

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

**Aislamiento y caracterización de cepas de *Enterococcus*
vancomicina resistentes (VRE) en piezas de pollos de
abastecimientos comerciales**

Trabajo de investigación para optar por el grado de Licenciatura en
Microbiología y Química Clínica

Tania Fernández Mora.

Tutor: Fernando García Santamaría, Ph.D.

Laboratorio de Bacteriología Médica

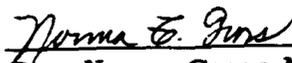
San José, Costa Rica

2002

ARTICULO 3

Informe Final de Práctica Dirigida de Graduación presentado a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el Título de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y grado profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.

El Tribunal Examinador estuvo integrado por los siguientes miembros:


Dra. Norma Gross Martínez
Presidenta


Dr. Fernando García Santamaría


Dr. Norman Rojas Campos


Dr. Esteban Chaves Olarte


Dr. Julio García Fernández

Dedicatoria

A mis padres por el apoyo incondicional y la orientación constante que me han dado a lo largo de mi carrera.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Fernando García Santamaría por haber sido mi tutor y amigo, por todos los conocimientos que me ha transmitido a lo largo de la realización de mi trabajo de investigación que han hecho posible su culminación. Gracias por el apoyo brindado y la confianza que depositó en mi al permitirme realizar esta tarea y por último muchas gracias por inculcarme el amor a la ciencia.

Al Dr. Warner Bustamante, por su ayuda a lo largo de la realización de este trabajo de investigación.

A la señora Dagmar Utzinger, por todos sus conocimientos y colaboración brindada a lo largo del tiempo.

Al Dr. Esteban Chaves y al Dr. Norman Rojas, por sus observaciones en la revisión de mi trabajo.

A la señora Laura Villalobos, por su ayuda brindada en la manipulación de alimentos.

A Rodrigo Mora mi compañero de internado, por brindarme el apoyo necesario a lo largo de los seis meses compartidos y por toda la alegría compartida en ese tiempo.

Indice general

Introducción	1
Objetivos	10
Materiales y métodos	11
Materiales	11
Medios de cultivo	11
Métodos	13
Recolección de muestras	13
Procesamiento de la muestra	13
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	14
Resultados	15
Discusión	20
Referencias	26

Fernández Mora, Tania

Aislamiento y caracterización de *Enterococcus* vancomicina resistentes (VRE) en piezas de pollo de abastecimientos comerciales.

Trabajo de investigación de Microbiología y Química Clínica.- San José, C.R.:

T. Fernández M., 2002.

30h.: 2 il.- 25 refs.

Se propone estudiar la presencia de *Enterococcus* vancomicina resistentes en piezas de pollo para consumo humano. Se pretende también estandarizar un método de laboratorio para el aislamiento de cepas de VRE a partir de alimentos no cocinados y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de vancomicina correspondiente a cada una de las cepas aisladas.

Se realizó el aislamiento de las cepas de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina en 32 piezas de pollo para el consumo humano. Esto se llevó a cabo mediante incubaciones de las piezas en Agua Peptonada Bufferizada, Enterococcosel con 6 µg/ml de vancomicina, Agar Kanamicina Esculina Azida y por último en Agar Infusión Cerebro Corazón con 6 µg/ml de vancomicina. Se determinó como *Enterococcus* a los cocos Gram positivos, catalasa negativos, con capacidad de hidrolizar esculina y de crecer en medios con 6.5% de NaCl. Posteriormente, se determinó la MIC a la vancomicina a todas las cepas obtenidas mediante la técnica de dilución en agar.

El 75% de las piezas de pollo de consumo humano resultaron positivas por VRE. La mayoría de estas cepas presentaron bajos niveles de resistencia a la vancomicina con MIC de 16 µg/ml. Solamente el 9.7% de las cepas aisladas presentaron altos niveles de resistencia a la vancomicina con MIC superiores a 32 µg/ml. Se pudo concluir, que el método de laboratorio utilizado para el aislamiento de VRE fue efectivo, y que en piezas de pollo de consumo humano la ocurrencia de VRE es de un 75%.

Palabras claves: *Enterococcus*, vancomicina, resistencia.

Director de la investigación: Dr. Fernando García Santamaría, Ph.D.

Introducción

Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* se caracterizan por ser cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, capaces de crecer en medios de cultivo de altas concentraciones de sal e hidrolizar esculina en presencia de sales biliares (Forbes *et al.*, 1998). Se encuentran frecuentemente distribuidas en suelos, alimentos, agua y forman parte de la flora normal de tracto intestinal y genitourinario de seres humanos y otros animales (Forbes *et al.*, 1998).

Estos representan un riesgo importante a la salud pública, debido a que son una de las principales causas de endocarditis. Además, a partir de la década de los 1970 han sido reconocidos como causas importantes de infecciones intrahospitalarias, siendo los segundos microorganismos más comunes en infecciones nosocomiales de tracto urinario e infecciones de heridas, y los terceros más comunes en bacteremias nosocomiales en los Estados Unidos de América (Cetinkaya *et al.*, 2000).

Una de las principales razones por las que estos organismos han sobrevivido al ambiente hospitalario es por su resistencia intrínseca a muchos de los antibióticos comúnmente utilizados como cefalosporinas, cloramfenicol, clindamicina, eritromicina y otros macrólidos, monobactams, algunas penicilinas, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas (Jacoby, 1996). A pesar de su resistencia intrínseca, probablemente la principal razón de este hecho es su habilidad para adquirir resistencia frente a la mayoría de antibióticos disponibles, ya sea mediante mutaciones o mediante la recepción de material genético ajeno a través de plásmidos o transposones (Cetinkaya *et al.*, 2000).

Como consecuencia del uso indebido de antibióticos, una gran cantidad de microorganismos han aumentado la resistencia a los agentes antimicrobianos. Tal es el caso de bacterias como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Klebsiella*, entre otros. (Jacoby, 1996)

La vancomicina y la teicoplanina son glicopéptidos cíclicos altamente activos contra bacterias Gram positivas. Los glicopéptidos se unen a los residuos terminales acyl-D-Alanina-D-Alanina del pentapéptido precursor del peptidoglicán mientras es exportado hacia la pared celular. De esta manera se provoca un bloqueo en la interacción de la transglicosidasa con el peptidoglicán, previniendo el crecimiento de la pared celular. Debido a que los glicopéptidos son moléculas grandes, con pesos moleculares aproximados de 1448 y de 1900 gramos para la vancomicina y la teicoplanina respectivamente, no son activos contra bacterias Gram negativas debido a la impermeabilidad de la membrana externa. (Woodford *et al.*, 1995)

Enterococcus vancomicina resistentes fueron reportados por primera vez en Europa alrededor de la década de 1980, sin embargo su prevalencia ha aumentado, aunque las cifras exactas no se conocen (Shlaes *et al.*, 1994).

