

Universidad de Costa Rica

Facultad de Microbiología

**Ocurrencia de *Enterococcus vancomicina* resistente en contenido intestinal
de bovinos y porcinos**

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

Silvia Hernández R

Natalia Vargas B.

Tutor: Fernando García, Ph. D.

Laboratorio de Bacteriología Médica

San José, Costa Rica

2000

Dedicatoria

A nuestros padres por su apoyo y orientación constante a lo largo de nuestra carrera, sin ellos nada de esto sería posible

A Edgar Alonso (q.d.D.g.), quien nos dio un gran ejemplo de valentía, perseverancia y amor a la vida.

Agradecimientos

Nuestro más sincero agradecimiento al Dr. Fernando García, nuestro amigo y tutor, quien con su dedicación y enseñanzas nos permitió realizar y culminar este trabajo. Gracias por inculcar en nosotras el amor a la ciencia y en especial a la bacteriología.

Dr. Warner Bustamante, por su gran ayuda y orientación a lo largo de nuestro trabajo.

Señora Dagmar Utzinger, por sus conocimientos y colaboración, pero sobre todo por el apoyo y la alegría que siempre nos brindó.


Señor Denis Camareno, por su valioso trabajo y su actitud siempre servicial.

Ing. José Ramón Molina y Dr. Gonzalo Bonilla, del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica, por su ayuda en la recolección de las muestras porcinas.

Dra. Magaly Caballero, por el suministro de las muestras bovinas y la información brindada para la realización del trabajo.

Dr. Marco Luis Herrera y Dr. Alvaro Vargas del Hospital Nacional de Niños, por su colaboración en la identificación de las especies de *Enterococcus*.

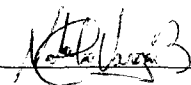
Dr. Esteban Chaves y Dr. Francisco Hernández por sus valiosas observaciones en la revisión de nuestro trabajo.



Fernando García S., Ph.D.



Silvia Hernández R.



Natalia Vargas B.

Indice

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	7
Metodología	8
Materiales	8
Reactivos	8
Medios de cultivos	8
Métodos	11
Recolección de la muestra	11
Procesamiento de la muestra	11
Identificación fenotípica del género	11
Identificación de especies	11
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima	11
Resultados	13
Discusión	24
Referencias	29
Anexos	34
Anexo 1	35
Anexo 2	38

Resumen

La mayoría de bacterias del género *Enterococcus* poseen resistencia intrínseca a muchos antimicrobianos. Adicionalmente estos organismos pueden expresar una resistencia adquirida mediante la incorporación de plásmidos o transposones. La vancomicina es uno de los pocos antibióticos que tiene actividad inhibitoria consistente, aunque ésta no es bactericida. Los primeros aislamientos de cepas de *Enterococcus* vancomicina-resistente (EVR) se empezaron a reportar a finales de la década de los 1980s. En la presente investigación se determinó la frecuencia de EVR en 130 muestras de contenido intestinal de bovinos y 350 muestras de contenido intestinal de porcinos, recolectadas de abril de 1999 a marzo de 2000. El medio de aislamiento utilizado fue el agar Infusión Cerebro-Corazón con una concentración de 6µg/ml de vancomicina. También se realizó la identificación de especie mediante el sistema Vitek usando tarjetas GPI y la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) a la vancomicina a todas las cepas obtenidas mediante la técnica de dilución en agar. A 56 cepas se les analizó paralelamente la sensibilidad a vancomicina mediante el sistema Vitek y el método de dilución en agar. Un 14.6% y un 11.1% de las muestras de contenido intestinal de bovinos y porcinos, respectivamente, fueron positivas por EVR. *Enterococcus casseliflavus* (74.2%) y *Enterococcus gallinarum* (12.9%) fueron las especies más prevalentes en bovinos; en porcinos fueron *Enterococcus faecium* (39.0%) y *Enterococcus faecalis* (32.2%). El 87.1% de las cepas aisladas de bovinos presentaron una MIC a vancomicina de 8 µg/ml; el 87.1% de las cepas de porcinos mostraron una MIC para vancomicina > 512 µg/ml. En porcinos, la mayor incidencia de EVR se presentó en el grupo de las gestantes (23.7%), seguido, en igual porcentaje (10.0%), por las etapas de lactantes, desarrollo y engorde.

Palabras claves: *Enterococcus*, vancomicina, resistencia.

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 con altas concentraciones de sal e hidrolizar la 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 humanos y otros animales (Forbes *et al.* 1998). Su importancia clínica radicaba, hasta hace poco, en su patogenicidad ocasional al ser humano, causando infecciones de origen endógeno como endocarditis y meningitis.

Recientemente este grupo bacteriano ha tomado una mayor importancia como causante de infecciones intrahospitalarias, entre las que se incluyen infecciones del tracto urinario, bacteremias, endocarditis, infecciones mixtas de abdomen y pelvis, heridas quirúrgicas y ocasionalmente infecciones oculares (Forbes *et al.* 1998). Aunque gran variedad de especies de este género han sido aisladas de infecciones en humanos, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* representan cerca del 80% de los aislamientos clínicos (Huycke *et al.* 1998).

La mayoría de enterococos poseen resistencia natural o intrínseca a varias drogas, incluyendo cefalosporinas y penicilinas semisintéticas resistentes a penicilinasas, así como concentraciones clínicas de clindamicina y aminoglicósidos. Muchas de estas bacterias son tolerantes a los efectos bactericidas de agentes activos a nivel de pared celular, incluyendo ampicilina y vancomicina. Sin embargo, datos recientes sugieren que esta propiedad no es intrínseca, sino inducida posterior a la exposición a la droga (Murray 1998). En adición a la

resistencia natural a muchos antimicrobianos, los enterococos han desarrollado resistencia mediada por plásmidos y transposones a tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, trimetoprim y clindamicina (Murray 1998).

Entre los pocos antibióticos que muestran actividad inhibitoria consistente, pero no bactericida, contra enterococos están penicilina, ampicilina, piperacina, imipenem y vancomicina (Huycke *et al.* 1998). Sin embargo, en 1988 se informó en Europa de los primeros aislamientos de *Enterococcus* vancomicina-resistente (EVR) (Mc Donald *et al.* 1997). En la resistencia a la vancomicina están involucrados múltiples genes y se conocen cinco fenotipos; tres de ellos designados VanA, VanB y VanC (cuadro 1). Se han descrito dos fenotipos adicionales, denominados VanD y VanE, los cuales fueron encontrados, respectivamente, en una cepa de *E. faecium* (Jacoby 1996; Murray 1998; Perichon *et al.* 1997) y en una cepa de *E. faecalis* aislada del fluido peritoneal de un paciente con peritonitis tratado con vancomicina (Fines *et al.* 1999).

Cuadro 1. Características generales de la resistencia a glicopéptidos en cepas de *Enterococcus*§.

Fenotipo	Genotipo	MIC (µg/ml)		Expresión	Transferible por Conjugación	Especies
		Vancomicina	Teicoplanina			
VanA	<i>vanA</i>	64 - > 1000	16 - 512	Inducible	+	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. raffinosus</i>
VanB	<i>vanB</i>	4 - 1000	0.5 - 1	Inducible	+	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
VanC	<i>vanC-1</i>	2 - 32	0.5 - 1	Constitutiva	-	<i>E. gallinarum</i>
	<i>vanC-2</i>	2 - 32	0.5 - 1	Constitutiva	-	<i>E. casseliflavus</i>
	<i>vanC-3</i>	2 - 32	0.5 - 1	Constitutiva	-	<i>E. flavescens</i>

§Modificado de Jacoby 1996.

