



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

“Caracterización de especies y perfil de resistencia antimicrobiana en enterococos aislados de alimentos de origen animal provenientes de un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina”

Tesista: Bioquímico Gastón Delpech

Director: Prof. Dra. María Marta De Luca

Co-director: Prof. Dra. Mónica Sparo

Lugar de trabajo: Escuela Superior de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

2013

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Autoridades

Decano

Prof. Dr. Jorge Guillermo MARTINEZ

Vicedecano

Prof. Dr. Enrique PÉREZ ALBIZÚ

Secretaria de Asuntos Académicos

Prof. Dra. Ana Lía ERRECALDE

Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Prof. Dra. María Marta DE LUCA

Secretaria de Extensión Universitaria

Prof. Dra. Graciela Susana ETCHEGOYEN

Secretario Docente Asistencial

Prof. Dr. Fernando CURCIO

Secretario Económico Financiero

Cdor. Rubén GALLE

Director del Departamento de Postgrado

Prof. Dr. Eduardo RODRÍGUEZ

Director de la Escuela Universitaria de Recursos Humanos del Equipo de Salud

Prof. Dr. Alberto Mario FONTANA

Secretario de Ciencia y Técnica

Prof. Dr. Gustavo Juan RINALDI

Secretario Médico Asistencial

Prof. Dr. Pedro Rodolfo ESTELRRICH

Secretario de Relaciones Institucionales

Prof. Dr. Julio César HIJANO

Director del Hospital Universitario

Prof. Dr. Guillermo Daniel PRAT

Asesor de Gestión

Dr. Felipe CAMPOAMOR

Secretaria de Supervisión Administrativa

Sra. Norma FORTUNATO de CARRADORI

Secretaria Administrativa

Sra. Elsa Lidia ANTONINI

A mi familia

“Invertir en conocimientos produce siempre los mejores beneficios”

Benjamin Franklin

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional desde el principio hasta el final.

A la Prof. Dra. María Marta De Luca, por su dirección, orientación y consejos a lo largo de este proceso tanto a distancia como en persona.

A la Prof. Dra. Mónica Sparo, por su guía constante, su entusiasmo contagioso por la investigación además de compartir sus conocimientos y experiencia. Remamos y llegamos.

A Celiay Gisela, por su acompañamiento desinteresado.

Al Dr. Miguel Ángel García Allende y la Lic. Mónica Ceci, por brindarme su tiempo, colaboración y sugerencias indispensables.

A la Escuela Superior de Ciencias de la Salud (UNCPBA), por darme su apoyo institucional para realizar esta investigación.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por esta gran oportunidad.

A la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP), por abrirme sus puertas

A la gente de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas, por su trato cálido y amable

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron con el recorrido por este camino y que colaboraron para que esta tesis fuera posible.

GRACIAS

INDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ubicación taxonómica	2
1.2. Hábitat de <i>Enterococcus</i> spp.	4
1.3. Caracterización fenotípica de <i>Enterococcus</i> spp.	5
1.4. Impacto de <i>Enterococcus</i> spp.	6
1.5. Factores de virulencia	9
1.5.1. Hemolisina	10
1.5.2. Sustancia Agregativa	11
1.5.3. Gelatinasa	12
1.5.4. Biofilm	13
1.5.5. Evasión de la respuesta inmune	15
1.6. Resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp.	17
1.6.1. β -lactámicos	18
1.6.2. Glucopéptidos	20
1.6.3. Aminoglucósidos	21
1.6.4. Macrólidos	24
1.6.5. Quinolonas	25
1.6.6. Oxazolidinonas	26
1.6.7. Tetraciclinas	27
1.6.8. Cloranfenicol	28
1.7. Producción de alimentos de origen animal en el Centro de la Provincia de Buenos Aires	29

OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. OBJETIVO 1. Aislar y caracterizar fenotípicamente a nivel de especie enterococos recuperados de alimentos de origen cárnico y lácteo elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina	34
1.1. Período y área de estudio	34
1.2. Toma de muestras	35
1.2.1. Salamín artesanal	36
1.2.2. Carne picada	37
1.2.3. Leche de cabra	37
1.2.4. Queso de cabra artesanal	38
1.2.5. Queso de vaca artesanal	38
1.2.6. Queso de oveja artesanal	39
1.3. Procesamiento de las muestras	39
1.3.1. Obtención de homogenatos a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales	39
1.3.1.1.Salamín artesanal	39
1.3.1.2.Carne picada	39
1.3.1.3.Leach de cabra	40
1.3.1.4.Queso de vaca artesanal, queso de cabra artesanal y queso de oveja artesanal	40
1.4.Caracterización fenotípica de aislamientos de enterococos	40
1.4.1. Aislamiento inicial a partir de homogenatos de productos cárnicos y lácteos	40
1.4.1.1. Preparación de diluciones	40
1.4.1.2.Aislamiento inicial a partir de homogenatos	40