Debido a que la vancomicina es uno de los pocos antibióticos actualmente efectivos contra *Enterococcus*, la aparición de cepas resistentes a vancomicina viene a ser un problema fundamental en el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos, de manera que la mortalidad aumenta considerablemente.

Los parámetros epidemiológicos que contribuyen en la aparición y diseminación de cepas de *Enterococcus* vancomicina resistentes (VRE) parecen ser diferentes de acuerdo al lugar geográfico. En los Estados Unidos de América se cree que su aparición se debe al uso indiscriminado de vancomicina a nivel hospitalario que ha inducido la resistencia hacia los glicopéptidos. A partir de ahí se ha producido el esparcimiento a nivel comunitario por medio del personal docente o de los pacientes. (Mundy *et al.*, 2000).

Sin embargo, en Europa parecen tener un origen distinto por diversas razones. Entre éstas se encuentra el hecho de que se han aislado a partir de heces, microorganismos resistentes en pacientes cuyo centro médico no tienen uso de la vancomicina, y de personas sanas que no presentan antecedentes de exposición a este tipo de antibióticos (Woodford *et al.*, 1995). Además, en Holanda, *Enterococcus* vancomicina resistentes no han sido detectados en personas estrictamente vegetarianas por lo cual se supone que la fuente de VRE es carne contaminada con materia fecal (Wegener *et al.*, 1999). Además, a nivel

europeo la vancomicina se utiliza de una manera más discreta (Mundy *et al.*, 2000). Por lo tanto, se ha propuesto una segunda teoría sobre el origen de los VRE .

Es bien sabido que los *Enterococcus* son flora normal de tracto gastrointestinal, y se cree que un reservorio importante en la transmisión de VRE son los animales de granja incluyendo patos, pollos, cerdos, pavos; en los cuales se han encontrado cepas con diferentes grados de resistencia. Esto se ha reportado principalmente en granjas donde se utilizan promotores de crecimiento animal.

Suplementar el alimento animal con agentes antimicrobianos para fomentar su crecimiento ha sido una práctica común de los pasados treinta años; y se estima que constituyen más de la mitad de los agentes antimicrobianos utilizados alrededor del mundo (Wegener *et al.*, 1999). Estos consisten en antibióticos no utilizados en humanos pero con acciones muy similares a éstos, los cuales son encargados de promover la tasa de crecimiento animal (Wegener *et al.*, 1999). En el caso de la resistencia a la vancomicina, se cree que es inducida por la presión selectiva que ejerce el uso de la avoparcina, un antibiótico de la familia de los glicopéptidos como promotor de crecimiento animal.

Es una realidad que el uso de avoparcina como suplemento nutricional induce la resistencia a la vancomicina por parte de *Enterococcus* provenientes de animales de granja. Sin embargo, aun está en estudio si esta resistencia pueda o no ser transferible al ser humano mediante cadena alimenticia. Por medio de técnicas de tipificación molecular, se ha podido observar una muy alta diversidad de tipos de VRE tanto en animales como en seres humanos. Sin embargo, se han encontrado tipos similares o relacionados tanto en humanos como en animales, lo que sugiere que una transferencia de la resistencia si se lleva a cabo (Wegener *et al.*, 1999 ; Woodford *et al.*, 1998).

Marcadores que distingan enterococos aislados a partir de fuentes humanas y no humanas pueden permitir la posibilidad de investigar en esta área. Por ejemplo, un marcador en *E. faecium* es la producción de ácido a partir de raffinosa que se ha sugerido como prueba positiva en cepas de origen aviar (Woodford *et al.*, 1995)

Sin embargo, la mayoría de investigadores respalda la teoría de que se presenta una transferencia de los genes de resistencia, más que la diseminación clonal de este tipo de microorganismos entre especies de animales y el ser humano (Endtz *et al.*, 1998).

A partir de las cepas de VRE aisladas, han sido reconocidos diferentes fenotipos en base al nivel de resistencia los glicopéptidos que corresponden a VanA, VanB, VanC, VanD y VanE (Cetinkaya *et al.*, 2000). Dos de estos fenotipos (VanA y VanB), son mediados por un grupo de genes adquiridos (Woodford *et al.*, 1995).

Los *Enterococcus* que contienen el fenotipo VanA, presentan típicamente un alto nivel de resistencia a la vancomicina, con concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) mayores o iguales a 64 µg/ml y a la teicoplanina (con MIC mayores o iguales a 16 µg/ml). Esta resistencia puede ser inducida por glicopéptidos (como la vancomicina, teicoplanina, avoparcina y ristocceina), y por agentes no glicopéptidos como la bacitracina, polimixina B y robenidina. (Cetinkaya *et al.*, 1995).

Los detalles de la resistencia han sido bien documentados con el grupo de genes *vanA*, encontrados en el transposón Tn1546 de *E.faecium* (Cetikaya *et al.*, 1995). Dentro de este grupo de genes se encuentra el *vanA*, el cual codifica para el péptido VanA. Esta proteína es estructuralmente similar a la enzima D-Ala-D-Ala ligasa (Woodford *et al.*, 1995). Esta enzima es la responsable de la ligación del dipéptido D-Ala-D-Ala, que es el blanco de los glicopéptidos en las bacterias Gram positivas (Woodford *et al.*, 1995).

El péptido VanA, ha mostrado tener actividad D-Ala-D-Ala ligasa, solamente que con un rango de especificidad más amplio respecto al sustrato. Esto ha sugerido que sirve para la producción del componente D-ala-X, para la incorporación de este dipéptido en los precursores del peptidoglicán. De esta manera se da una disminución en la unión con glicopéptidos (Woodford *et al.*, 1995).

Sin embargo, el gen *vanA* no es suficiente para conferir la resistencia a los glicopéptidos por parte de los *Enterococcus*, para esto se requieren otro grupo de genes entre los que se encuentran el gen *vanH*. Este gen codifica para la proteína VanH, la cual tiene una actividad similar a la enzima ácido-2-hidroxicarboxílico deshidrogenasa. El

péptido VanH reduce los 2-cetoácidos para la producción de D-hidroxiácidos. Posteriormente la VanA ligasa cataliza la síntesis de los dipéptidos de los precursores del peptidoglicán mediante la formación de un enlace tipo éster entre la D-Ala y estos productos (Woodford *et al.*, 1995).

