

Citolisina y alto nivel de resistencia a gentamicina en *Enterococcus faecalis* de distinto origen

Mónica Sparo^{1,2}, Gastón Delpech¹, Gisela Pourcel¹, Celia Schell², María M de Luca², Judith Bernstein², Silvia Grenovero², Juan A Basualdo²

Resumen: Los enterococos integran la microbiota intestinal habitual del hombre y están presentes en alimentos de origen animal y vegetal. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de citolisina y alto nivel de resistencia a gentamicina (ANRG) en *Enterococcus faecalis* de origen humano, animal y de alimentos. Las muestras clínicas provinieron de pacientes con infecciones invasivas, internados en el Hospital Ramón Santamarina de Tandil, provincia de Buenos Aires. Las heces de pollos se tomaron de una granja del partido de Tandil. La carne picada fue recolectada de carnicerías de la ciudad de Tandil. El período del estudio comprendió un año. La identificación de *E. faecalis* (genes *tuf* y *sodA*) y la investigación del *cylA* y de los genes codificantes de ANRG se realizaron mediante amplificación génica. Se efectuó concentración inhibitoria mínima (CIM) para gentamicina y estreptomycin. Se caracterizaron como *E. faecalis* los siguientes aislamientos: heces: 41; carne: 38; hemocultivos: 11; líquidos de punción: 9; abscesos retroperitoneales: 2. Se observó el gen *cylA* en *E. faecalis* de heces y carne picada; *cylA* estuvo siempre asociado con ANRG en los aislamientos de alimentos y en 7/9 *cylA*+ de animales. En las muestras humanas todos los aislamientos de hemocultivo presentaron ANRG + *cylA*. En los enterococos con ANRG se detectó el gen *aac* (6')-le-aph (2'')-la, coincidente con los valores CIMgen > 500 µg/ml y CIMestr < 2000 µg/ml. La detección de *E. faecalis* con *aac* (6')-le-aph (2'')-la y *cylA* en el hombre, alimentos y animales demostró su diseminación en el ecosistema.

Palabras clave: *E. faecalis*, resistencia a gentamicina, gen *cylA*, gen *aac* (6')-le-aph (2'')-la.

Cytolysin and high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* from different origin

Abstracts: Enterococci are part of the indigenous intestinal human microbiota and are also present in food of animal origin and vegetables. The aim of this work was to investigate the presence of cytolysin and high-level gentamicin resistance (HLGR) in *Enterococcus faecalis* from human, animal and food origin. Clinical samples from patients with invasive infectious diseases admitted to Ramón Sanamarina Hospital (Tandil, Province of Buenos Aires) were obtained. Feces from a chicken house in Tandil District were gathered. Minced meat from butchers of Tandil City was collected. This study was carried out along a one-year period. Identification of *E. faecalis* (*tuf* and *sodA* genes) as well as investigation of *cylA* and HLGR-coding genes were performed through gene amplification. Minimum inhibitory concentration (MIC) for gentamicin and streptomycin was determined. The following isolates were characterized as *E. faecalis*: 41, feces; 38, minced meat; 11, hemocultures; 9, sterile body fluids (other than blood); 2, retroperitoneal abscesses. In *E. faecalis* from feces and minced meat, *cylA* was observed; in all food isolates and 7/9 animal origin isolates *cylA* and HLGR were associated. Among human samples, enterococci from hemocultures showed HLGR + *cylA*. In all HLGR isolates, *aac* (6')-le-aph (2'')-la gene was detected. This finding matched with MICgen > 500 µg/ml and MICstr < 2000 µg/ml. Spread of *cylA*- *aac* (6')-le-aph (2'')-la *E. faecalis* was proven through its detection in man, food and animals.

Key words: *E. faecalis*, gentamicin resistance, gen *cylA*, gen *aac* (6')-le-aph (2'')-la.