Numerosos factores predisponen a una persona a sufrir una infección por EVR, pero la colonización precede la mayoría de las infecciones (Edmond *et al.* 1995). Aunque se ha descrito la transmisión nosocomial de paciente a paciente y la introducción de cepas EVR de sitios endémicos a algunos hospitales (Edmond *et al.* 1995), aún no se ha dilucidado de dónde y cómo se originan las cepas de EVR que actúan como residentes nosocomiales.

En algunos informes se ha descrito que la colonización de personas con EVR ocurre frecuentemente en las comunidades (Donnelly *et al.* 1996) y se ha logrado aislar EVR de voluntarios sanos, drenajes y fuentes animales, incluyendo carne de pollo cruda (Coque *et al.* 1996). Un factor importante asociado con EVR en las comunidades europeas ha sido el uso de avoparcina, un glicopéptido antimicrobiano utilizado en dosis subterapéuticas como promotor de crecimiento en animales para consumo humano (Collignon y Partridge. 2000, Devriese *et al.* 1996, Mc Donald *et al.* 1997, Wegener *et al.* 1999). Aunque en los Estados Unidos el uso de avoparcina es prohibido, el aumento en los hospitales de la terapia con vancomicina y otras drogas antimicrobianas constituye un factor de riesgo importante en la infección humana con EVR. Se conoce claramente, que el uso de antibióticos en los centros de salud, altera la flora bacteriana intestinal, predisponiendo a los pacientes a la infección con EVR provenientes de otros pacientes colonizados o infectados. Por otro lado, existen evidencias epidemiológicas que indican la colonización en la comunidad por ingestión de alimentos contaminados con EVR, esta contaminación puede provenir de materia fecal. (Figura 1)

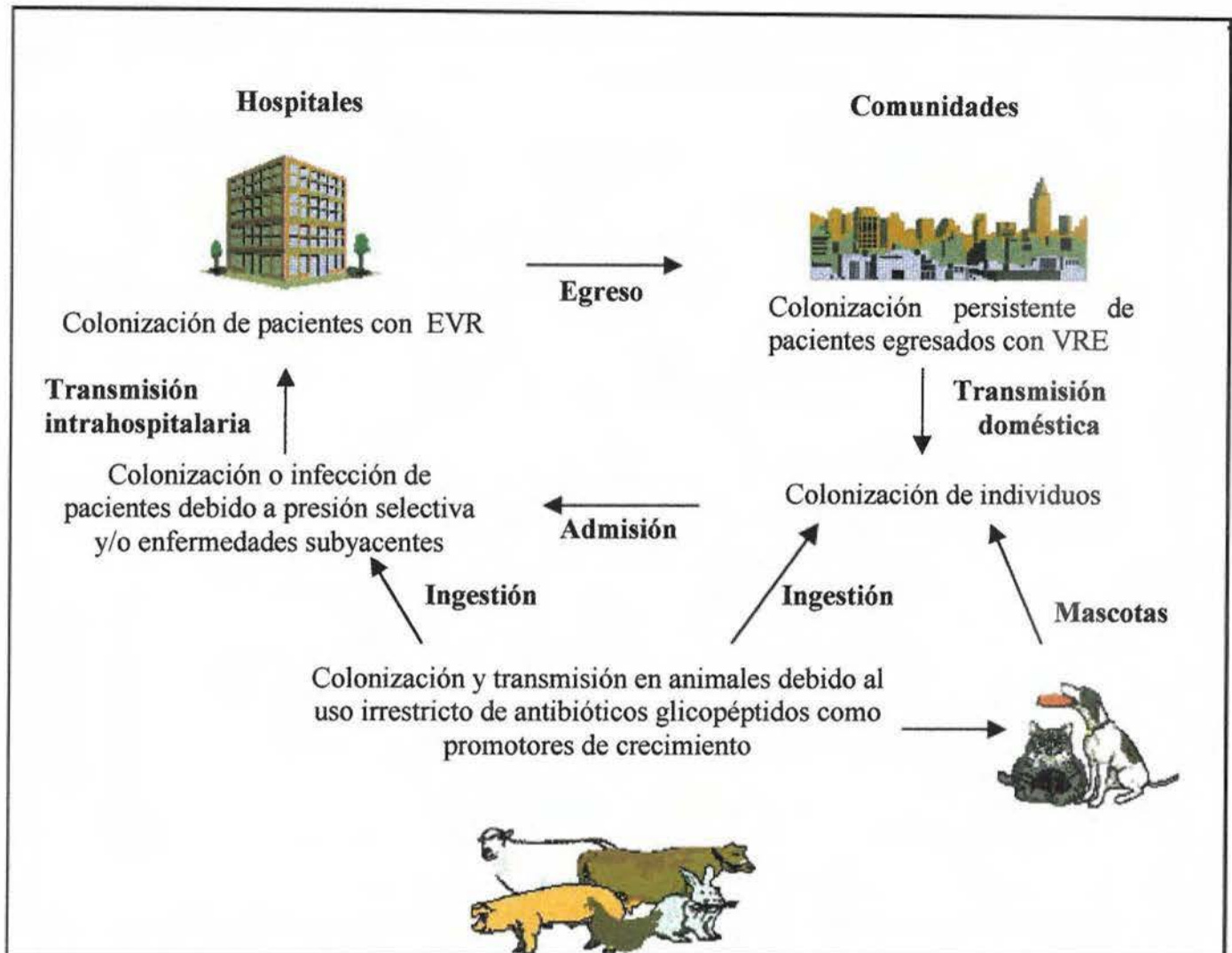


Figura 1. Representación esquemática de las posibles rutas de transmisión de *Enterococcus vancomicina-resistente*.

En Costa Rica, un estudio realizado en el Hospital Nacional de Niños, demostró la colonización intestinal por EVR en el 1.9% de pacientes con menos de un día de internamiento (Jiménez *et al.* 1998). Estudios posteriores realizados por Alpízar y Pacheco (1999), demostraron la presencia de cepas de EVR en el 14.0% del contenido intestinal de pollos en muestreos realizados en un matadero nacional.

Debido a las implicaciones que estos resultados tienen en la salud pública, se hace necesario la búsqueda de EVR en diferentes fuentes extrahospitalarias para poder determinar los posibles mecanismos de transmisión de las diferentes cepas de EVR y de los determinantes de la resistencia a glicopéptidos.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar la ocurrencia de *Enterococcus* vancomicina resistente en contenido intestinal de bovinos y porcinos.

Objetivos Específicos

1. Analizar, al menos, cien muestras de heces de bovinos por la presencia de *Enterococcus* vancomicina resistente.
2. Analizar, al menos, doscientas muestras de heces de porcinos por la presencia de *Enterococcus* vancomicina resistente.
3. Realizar la identificación bioquímica a nivel de especie mediante el sistema Vitek de las cepas aisladas.
4. Determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) a la vancomicina de las cepas aisladas.