1.4.2.Obtención de cultivos puros	41
1.4.3.Conservación y recuperación de aislamientos	41
1.4.4. Caracterización fenotípica a nivel de género y especie	41
1.4.4.1.Coloración de Gram	41
1.4.4.2.Prueba de catalasa	42
1.4.4.3.Desarrollo en caldo con cloruro de sodio 6,5% p/v	42
1.4.4.4.Hidrólisis de esculina en presencia de 40% de bilis	43
1.4.4.5.Actividad de pirilidonil arilamidasa	43
1.4.4.6.Fermentación de hidratos de carbono	43
1.4.4.6.1. Preparación de las soluciones de hidratos de carbono 10% p/v	44
1.4.4.6.2. Desarrollo de la reacción	44
1.4.4.7.Utilización de piruvato de sodio	45
1.4.4.7.1. Preparación de la solución de piruvato de sodio 10% p/v	45
1.4.4.7.2. Desarrollo de la reacción	45
1.4.4.8.Hidrólisis de arginina	46
1.4.4.8.1. Preparación de la solución de arginina 10% p/v	46
1.4.4.8.2. Desarrollo de la reacción	46
1.4.4.9. Motilidad	47
1.4.4.10.Producción de pigmento	47
1.4.4.11.Tolerancia al telurito de potasio 0,04%	47
1.4.4.12. Formación de ácido en caldo con metil- α -D-glucopiranosido al 1% y rojo de fenol	48
1.4.5.Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida	48
1.4.5.1.Preparación de extractos proteicos	49

1.4.5.2.Corrída electroforética	49
1.4.5.3.Tinción de proteínas	49
1.4.5.4.Decoloración de geles	50
1.4.5.5.Secado y conservación de geles	50
1.4.5.6.Análisis de geles de poliacrilamida	50
1.4.5.7.Cepas de referencia utilizadas para SDS-PAGE	50
2. OBJETIVO 2. Detectar la expresión de distintos factores de virulencia en los aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp.	51
2.1. Obtención de cultivos puros	51
2.2. Detección de producción de hemolisina	52
2.3. Detección de gelatinasa	52
2.4. Producción de Sustancia Agregativa	52
2.5. Producción de <i>biofilm</i> en microplacas de poliestireno	53
2.6. Ensayo de resistencia a la opsonofagocitosis	53
2.7. Resistencia al efecto bactericida del suero normal	54
3. OBJETIVO 3. Determinar el perfil de resistencia asociada a antimicrobianos de utilización clínica para <i>Enterococcus</i> spp. mediante pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> cualitativas y cuantitativas.	54
3.1.Pruebas cualitativas	55
3.1.1.Prueba de difusión en agar	55
3.1.2.Producción de β -lactamasa	56
3.2.Pruebas cuantitativas	57
3.2.1.Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	57
4.OBJETIVO 4. Detectar los fenotipos de resistencia a glucopéptidos en los enterococos recuperadas	58
4.1.Detección <i>in vitro</i> de resistencia intrínseca a vancomicina	58
4.2.Categorización de fenotipos de resistencia a glucopéptidos	58

5. Análisis estadístico	58
APÉNDICE 1. Preparación de reactivos para SDS-PAGE	60
RESULTADOS	63
1. OBJETIVO 1	64
2. OBJETIVO 2	69
3. OBJETIVO 3	77
4. OBJETIVO 4	101
DISCUSIÓN	103
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	156
GLOSARIO	171
ÍNDICE DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS	175