La identidad de los D-hidroxiácidos producidos e incorporados por VanH y VanA respectivamente, han sido elucidados mediante la inactivación del gen *vanH*, en estudios realizados por Arthur, M. y colaboradores, quienes encontraron que al inactivar el gen *vanH* la MIC para la vancomicina se reducían considerablemente. Sin embargo, la resistencia podía restaurarse mediante la adición de D-2-hidroxibutirato o D-lactato. De esta forma, se ha sugerido que el D-lactato es producido a partir del piruvato por la enzima VanH y que posteriormente es incorporado a los precursores del peptidoglicán (Woodford *et al.*, 1995).

Un tercer gen ha sido identificado como esencial para la resistencia a glicopéptidos, el cual se denomina *vanX* y codifica para un péptido citoplasmático con acción DD-dipeptidasa. Se ha demostrado la habilidad de esta proteína VanX para hidrolizar los dipéptidos D-ala-D-ala, sin embargo es incapaz de hidrolizar D-ala-D-lactato (Woodford *et al.*, 1995).

Debido a que la resistencia a glicopéptidos mostrada por los *Enterococcus* VanA es inducida, se sugiere que la expresión es regulada en un nivel genético. De esta manera, se han encontrado dos ORF más, designados *vanS* y *vanR*.

Análisis de los productos de estos genes, indican similitud con un sistema regulatorio de transducción de señal mediado por dos componentes. Este sistema usualmente consiste en un sensor transmembrana, el cual corresponde a un péptido con actividad de histidina protein quinasa, que contiene un residuo específico de histidina el cuál es fosforilado en respuesta a estímulos ambientales específicos. El grupo fosfato es posteriormente transferido a un residuo de aspartato del segundo péptido (el regulador de la respuesta). Este regulador presenta un dominio unido al ADN, y una vez fosforilado, afecta la transcripción específica de genes. El producto del gen *vanS* parece estar relacionado con

la histidina protein quinasa y el gen *vanR* con el péptido regulador de respuesta (Woodford *et al.*, 1995).

El papel de estos dos péptidos en la regulación de VanA se ha confirmado mediante la inactivación de genes. La inactivación del gen *vanS* no muestra efecto en el nivel de resistencia, sin embargo, la transcripción de los genes de resistencia decrece. En contraste, al inactivar al gen *vanR*, la cepa se torna susceptible a los glicopéptidos (Woodford *et al.*, 1995).

El estímulo ambiental que dispara la autofosforilación de VanS no ha sido identificado aún, pero es probable que esté relacionado con la presencia de vancomicina y su interacción con el sitio D-Ala-D-Ala, el cual inhibe la transglicosilación (Woodford *et al.*, 1995).

El transposón *Tn1546* acarrea otros ORF, *vanY* y *vanZ*, los cuales no son necesarios para la resistencia a glicopéptidos. El gen *vanY* codifica para una DD-carboxipeptidasa, la cual reduce la disponibilidad del pentapéptido precursor del peptidoglicán terminado en D-Ala-D-Ala y por ende, previene su unión a glicopéptidos. El mecanismo mediante el cual el gen *vanZ* induce resistencia a glicopéptidos todavía no se ha establecido, sin embargo, se ha observado que al introducir un plásmido recombinante conteniendo solamente este gen incrementa las MIC de la teicoplanina, sin afectar la MIC de la vancomicina (Woodford *et al.*, 1995).

El fenotipo VanB originalmente fue descrito como inducible, de bajo nivel de resistencia no transferible a la vancomicina, y susceptible a la teicoplanina. Sin embargo, es claro que *Enterococcus* que contienen el gen *vanB* son fenotípicamente muy diversos en cuanto a la resistencia a glicopéptidos, exhibiendo un rango muy amplio de MIC de vancomicina. Además, se ha descrito la emergencia de mutantes que expresan *vanB* de manera constitutiva. Estos mutantes son también resistentes a la teicoplanina e indistinguibles de acuerdo a las pruebas de susceptibilidad a antibióticos del fenotipo VanA (Woodford *et al.*, 1995).

La resistencia mediada por *vanB* puede ser también transferible, y el gen puede estar localizado en el cromosoma o en plásmidos. La variabilidad en la localización de *vanB*

sugiere que al igual que *vanA*, puede localizarse a nivel de un transposón (Woodford *et al.*, 1995).

La resistencia a los glicopéptidos por parte de éste se encuentra dado por el gen denominado *vanB*. Este gen codifica también para una ligasa con 76% de homología con la ligasa codificada por *vanA*. De esta manera, las bases moleculares de la resistencia parecen ser idénticas entre los fenotipos VanA y VanB. Lo anterior sugiere que una cepa con fenotipo VanB debería de requerir otros genes además de *vanB* para conferir la resistencia a los glicopéptidos, de manera comparable al grupo de genes de las cepas VanA. Secuencias relacionadas a *vanH* y *vanX* han sido identificadas a los lados del gen *vanB*; así mismo, se ha detectado una actividad DD-carboxipeptidasa inducible con la vancomicina, análogo al péptido VanY (Woodford *et al.*, 1995).

La expresión de la resistencia del fenotipo VanB es inducible en la mayoría de los casos, y se cree que podría estar regulado por un sistema similar al que se presenta en VanA. Sin embargo, algunas de las cepas VanB no parecen contener el gen *vanS* de acuerdo a análisis mediante la técnica de PCR. Estas diferencias en la regulación podrían explicar el amplio rango de las MIC de vancomicina en las *Enterococcus* VanB (Woodford *et al.*, 1995).

El fenotipo VanC se caracteriza por una baja resistencia a la vancomicina y susceptibilidad a la teicoplanina. Es una propiedad intrínseca de la mayoría de aislamientos de *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*. El gen que codifica para este fenotipo se encuentra a nivel cromosomal y se expresa de manera constitutiva. Sin embargo, datos recientes sugieren que puede ser inducible en algunas cepas de *E. gallinarum* (Woodford *et al.*, 1995).

Se sugiere que el péptido VanC, presenta también actividad de ligasa, con un 38% de homología en cuanto a los aminoácidos con las ligasas codificadas por *vanA* y *vanB*. La enzima es una D-Ala-D-Ser ligasa, de manera que los precursores del peptidoglicán presentan el dipéptido D-Ala-D-Ser en vez de D-Ala-D-Ala; lo cual reduce la unión con la vancomicina (Woodford *et al.*, 1995).

