido con un aminoglucósido, sin embargo, debido a su abuso a nivel mundial, existen cepas con altos niveles de resistencia, razón por la cual, otras opciones terapéuticas han sido implementadas como el uso de tetraciclinas o cloranfenicol (Girón-González y Pérez-Cano, 2003). Vemos ya que en este trabajo se han aislado cepas con resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas y fenicoles, reduciendo el espectro de opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones graves por enterococos.

A pesar de que *Enterococcus* spp. puede ser un patógeno oportunista, se está estudiando como posible método potencial para controlar poblaciones endógenas microbianas de semillas de lechugas, para así evitar la contaminación de patógenos para obtener productos seguros. El objetivo es producir bacteriocinas de la cepa *E. hirae* Eh9 para eliminar el crecimiento de

cepas de *E. coli* O157:H7 (Goñi *et al.*, 2016), las cuales crean brotes alimentarios importantes.

Esta no es la primera vez que se usan bacteriocinas, ya se había empleado la bacteriocina producida por bacterias ácido lácticas (Audisio *et al.*, 2005). Está demostrado que esas bacteriocinas tienen amplio rango de acción sobre varias bacterias productoras de infecciones alimentarias (Ibarguren *et al.*, 2010). Los métodos más usados para disminuir la carga bacteriana de las semillas de los vegetales y frutas son: agua con hipoclorito de sodio (Beuchat *et al.*, 1998), ozono (Wade, *et al.*, 2003), agua clorada (Winthrop *et al.*, 2003) y radiaciones ionizantes (Saroj *et al.*, 2006).

Estos métodos son excelentes para disminuir no solo la carga bacteriana de *E. coli* sino además de *Enterococcus* spp., en los vegetales de consumo humano. Pero no basta con eliminarlos de los productos crudos, sino también hay que hacerlo del agua de riego, ya que es la fuente principal de diseminación de cepas de *Enterococcus*. Estos investigadores demostraron que el uso de luz ultravioleta (30 mW/s/cm²) sobre efluentes de agua para riego, eliminaron los coliformes fecales y *Enterococcus*, convirtiendo las aguas, aptas para el riego, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (Beltrán y Jiménez 2008).

Vale resaltar, que la eficiencia de inactivación de la luz ultravioleta sobre los efluentes, depende de varios factores, como la transmitancia, el contenido total de sólidos suspendidos, así como la distribución y tamaño de las partículas presentes en el efluente. Normalmente, las partículas reflejan o absorben luz ultravioleta, disminuyendo su efecto sobre los microorganismos. Además, la eficiencia de la luz ultravioleta disminuye en efluentes con contenido total de sólidos suspendidos > 30 mg/L, transmitancia < 60% y la presencia de

partículas > 40 μm , por lo tanto, el tiempo de exposición, variará según el efluente a tratar (Madge y Jensen 2006).

Los resultados obtenidos en esta investigación son de gran importancia para la salud pública, debido a que se encontraron cepas con altos porcentajes de resistencia provenientes de lechugas, un alimento bastante consumido por la población. Además las lechugas donde se aislaron más enterococos, fueron las compradas el Mercado Municipal, que es el lugar más visitado por las personas para realizar la compra de sus alimentos debido a la variedad de productos, precios más asequibles y frescura de los mismos. De gran relevancia es que, los enterococos en los últimos años han adquirido suma importancia porque cepas con mecanismos de resistencia que se creían estar presentes solo a nivel hospitalario, hoy en día están en el ambiente, y a través de los alimentos sería una forma de diseminar este tipo de cepas, que vienen con mecanismos de resistencia a algunos de los antibióticos de uso clínico que se usan para tratar infecciones sistémicas por este género.

CONCLUSIONES

El expendio de lechugas en centros comerciales garantiza una carga menor de enterococos.

Las personas sanas pueden adquirir cepas de enterococos multirresistentes a través de la cadena alimenticia y ser portadores intestinales de ellas.

La clonalidad de cepas de enterococos puede deberse a una fuente de contaminación común, como el agua de riego o el uso de materia orgánica en los cultivos.

RECOMENDACIONES

Es vital lavar bien las lechugas para disminuir la carga bacteriana, ya que en este estudio se aisló *E. faecalis* en algunas lechugas, siendo la principal especie causante de infecciones graves por enterococos en pacientes hospitalizados.

Evitar el uso de antibióticos innecesarios para no seleccionar estas bacterias y que causen infecciones oportunistas.