Introducción

Los enterococos son bacterias Gram positivas que integran la microbiota intestinal habitual del hombre y están presentes en alimentos de origen animal y vegetal. Cuando se comportan como agentes etiológicos de enfermedades invasivas, la erradicación es dificultosa por su resistencia natural y adquirida a diferentes antimicrobianos y por la presencia de componentes celulares que pueden actuar como factores de virulencia¹⁻⁶. Sin embargo los enterococos tienen propiedades tecnológicas ya que producen péptidos antimicrobianos (bacteriocinas)

y contribuyen a la maduración de numerosos alimentos fermentados regionales de origen lácteo y cárnico⁷⁻⁹. Este comportamiento dual genera controversia sobre la seguridad de las cepas presentes en alimentos.

La resistencia a múltiples antimicrobianos es común entre los enterococos y constituye un dilema relevante en salud pública. La resistencia de alto nivel a gentamicina (ANRG, CIM ≥ 500 µg/ml) en enterococos se describió por primera vez en 1979. En medicina humana representa un problema terapéutico significativo, en particular para los pacientes con enfermedades infecciosas invasivas como

1. Laboratorio de Microbiología, Medicina, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires.

2. Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

msparo@med.unlp.edu.ar

meningitis, osteomielitis y endocarditis, que requieren tratamiento antibiótico con eficacia bactericida^{10,11}.

Los enterococos tienen una gran variedad de elementos genéticos móviles y se consideran como un depósito para los genes de resistencia adquirida a los antimicrobianos por bacterias Gram positivas^{12,13}.

El gen *aac* (6')-Ie-aph (2'')-Ia es el más frecuente entre las distintas especies de enterococos con ANRG; codifica la enzima AAC(6')-APH(2'') con actividad acetiltransferasa y fosfotransferasa¹⁴. Este gen bifuncional confiere resistencia a los aminoglucósidos disponibles clínicamente excepto estreptomicina, eliminando así el sinergismo bactericida entre aminoglucósidos y un agente activo sobre de la pared celular, como ampicilina o vancomicina^{15,16}. También se han caracterizado otros genes monofuncionales que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Dentro de la clase APH(2'')-subclase I de las fosfotransferasas se han descrito genes cromosómicos como *aph*(2'')-Ib y *aph*(2'')-Id y genes de origen plasmídico como *aph*(2'')-Ic, que codifican enzimas que generan resistencia a gentamicina y amikacina; detectados originalmente en especies de *Enterococcus* distintas a *E. faecalis*¹⁷. Otros genes *aph*(3')-IIIa y *ant*(4')-Ia codifican resistencia a varios aminoglucósidos, excepto a gentamicina¹⁸.

La especie *E. faecalis* es la recuperada con mayor frecuencia en animales, alimentos de origen animal y en pacientes con infecciones asociadas a los cuidados de la salud, principalmente en individuos con enfermedades subyacentes^{11,19-22}.

Algunas cepas de *E. faecalis* pueden producir una citolisina/ hemolisina que tiene propiedades generales líticas. Esta citolisina, secretada en una forma inactiva, denominada componente L, se escinde por un segundo factor, componente A, para formar un factor lítico activo²³.

Se ha demostrado que la producción de citolisina contribuye a la gravedad de la enfermedad infecciosa tanto en modelos animales como en el hombre^{24,25}. Estos estudios demostraron que el 60% de las cepas de *E. faecalis* aisladas de diferentes sitios de infección producen citolisina. Además, se observó que se asocia con un aumento de cinco veces en el riesgo de muerte en pacientes con bacteriemia²³.

Por lo tanto el ANRG y la producción de citolisina en *E. faecalis* pueden condicionar la resolución clínica y microbiológica de las enfermedades infecciosas severas en pacientes afectados por estas cepas²⁶⁻²⁸.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de citolisina y de ANRG en *E. faecalis* de origen humano, animal y de alimentos.

Materiales y métodos

Se diseñó un estudio de tipo observacional, descriptivo, transversal y prospectivo. Se incluyeron aislamientos

de *E. faecalis* provenientes de muestras clínicas, heces de pollos y carne picada durante el período enero-diciembre de 2011.

Aislamiento e identificación: las muestras clínicas humanas, hemocultivos y otros líquidos de punción, provinieron de pacientes con infecciones invasivas, internados en el Hospital Ramón Santamarina de Tandil (HMRS), provincia de Buenos Aires. Los aislamientos significativos (uno por paciente) caracterizados fenotípicamente como *E. faecalis* fueron almacenados por el Laboratorio de Microbiología Clínica del HMRS a -70°C en caldo-glicerol 30% hasta su posterior proceso.