E. gallinarum también presenta actividad DD-dipeptidasa y DD-carboxipeptidasa, las cuales son las encargadas de suprimir la síntesis de los precursores normales del peptidoglicán. Aunque las posiciones de los genes que codifican para estas enzimas no se encuentran todavía determinadas, se ha observado que al inactivar el gen *vanC*, éstas otras actividades no son detectadas. Lo anterior sugiere que la transcripción de estos genes debe estar ligada con la transcripción de *vanC* (Woodford *et al.*, 1995).

Las bases bioquímicas de los fenotipos VanC expresados por *E. casseliflavus* y *E. flavescens*, *vanC-2* y *vanC-3* respectivamente, son todavía desconocidas (Woodford *et al.*, 1995).

En 1991 se describió un nuevo gen de resistencia, designado *vanD*. Este fue presentado por cepas de *E. faecium*. De acuerdo con la secuenciación parcial del gen que codifica para la ligasa, se determinó que existen semejanzas entre el gen *vanD* y los genes *vanA* y *vanB*. El gen *vanD* aparentemente se encuentra localizado dentro del cromosoma bacteriano y no se ha observado hasta el momento transferencia hacia otros *Enterococcus* (Cetinkaya *et al.*, 2000).

El gen *vanE* ha sido recientemente descrito en *E. faecalis* BM4405. Este fenotipo se caracteriza por bajos niveles de resistencia a la vancomicina, con MIC de 16 µg/ml, y susceptibilidad a la teicoplanina. Presenta similitud con el gen *vanC* (55% de homología) más que con *vanA* (45%), *vanB* (43%) o *vanD* (44%) (Cetinkaya *et al.*, 2000).

Existen además algunas cepas de *Enterococcus* dependientes de vancomicina, derivadas de los fenotipos VanA o VanB. Se sugiere que estas cepas son incapaces de producir la ligasa codificada por el gen *ddl*, ubicado en el cromosoma bacteriano. Con la presencia de vancomicina se da la inducción de la enzima D-Ala-D-lactato ligasa, codificada por *vanA* o *vanB*, de manera que puede darse la síntesis de los precursores del peptidoglicán (Woodford *et al.*, 1995).

La presencia de los fenotipos de resistencia VanA y VanB representan un riesgo para la salud pública, no solamente por las pocas opciones terapéuticas que quedan al darse una infección por este tipo de microorganismos, como ya anteriormente fue mencionado,

sino también porque representan un riesgo para la aparición de resistencia a la vancomicina en otras bacterias Gram positivas. *In vitro*, ya se ha observado la transferencia hacia otros géneros de los genes que codifican para el fenotipo VanA. Microorganismos que han resultado como receptores exitosos incluyen *Streptococcus viridans* y *S. pyogenes*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Ha sido demostrado la transferencia de los genes de resistencia a *S.aureus*, tanto *in vitro* como en la piel de ratones. De esta manera surge la preocupación de que la transferencia en seres humanos bajo condiciones naturales podría ocurrir (Cetinkaya *et al.*, 2000). Por otra parte, genes de resistencia a la vancomicina han sido encontrados en aislamientos de microorganismos que no pertenecen al género *Enterococcus*. Una secuencia genética similar a *vanB*, la cual ha sido designada *vanB3*, ha sido reportada en *Streptococcus bovis* (Cetinkaya *et al.*, 2000).

Debido a la importancia clínica de bacterias resistentes a la vancomicina, es importante investigar sobre la presencia de reservorios en la naturaleza. Debido a la alta sospecha que se presenta en Europa sobre la función de la carne cruda como reservorio, se hace fundamental el análisis de este tipo de productos en nuestro país con el fin de determinar si constituyen o no una fuente de riesgo para la transmisión de estos genes de resistencia.

Objetivos

Objetivo General

- Estudiar la presencia de *Enterococcus* vancomicina resistentes en piezas de pollo para consumo humano.

Objetivos Específicos

- Estandarizar un método de laboratorio para el aislamiento de cepas de *Enterococcus* vancomicina resistentes a partir de alimentos no cocinados.
- Realizar el aislamiento de cepas de *Enterococcus* vancomicina resistentes en piezas de pollos de abastecimientos comerciales.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de vancomicina correspondiente a cada una de las cepas de *Enterococcus* vancomicina resistentes aislados.

Materiales y Métodos

Materiales:

Medios de Cultivo

Agar Kanamicina-Esculina-Azida

- Triptona 20.0 g/l
- Extracto de levadura 5.0 g/l
- NaCl 5.0 g/l
- Citrato de Sodio 1.0 g/l
- Esculina 0.5 g/l
- Citrato férrico de Amonio 0.5 g/l
- Azida de Sodio 0.15 g/l
- Kanamicina 20 mg/l
- Agar 20.0 g/l
- pH 7.0-7.2

Agua Peptonada Bufferizada

- Triptona 10.0 g/l
- NaCl 5.0 g/l
- Na₂HPO₄ 3.5 g/l
- KH₂PO₄ 1.5 g/l
- pH 7.2

Enterococcosel suplementado con vancomicina

- Digestión pancreática de caseína 17.0 g/l
- Bilis 10.0 g/l
- NaCl 5.0 g/l
- Extracto de levadura 5.0 g/l
- Digestión péptica de tejido animal 3.0 g/l
- Esculina 1.0 g/l
- Citrato de Sodio 1.0 g/l
- Citrato férrico de Amonio 0.5 g/l
- Azida de Sodio 0.25 g/l
- Vancomicina 6 mg/l
- pH 6.9-7.3

Agar Infusión Cerebro-Corazón (AICC) con vancomicina

- Caldo Infusión Cerebro-Corazón 37.0 g/l
- Agar 20.0 g/l
- Vancomicina 6 mg/l

Caldo base púrpura de bromocresol con glucosa y 6.5% NaCl

- Extracto de carne 1.0 g/l
- Peptona 10.0 g/l
- NaCl 65.0 g/l
- Púrpura de bromocresol 0.015 g/l
- Glucosa 10.0 g/l
- pH 6.8-7.0

Agar bilis-esculina

- Extracto de carne 3.0 g/l

- Peptona 5.0 g/l
- Bilis 40.0 g/l
- Esculina 1.0 g/l
- Citrato férrico 0.5 g/l
- Agar 15.0 g/l
- pH 7.0

Métodos:

Recolección de muestras

Se trabajó con muestras de piezas de pollo (muslos y alitas) de un peso mínimo de 250 g, obtenidas de manera aleatoria, de cada una de las provincias del valle central. Se trabajó con 32 muestras distribuidas de la siguiente manera: Alajuela 9, San José 12, Heredia 6 y Cartago 5.