BIBLIOGRAFÍA

Abadía-Patiño, L. 2013. Perfil de susceptibilidad de cepas de *Enterococcus* spp., aisladas en animales destinados al consumo humano, criados en los estados Monagas y Anzoátegui. *Rev. Soc. Venezol. Microbiol.*, 13:100-104.

Aguirre, J.; Rodríguez, M. and García, G. 2007. Variability of the *Listeria innocua* and *Enterococcus faecalis* inactivation in foods by heating and irradiation. Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense. Madrid, 30: 456-460.

Akar, S.; Gokyigit Pekel, G.; Demircan, A. and Demirok, A. 2015. *Enterococcus casseliflavus* endophthalmitis due to metallic intraocular foreign body. *Eye.*, 29: 839-840.

Amponsah, F.; Obiri, K.; Abaidoo, R.; Andoh, L.; Drechsel, P. and Kondrasen, F. 2010. Bacterial contamination of lettuce and associated risk factors at production sites, markets and street food restaurants in urban and peri-urban Kumasi, Ghana. *Sci. Res. Essay*, 5(2): 217-223.

Audisio, M.; Terzolo, H. and Apella, M. 2005. Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6): 3373-3375.

Baldini, M.; Selzer, P. 2008. Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas. *Rev. Argent. Microbiol.*, 40: 48-51.

Beltrán, N. and Jiménez, B. 2008. Faecal coliforms, faecal enterococci, *Salmonella typhi* and *Acanthamoeba* spp. UV inactivation in three different biological effluents. *Water SA*. 34(2): 261-269.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493.

Berenger, B.; Kulkarni, S.; Hinz, B.; and Forgie, S. 2015. Exogenous endophthalmitis caused by *Enterococcus casseliflavus*: a case report and discussion regarding treatment of intraocular infection with vancomycin-resistant enterococci. *Can J Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 26:330-332.

Beuchat, L.; Nail, B.; Adler, B. and Clavero, M. 1998. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *J. Food Protec.*, 61: 1305-1311.

Boehme, S. 2004. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in

agricultural foodstuffs. *Mol. Nutr. Food Res.*, 48: 522-531.

Cercenado, E. 2011. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enf. Infec. Microbiol. Clín.*, 29: 59-65.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement Document. M100-S26, 36: 84-86.

Choi, S.; Lee, S.; Kim, T.; Chung, J.; Choo, E.; Kwak, Y.; Kim, M.; Kim, Y.; Woo, J.; Ryu, J. and Kim, N. 2004. Clinical Features and Outcomes of Bacteremia Caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: Analysis of 56 Cases. *Clin. Infect. Dis.*, 38: 53-61.

Cova, R. 2012. Aislamiento y susceptibilidad antimicrobiana de *Aeromonas* sp. En vegetales frescos que se utilizan para la preparación de comida rápida en puestos ambulantes de alimentos en la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 12-18.

Deshpande, L.; Fritsche, T.; Moet, G.; Biedenbach, D. and Jones, R. 2007. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 58:163–70.

Edmond, M.; Ober, J.; Weinbaum, D.; Pfaller, M.; Hwang, T.; Sanford, M. and Wenzel, R. 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin. Infect. Dis.*, 20:1126-33.

Fischer, M. 2008. Effects of weed management strategies on quality and enteric pathogen contamination of organic lettuce. 16th IFOAM Organic World Congress, June 16.

Franz, C.; Muschol-Silbehorn, A.; Yousif, N.; Swings, J. and Holzapfel, W. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4385-09.

Freney, J.; Renaud, F.; Hansen, W. and Bollet, C. 2000. Précis de Bactériologie Clinique. Première édition. Editorial ESKA. Paris. pp. 1692.

Girón-González, J. and Pérez-Cano R. 2003. Tratamiento de las infecciones por enterococo. *Rev. Clin. Esp.*, 203(10):482-05

Goñi, M.; Tomadoni, B.; Audisio, M.; Ibarguren, C.; Roura, S.; Moreira, M. and Ponce, A. 2016. Application of bacteriocins from *Enterococcus hirae* on butterhead lettuce. *Inter. Food Res. J.*, 23(6): 2653-2660.

Ibarguren, C., Audisio, M., Farfaan, T. and Apella, M. 2010. Silicates characterization as potential bacteriocin-carriers. *Inn. Food Scien. Emer. Technol.*, 11(1): 197-202.

Jay, J. 1991. Modern food microbiology. Fourth Edition. AVI, Van Nostrand Reinhold, New York.