Para analizar los aislamientos de origen animal se realizaron cultivos de heces de pollos, con frecuencia mensual, en una granja de cría de aves de corral del partido de Tandil. A 0.5 g de heces de animales recogidas en el criadero, se les añadieron 5.0 ml de caldo selectivo.

Los aislamientos de alimentos provinieron de muestras de carne picada que fueron recolectadas de carnicerías ubicadas en la zona céntrica (ECZC 1-5) y en la periferia (ECP1-4) de la ciudad de Tandil, provincia de Buenos Aires. Se tomaron aleatoriamente 3 piezas/lote a partir de 10 lotes/carnicería, abarcando los cuatro períodos estacionales. Las muestras fueron homogeneizadas mediante la adición de 25 g de carne picada a 100 ml de agua peptonada en una bolsa de plástico estéril y agitada en homogeneizador (Seward, UK) durante 2 min²⁹. Posteriormente, se inocularon 0.5 ml a 5 ml de caldo selectivo.

El caldo selectivo empleado consistió en caldo azida glucosa (Lab. Britania; Argentina) adicionado de gentamicina (droga p.a.; 100 µg / ml). Luego de 72 h de incubación a 35°C, se realizaron sub-cultivos en medio sólido (agar bilis esculina, Lab. Britania) adicionado de gentamicina (droga p.a.; 100 µg / ml) y se incubaron a 35°C durante 48 h.

Los aislamientos clínicos identificados fenotípicamente como *E. faecalis* por el Laboratorio de Microbiología Clínica del HMRS y los aislamientos de carne picada y heces de pollos recuperados de los medios selectivos para enterococos fueron genotipificados a nivel de género y especie para *E. faecalis*. La confirmación de género se realizó mediante la amplificación del gen *tuf* (PCR) de acuerdo con Ke et al.,³⁰ sin modificaciones. Fueron empleados los siguientes cebadores derivados de regiones muy conservadas: Ent1 (5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3'); Ent2 (5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3'). Para la confirmación de especie se siguió el protocolo descrito por Jackson et al.,³¹ sin modificaciones, mediante amplificación del gen *sodA*. Se utilizaron los cebadores FL1 (5'-ACTTATGTGACTAACTTAACC-3'); FL2 (5'-TAATGGTGAATCTTGTTTGG-3').

Alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos: se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para gentamicina y estreptomicina mediante el método de di-

lución en agar, siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute*³². Como controles se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299.

Para la amplificación génica del ADN, la PCR se realizó de acuerdo a Donabedian et al³³. Las mezclas de reacción contuvieron solución buffer de PCR, 200 µM deoxinucleósido trifosfato (Bio Rad, US), 1.25 U de Taq polimerasa (Promega, US), 1-2 colonias bacterianas de cada aislamiento y 0.1 µg de cada cebador. El volumen final de reacción fue 50 µl. La reacción fue realizada con un pre-ciclo de 10 min a 94°C y ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, y 3 min a 72°C, que fueron seguidos por un ciclo final de 10 min a 72 °C. En la corrida electroforética en gel de agarosa (1.4%) se utilizó un marcador con un rango de 100-1000 pb (Inbio Highway, Argentina). Cepas controles utilizadas: *E. faecalis* NMH524, *E. faecalis* ATCC51299 y *E. faecalis* ATCC 29212.

Los cebadores utilizados para detectar los genes fueron los siguientes:

Gen aac (6')-le-aph (2'')-Ia, 5'-GAGCA-ATAAGGGCATACCAAAAATC-3' y 5'-CCGTG-CATT TGTCTTAAAAAACTGG-3. Gen aph (2'')-Ib, 5'-TATGGATTCATGGTTAACTTGGACGCTGAG-3' y 5'-ATTAAGCTTCCT GCTAAAATATAAACATCTCTGCT-3'. Gen aph (2'')-Ic, 5'-GAAGTGATGGA AATCCCTTCG-TG-3' y 5'-GCTCTAACCTTCAGAAATCCAGTC-3'. Gen aph (2'')-Id, 5'-GGTG GTTTTACAGGAATGCCATC-3' y 5'-CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC-3'.