Procesamiento de la muestra

Para estandarizar el método de aislamiento de *Enterococcus vancomicina* resistentes en productos alimenticios se siguió el protocolo que se describe a continuación.

Se determinó el peso exacto de la (s) pieza (s) de pollo mediante una balanza. Una vez determinado el peso exacto se depositó la (s) pieza (s) en una bolsa de Stomacher y se agregó cantidades equivalentes de Agua Peptonada Bufferizada al 0.1%. Se masajearon bien las piezas y se dejaron en incubación a 35°C por un período de 18-24 horas.

Luego de pasar el período de incubación, se traspasó 1 ml de cada uno de los caldos a 9 ml de Enterococcosel suplementado con 6 µg/ml de vancomicina. Estos se dejaron en incubación a 37°C por un período de 24-48 horas.

A partir de los caldos positivos de Enterococcusel suplementado con vancomicina (aquellos que presentaran un ennegrecimiento del medio), se rayó 2 placas de Agar Kanamicina-Esculina-Azida y se incubaron a 35°C y a 43°C por 48 horas.

A las colonias sospechosas obtenidas en este medio, se les realizó la tinción de Gram. Las colonias de cocos Gram positivos se rayaron en placas de Agar Infusión Cerebro Corazón suplementado con 6 µg/l de vancomicina y se incubó por 24-48 horas a 35°C.

A las colonias purificadas obtenidas en el AICC con vancomicina se les volvió a realizar la tinción de Gram. Además, se les realizó la prueba de catalasa, hidrólisis de esculina y crecimiento en sal.

Todos los cocos Gram-positivos, catalasa negativos, con capacidad de hidrolizar esculina y de crecer en un medio conteniendo 6.5% de NaCl se consideraron *Enterococcus* vancomicina resistentes.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se subcultivaron las cepas en placas de Agar Sangre sin antibióticos y se incubaron a 35°C por un periodo de 18 horas. Posteriormente se realizaron suspensiones de cada una de las cepas al 0.5 Mc Farland en Solución Salina Estéril. Posteriormente se realizó una dilución de 1/100 de cada una de las suspensiones.

Por último, se sembraron 10µl de las diluciones en placas de Agar Infusión Cerebro Corazón con un volumen de 24 ml y con distintas concentraciones de vancomicina. Las concentraciones de vancomicina utilizadas fueron 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 µg/ml. Luego se incubaron a 35°C por 24 horas y se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria como la primera de las concentraciones de vancomicina a la cual no se presentaba crecimiento.

Se utilizó como control sensible a vancomicina la cepa 322 y como control resistente la cepa ATCC 51299 de *E. faecalis*

Resultados

Se recolectaron 32 piezas de pollo de diferentes establecimientos comerciales distribuidos de la siguiente manera:

Cuadro 1. Distribución de las muestra tomadas de la provincia de Alajuela.

No. de muestra	Establecimiento comercial	Distribuidora de pollo	Peso (g)
A1	La Despensa	Propokodusa	278
A2	Agencia As de Oros	As de Oros	266
A3	Super Pollo # 6	As de Oros	260
A4	Distribuidora Arroquí	Pollos Tío Pepe	285
A5	Distribuidora La Barrita	Pipasa	269
A6	Agencia As de Oros	As de Oros	265
A7	Distribuidora Pipasa	Pipasa	253
A8	Agencia As de Oros	As de Oros	295
A9	Más por Menos	Suave	268

Cuadro 2. Distribución de las muestra tomadas de la provincia de San José.

No. de muestra	Establecimiento comercial	Distribuidora de pollo	Peso (g)
SJ1	La Preferida	Suave	328
SJ2	Distribuidora Pipasa	Pipasa	310
SJ3	El Corral	Pollos Tío Pepe	283
SJ4	Super Pollo # 2	As de Oros	275
SJ5	Tramo La Catalina	Pollos Tío Pepe	333
SJ6	Automercado	Suave	292
SJ7	Abastecedor El Mercado	Pipasa	312
SJ8	Agencia Pipasa	Pipasa	255
SJ9	El Planeta Azul	Pipasa	345

SJ10	Megasúper	As de Oros	291
SJ11	Carnicería La Criolla	Pollos Tío Pepe	267
SJ12	Super ave	Suave	284

Cuadro 3. Distribución de las muestra tomadas de la provincia de Heredia

No. de muestra	Establecimiento comercial	Distribuidora de pollo	Peso (g)
H1	Hipermás	Suave	326
H2	Más por Menos	Suave	262
H3	Agencia Pipasa	Pipasa	318
H4	Distribuidora San Martín	Pipasa	288
H5	Distribuidora Hermanos Alpízar	As de Oros	255
H6	Periféricos	Pollos Tío Pepe	274

Cuadro 4. Distribución de las muestra tomadas de la provincia de Cartago.

No. de muestra	Establecimiento comercial	Distribuidora de pollo	Peso (g)
C1	Megasuper	As de Oros	294
C2	Supercarnes Montecillos	Pipasa	255
C3	Distribuidora La Amistad	Pipasa	340
C4	Distribuidora San Martín	Suave	330
C5	Altamar	Pipasa	295

Del total de muestras analizadas, el 34.4% eran distribuidas a los abastecimientos comerciales por la distribuidora de pollo Pipasa, un 25% por As de Oros, un 21.9% por Suave, un 15.6% por Pollos Tío Pepe y un 3.1% por Propokodusa.

De las 32 muestras analizadas, 24 (75%) se consideraron positivas ya que hubo crecimiento en las placas de AICC con 6 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Se encontraron distribuidas de la siguiente manera; en Alajuela de 9 muestras 6 se consideraron positivas

(66%), en Heredia 4 de 6 muestras fueron positivas (66%), en San José lo fueron 10 de 12 muestras analizadas (83%) y en Cartago 4 de 5 muestras analizadas (80%).