Johnston, L., and Jaykus L. 2004. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Produce. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(5): 3133–3137.

Koneman, E.; Allen, S.; Winn, W.; Janda, W.; Procop, G.; Schrenckenberger, P. and Woods, G. 2008. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 1666.

Khurana R.; Leder H.; Nguyen Q. and Do, D. 2009. *Enterococcus casseliflavus* endophthalmitis associated with a horse tail injury. *Arch. Ophthalmol.*, 127:1551-1552.

Lai, K.; Fontechio, S.; Kelly, A.; Melvin, Z. and Baker, S. 1997. The epidemiology of fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *Infec. Control Epidemiol.*, 18(11):762-765.

MacFaddin, J. 2004. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 850.

Madge, B. and Jensen, J. 2006. Ultraviolet disinfection of faecal coliform in municipal wastewater: effects of particle size. *Water Environ. Res.*, 78(3): 294-304.

Mazzulli, T.; King S.; and Richardson S. 1992. Bacteremia due to beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin in a child with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin. Infect., Dis.* 14:780–781.

Miller Publishing Co. 2000. Feed additive compendium. Minnetonka, Minn.

Miller, W.; Munita, J. and Arias, C. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 12(10): 1221–1236.

Nguyen, J. and Hartnett, M. 2017. Successful management of post-traumatic

vancomycin-resistant *Enterococcus* endophthalmitis. *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.*, 5: 117-118.

Ortega, L. 2010. Enterococos: Actualización. *Rev. Haban. Cien. Méd.* 9(4): 507-515.

Páez, C. 2009. Determinación de coliformes fecales y totales en expendio de alimentos en establecimientos formales en el macrodistrito centro de la ciudad de la paz de septiembre a diciembre de 2007. Tesina elaborada para optar al título de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, 11-13.

Pavia, M.; Nobile, C.; Salpietro, L. and Angelillo, I. 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Protetct.*, 63: 912-915.

Quiñones, D. 2010. *Enterococcus* aislados en cuba: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. Trabajo presentado en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas. Departamento de Bacteriología-Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba.

Reid, K.; Cockerill, F. and Patel, R. 2001. Clinical and Epidemiological Features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* Bacteremia: A Report of 20 Cases. *Clin. Infec. Dis.*, 32: 1540-6.

Ronconi, M.; Merino, L. and Fernández, G. 2002. Detección de *Enterococcus* resistentes a altos niveles de aminoglucósidos y resistentes a glucopéptidos en *Lactuca sativa*. *Enferm. Infecc. y Microbiol. Clín.*, 20(8): 380-383.

Sabine, R. 2005. Effect of agronomic management practices on lettuce quality. International Scientific Conference on Organic Agriculture, 21 to September 23.

Saroj, S.; Shashidhar, R., Pandey, M., Dhokane, V., Hajare, S., Sharma, A. and Bandekar, J. 2006. Effectiveness of radiation processing in elimination of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* from sprouts. *J. Food Protec.*, 69: 1858– 1864.

Schell, C.; Delpech, G.; Pourcel, N.; Bernstein, J.; Grenovero, M.; Sparo, M.; Basualdo, J. and De Luca, M. 2010. Especies Emergentes de enterococos con multi-resistencia antimicrobiana aislados de alimentos de origen animal. *Rev. cient. facul. cien. méd.*, 2(2): 01-02.

Silva, J.; Loyola, P.; Galleguillos, J.; Rodríguez, Y.; Colque-Navarro, P.; Möllby, R. and Kühn, I. 2005. Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev. Méd. Chile*, 133: 1201-1210.

Sokal, R. and Rohlf, F. 1989. Biométrica y métodos estadísticos en la investigación biológica. Primera edición. Editorial Blume. España.

Sørensen, T.; Blom, D.; Monnet, N.; Frimodt-Møller, R.; Poulsen, and F. Espersen. 2001. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N. Engl. J. Med.*, 345:1161–1166.

Soriano, M.; Rico, H.; Moltó, J. and Mañes, J. 2001. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiol.* 18:159-163.

Tiimub, B.; Kuffour, R. and Kwarteng, A. 2012. Bacterial contamination levels of lettuce irrigated with waste water in the Kumasi Metropolis. *J. Biol. Agric. Hthcre.*, 2(10): 116-124.

Torre, I.; Pennino, F.; Diana, M.; De Marco, G.; Trotta, A.; Borriello, T. and Troiano, E. 2010. Antimicrobial susceptibility and glycopeptide-resistance of enterococci in vegetables. Faculty of Medicine and Surgery University of Naples “Federico II”. Italy, 7: 47-51.