Hemolisina: el gen *cylA* se detectó mediante PCR utilizando los cebadores ATGGAT GGGACAGATGGAAA y AGCTGCGCTTAGTTCTGGAG7. La reacción se desarrolló en un volumen total de 25 µl; conteniendo 20 pmol de cada cebador, 1-2 colonias bacterianas de cada aislamiento, 200 µM de cada deoxinucleósido trifosfato (Bio-Rad), 1.0 U de Taq polimerasa (Promega), MgCl₂ 1.5 µM, 2.5 µl de buffer para PCR 10X y 2 µl de ADN molde. Se realizó un pre-ciclo de 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 90°C, 30 s a 54°C y 1 min a 72°C. Luego se efectuó un ciclo final de extensión durante 8 min a 72°C. Los productos de la PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.4%. Se utilizó un marcador con un rango 100-1000 pb (Inbio Highway). Cepas controles analizadas: *E. faecalis* DS16 (Gilmore M. Collection; Ca, US) y *E. faecalis* CECT7121.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 11.5 para Windows, aplicando la prueba estadística Chi cuadrado (χ^2). Se consideró estadísticamente significativo el hallazgo de valores de $p < 0.05$.

Resultados

Durante el período analizado se caracterizaron genotípicamente como *E. faecalis*: 41 aislamientos en he-

ces de pollos y 38 aislamientos en carne picada. En las muestras de origen humano se reconocieron aislamientos significativos en hemocultivos (11); líquidos abdominales (7), líquido pericárdico (1), líquido articular (1) y absceso retroperitoneal (2).

La investigación del gen estructural *cylA* permitió reconocer la presencia de este determinante de virulencia en *E. faecalis* recuperados de heces y en carne picada. Este determinante genético estuvo asociado con ANRG en la totalidad de aislamientos provenientes de carne picada y en 7/9 *cylA*+ recuperados de heces de animales (Tabla 1).

Tabla 1. Portación del gen *cylA* y expresión de alto nivel de resistencia a gentamicina en *E. faecalis* de origen clínico y no clínico

Origen	n	n (%)		
		ANRG	<i>CylA</i>	ANRG+ <i>cylA</i>
No clínico	79			
Carne	38	7 (18.4)	5 (13.2)	5 (13.2)
Pollo	41	28 (63.4)	9 (23.7)	7 (18.4)
Clínico	22			
Hemocultivos	11	11 (100)	11 (100)	11 (100)
Líquidos de punción	9	1 (11.1)	0	0
Abscesos	2	2 (100)	0	0

ANRG: alto nivel de resistencia a gentamicina.

cylA: gen estructural *cylA*.

En carne picada el 18.4% de los aislamientos presentó ANRG, sin embargo en heces de pollos esta resistencia fue significativamente mayor ($p < 0.05$). La presencia de ANRG en aislamientos de *E. faecalis* recuperados de heces de pollos fue más frecuente ($p < 0.05$) que la asociación ANRG + *cylA*. Este hecho no se observó en los aislamientos de carne picada (Tabla 1).

En los aislamientos provenientes de muestras clínicas humanas la totalidad de los enterococos recuperados de hemocultivo presentaron ambas características, de resistencia y de virulencia asociadas. En los líquidos de punción se observó ANRG en un aislamiento proveniente del líquido articular (1/9) y en 2/2 aislamientos de abscesos retroperitoneales (Tabla 1).

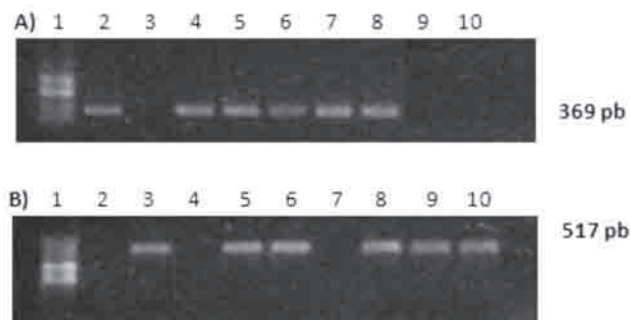
En todos los aislamientos con ANRG se detectó el gen aac (6')-le-aph (2'')-Ia (Figura 1).