De estas 24 muestras positivas, se obtuvo un total de 72 cepas, de las cuales 7 presentaron una MIC de 8 $\mu\text{g/ml}$ (9.7%), 58 una MIC de 16 $\mu\text{g/ml}$ (80.6%), 3 una MIC de 32 $\mu\text{g/ml}$ (4.1%), 2 una MIC de 64 $\mu\text{g/ml}$ (2.8%), 1 una MIC de 128 $\mu\text{g/ml}$ (1.4%) y 1 una MIC de 512 $\mu\text{g/ml}$ (1.4%); como puede observarse en el cuadro 5 y en la figura 1.

Cuadro 5. Resultados de las MIC obtenidas de cada una de las cepas.

Cepa	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Cepa	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
A4.1	8	SJ1.1	16
A4.3	16	SJ1.4	16
A4.4	8	SJ2.1	16
A4.5	16	SJ2.2	16
A4.6	16	SJ2.5	64
A5.3	16	SJ3.1	16
A6.1	16	SJ3.3	16
A6.2	16	SJ3.4	16
A6.3a	32	SJ4.1	16
A6.3b	8	SJ4.2	512
A7.1	16	SJ4.3	16
A7.3	16	SJ5.1	16
A7.4B	16	SJ5.2	16
A8.2	32	SJ5.3	16
A9.1	16	SJ6.2	16
A9.3	16	SJ6.3	16
H.32A	8	SJ7.1	16
H1.3	16	SJ7.2	16
H3.1	16	SJ7.3	16
A7.2	16	SJ7.4	16

A6.4	16	SJ8.1	16
A7.4A	16	SJ8.2	16
A8.1	16	SJ9.1	16
A9.2	16	SJ9.2	64
H1.1	16	SJ9.3	16
H1.2	16	SJ10.1	16
H2.1	16	SJ10.2	16
H2.2	16	SJ10.3	16
H2.3	16	SJ10.4	16
H3.2	16	C1.3	16
H3.4	8	C1.4	16
H4.4	16	C2.1	16
A8.3	16	C2.4	128
H4.1	32	C4.1	16
H4.2	8	C4.2	16
H4.3	8	C5.1	16

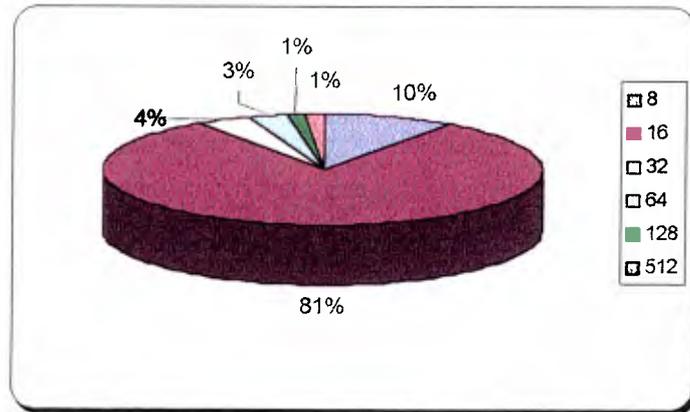


Figura 1. Distribución de las MIC obtenidas de las muestras positivas

De acuerdo con las MIC obtenidas, 65 cepas se consideraron como *Enterococcus* de sensibilidad intermedia a la vancomicina, puesto que sus MIC se encontraban entre 4-32 $\mu\text{g/ml}$. Solamente 7 cepas (9.7%) se consideraron como *Enterococcus* vancomicina resistentes puesto que sus MIC eran mayores o iguales a 32 $\mu\text{g/ml}$.

De estas 7 cepas de *Enterococcus* vancomicina resistentes, 3 de ellas provenían de San José, 2 de Alajuela, 1 de Heredia y otra de Cartago. Cuatro de las cuales eran distribuidos por Pipasa, representando un 57.1% de todas las cepas resistentes; y tres de ellas por As de Oros que corresponde al 43.9% restante. Las dos cepas de mayor resistencia fueron aisladas de las provincias de San José y Cartago. Se aislaron cepas de resistencia intermedia a la vancomicina en pollos de abastecimientos comerciales distribuidos por Pollos Tío Pepe y Suave, sin embargo no se aislaron *Enterococcus* vancomicina resistentes en piezas de pollo de estas distribuidoras. En la distribuidora Propokodusa no se aisló ninguna cepa de *Enterococcus* vancomicina resistente ni de susceptibilidad intermedia.

Discusión

Hoy en día, los enterococos se constituyen como uno de los mayores problemas de infecciones nosocomiales y comunitarias en el ámbito mundial. Se les puede aislar de un amplio rango de hospederos, así como de una serie de sitios anatómicos, en donde pueden o no estar causando patología, por lo que su dispersión se ha visto aumentada sobre todo en aquellos organismos que presentan un mecanismo de resistencia que se pueda transferir de una especie resistente a una susceptible (Woodford *et al.*, 1995).

Se ha informado de aislamientos de *Enterococcus* resistentes a vancomicina alrededor del mundo, incluyendo Bélgica, Francia, Alemania, Italia, Reino Unido y Estados Unidos de América. El primer brote nosocomial por VRE se reportó en Reino Unido a finales de La década de 1980 y el número de hospitales afectados se ha incrementado recientemente. En los Estados Unidos de América el aumento en la prevalencia de VRE también se ha evidenciado últimamente (Woodford *et al.*, 1995).

En nuestro país, la presencia de *Enterococcus* vancomicina resistentes se demostró por primera vez por medio de un estudio realizado en el Hospital Nacional de Niños con pacientes de menos de un día de internamiento donde se encontró una colonización intestinal de 1.9% (Jiménez *et al.*, 1998). Este hallazgo motivó a la búsqueda de posibles fuentes extrahospitalarias como posible reservorio de EVR (Hernández *et al.*, 2000).

A nivel europeo las carnes son consideradas como posibles reservorios de EVR. La carne de pollo se considera como un reservorio importante debido a las malas prácticas durante el proceso de esviscerado. Esto por cuanto en la mayoría de los casos se realiza de manera mecánica adaptado al peso y tamaño estándar de un pollo promedio, por lo que generalmente durante esta etapa se produce la ruptura del intestino del ave con la consecuente contaminación del producto con material fecal.

Tomando en cuenta de que la pieza de pollo se trata de un alimento crudo y que se espera esté contaminado con material fecal, se buscó un método para estandarizar el aislamiento de EVR en estas piezas, de manera que se utilizaran medios suficientemente

enriquecidos para el aislamiento de *Enterococcus*, y a su vez selectivos para el resto de bacterias, principalmente las enterobacterias que se espera se encuentren en grandes cantidades en este tipo de alimentos.