Van den Bogaard, A. and E. Stobberingh, 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14:327–335.

Wade, W.; Scouten, A.; McWatters, K.; Wick, R.; Demirci, A.; Fett, W. and Beuchat, L. 2003. Efficacy of ozone in killing *Listeria monocytogenes* on alfalfa seeds and sprouts and effects on sensory quality of sprouts. *J. Food Protect.*, 66(1): 44-51.

Winthrop, K.; Palumbo, M.; Farrar, J.; Mohle-Boetani, J.; Abbott, S.; Beatty, M.; Inami, G. and Werner, S. 2003. Alfalfa sprouts and *Salmonella* Kottbus infection: a multistate outbreak following inadequate seed disinfection with heat and chlorine. *J. Food Protect.*, 66(1): 13-17.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	DETECCIÓN DE ANTIBIOTIPOS DE CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp., PROVENIENTES DE LECHUGAS DE DIFERENTES ESPECIES Y DISTINTOS LUGARES
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Bastardo, María Fernanda	CVLAC	19978561
	e-mail	mariafernanda88@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Antibiótipos, Lechugas, <i>Enterococcus</i> spp.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluaron antibiotipos de cepas de *Enterococcus* spp., provenientes de lechugas de diferentes especies y distintos comercios de Cumaná, estado Sucre. De 52 lechugas adquiridas en centros de expendios de comida, se aislaron cepas de *Enterococcus* spp. (38%). Desde el punto de vista comercial, las lechugas de este estudio fueron Batavia, Iceberg, Achicoria roja, Escarola y Romana. Científicamente, las lechugas pertenecen a dos géneros, *Lactuca* y *Cichorium*. La variedad de lechuga más vendida en la ciudad de Cumaná fue *Lactuca sativa* L. pero la más contaminada por enterococos fue *Lactuca sativa* var. *capitata* (89%). Los sitios donde se compraron más lechugas fueron el Mercado Municipal y un Puesto Ambulante del centro de la ciudad. Solo dos sitios vendieron lechugas no contaminadas con enterococos. Se demostró la diseminación clonal de dos cepas de *E. faecalis* y una cepa de *E. faecium* por antibiotipificación, y estas cepas clonales fueron aisladas de lechugas compradas en el Mercado municipal, lo que hace suponer que la fuente de contaminación es la misma. Los antibiotipos de todas las especies de enterococos aisladas en este trabajo se realizaron mediante las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, con el fin de conocer si se trataban de la misma cepa o eran distintas. El perfil de susceptibilidad demostró que hay cepas resistentes a glicopéptidos, fluoroquinolonas, ansamicinas, macrólidos, fenicoles y tetraciclinas. Sin embargo la mayoría de las bacterias encontradas en estas lechugas presentaron resistencia a el antibiótico rifampicina, y susceptibilidad de intermedia a alta a ciprofloxacina. Estos resultados demuestran que la cadena alimenticia es una vía de diseminación de bacterias multirresistentes a la microbiota intestinal humana, convirtiendo el tracto gastrointestinal en un reservorio de bacterias intratables con los antibióticos disponibles.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Abadía-Patiño, Lorena	ROL	C ☐ A ☒ T ☐ J ☐ A ☐ S ☒ U ☐ U ☐
	CVLAC	10952465
	e-mail	labadia@udo.edu.ve
	e-mail	
Michelli Viña, Elvia	ROL	C ☐ A ☐ T ☐ J ☒ A ☐ S ☐ U ☐ U ☒
	CVLAC	8644673
	e-mail	melvia@udo.edu.ve
	e-mail	
Batancourt Villarroel, José	ROL	C ☐ A ☐ T ☐ J ☒ A ☐ S ☐ U ☐ U ☒
	CVLAC	8649514
	e-mail	jbetanvi@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2018	05	10

Lenguaje: **SPA** _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-bastardom.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: Universal (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

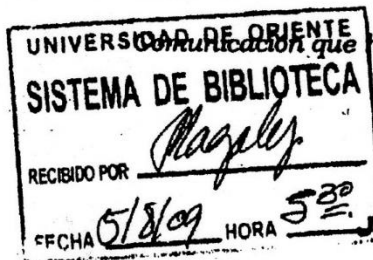
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUAPELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : "los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización".



María Bastardo
Autor



Dra. Lorena Abadía-Patiño
Asesora