Metodología

Materiales

Reactivos

Solución de H₂O₂ al 35%

Vancomicina 50 mg/ml

Solución de azida de sodio al 10% (w/v)

Medios de cultivo

Agua peptonada buferizada

- 10.0 g Bacto Triptona
- 5.0 g NaCl
- 3.5 g Na₂HPO₄
- 1.5 g KH₂PO₄
- 1 litro de agua destilada
- pH 7.2

Agar Infusión Cerebro-Corazón (AICC) conteniendo 6 µg/ml vancomicina y 0.04% (w/v) de azida de sodio (NaN₃)

- 37.0 g Caldo Infusión Cerebro-Corazón (CICC)
- 15.0 g Agar
- 120.0 µl vancomicina (50 mg/ml)
- 4.0 ml NaN₃ 10% (w/v)
- H₂O destilada: cantidad suficiente para (c.s.p.) 1 litro

Caldo base púrpura de bromocresol con glucosa y 6.5 % NaCl

- 1.0 g extracto de carne
- 10.0 g peptona
- 65.0 g NaCl
- 0.015 g púrpura de bromocresol
- 10.0 g glucosa
- H₂O destilada: c.s.p. 1 litro
- pH 6.8 – 7.0

Agar bilis-esculina

- 3.0 g extracto de carne
- 5.0 g peptona
- 40.0 g Oxygall (bilis)
- 1.0 g esculina
- 0.5 g citrato férrico
- 15.0 g agar
- H₂O destilada: c.s.p. 1 litro
- pH 7.0

Agar Infusión Cerebro-Corazón con diferentes concentraciones de vancomicina para la prueba de la MIC

- 37.0 g CICC
- 15.0 g Agar Agar
- H₂O destilada: c.s.p. 1 litro
- Volumen de vancomicina según la concentración deseada basándose en la siguiente relación:

Concentración en $\mu\text{g/ml}$	Volumen de vancomicina (50 mg/ml) en $\mu\text{l/l}$ AICC
0	0
2	4
4	8
8	16
16	32
32	64
64	128
128	256
256	512

Se depositan 24 ml del medio con la vancomicina por placa de Petri y se dejan solidificar en una superficie a nivel. Las placas se cubren con papel kraft para evitar que el paso de la luz altere la vancomicina.

Métodos

Recolección de muestras. Se recolectaron hisopados rectales de bovinos, con torundas de algodón estéril, en las fincas de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional, ubicada en la provincia de Heredia, y en la finca MECANARO, ubicada en La Fortuna de San Carlos. Los hisopados rectales de porcinos fueron proporcionados por el Centro de Investigación y Nutrición Animal (CINA), y se colectaron en cuatro diferentes porquerizas nacionales. Ambos tipos de muestra se transportaron a 4°C al Laboratorio de Bacteriología Médica en la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Procesamiento de la muestra.

Cada torunda se colocó en un tubo con 2 ml de agua peptonada buferizada más 0.04% de azida de sodio, se homogeneizó y se incubó a 37° C por 24 horas. Posteriormente se sembró cada muestra en un plato que contenía AICC con 6.0 µg/ml de vancomicina y 0.04 % de azida de sodio y se incubó hasta por 48 horas a 37° C.

Identificación fenotípica de género. Se usaron como patrones de comparación visual, las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* UCR 7A. De cada muestra sospechosa proveniente del AICC con vancomicina y azida de sodio se procedió a aislar, en agar sangre con 6.0 µg/ml de vancomicina, hasta tres morfotipos coloniales. Se incubó a 37° C de 24 a 48 horas y se realizó a cada aislamiento una identificación parcial por medio de la tinción de Gram, reacción de catalasa, crecimiento en NaCl al 6.5% e hidrólisis de esculina en presencia de sales biliares. Se consideró como posible miembro del género

Enterococcus todo coco Gram positivo, catalasa negativa, bilis esculina positivo y capaz de crecer en 6.5% de NaCl. Para la prueba de catalasa se utilizó como control positivo la cepa de *Staphylococcus aureus* UCR 415 y para las demás pruebas los controles positivos fueron *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* UCR 7A.

Identificación de especie La identificación hasta especie se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Nacional de Niños mediante el uso del sistema automatizado Vitek de la casa bio Mérieux.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima Se realizó en placas de agar infusión cerebro corazón con vancomicina a concentraciones de 0.0 µg/ml, 2.0 µg/ml, 4.0 µg/ml, 8.0 µg/ml, 16.0 µg/ml, 32.0 µg/ml, 64.0 µg/ml, 128.0 µg/ml, 256 µg/ml y 512 µg/ml.

Se dividió cada placa, en su parte posterior, en una cuadrícula con 12 rectángulos de 2.0 x 1.5 cm de lado. Para el cultivo de cada cepa se realizó una suspensión en fase logarítmica (24 horas de crecimiento) utilizando el estándar de McFarland 0.5 y se depositó con micropipeta 10 µl de la suspensión en el espacio correspondiente, previamente rotulado. Se usó como control sensible a vancomicina la cepa ATCC 29212 y como control resistente la cepa UCR 7A (MIC ≥ 256 µg/ml). Se incubó 24 horas a 37° C.

Se estableció como sensible para la vancomicina una MIC ≤ 4 µg/ml, intermedio entre 4 y 32 µg/ml y resistente ≥ 32 µg/ml (Alpizar & Pacheco 1999).

Resultados

Se trabajó con 130 muestras de contenido intestinal de bovinos recolectadas en tres muestreos y con 350 muestras de contenido intestinal de porcinos obtenidas en cuatro muestreos. De la totalidad de muestras de bovinos se encontraron 19 positivas para EVR (14.6%). En porcinos se obtuvo un 11.1% de positividad para EVR correspondiente a 39 muestras en total (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Resultados del procesamiento de muestras de contenido intestinal de bovinos recolectadas durante el periodo abril-julio de 1999

Muestreo	Muestras recolectadas	Muestras positivas	% de muestras positivas	Número de cepas aisladas
A	10	2	20.0	4
B	60	0	0.0	0
C	60	17	28.0	27
Total	130	19	14.6	31

Cuadro 3. Resultados del procesamiento de muestras de contenido intestinal de porcinos recolectadas durante el periodo julio de 1999 a marzo del 2000

Muestreo	Muestras recolectadas	Muestras positivas	% de muestras positivas	Número de cepas aisladas
A	100	3	3.0	5
B	100	11	11.0	25
C	50	7	14.0	36
D	100	18	18.0	58
Total	350	39	11.1	124

En diez muestras, de las 19 positivas en bovinos, se aisló una sola cepa y en nueve 2 cepas o más, para un total de 31 cepas. Estas cepas se identificaron como *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y *S. equinus* como se observa en el cuadro 4. De las 39 muestras positivas en porcinos, en 11 se aisló una sola cepa y en 28 dos cepas o más, para un total de 124 cepas que se identificaron como *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *S. equinus* (Ver cuadro 5).