El primer paso para el aislamiento, constó en una incubación de la pieza en Agua Peptonada Bufferizada, esto a manera de preenriquecimiento, ya que las piezas de pollo normalmente se encuentran refrigeradas o congeladas y puede producirse el deterioro de las bacterias presentes en el alimento. La incubación con Enterococcosel y vancomicina, resulta en un paso de enriquecimiento selectivo, por la presencia no sólo del antibiótico de acción contra la mayoría de las bacterias Gram positivas, sino también por la presencia de otras sustancias como la bilis que puede inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas, y la azida de sodio contra bacterias Gram negativas. De acuerdo a estudios realizados por Van Horn y colaboradores, este es un muy buen medio para el aislamiento de *Enterococcus* vancomicina resistentes, ya que inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* vancomicina sensibles entre otros microorganismos (Van Horn *et al.*, 1996).

Luego de la etapa de enriquecimiento selectivo, le sigue la etapa del aislamiento selectivo y diferencial en el medio Agar Kanamicina-Esculina-Azida. Este medio resulta selectivo por la presencia de kanamicina y azida de sodio con acción contra Gram negativos. La temperatura a la cual se incubó (43°C) resulta a su vez un parámetro selectivo para el crecimiento de la mayoría de bacterias Gram positivas como Gram negativas. La presencia de esculina hace de éste un medio diferencial puesto que permite la diferenciación de bacterias capaces o no de hidrolizarla.

En una investigación realizada por Alpízar y Pacheco se logró demostrar un porcentaje de positividad de un 14.0% de VRE obtenidos del contenido intestinal directamente de la cloaca de pollos (Alpízar *et al.*, 1999) Así mismo, se realizó posteriormente una investigación del contenido intestinal de bovinos y porcinos, obteniéndose porcentajes de positividad de 14.6% y 11.1% respectivamente (Hernández *et al.*, 2000).

Si se realiza una comparación con los resultados obtenidos en la investigación realizada por Alpizar y Pacheco en 1999, se puede observar que el porcentaje de positividad fue inferior en ese estudio (14.1%) que el obtenido en la presente investigación, el cual fue de un 75%. Así mismo, la mayoría de las cepas aisladas en el estudio de Alpizar y Pacheco presentaron alta resistencia a la vancomicina con MIC superiores a 512 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la mayoría de las cepas aisladas en esta investigación presentaron baja resistencia a la vancomicina con MIC de 16 $\mu\text{g/ml}$. Estas diferencias pueden explicarse desde diversos puntos.

Como primero, tenemos que los métodos utilizados para el aislamiento de *Enterococcus* vancomicina resistentes fueron diferentes en ambos estudios. En el caso del estudio de Alpizar y Pacheco, consistió en el rayado directo de la muestra a placas con AICC suplementado con vancomicina. En la presente investigación la muestra se procesó utilizando diferentes medios de enriquecimiento selectivo para *Enterococcus*, por lo que el aumento de la ocurrencia podría explicarse de acuerdo a un mayor enriquecimiento de la muestra.

Por último no se conocen con exactitud las cifras de avoparcina utilizadas en 1998, que fue el año en el cual se realizaron los muestreos para la investigación realizada por Alpizar y Pacheco; ni las cifras utilizadas en el año 2001, fecha en la cual se llevó a cabo el muestreo de la presente investigación. Es conocido que el abolir el uso de la avoparcina como promotor de crecimiento animal disminuye drásticamente el número de *Enterococcus* con altos niveles de resistencia a la vancomicina en animales de granja. Las diferencias en cuanto a los niveles de resistencia de estos dos estudios pueden deberse a una disminución en el uso de este glicopéptido como promotor de crecimiento animal.

Por ejemplo, estudios realizados por Aarestrup y colaboradores en Dinamarca, en donde la prohibición del uso de la avoparcina como promotor de crecimiento se dio en el año 1995; indican una disminución significativa del porcentaje de EVR aislados a partir del año siguiente. En esta investigación, se reporta en animales de granja un porcentaje de enterococos resistentes de un 72.7% en 1995. Para 1996 este porcentaje había disminuido a

42.5%, en 1997 fue de 20.8% y continuó disminuyendo en 1998 donde fue de 8.4%, en 1999 se presentó un ligero incremento de 9.0 %, para volver a disminuir en el 2000 con un porcentaje de positividad de 5.8% (Figura 2)

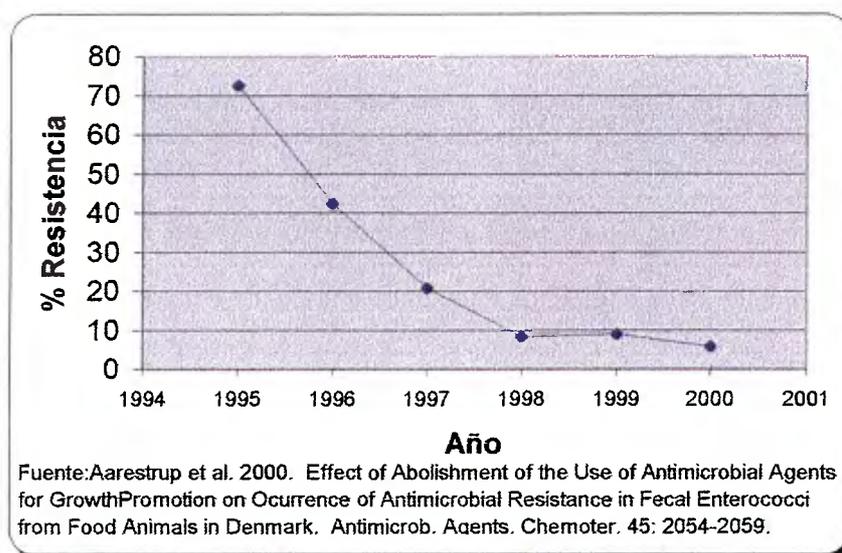


Figura 2. Efecto de la abolición de la avoparcina sobre el porcentaje de VRE

En cuanto a las cepas aisladas, 65 de ellas presentaron MIC de 8-16 $\mu\text{g/ml}$. Es probable que estas cepas sean de fenotipo VanC, puesto que presenta bajos niveles de resistencia a la vancomicina.