RESUMEN

Los enterococos son microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Forman parte de la microbiota habitual del tracto gastro-intestinal del hombre, de los animales y de los productos de ese origen. En la actualidad, se considera que el género *Enterococcus* presenta un comportamiento dual. Existe documentación sobre las propiedades biotecnológicas de estos microorganismos como la existencia de enterococos que se comportan como biopreservantes o como probióticos. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas estas bacterias han sido reconocidas con frecuencia creciente como patógenos oportunistas vinculados con la producción de cuadros infecciosos en los seres humanos. Asimismo, se ha comprobado que los enterococos presentan resistencia a un amplio número de antimicrobianos. A la resistencia natural o propia de las especies se agrega la resistencia adquirida que posibilita la diseminación y generación de reservorios de enterococos resistentes a los antimicrobianos. Asimismo, se ha detectado en enterococos la presencia de diversos compuestos denominados factores de virulencia, que contribuyen con la patogenicidad de estos microorganismos en las distintas etapas del proceso infeccioso. Dentro del género *Enterococcus* las especies más frecuentes son *E. faecalis* y *E. faecium* en muestras de origen humano como en alimentos de origen animal. Otras especies han sido aisladas con menor frecuencia tales como *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. raffinosus*. Estudios previos han comunicado que los enterococos recuperados de origen animal son capaces de presentar resistencia a múltiples antimicrobianos utilizados en Medicina Humana como en Medicina Veterinaria, como los enterococos resistentes a glucopéptidos, con alto nivel de resistencia a los aminoglicósidos o ampicilino-resistentes. Se ha demostrado en aislamientos de origen cárnico y lácteo la producción de factores de virulencia tales como gelatinasa, hemolisina y Sustancia Agregativa. En Argentina, se ha comunicado la colonización o infecciones severas causadas por enterococos multi-resistentes a los antimicrobianos. Sin embargo, es escasa la documentación sobre la expresión de resistencia antimicrobiana y/o de factores relacionados con la patogenicidad por parte de enterococos recuperados de

alimentos de origen animal, cárnicos o lácteos. En el Centro de la Provincia de Buenos Aires existe un área rural, incluyendo al Partido de Tandil, en la cual tienen gran relevancia la producción, consumo y comercialización de alimentos de origen animal (cárnicos, lácteos) elaborados artesanalmente. Sin embargo, hasta el momento no se contaba con información sobre la prevalencia de enterococos resistentes a los antimicrobianos y que expresaran factores de virulencia.

El objetivo general de esta investigación fue caracterizar fenotípicamente y determinar el perfil de resistencia *in vitro* de especies de enterococos aislados de alimentos de origen animal provenientes de un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Durante el período 2009-2012 se analizaron N = 1937 muestras de carne picada ($n = 1080$), salamines artesanales ($n = 642$), quesos de vaca ($n = 119$), quesos de cabra ($n = 42$), leche de cabra ($n = 30$) y queso de oveja ($n = 24$). En una primera etapa se aislaron y caracterizaron fenotípicamente a nivel de especie, enterococos recuperados de alimentos de origen cárnico y lácteo elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Se recuperaron 252 enterococos de alimentos cárnicos y lácteos. *E. faecalis* (65,5%), *E. faecium* (32,1%), *E. raffinosus* (0,8%), *E. avium* (0,4%), *E. durans* (0,4%), *E. gallinarum* (0,4%) y *E. hirae* (0,4%). Se observó una mayor frecuencia de recuperación de enterococos en alimentos cárnicos (59,1%) que en productos lácteos (40,9%). En las dos especies de enterococos más prevalentes se observó un comportamiento divergente pues un mayor número de *E. faecalis* se aisló de alimentos cárnicos (81,8%) aunque se observó una mayor frecuencia de recuperación de *E. faecium* en productos lácteos (82,7%). Los aislamientos no tipificados como pertenecientes a estas especies fueron aislados en su totalidad de muestras de origen lácteo.

La caracterización fenotípica a nivel de especie se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales. Sin embargo, también se utilizó una metodología que no se basa en la expresión de características fisiológicas, las cuales pueden presentar frecuencias variables incluso a nivel intra-especie. Se recurrió al análisis de perfiles proteicos totales mediante electroforesis vertical en gel de

poliacrilamida, que ha sido ampliamente utilizada y validada para aislamientos clínicos de enterococos aunque con escasa aplicación en los de origen ambiental.