Cuadro 4. Resultados y frecuencia de la identificación de especies de *Enterococcus* y *Streptococcus vancomicina* resistente mediante el sistema VITEK GPI aisladas a partir de contenido intestinal de bovinos

Especie	Muestreo			Total	
	A	B	C	n	%
<i>E. casseliflavus</i>	0	0	23	23	74.2
<i>E. gallinarum</i>	0	0	4	4	12.9
<i>S. equinus</i>	4	0	0	4	12.9
Total	4 (12.9%)	0 (0.0%)	27 (87.1%)	31	100.0

Cuadro 5. Resultados y frecuencia de la identificación de especies de *Enterococcus* y *Streptococcus vancomicina* resistente mediante el sistema VITEK GPI aisladas a partir de contenido intestinal de porcinos

Especie	Muestreo				Total	
	A	B	C	D	n	%
<i>E. faecium</i>	0	3	0	45	48	38.7
<i>E. faecalis</i>	1	0	36	2	39	31.5
<i>E. casseliflavus</i>	3	10	0	0	13	10.5
<i>E. gallinarum</i>	1	11	0	0	12	9.7
<i>E. hirae</i>	0	0	0	9	9	7.2
<i>S. equinus</i>	0	1	0	0	1	0.8
No identificado	0	0	0	2	2	1.6
Total	5	25	36	58	124	100.0

En tres muestras de bovinos, 14, 29 y 31, se aislaron 2 especies diferentes como se aprecia en el cuadro 6. Dos o más cepas de *S. equinus* o *E. casseliflavus* se aislaron de las muestras 8, 15, 20, 28, 29, 37 y 39. Las tres cepas de *S. equinus* son fenotípicamente idénticas, así como las cepas de *E. casseliflavus* en las muestras 15, 20 y 39. Las cepas de *E. casseliflavus* en las muestras 28, 29 y 37 son bioquímicamente distinguibles entre sí mediante el sistema Vitek (Cuadro 7).

Cuadro 6. Desglose de las muestras con aislamientos especie-múltiple de EVR a partir de contenido intestinal de bovinos

Muestreo	Nº muestra	Nº cepa	Especie
C	14	14a	<i>E. casseliflavus</i>
		14b	<i>E. gallinarum</i>
C	29	29a	<i>E. casseliflavus</i>
		29b	<i>E. gallinarum</i>
		29c	<i>E. casseliflavus</i>
C	31	31a	<i>E. casseliflavus</i>
		31b	<i>E. gallinarum</i>

Cuadro 7. Comparación de los bionúmeros de cepas de igual especie aisladas en la misma muestra bovina

Muestreo	Nº muestra	Especie	Cepa	Igual bionúmero	Diferente bionúmero
A	8	<i>S. equinus</i>	8a,8b,8c	8a,8b,8c	
C	15	<i>E. casseliflavus</i>	15a,15b	15a,15b	
C	20	<i>E. casseliflavus</i>	20a,20b,20c	20a,20b,20c	
C	28	<i>E. casseliflavus</i>	28a,28b		28a,28b
C	29	<i>E. casseliflavus</i>	29a,29c*		29a,29c
C	37	<i>E. casseliflavus</i>	37a,37b		37a,37b
C	39	<i>E. casseliflavus</i>	39a,39b	39a,39b	
Total			15	9	6
%			100.0	60.0	40.0

* 29b es *E. gallinarum*

En cuanto a porcinos, 5 muestras presentaron especies diferentes: 65, 149, 342, 354 y 356 (Cuadro 8). Por otro lado, de 24 muestras se aislaron 2 o más cepas de *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. faecium* y *E. hirae*. Se observó igual bionúmero en las cepas de *E. casseliflavus* de las muestras 104 y 149 (a,c,b,d y i); en *E. gallinarum* de las muestras 149 (e,f y h), 182 y 198 (a,b y c); en *E. faecalis* de las muestras 200 (a y b), 210 (a y b), 213 (a, b, d y f), 214 (a, c, d, f, g, i, k, l y b, e, j) y 215 (b, c, d, e, f y g); *E. hirae* 303 (b y c) y 356 (a y b) y *E. faecium* de las muestras 310, 343 (a y c), 347 (a, b, c, d, e, g, h, i), 348, 354 (b y c), 356 (c, d, e, f), 358 (a y b), 369 (b y d) y 378 (a, c, d, e). Según el sistema de identificación Vitek, las siguientes cepas mostraron bionúmeros diferentes: *E. casseliflavus* 65 y 149g; *E. gallinarum* 198d; *E. faecium* 155, 343 (b y d), 347f, 354d, 358c, 369 (a y c) y 378 (b y f); *E. faecalis* 200 (c y d), 210 (c y d), 213 (c y e), 214 (h y m) y 215a y *E. hirae* 303a (Ver cuadro 9).

Cuadro 8. Desglose de las muestras con aislamientos especie-múltiple de EVR
a partir de contenido intestinal de porcinos

Muestreo	Nº muestra	Nº cepa	Especie
A	65	65a	<i>E. casseliflavus</i>
		65b	<i>E. gallinarum</i>
		65c	<i>E. casseliflavus</i>
B	149	149a	<i>E. casseliflavus</i>
		149b	<i>E. casseliflavus</i>
		149c	<i>E. casseliflavus</i>
		149d	<i>E. casseliflavus</i>
		149e	<i>E. gallinarum</i>
		149f	<i>E. gallinarum</i>
		149g	<i>E. casseliflavus</i>
		149h	<i>E. gallinarum</i>
		149i	<i>E. casseliflavus</i>
D	342	342a	<i>E. hirae</i>
		342b	<i>E. faecium</i>
D	354	354a	<i>E. hirae</i>
		354b	<i>E. faecium</i>
		354c	<i>E. faecium</i>
		354d	<i>E. faecium</i>
D	356	356a	<i>E. hirae</i>
		356b	<i>E. hirae</i>
		356c	<i>E. faecium</i>
		356d	<i>E. faecium</i>
		356e	<i>E. faecium</i>
		356f	<i>E. faecium</i>

Cuadro 9. Comparación de los bionúmeros de cepas de igual especie aisladas en la misma muestra porcina

Muestreo	Nº muestra	Especie	Cepa	Igual bionúmero	Diferente bionúmero
A	65	<i>E. casseliflavus</i>	65a,65c*		65a,65c
B	104	<i>E. casseliflavus</i>	104a,104b	104a,104b	
B	149	<i>E. casseliflavus</i>	149a,149b,149c, 149d,149g,149i	149a,149c, 149b,149d,149i	149g
		<i>E. gallinarum</i>	149e,149f,149h	149e,149f,149h	
B	155	<i>E. faecium</i>	155a,155b		155a,155b
B	182	<i>E. gallinarum</i>	182a,182b	182a,182b	
B	198	<i>E. gallinarum</i>	198a,198b,198c, 198d	198a,198b,198c	198d
C	200	<i>E. faecalis</i>	200a,200b,200c, 200d	200a,200b	200c,200d
C	210	<i>E. faecalis</i>	210a,210b,210c, 210d	210a,210b	210c,210d
C	213	<i>E. faecalis</i>	213a,213b,213c, 213d,213e, 213f	213a,213b,213d, 213f	213c,213e
C	214	<i>E. faecalis</i>	214a,214b,214c, 214d,214e,214f, 214g,214h,214i, 214j,214k,214L, 214m	214a,,214c,214d, 214f,214g,214i, 214k,214L, 214b,214e,214j	214h,214m
C	215	<i>E. faecalis</i>	215a,215b,215c, 215d,215e,215f, 215g	215b,215c,215d, 215e,215f,215g	215a
D	303	<i>E. hirae</i>	303a,303b,303c	303b,303c	303a
D	310	<i>E. faecium</i>	310a,310b	310a,310b	
D	336	<i>E. faecalis</i>	336a,336b		336a,336b
D	343	<i>E. faecium</i>	343a,343b,343c, 343d	343a,343c	343b,343d