De las 7 cepas restantes, 2 de ellas presentan MIC superiores a 128 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Es muy probable que estas cepas sean de fenotipo VanA, puesto que presentan un alto nivel de resistencia a la vancomicina, y además en nuestro país aún no se han aislado cepas de fenotipo VanB, que es el otro fenotipo que exhibe un patrón de resistencia de mediano a alto. Las otras 5 cepas restantes presentan MIC de 32-64 $\mu\text{g/ml}$ y pueden coincidir tanto con el fenotipo VanA como VanC. Típicamente los *Enterococcus* vancomicina resistentes del fenotipo VanA corresponden a las especies *E.faecalis* y

E.faecium, con MIC muy elevadas. Sin embargo, debido a que este tipo de fenotipo de resistencia es transferible, se han aislado *Enterococcus* de fenotipo VanA en otras especies, incluyendo en *E.avium*, para las cuales los niveles de resistencia son inferiores de manera que expresan MIC de 32-64 $\mu\text{g/ml}$ (Harwood *et al.*, 2001).

Conclusiones

- Se logró demostrar la presencia de *Enterococcus* vancomicina resistentes en piezas de pollos de abastecimientos comerciales.
- Puede concluirse que el método empleado en el aislamiento de *Enterococcus* vancomicina resistentes en productos alimenticios de origen animal es efectivo.
- Se puede concluir que la ocurrencia de *Enterococcus* vancomicina resistentes en piezas de pollo de abastecimientos comerciales es de un 75%.
- Se determinó que solamente un 9.7% de los aislamientos realizados presentan niveles altos de resistencia a la vancomicina.

Referencias

- Aarestrup, F. 2000. Characterization of Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from Broilers and Pigs in Denmark: Genetic Evidence that Persistence of GRE in Pig Herds Is Associated with Coselection by Resistance to Macrolides. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2774-2777.
- Aarestrup, F.M.; A. Seyfarth, H. Emborg, K. Peddersen, R. Hendriksen, F. Bager. 2001. Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 45: 2054-2059.
- Alpizar, A., A. Pacheco. 1999. Ocurrencia de *Enterococcus vancomicina* resistente en contenido intestinal de pollo. Trabajo Final de Graduación. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Boerling, P.; A. Wissing, F.M. Aarestrup, J. Frey, J. Nicolet. 2001. Antimicrobial Growth Promoter Ban and Resistance to Macrolides and Vancomycin in Enterococci from Pigs. *J.Clin. Microbiol.* 39: 4193-4195.
- Butaye, P.; L. Devriese, F. Haesebrouck. 2001. Differences in Antibiotic Resistance Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Farm and Pet Animals. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 45: 1374-1378.
- Cetinkaya, Y.; P. Falk, G. Mayhall. 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686-707.

- Endtz, H., N. Van Den Braak, A. Van Belkum, m. Van Keulen, J. Vliegthart, H. Verbrugh. 1998. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospitalized Patients and Poultry Products in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 36:1927-1932.
- Forbes, B.A., D.F. Sahm, A.S. Weissfeld. 1998. *Streptococcus, Enterococcus, and similar organisms*, pp.620-625. En J. Roche (ed), *Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology*, 10th ed. Mosby, St.Louis, MO.
- García, F.; W. Bustamante, M. Caballero, A. Alpízar, S. Hernández, A. Pacheco, N. Vargas, G. Bonilla, J. Molina, M. Herrera, A. Vargas. Predominance of *vanA* genotype among vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates from poultry and swine in Costa Rica.
- Harwood, V.; M. Brownell, W. Perusek, J. Whitlock. 2001. Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4930-4933.
- Hernández, S., N. Vargas. 2000. Ocurrencia de *Enterococcus vancomicina* resistente en contenido intestinal de bovinos y porcinos. Trabajo Final de Graduación. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Jacoby, G. 1996. Antimicrobial-Resistant Pathogens in the 1990s. *Annu. Rev. Med.* 47:169-179.
- Jiménez, A.L., M.L. Avila-Agüero, M.A. Umaña, M.L. herrera, I. Faigenzicht, M.M. Paris. 1998. Outpatient prevalence of vancomycin-resistant enterococcal enterical

colonization in children. Servicio de Infectología, Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica. ICAP.

- Johnson, C., M. Whitman, P. Pitsakis, E. DeJesús, A. Osborne, M. Levison. 1996. Gastrointestinal Tract Colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in an Animal Model. *Antimicrob. Agents. Chemot.* 40: 1526-1530.
- McDonald, L.; M. Kuehnert, F. Tenover, W. Jarvis. Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting: Prevalence, Sources, and Public Health Implications. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol3no3/mcdonald.htm>
- Mundy, L.; D. Sahn, M. Gilmore. 2000. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 513-522.
- Murray, B. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no1/murray.htm>
- Robredo, B.; K. Singh, F. Barquero, B. Murray, C. Torres. 1999. From *vanA* *Enterococcus hirae* to *vanA* *Enterococcus faecium*: a Study of Feed Supplementation with Avoparcin and Tylosin in Young Chickens. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 43: 1137-1143.
- Rosenberg, J., F. Tenover, J. Wong, W. Jarvis, D. Vugia. 1997. Are Clinical Laboratories in California Accurately Reporting Vancomycin-Resistant Enterococci?. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2526-2530.
- Shlaes, D. y L. Rice. 1994. Bacterial resistance to the cyclic glycopeptides. *Trends in Microbiology.* 10: 385-388.

- Van Horn, K., C. Gedris, K. Rodney. 1996. Selective Isolation of Vancomycin-Resistant Enterococci. *J.Clin.Microbiol.* 34: 924-927.
- Wegener, H.; F. Aarestrup, L. Jensen, A. Hammerum, F. Bager. 1999. Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and *Enterococcus faecium* Resistance to Therapeutic Antimicrobial Drugs in Europe.
<http://id.medscape.com/govmt/CDC/EID/1999/v05.n03.wege/pnt-e0503.03.wege.html>
- Woodford, N., A. Johnson, D. Morrison y D. Speller. 1995. Current Perspectives on Glycopeptide Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:585-615.
- Woodford, N., A. Adebiyi, M. Palepou, B. Cookson. 1998. Diversity of VanA Glycopeptide Resistance Elements in Enterococci from Humans and Nonhumans Sources. *Antimicrob. Agents. Chemot.* 42: 502-508.
- Zervos, M.J., L.A. Thal, J.W. Chow, R. Mahayni, H. Bonilla, M.B. Perri, S.A. Donabedian, J. Silverman, S.Taber. 1995. Characterization of Antimicrobial Resistance in Enterococci of Animal Origin. *Antimicrob. Agents. Chemot.* 39: 2112-2115.