En una segunda etapa se detectó la expresión de distintos factores de virulencia en los enterococos recuperados de alimentos de origen animal. El 28,5% de los aislamientos fue productor de factores de virulencia, recuperados de productos cárnicos (68,1%) y lácteos (31,9%). El 18,5% de los enterococos aislados expresó un factor de virulencia mientras que el 10,0% fue positivo para dos o tres factores de virulencia. En 24/252 aislamientos se observó la expresión de hemolisina, principalmente en enterococos recuperados de alimentos cárnicos (83,3%) aunque también en productos lácteos (16,7%). A nivel de especie se observó un mayor número de *E. faecalis* positivos para hemolisina ($n = 23$) y en menor cantidad para *E. faecium* ($n = 1$). Los aislamientos que expresaron hemolisina fueron recuperados de carne picada ($n = 13$), salami ($n = 7$), queso de vaca ($n = 3$) y queso de oveja ($n = 1$). Los enterococos de leche y queso de cabra no fueron productores de hemolisina. En 43/252 enterococos recuperados de productos cárnicos (65,1%) y lácteos (34,9%) se observó la producción de gelatinasa. Este factor de virulencia se detectó en *E. faecalis* ($n = 38$), *E. faecium* ($n = 1$), *E. hirae* ($n = 1$) y *E. raffinosus* ($n = 1$). Los aislamientos gelatinasa-positivos fueron recuperados de carne picada ($n = 19$), salami artesanal ($n = 9$), leche de cabra ($n = 4$), queso de vaca ($n = 7$) y queso de oveja ($n = 4$). No se detectó la expresión de este factor de virulencia en enterococos de queso de cabra. La producción de Sustancia Agregativa fue detectada en el 13,1% de los enterococos recuperados de alimentos cárnicos (60,6%) y lácteos (39,4%). los aislamientos productores de Sustancia Agregativa fueron caracterizados como *E. faecalis* (87,9%) y como *E. faecium* (12,1%). Los enterococos tipificados como pertenecientes a las otras especies no expresaron Sustancia Agregativa. Los aislamientos fueron recuperados de carne picada ($n = 13$), salami artesanal ($n = 7$), queso de vaca ($n = 5$), queso de oveja ($n = 5$) y leche de cabra ($n = 3$). Al analizar la producción de factores de virulencia se determinó que la expresión de un solo componente se observó en *E. faecalis* (89,3%), *E. faecium* (8,5%) y *E. raffinosus* (2,2%). Los aislamientos fueron recuperados de productos cárnicos (70,2%) y de productos

lácteos (29,8%). Se detectó la expresión simultánea de dos o tres factores de virulencia. Se observó la producción conjunta de hemolisina y gelatinasa en el 1,6% de los aislamientos, caracterizados como *E. faecalis* de alimentos cárnicos ($n = 3$) y lácteos ($n = 1$). En cambio, el fenotipo hemolisina-Sustancia Agregativa (1,2%) se detectó en alimentos lácteos y en menor número en derivados cárnicos. La producción simultánea de gelatinasa-Sustancia Agregativa fue la más prevalente entre los aislamientos que expresaron dos factores de virulencia (6,0%). Los aislamientos provinieron de alimentos cárnicos (60%) y lácteos (40%), con predominio de *E. faecalis* ($n: 13$) sobre *E. faecium* ($n = 2$). Asimismo, se observó en *E. faecalis* ($n = 3$) la expresión asociada de hemolisina, gelatinasa y Sustancia Agregativa. Los enterococos con este fenotipo de virulencia fueron recuperados en su totalidad de productos cárnicos.

En esta investigación se evaluó la capacidad de los enterococos aislados de alimentos cárnicos y lácteos para formar *biofilm* mediante un ensayo *in vivo*. Se comprobó que el 100% de los enterococos no fue productor de biopelícula. Asimismo, se observó que fueron susceptibles a la muerte por opsonofagocitosis y a la actividad bactericida del suero normal, pruebas realizadas para determinar si los aislamientos expresaban componentes polisacáridicos que contribuyeran con la evasión de la respuesta inmune.

En una tercera etapa se investigó el perfil de resistencia antimicrobiana de los enterococos recuperados de alimentos de origen animal mediante pruebas de sensibilidad *in vitro* cualitativas (difusión en agar, producción de beta-lactamasa) y cuantitativas (Concentración Inhibitoria Mínima). Se detectó resistencia antimicrobiana en el 45,2% de los enterococos estudiados: *E. faecalis*, (51,8%), *E. faecium*, (47,4%) y *E. gallinarum*, (0,8%). El 49,1% presentó resistencia a un antimicrobiano y el 50,9% a dos o más antimicrobianos en forma simultánea. Mediante la prueba cualitativa de difusión en agar se observó la expresión de resistencia a: ampicilina (18,3%), tetraciclina (11,1%), ciprofloxacina (9,1%), eritromicina (12,7%), cloranfenicol (4,8%), linezolid (5,6%), alto nivel de resistencia a gentamicina (12,7%), alto nivel de resistencia a estreptomina (10,3%),