Este hallazgo es coincidente con los valores de sensibilidad cuantitativa para gentamicina y estreptomycin, CIMgen >500 µg/ml y la CIMestr <2000 µg/ml, en todos los aislamientos que presentaron ANRG.

Discusión

En la última década, *E. faecalis* ha emergido como un importante patógeno asociado a los cuidados de la sa-

Figura 1. *E. faecalis* de carne picada con determinantes genéticos de ANRG y hemolisina



A) Amplificación (PCR múltiple) de genes aac(6)-le-aph(2'')-la (369 pb), aph(2'')-lb (867 pb), aph(2'')-lc (444 pb), aph(2'')-ld (641 pb), aph(3)-IIIa (523 pb) y ant(4)-Ia (294 pb). Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: *E. faecalis* NMH 524 (ANRG, 369 pb). Calle 3: *E. faecalis* ATCC 29212 sin ANRG. Calles 4-8: aislamientos (CPT13-CPT17) de carne con ANRG. Calles 9 y 10: aislamientos sin ANRG (CPT23, CPT25). B) Amplificación del gen cyla (517 pb). Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: *E. faecalis* CECT7121 no productor de hemolisina. Calle 3: *E. faecalis* DS16 productor de hemolisina. Calles 4, 7: aislamientos (CPT10, CPT11) no productores de hemolisina. Calles 5, 6, 8, 9, 10: aislamientos (CPT13-CPT17) con banda 517 pb.

lud.³⁴ En distintas especies de enterococos, el ANRG se ha descrito en cepas de origen humano, de alimentos y de animales destinados a consumo^{33, 35-37}.

El hallazgo frecuente de ANRG en *E. faecalis* recuperados de heces de pollos coincide con lo comunicado por Brtková et al³⁸, que detectaron un 45% de ANRG en enterococos recuperados de pollos de corta edad.

Recientemente nuestro grupo comunicó la presencia de enterococos con alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos (7.8%), a partir de productos cárnicos fermentados³⁹. Estos datos sugieren que aves de corral y productos cárnicos pueden constituir un reservorio específico de estos determinantes genéticos. Donabedian et al³³, también identificaron el gen aac(6)-le-aph(2'')-la de ANRG en el 38% de aislamientos provenientes de granjas criaderos de pavos; aunque en este trabajo de investigación la totalidad de *E. faecalis* con ANRG portaron el gen bifuncional.

Es importante destacar que la totalidad de los aislamientos de hemocultivo presentaron ANRG y cyla+. Del Campo et al³⁵, comunicaron el aislamiento de enterococos con ANRG (70%) en muestras de hemocultivos. Asimismo, en un estudio multi-céntrico europeo se detectó ANRG (48.3%) en cepas invasivas de enterococos.⁶ Huycke et al²³, en bacteriemias por *E. faecalis* observa-

ron un 35.8% de ANRG, el 98.5% de los mismos presentaban hemolisina; en línea con lo obtenido en esta investigación.

Los resultados del presente trabajo muestran una concordancia del gen codificante de ANRG entre enterococos de origen humano, de alimentos y de animales productores de alimentos sobre un área geográfica determinada. Como se ha demostrado que aislamientos de *E. faecalis* de origen animal y humano presentan idéntico mecanismo de resistencia a gentamicina, es factible el intercambio de estos genes de resistencia a través de transferencia horizontal, como ya fue probado por Sparo et al⁴⁰. Los hallazgos de ANRG en enterococos en las heces de los animales de cría también sugiere la probable diseminación hacia los alimentos. La presencia de *E. faecalis* con ANRG en las heces de pollos puede devenir del uso de aminoglucósidos en los animales de cría.

Existe evidencia de que, el aumento en el consumo de agentes antimicrobianos por los animales, resulta en un aumento en la resistencia a los antimicrobianos^{41,42}.