D	347	<i>E. faecium</i>	347a,347b,347c, 347d,347e,347f, 347g,347h,347i	347a,347b,347c, 347d,347e,347g, 347h,347i	347f
D	348	<i>E. faecium</i>	348a,348b, 348c	348a,348b, 348c	
D	353	<i>E. faecium</i>	353a, 353b		353a, 353b
D	354	<i>E. faecium</i>	354b,354c, 354d**	354b,354c	354d
D	356	<i>E. faecium</i>	356c,356d,356e, 356f	356c,356d 356e,356f	
		<i>E. hirae</i>	356a,356b	356a,356b	
D	358	<i>E. faecium</i>	358a,358b,358c	358a,358b	358c
D	369	<i>E. faecium</i>	359a,359b,359c, 359d	359b,359d	359a,359c
D	378	<i>E. faecium</i>	378a,378b,378c, 378d,378e,378f	378a,378c,378d, 378e	378b,378f
D	399	No identificado	399a,399b		399a,399b
Total			107	76	31
%			100.0	71.0	29.0

* 65b es *E. gallinarum*

** 354a es *E. hirae*

De las 31 cepas positivas en bovinos, incluyendo las cuatro identificadas como no *Enterococcus*, se encontró que 27 presentaron una MIC de 8 µg/ml (87.1%) y 4 una MIC > 512 µg/ml (12.9 %) como se observa en el cuadro 10. En los resultados de la MIC de las 124 cepas de porcinos se encontró, tomando en cuenta las tres cepas identificadas como no *Enterococcus*, en 108 cepas, un valor de MIC > 512 µg/ml con un porcentaje de 87.1%, 11 cepas con una MIC de 8 µg/ml (8.9 %) y 5 muestras con una MIC = 16 µg/ml para un 4% (Ver cuadro 11).

Cuadro 10. Distribución de especies EVR aislados a partir de contenido intestinal de bovinos según el resultado obtenido en la MIC

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Especie			Total	
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>S. equinus</i>	n	%
512	0	0	4	4	12.9
8	23	4	0	27	87.1
Total	23	4	4	31	100.0
%	74.2	12.9	12.9	100.0	

Cuadro 11. Distribución de especies EVR aislados a partir de contenido intestinal de porcinos según el resultado obtenido en la MIC

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Especie							Total	
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. equinus</i>	NI*	n	%
>512	45	39	10	4	9	1	0	108	87.1
16	3	0	2	0	0	0	0	5	4.0
8	0	0	1	8	0	0	2	11	8.9
Total	48	39	13	12	9	1	2	124	100.0
%	38.7	31.5	10.5	9.7	7.2	0.8	1.6		

*NI, no identificadas

Se encontró diferente porcentaje de positividad en los porcinos de acuerdo a la etapa de desarrollo analizada. El mayor porcentaje se obtuvo en las muestras de cerdas gestantes, con un 23.7%, seguido por las muestras de los cerdos en las etapas de lactantes, desarrollo y

engorde con un 10.0% cada una. Las muestras de cerdo en las etapas de preinicio e inicio mostraron un porcentaje de positividad para EVR de 2.5% y 5.5%, respectivamente.

Cuadro 12. Frecuencia de muestras positivas para EVR obtenidas según etapa de desarrollo en porcinos

Etapa	Muestreo				Total
	A	B	C	D	Nº muestras/ Muestras positivas
Lactantes	20/0	20/2	0/0	20/4	60/6(10.0%)
Pre-inicio	20/0	20/1	0/0	0/0	40/1 (2.5%)
Inicio	20/0	20/4	30/0	20/1	90/5 (5.5%)
Desarrollo	20/3	20/2	0/0	20/1	60/6 (10.0%)
Engorde	0/0	0/0	0/0	20/2	20/2 (10.0%)
Gestantes	20/0	20/2	20/7	20/10	80/19 (23.7%)
Total	100/3	100/11	50/7	100/18	350/39 (11.1%)

Con el objetivo de comparar las concentraciones mínimas inhibitorias entre el método de dilución en agar y el sistema automatizado Vitek, fueron analizadas 56 cepas del muestreo D de porcinos, donde se observó que la determinación de la sensibilidad de los *Enterococcus* a la vancomicina presenta gran divergencia según el método utilizado (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de la susceptibilidad de *Enterococcus* spp. a vancomicina mediante los métodos de dilución en agar y automatizado Vitek

Cepa	MIC µg/ml	
	Dilución en agar	Sistema Vitek
P67	> 512	1
P68	> 512	8
P69	> 512	4
P70	> 512	1
P71	> 512	4
P72	> 512	2
P73	> 512	1
P74	> 512	2
P75	> 512	2
P76	> 512	< 0.5
P77	> 512	1
P78	> 512	1
P79	> 512	2
P80	> 512	16
P81	> 512	16
P82	> 512	1
P83	> 512	2
P84	> 512	4
P85	> 512	1
P86	> 512	> 32
P87	> 512	> 32
P88	> 512	< 0.5
P89	> 512	2
P91	> 512	4
P92	> 512	> 32
P93	> 512	1
P94	> 512	1
P95	> 512	> 32
P96	> 512	1
P97	> 512	> 32
P98	> 512	> 32

P99	> 512	2
P100	> 512	2
P101	> 512	> 32
P102	> 512	2
P103	> 512	2
P104	> 512	2
P105	> 512	> 32
P107	> 512	2
P108	> 512	> 32
P109	> 512	1
P110	> 512	1
P111	> 512	1
P112	> 512	4
P113	> 512	2
P114	> 512	2
P115	> 512	4
P116	> 512	1
P117	> 512	2
P118	> 512	2
P119	> 512	> 32
P120	> 512	1
P121	> 512	< 0.5
P122	> 512	> 32
P123	> 512	> 32
P124	> 512	> 32

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 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, España, Reino Unido y Estados Unidos. El primer brote nosocomial por EVR se reportó en Reino Unido a fines de los años 1980s y el número de hospitales afectados se ha incrementado recientemente. En los Estados Unidos el aumento en la prevalencia de EVR también se ha evidenciado últimamente (Woodford *et al.* 1995).

Se ha sugerido que la colonización con EVR ocurre frecuentemente en la comunidad, esto debido a la existencia de los enterococos en el medio ambiente, incluyendo heces animales, alimentos de origen animal y aguas residuales, por lo que el contacto con estas fuentes aumenta los reservorios humanos colonizados con EVR, favoreciendo posteriormente la introducción a nivel hospitalario (Devriese *et al.* 1996; Herrera *et al.* 1998; Mc Donald *et al.* 1997; van den Braak *et al.* 1998; Woodford *et al.* 1998).

En nuestro país, la presencia de EVR 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 de EVR y en una

investigación realizada por Alpízar y Pacheco se logró demostrar un porcentaje de positividad de EVR en contenido intestinal de pollos de un 14.0%.

Con estos resultados como preámbulo y debido a la importancia que tienen sobre la salud pública nacional se continuó con la búsqueda de EVR, esta vez en contenido intestinal de bovinos y porcinos. Para el aislamiento de los EVR se realizó una modificación al protocolo utilizado por Alpízar y Pacheco (1999) y se trabajó con agar infusión cerebro-corazón (AICC) en sustitución del agar Mueller-Hinton como medio de aislamiento. Esta sugerencia ya había sido indicada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y estudios comparativos para las condiciones de aislamiento de EVR comprueban que los enterococos requieren de medios de cultivo ricos para el crecimiento rápido (Butaye *et al.* 1998), así como que los métodos fenotípicos óptimos para la determinación de la resistencia a la vancomicina en *Enterococcus* spp. utilizan el AICC como medio de crecimiento (Kohner *et al.* 1997; Rosenberg *et al.* 1997).