vancomicina (12,3%) y teicoplanina (12,3%). Se detectaron diferencias en lo concerniente a las frecuencias de resistencia tanto a nivel de especie como de acuerdo al tipo de alimento considerado. Asimismo, se observaron discrepancias y similitudes entre las pruebas de difusión y la metodología cuantitativa, al determinar las Concentraciones Inhibitorias Mínimas para los antimicrobianos en los enterococos investigados. En ese aislamiento se detectó la producción de β -lactamasa mediante una prueba específica. Se demostró que un aislamiento de *E. faecalis* categorizado como ampicilino-sensible por el método cualitativo presentaba una Concentración Inhibitoria Mínima compatible con resistencia a ese antimicrobiano. En cambio, se confirmó la susceptibilidad intermedia a vancomicina para el aislamiento de *E. gallinarum*.

El 57,1% de los aislamientos mono-resistentes y el 46,5% de los multi-resistentes fueron caracterizados como *E. faecalis*. En cambio 41,1% de los enterococos resistentes a un antimicrobiano y el 53,5% de resistentes múltiples fueron tipificados como *E. faecium*. La mono-resistencia se observó para ampicilina, tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, linezolid, alto nivel de resistencia a gentamicina y alto nivel de resistencia a estreptomina. No se observó la expresión única de resistencia a vancomicina o a teicoplanina. Los enterococos mono-resistentes fueron recuperados de alimentos cárnicos (33,9%) y de productos lácteos (66,1%).

Se observó resistencia simultánea en un rango de 2 a 8 antimicrobianos en 58/252 aislamientos de enterococos. Se detectó resistencia antimicrobiana múltiple en *E. faecalis* (27/58) y *E. faecium* (31/58) de productos cárnicos (53,4%) y lácteos (46,6%). Los distintos fenotipos de multi-resistencia antimicrobiana abarcaron a la totalidad de los antimicrobianos ensayados. El número de fenotipos de multi-resistencia fue variable de acuerdo a la cantidad de antimicrobianos para los cuales se observó expresión simultánea. Se detectó resistencia conjunta a dos antimicrobianos en 17 aislamientos distribuidos en ocho fenotipos de resistencia, resistencia a tres antimicrobianos ($n = 23$) agrupados en seis fenotipos, resistencia a cuatro antimicrobianos ($n = 1$), resistencia a cinco antimicrobianos ($n = 3$; 2

fenotipos), resistencia a seis antimicrobianos ($n = 6$; 4 fenotipos), resistencia a siete antimicrobianos ($n = 2$; 2 fenotipos) mientras que $n = 6$ aislamientos expresaron un fenotipo de resistencia conjunta a ocho antimicrobianos.

Al estudiar los perfiles de resistencia antimicrobiana y la producción de factores de virulencia se observó la expresión simultánea de factores de virulencia y de resistencia a los antimicrobianos en el 12,7% de los enterococos recuperados de alimentos de origen animal, tipificados previamente como *E. faecalis* (10,3%) y *E. faecium* (2,4%). Los aislamientos fueron recuperados de carne picada ($n = 11$), salami artesanal ($n = 8$), queso de oveja ($n = 8$) y queso de vaca ($n = 5$). No se detectó expresión conjunta de factores de virulencia y de resistencia antimicrobiana en enterococos de leche de cabra o de queso de cabra. En estos fenotipos simultáneos se observaron uno, dos o tres factores de virulencia y de uno a seis antimicrobianos. Se destaca la presencia de la expresión conjunta en enterococos resistentes a los glucopéptidos, ampicilino-resistentes, con alto nivel de resistencia a gentamicina y /o alto nivel de resistencia a estreptomycin. En estas combinaciones se han detectado tanto factores de virulencia como tipos de resistencia antimicrobiana que pueden ser diseminados mediante transferencia horizontal.