En el presente trabajo se identificó al determinante de virulencia cyla (13.2%) en *E. faecalis* aislados de carne picada. Sánchez Valenzuela et al⁴³, detectaron este gen en enterococos de derivados cárnicos en una menor proporción (5.3%). En España, Sánchez Valenzuela et al.⁴⁴ en alimentos artesanales de origen animal observaron una prevalencia de cyla en *E. faecalis* similar (22.2%) a la informada en este trabajo. Aslam et al.⁴⁵ también hallaron una mayor frecuencia de portación de cyla en enterococos recuperados de pollos con respecto a los aislamientos de carne de origen bovino.

En el presente trabajo se detectó la asociación cyla-ANRG en enterococos aislados de pollos (18.4%) y carne picada (13.2%). Franz et al.⁴⁶ y Ribeiro et al.⁴⁷ observaron menores prevalencias de *E. faecalis* resistentes a gentamicina- cyla+ al analizar, respectivamente, alimentos lácteos de origen europeo (8.5%) y productos cárnicos tradicionales fermentados (5%).

Para comprobar la presencia y posible circulación de los genes de resistencia y de virulencia en un ecosistema determinado, se utilizó como modelo el ANRG y la presencia de citolisina/hemolisina en *E. faecalis* de diferente orígenes. Se pudo comprobar la diseminación, en el partido de Tandil, de aislamientos de *E. faecalis* de origen humano, de alimentos y de animales portadores de los genes aac(6)-le-aph(2'')-la y cyla.

Agradecimientos

A la Fundación "Alberto J. Roemmers" por el subsidio otorgado.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Baquero F, Blázquez J. Evolution of antibiotic resistance. *Trends Ecol Evol* 1997;12(2):482-7.
2. Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, et al. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(1):59-65.
3. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect Immun* 2008;76(9):4120-8.
4. Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, et al. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect* 2011;13(14-15):1185-90.
5. Arias CA, Murray BE. The rise of *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(4):266-78.
6. Kuch A, Willems RJA, Werner G, et al. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(3):551-8.
7. Sparo M, Núñez GG, M. Castro M, et al. Characteristics of an environmental strain *Enterococcus faecalis* CECT 7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiol* 2008;25(4):607-15.
8. Sparo MD, Jones DG, Sánchez Bruni SF. In vitro efficacy of the novel peptide CECT7121 against bacteria isolated from mastitic dairy cattle. *Lett Appl Microbiol* 2009a;48(2):187-92.
9. Sparo MD, Jones DG, Sánchez Bruni SF. Assessment of the in vitro efficacy of the novel antimicrobial peptide CECT7121 against human Gram-positive bacteria from serious infections refractory to treatment. *Chemotherapy* 2009b;55(4):270-7.
10. Patterson JE, Zervos MJ. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus*: microbiology, genetic basis, and epidemiology. *Rev Infect Dis* 1990;12(4):644-52.
11. Gentile JH, Sparo MD, Pipo VB, Gallo AJ. Meningitis due to *Enterococcus faecalis*. *Medicina (B. Aires)*. 1995;55(5):435-7.
12. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006;42(Suppl 1):S25-34.
13. Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Werner G, Sundsfjord A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(6): 541-54.
14. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* 2000;31(2):586-9.
15. Chow JW, Donabedian SM, Clewell SM, Sahm DB, Zervos MJ. In vitro susceptibility and molecular analysis of gentamicin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32(3):141-6.
16. Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiol Infect* 2001;126(2):197-204.
17. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010;13(6):151-71.
18. Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(3):511-4.
19. Fernández-Guerrero M.L, Herrero L, Bellver M, Gadea I, Roblas RF, De Górgolas M. Nosocomial enterococcal endocarditis: a serious hazard for hospitalized patients with enterococcal bacteraemia. *J Intern Med* 2002;252(6):510-5.
20. Čanžek Majhenič A, Rogelj I, Perko B. Enterococci from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int J Food Microbiol* 2005;102(2):239-44.
21. Ruzauskas M, Virgailis M, Slugzdinienė R, et al. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from livestock in Lithuania. *Veterinarski Arhiv* 2009;79(5):439-49.
22. Liu Y, Liu K, Lai J, Wu C, Shen J, Wang Y. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species of food animal origin from Beijing and Shandong Province, China. *J Appl Microbiol* 2013;114(2):555-63.
23. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(8):1626-34.
24. Jett BD, Jensen HG, Nordquist RE, Gilmore MS. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun* 1992;60(6):2445-52.
25. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 1995;34(2):152-6.
26. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987;25(8):1524-8.
27. Dupont H, Vael C, Muller-Serieys C, et al. Prospective evaluation of virulence factors of enterococci isolated from patients with peritonitis: impact on outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(3):247-53.
28. Jang, HC, Lee S, Song KH, et al. Clinical features, risk factors and outcomes of bacteremia due to Enterococci with high-level gentamicin resistance: comparison with bacteremia due to Enterococci without high-level gentamicin resistance. *J Korean Med Sci* 2010;25(1):3-8.
29. APHA. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food, 4th edn. American Public Health Association. Washington D.C., US. 2001.
30. Ke D, Picard FJ, Martineau F, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3497-503.
31. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3558-65.
32. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22nd informational supplement. CLSI: Wayne, PA. 2012.
33. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, et al. Molecular characterization of gentamicin resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 2003;41(3):1109-13.
34. Fariñas MC, Torres C. Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(8):500-2.
35. Del Campo R, Tenorio C, Rubio C, Castillo J, Torres C, Gó-