Devriese y colaboradores (1996) obtuvieron resultados negativos al analizar contenido intestinal de rumiantes por EVR en Bélgica. En contraste, en éste estudio se detectó un 14.6% de positividad en muestras de contenido intestinal de bovinos con EVR. Sin embargo, Devriese y colaboradores utilizaron una concentración de vancomicina de 20 µg/ml en los caldos de enriquecimiento, la cual es una concentración muy elevada que permite detectar solamente el crecimiento de cepas con fenotipos de alto nivel de resistencia a glicopéptidos (VanA). Esto podría explicar el bajo nivel de detección de EVR en Bélgica con respecto a nuestros datos, puesto que todas las cepas de EVR aisladas de bovinos en el presente estudio mostraron una MIC igual a 8 µg/ml.

Múltiples reportes han evidenciado la presencia de EVR en contenido intestinal de cerdos, sin embargo, los porcentajes de positividad varían entre los diferentes estudios dependiendo del método de detección utilizado. Mientras que Butaye y colaboradores (1999) encontraron un porcentaje de positividad del 31.0% en su estudio realizado en granjas porcinas en Bélgica, en esta investigación se obtuvo un porcentaje de positividad del 11.1% de EVR en muestras porcinas recolectadas en diferentes porquerizas del país. Por otra parte, Devriese y colaboradores (1996) reportaron porcentajes de positividad de un 6.0% de EVR en cerdos, pero utilizando métodos de detección únicamente para el fenotipo de alta resistencia (VanA).

En 3 de las 19 muestras de origen bovino y en 5 de las 39 de origen porcino se observó la presencia de muestras especie-múltiple, fenómeno que ya había sido informado por Alpizar y Pacheco (1999) en muestras aviares.

En un 40% de las muestras de bovinos y en un 29% de las muestras de porcinos con más de una cepa de igual especie, se observan diferencias en cuanto al bionúmero. Según Alpizar y Pacheco (1999), esto se debe a la existencia de diferentes biotipos de igual especie dentro de una misma muestra, lo cual debe confirmarse mediante técnicas de tipificación genética.

En bovinos se pudo observar que la especie más frecuentemente aislada fue *E. casseliflavus* (74.2%), seguida por *E. gallinarum* (12.9%) mientras que en porcinos las especies más prevalentes fueron *E. faecium* (39.0%) y *E. faecalis* (32.2%). Este patrón de prevalencia en porcinos se presentó también en estudios previos publicados por Butaye y colaboradores (1999), Devriese y colaboradores (1996) y Aarestrup y colaboradores (1996).

En referencia a la MIC, tanto *E. casseliflavus* como *E. gallinarum* se han relacionado fenotípicamente con patrones de baja a moderada resistencia a la vancomicina (MIC 4-8 µg/ml), (Clark *et al.* 1998; Coque *et al.* 1996) lo cual correlaciona con los datos obtenidos de los bovinos en este estudio (MIC < 8 µg/ml). Con respecto a *E. faecium* y *E. faecalis*, sus patrones de resistencia se asocian generalmente a baja susceptibilidad a la vancomicina (MIC 64->1000 µg/ml), (Woodford *et al.* 1995) lo que muestra correspondencia con lo encontrado en las muestras de porcinos (MIC > 512 µg/ml).

A pesar de que tanto en *E. casseliflavus* como *E. gallinarum* lo más común es encontrar niveles de resistencia a vancomicina bajos, en 10 cepas de *E. casseliflavus* y 4 de *E. gallinarum* aisladas de porcinos se presentó una MIC > 512µg/ml. Según la literatura consultada, esto puede explicarse debido a que estas dos especies de enterococos pueden adquirir los fenotipos VanA o VanB, lo que les confiere una alta resistencia a glicopéptidos (Coque *et al.* 1996; Dutka-Malen *et al.* 1994; Devriese *et al.* 1999).

Otro punto destacable en las muestras fecales de cerdos es el aislamiento de 9 cepas de *E. hirae* las cuales presentaron una MIC > 512 µg/ml. Este dato resulta interesante pues aunque se conoce que esta especie posee VanA, se reporta que sus niveles de resistencia a glicopéptidos son menores a los observados en este estudio, oscilando entre 64-128 µg/ml (Butaye *et al.* 1999; Robredo *et al.* 1999).

Debido a que la flora intestinal de los animales cambia con la edad, se analizó la ocurrencia de EVR en cerdos de diferentes grupos etarios. Es preciso indicar que estas diferencias se determinan tomando en consideración la edad, el peso y la dieta recibida. Se encontró el mayor porcentaje de positividad en el grupo de gestantes (23.7%), seguido por un

10% tanto en desarrollo y engorde como en lactantes. Esto presenta similitud a lo reportado por Butaye y colaboradores (1999) en un estudio realizado con cerdas gestantes, lactantes y engorde donde se obtuvo una positividad para EVR de 53%, 21% y 18%, respectivamente. La razón de esta distribución no está muy clara, puesto que la más alta prevalencia se presentó en gestantes donde el uso de promotores de crecimiento es prohibido (Butaye *et al.* 1999). Se puede especular que estos animales pueden haber recibido avoparcina durante las etapas de crecimiento previas.

En múltiples estudios se han indicado las diferencias entre los diversos métodos de susceptibilidad a antimicrobianos para detectar en *Enterococcus* la resistencia a la vancomicina. En este caso se pudo comprobar la gran divergencia presentada entre el sistema automatizado Vitek y la técnica de dilución en agar (AICC), pues como se pudo observar, cepas detectadas resistentes por medio de la técnica manual reportaron ser sensibles mediante el sistema Vitek. Esta “falsa sensibilidad” determinada por el sistema Vitek, tomando en cuenta que la dilución en agar se considera como método de referencia, se ha reportado en investigaciones previas y se explica debido a los cortos tiempos de incubación requeridos para este test, los cuales son insuficientes para la inducción y expresión de niveles bajos e intermedios de resistencia (Endtz *et al.* 1997; Kohner *et al.* 1997; Rosenberg *et al.* 1997; Woodford *et al.* 1995). De las 56 cepas detectadas resistentes por el método de dilución en agar (MIC > 512 µg/ml), solamente 13 (MIC > 32 µg/ml) presentan concordancia entre los dos métodos de determinación de la sensibilidad a la vancomicina, puesto que la tarjeta GPS-TA del sistema automatizado Vitek establece como máximo reporte de resistencia a la vancomicina 32 µg/ml.

En conclusión, es importante señalar que de acuerdo a los resultados observados en el presente estudio, se puede sugerir que la presencia de EVR en bovinos no es de gran relevancia en la transmisión de esta bacteria en las comunidades, ya que en el 100% de los enterococos aislados se presentó un patrón de resistencia intrínseca a la vancomicina. De la misma forma, se puede indicar que el hallazgo de EVR en cepas porcinas podría ser de importancia, tanto en la transmisión comunitaria de esta bacteria, como en la transferencia de resistencia a vancomicina a otros patógenos humanos gram positivos. Esta diferencia se debe a que la mayoría de las cepas EVR aisladas en porcinos exhiben patrones adquiridos de resistencia a este glicopéptido.