En una fase posterior se detectaron los fenotipos de resistencia a glucopéptidos en los enterococos recuperados de alimentos cárnicos y lácteos. Se detectó resistencia a glucopéptidos en 31/252 (12,3%) enterococos recuperados de productos lácteos (23/252) y cárnicos (8/252). En cambio, se observó susceptibilidad intermedia en 1/252 (0,4%) aislamientos, tipificado previamente como *E. gallinarum* de origen lácteo. Los enterococos con resistencia a glucopéptidos fueron tipificados como *E. faecium* y la totalidad fue categorizada como VanA. Este fenotipo confiere resistencia inducible de alto nivel a vancomicina y a teicoplanina. No se recuperaron enterococos que expresaran el fenotipo VanB. El aislamiento de *E. gallinarum* fue categorizado como VanC.

Se estableció la prevalencia de *Enterococcus* spp. en las muestras cárnicas y lácteas analizadas. Se detectaron variaciones para las distintas especies y de

acuerdo al tipo de alimento. Para *E. faecalis* se observó una mayor prevalencia en muestras de queso de oveja, seguido por leche de cabra, queso de vaca, queso de cabra, carne picada y salami artesanal. En cambio, para *E. faecium* el orden y frecuencia de las de prevalencias no fue el mismo que para *E. faecalis* (queso de vaca seguido por queso de oveja, queso de cabra, leche de cabra, salami artesanal y en menor medida de carne picada). El rango de prevalencia de las otras especies, menos frecuentes, estuvo comprendido entre el 0,8% y 6,7% de las muestras de los alimentos de los cuales se recuperaron.

En esta investigación se aislaron enterococos de productos animales que expresaron factores de virulencia y/o resistencia a los antimicrobianos ensayados. La recuperación de enterococos con resistencia única como múltiple a los antimicrobianos junto con la expresión conjunta de factores de virulencia debe ser considerada un motivo de preocupación a nivel de la Salud Pública debido a que se ha demostrado que los determinantes genéticos que los codifican pueden ser transferidos a otras bacterias como ocurre con la resistencia a glucopéptidos y de alto nivel a los aminoglucósidos.

Los resultados de esta tesis demuestran que los enterococos que habitan reservorios no humanos, como los alimentos de origen animal elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, juegan un papel crítico en la adquisición y diseminación de aislamientos con resistencia múltiple a los antimicrobianos que limitan las opciones terapéuticas disponibles y/o que producen factores involucrados con la patogenicidad de este género bacteriano.

INTRODUCCIÓN

El género *Enterococcus* pertenece a un grupo de microorganismos conocido como bacterias ácido-lácticas, que integran la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de mamíferos y de los alimentos de origen animal (Foulquié Moreno *et al.* 2006).

Tradicionalmente, los enterococos han sido considerados como patógenos en bajo grado. Su capacidad para producir infección en el hombre está relacionada con la presencia de factores de virulencia y su marcada resistencia a los antimicrobianos (Franz *et al.* 2003). Diversas especies del género *Enterococcus* pueden adquirir y compartir material genético asociado a mayor virulencia y/o a resistencia a los antimicrobianos tanto inter-género como intra-género (Paoletti *et al.* 2007, de Niederhäuser *et al.* 2011, Vignaroli *et al.* 2011).

Se ha comunicado la existencia de enterococos aislados de alimentos de origen animal que no poseen los factores de virulencia descritos para este género, aunque la resistencia múltiple a los antimicrobianos contribuye a su virulencia (Foulquié Moreno *et al.* 2006, Sánchez Valenzuela *et al.* 2008, Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

En Argentina existe escasa documentación sobre las especies implicadas, la expresión de factores de virulencia y el perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas de enterococos aislados de alimentos de origen animal (Marguet *et al.* 2008).

1.1. Ubicación taxonómica

El género *Enterococcus* pertenece a la rama clostridial, con bajo contenido G+C, del Phylum *Firmicutes*. Está relacionado filogenéticamente con los géneros *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Facklamia*, *Globicatella* y *Abiotrophia* (Murray 1990).

En la Figura 1 se observa la ubicación taxonómica del género *Enterococcus*.