- mez-Lus R. Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2000;15(3):221-6.
36. Novais C, Coque TM, Costa MJ, Sousa JC, Baquero F, Peixe LV. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(6):1139-43.
 37. Jamet E, Akary E, Poisson MA, Chamba JF, Bertrand X, Serror P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol* 2012;31(2):191-8.
 38. Brtková A, Revllová M, Bujdaková H. Dissemination of virulence factors and antimicrobial resistance in faecal enterococci from poultry in Slovakia. *Curr Nutr Food Sci* 2011;7(2):137-43.
 39. Delpech G, Pourcel G, Schell C, et al. Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from artisanal food of animal origin in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9(10):939-44.
 40. Sparo M, Urbizu L, Solana MV, et al. High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Lett Appl Microbiol* 2012;54(2):119-25.
 41. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17(6):431-7.
 42. Mathew AG, Cissell R, Liamthong S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis* 2007;4(2):115-33.
 43. Sánchez Valenzuela A, Ben Omar N, Abriouel H, et al. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol* 2008;46(8):2648-52.
 44. Sánchez Valenzuela A, Ben Omar N, Abriouel H, et al. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 2009;20(4):381-5.
 45. Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol* 2012;156(3):222-30.
 46. Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NAMK, Vancaneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococci* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(9):4385-9.
 47. Ribeiro T, Oliveira M, Fraqueza M., et al. Antibiotic resistance and virulence factors among *Enterococci* isolated from Chouriço, a traditional Portuguese dry fermented sausage. *Food Protect* 2011;74(3):465-9.

“...más fácil describir la enfermedad y la muerte que combatirlas, o inventar siniestras intrigas que ser víctimas de ellas sin previo aviso. Pero, ¿por qué no recogen por sí mismos el material, esos escritores profesionales? Casi nunca lo hacen. Los novelistas que quieren llevar al lector a los bajos fondos, rara vez los frecuentan. Los especializados en la enfermedad y la muerte, raramente pueden ser inducidos a acompañarnos al hospital donde acaban de despachar a su heroína. Poetas y filósofos que, en sonoros versos y en prosa, saludan como libertadora a la muerte, palidecen a menudo con sólo oír el nombre de ésta, su mejor amiga. Es una vieja historia. Leopardi, el más grande poeta de la Italia moderna, que deseaba la muerte en exquisitas rimas, desde que era muchacho, fue el primero en huir, cuando el cólera apareció en Nápoles. Hasta el gran Montaigne, cuyas serenas meditaciones sobre la muerte bastan para inmortalizarlo, escapó como una liebre cuando surgió la peste en Burdeos. El sombrío viejo Schopenhauer, el más grande filósofo de nuestro tiempo, que hizo de la negación de la vida la clave de su sistema, interrumpía siempre toda conversación sobre la muerte”.

Axel Munthe, 1857-1949.

La Historia de San Michele

(extraído del prólogo de la 12a edición inglesa, 1930)