Referencias

Aarestrup, F.M., P. Ahrens, M. Madsen, L.V. Pallesen, R.L. Poulsen, H. Westh. 1996. Glycopeptide susceptibility among danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA cluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1938-1940.

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.

Butaye, P., L.A. Devriese, H. Goossens, M. Ieven. 1998. Enterococci with acquired vancomycin resistance in pigs and chickens of different age groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:365-366.

Butaye, P., L.A. Devriese, F. Haesebrouck. 1998. Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 36:1907-1911.

Clark, N.C., L.M. Teixeira, R.R. Facklam, F.C. Tenover. 1998. Detection and differentiation of VanC-1, VanC-2 y VanC-3 glycopeptide resistance genes in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 36:2294-2297.

Collignon, P., I.G. Partridge. 2000. Vancomycin-resistant enterococci and use of avoparcin in animal feed: is there a link? *Med. J. Aust.* 172:43-44.

Coque, T.M., J.F. Tomayko, S.C. Ricke, P.C. Okhyusen, B.E. Murray. 1996. Vancomycin-Resistant Enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2605-2609.

Devriese, L.A., M. Ieven, H. Goosens, P. Vandamme, B. Pot, J. Hommeez, F. Haesebrouck. 1996. Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2285-2287.

Donnelly, J.P., A. Voss, W. Witte, B. Murray. 1996. Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics, influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? *Antimicrob. Chemother.* 37:389-390.

Dutka-Malen, S., B. Blaimont, G. Wauters, P. Courvalin. 1994. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1675-1677.

Edmond, M.B., J.F. Ober, J.L. Weinbaum, M.A. Pfaller, T. Hwang, M.D. Sanford, R. P. Wenzel. 1995 Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin. Infect. Dis.* 20:1126-1133.

Endtz, H.P., N. van den Braak, A.V. Belkum, W.H. Goessens, D. Kreft, A.B. Stroebe, H.A. Verbrugh. 1998. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 36:592-594.

Fines, M, B. Perichon, P. Reynolds, D. F. Sahm, and P. Courvalin. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 :2161-2164.

Forbes, B.A., D.F. Sahm, A.S. Weissfeld. 1998. *Streptococcus, Enterococcus, and similar organisms*, pp. 620-625. En J. Roche (ed), *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th ed. Mosby, St. Louis, MO.

Herrera, M.L., A. Vargas, M. Campos. 1998. Aislamientos de *Enterococcus* sp. resistentes a la vancomicina en muestras de heces de niños costarricenses. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera.* 33:29-38.

Huycke, M.M., D.F. Sahm, M.S. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistance enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4: www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no2/huycke.htm.

Jacoby, G.A. 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. Faingezicht, M.M. París. 1998 Outpatient prevalence of vancomycin-resistant enterococcal enterical colonization in children. Servicio de Infectología, Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica. ICAP.

Kohner, P.C., R. Patel, J.R. Uhl, K.M. Garin, M.K Hopkins, L.T. Wegener, F.R. Cockerill III. 1997. Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-Test, disk diffusion, and automated Vitek methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to vancomycin. J. Clin. Microbiol. 35:3258-3263.

McDonald, L.C., M. J. Kuehnert, F.C. Tenover, and W.R. Jarvis. 1997. Vancomycin – resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. Emerg. Infect. Dis. 3: www.cdc.gov/ncidod/EID/vol3no3/mcdonald.htm.

Murray, B.E. 1998. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. Emerg. Infect. Dis. 4: www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no1/murray.htm.

Perichon, B., P. Reynolds, and P. Courvalin. 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob. Agents Chemother. 41 : 2016-2018.

Poyart, C., C. Pierre, G. Quesne, B. Pron, P. Berche, P. Trieu-Cuot. 1997. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a VanB transferable determinant in *Streptococcus bovis*. . Antimicrob. Agents Chemother. 41:24-29.

Robredo, B., K.V. Singh, F. Barquero, B.E. 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 Chemother. 43:1137-1143.

Rosenberg, J., F.C. Tenover, J. Wong, W. Jarvis, D.J. Vugia. 1997. Are clinical laboratories in California accurately reporting vancomycin-resistant enterococci? J. Clin. Microbiol. 35:2526-2530.

Wegener, H., F.M. Aarestrup, L.B. Jensen, A.M. Hammerum, F. Bager. 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. Emerg. Infect. Dis. 5:
id.medscape.com/govmt/CDC/EID/1999/v05.n03/e0503.03.wege.htm

Welton, L.A., L.A. Thal, M.B. Perri, S. Donabedian, J. McMahon, J.W. Chow, M.J. Zervos. 1998. Antimicrob. Agents Chemother. 42:705-708.

Woodford, N., A.P. Johnson, D. Morrison, D. Speller. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8:585-615.

Anexos

Anexo 1

Resultado de los aislamientos, realizados en el periodo abril-julio de 1999, a partir de contenido intestinal de bovinos, según muestreo, numeración, MIC e identificación hasta especie

Muestreo	Nº Cepa	Colonia	MIC vanc (µg/ml)	Identificación	Bionúmero	% similitud
A	B1	8a	> 512	<i>S. equinus</i>	56341250420	96% <i>S. equinus</i>
A	B2	8b	> 512	<i>S. equinus</i>	56341250420	96% <i>S. equinus</i>
A	B3	8c	> 512	<i>S. equinus</i>	56341250420	96% <i>S. equinus</i>
A	B4	9a	> 512	<i>S. equinus</i>	56341250420	96% <i>S. equinus</i>
C	B5	13a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B6	14a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77767374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B7	14b	8	<i>E. gallinarum</i>	77327374520	99% <i>E. casseliflavus</i>
C	B8	15a	8	<i>E. casseliflavus</i>	57325374510	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>S. Uberis</i>
C	B9	15b	8	<i>E. casseliflavus</i>	57325374510	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>S. Uberis</i>
C	B10	16a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374520	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>S. Bovis</i>

C	B11	17a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B12	20a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B13	20b	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B14	20c	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B15	22a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B16	27a	8	<i>E. gallinarum</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B17	28a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B18	28b	8	<i>E. casseliflavus</i>	77325370530	98% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B19	29a	8	<i>E. casseliflavus</i>	75367274530	98% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B20	29b	8	<i>E. gallinarum</i>	77367274530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B21	29c	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B22	30a	8	<i>E. casseliflavus</i>	75367370530	93% <i>E. casseliflavus</i> 5% <i>E. faecium</i>
C	B23	31a	8	<i>E. casseliflavus</i>	76365334530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>

C	B24	31b	8	<i>E. gallinarum</i>	77727274530	95% <i>E. casseliflavus</i> 4% <i>E. faecium</i>
C	B25	32a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B26	37a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77365334530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B27	37b	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327274530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B28	38a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327774530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B29	39a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B30	39b	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
C	B31	45a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77327274530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>

Anexo 2

Resultado de los aislamientos, realizados en el periodo julio de 1999 a marzo del 2000, a partir de contenido intestinal de cerdos según muestreo, numeración, MIC e identificación hasta especie

Muestreo	Nº Cepa	Colonia	MIC vanc (µg/ml)	Identificación	Bionúmero	% similitud
A	P1	65a	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327374530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
A	P2	65b	> 512	<i>E. gallinarum</i>	77307274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
A	P3	65c	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
A	P4	66a	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
A	P5	67a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
B	P6	104a	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
B	P7	104b	< 16	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
B	P 08	159a	< 16	<i>E. casseliflavus</i>	77327254430	98% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
B	P 09	149a	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
B	P10	149b	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327374530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>

B	P11	155a	< 16	<i>E. faecium</i>	75367270430	92% <i>E. faecium</i> 7% <i>E. gallinarum</i>
B	P12	155b	< 16	<i>E. faecium</i>	77727250430	94% <i>E. faecium</i> 5% <i>E. gallinarum</i>
B	P13	171a	8	<i>E. casseliflavus</i>	77367374530	99% <i>E. casseliflavus</i> 1% <i>E. faecium</i>
B	P14	175a	> 512	<i>S. equinus</i>	54741000000	99% <i>S. equinus</i> <1% <i>S. acidominimus</i>
B	P15	182a	8	<i>E. gallinarum</i>	77327274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
B	P16	182b	8	<i>E. gallinarum</i>	77327274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
B	P17	198a	8	<i>E. gallinarum</i>	77327274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
B	P18	149c	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327370530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
B	P19	198b	8	<i>E. gallinarum</i>	77327274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
B	P20	103a	8	<i>E. gallinarum</i>	77327274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
B	P21	129a	8	<i>E. gallinarum</i>	77327274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
B	P22	149d	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
B	P23	149e	> 512	<i>E. gallinarum</i>	77227370530	97% <i>E. gallinarum</i> 2% <i>E. casseliflavus</i>

B	P24	149f	> 512	<i>E. gallinarum</i>	77227370530	97% <i>E. gallinarum</i> 2% <i>E. casseliflavus</i>
B	P25	198c	8	<i>E. gallinarum</i>	77327274520	90% <i>E. gallinarum</i> 9% <i>E. casseliflavus</i>
B	P26	198d	8	<i>E. gallinarum</i>	77727274520	98% <i>E. gallinarum</i> 1% <i>E. casseliflavus</i>
B	P27	149g	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77227374530	99% <i>E. casseliflavus</i>
B	P28	149h	> 512	<i>E. gallinarum</i>	77227370530	97% <i>E. gallinarum</i> 2% <i>E. casseliflavus</i>
B	P29	149i	> 512	<i>E. casseliflavus</i>	77327374530	99% <i>E. casseliflavus</i> <1% <i>E. faecium</i>
B	P30	154a	< 16	<i>E. faecium</i>	77727250430	94% <i>E. faecium</i> 5% <i>E. gallinarum</i>
C	P31	214a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P32	214b	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecalis</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
C	P33	215a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecalis</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
C	P34	215b	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P35	210a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P36	210b	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>

C	P37	213a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P38	213b	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P39	214c	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P40	214d	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P41	214e	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecalis</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
C	P42	215c	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P43	215d	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P44	200a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P45	200b	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P46	200c	> 512	<i>E. faecalis</i>	76725621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P47	213c	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecalis</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
C	P48	213d	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P49	213e	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecalis</i> <1% <i>E. gallinarum</i>

C	P50	214f	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P51	214g	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P52	214h	> 512	<i>E. faecalis</i>	76725621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P53	215e	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P54	215f	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P55	216a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P56	200d	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecalis</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
C	P57	212a	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P58	214i	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P59	214j	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecalis</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
C	P60	214k	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P61	210c	> 512	<i>E. faecalis</i>	74725621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P62	210d	> 512	<i>E. faecalis</i>	74765631610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P63	213f	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>

C	P64	214L	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P65	214m	> 512	<i>E. faecalis</i>	74725621610	99% <i>E. faecalis</i>
C	P66	215g	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765621610	99% <i>E. faecalis</i>
D	P67	303a	> 512	<i>E. hirae</i>	57363230510	95% <i>E. hirae</i> 3% <i>Aerococcus</i>
D	P68	303b	> 512	<i>E. hirae</i>	57763230510	99% <i>E. hirae</i> <1% <i>E. durans</i>
D	P69	303c	> 512	<i>E. hirae</i>	57763230510	99% <i>E. hirae</i> <1% <i>E. durans</i>
D	P70	305a	> 512	<i>E. hirae</i>	57763230510	99% <i>E. hirae</i> <1% <i>E. durans</i>
D	P71	356a	> 512	<i>E. hirae</i>	57763230510	99% <i>E. hirae</i> <1% <i>E. durans</i>
D	P72	3056b	> 512	<i>E. hirae</i>	57763230510	99% <i>E. hirae</i> <1% <i>E. durans</i>
D	P73	354a	> 512	<i>E. hirae</i>	57363230510	95% <i>E. hirae</i> 3% <i>Aerococcus</i>
D	P74	354b	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P75	354c	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P76	354d	> 512	<i>E. faecium</i>	77345270410	94% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>

D	P77	378a	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P78	378b	> 512	<i>E. faecium</i>	76705270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P79	378c	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P80	378d	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P81	356c	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P82	356d	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P83	378e	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P84	378f	> 512	<i>E. faecium</i>	76345270410	92% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P85	348a	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P86	348b	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P87	348c	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P88	310a	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P89	310b	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>

n	P90	399a	8	No identificado	57145174110	
D	P91	343a	> 512	<i>E. faecium</i>	77345270410	94% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P92	343b	> 512	<i>E. faecium</i>	76345270410	92% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P93	343c	> 512	<i>E. faecium</i>	77345270410	94% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P94	300a	> 512	<i>E. hirae</i>	56761230510	95% <i>E. hirae</i> 2% <i>E. faecium</i>
D	P95	342a	> 512	<i>E. hirae</i>	57763230510	99% <i>E. hirae</i> <1% <i>E. durans</i>
D	P96	343d	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P97	369a	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P98	353a	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P99	353b	> 512	<i>E. faecium</i>	77365270410	81% <i>E. faecium</i> 10% <i>E. gallinarum</i>
D	P100	369b	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P101	369c	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P102	347a	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>

n	P103	347b	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P104	347c	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P105	347d	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P106	399b	8	No identificada	57145174110	
D	P107	347e	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P108	347f	> 512	<i>E. faecium</i>	76345270410	92% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P109	356e	> 512	<i>E. faecium</i>	77745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P110	356f	> 512	<i>E. faecium</i>	77745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P111	342b	> 512	<i>E. faecium</i>	77705270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P112	359a	> 512	<i>E. faecium</i>	76705270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P113	359b	> 512	<i>E. faecium</i>	76345270410	92% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P114	347g	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P115	347h	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>

D	P116	347i	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P117	358a	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P118	358b	> 512	<i>E. faecium</i>	76745270410	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>
D	P119	358c	> 512	<i>E. faecium</i>	76345270410	92% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P120	346a	> 512	<i>E. faecium</i>	77345270410	94% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P121	359c	> 512	<i>E. faecium</i>	77365270410	81% <i>E. faecium</i> 10% <i>E. gallinarum</i>
D	P122	359d	> 512	<i>E. faecium</i>	76345270410	92% <i>E. faecium</i> 4% <i>E. avium</i>
D	P123	336a	> 512	<i>E. faecalis</i>	77767631610	99% <i>E. faecalis</i> < 1% <i>E. avium</i>
D	P124	336b	> 512	<i>E. faecalis</i>	76765631610	99% <i>E. faecium</i> <1% <i>E. gallinarum</i>