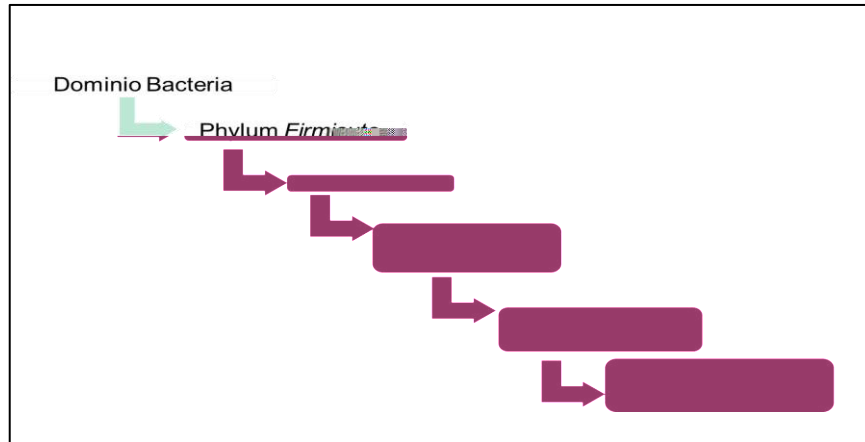


Figura 1. Ubicación taxonómica del género *Enterococcus*.

El término “enterococo” fue utilizado por primera vez en 1899, para describir a diplococos de origen intestinal. En 1906 se acuñó la denominación *Streptococcus faecalis* para designar a la primera especie del género. En 1937 los enterococos fueron incluidos como un grupo dentro de una clasificación serológica de las especies del género *Streptococcus*. Con el surgimiento de las técnicas moleculares como herramientas para la clasificación taxonómica, se propuso la creación del nuevo género *Enterococcus* (1984) para agrupar a estos microorganismos lejanamente relacionados con los estreptococos (Murray 1990; Devriese *et al.* 2006).

Hasta el momento, han sido propuestas 48 especies como integrantes del género *Enterococcus* de acuerdo a una recopilación realizada por Euzéby (2013): *E.aquimarinus* (2005), *E.asini* (1998), *E.avium* (1984), *E.caccae* (2006), *E.camelliae* (2007), *E.canintestini* (2005), *E.canis* (2003), *E.casseliflavus* (1984), *E.cecorum* (1989), *E.columbae* (1993), *E.devriesei* (2005), *E.dispar* (1991), *E.durans* (1984), *E.faecalis* (1984), *E.faecium* (1984), *E.flavescens* (1992), *E.gallinarum* (1984), *E.gilvus* (2002), *E.haemoperoxidus* (2001), *E.hermanniensis* (2004), *E.hirae* (1985), *E.italicus* (2004), *E.lactis* (2012), *E.malodoratus* (1984), *E.moraviensis* (2001), *E.mundtii* (1986), *E.pallens* (2002), *E.phoeniculicola* (2003), *E.plantarum* (2012), *E.porcinus* (2001), *E.pseudoavium* (1989), *E.quebecensis* (2012), *E.raffinosis* (1989), *E.ratti* (2001), *E.rivorum* (2012), *E.rotai* (2013), *E.saccharolyticus* (1991), *E.saccharominimus* (2004), *E.seriolicida* (1991), *E.silesiacus* (2006), *E.solitarius* (1989), *E.sulfureus* (1991), *E.termitis* (2006),

E.thailandicus (2008), *E.ureasiticus* (2012), *E.ureilyticus* (2013), *E.viikkiensis* (2011), *E.villorum* (2001).

1.2. Hábitat de *Enterococcus* spp.

Los enterococos integran la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Distintas especies de este género pueden colonizar diversos nichos por su excepcional aptitud de desarrollar y resistir en ambientes hostiles. Se han aislado enterococos de suelos, aguas, vegetales y alimentos de origen animal (Sparo & Mallo 2001, Foulquié Moreno *et al* 2006).

El género *Enterococcus* integra la microbiota de productos cárnicos y lácteos. Su capacidad para sobrevivir a procesos como la pasteurización y para adaptarse a diversas condiciones físico-químicas les permite a estas bacterias colonizar materias primas (carne, leche) como alimentos tratados térmicamente (Foulquié Moreno *et al* 2006).

Datos epidemiológicos indican que *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* constituyen las especies más frecuentemente recuperadas de alimentos de origen animal. Otras especies como *E. durans* y *E. hirae* presentan en su conjunto una prevalencia mucho menor (Ogier & Serror 2008).

Los alimentos de origen lácteo conforman uno de los principales reservorios naturales de *Enterococcus* spp. Por lo tanto su presencia puede estar asociada al medio ambiente o a la contaminación con materia fecal, ya sea de manera directa o indirecta, proveniente de animales de granja o del hombre. Otros factores predisponentes son las condiciones de limpieza del equipo de ordeño y la pureza del agua utilizada para el procesamiento de la leche (Gelsomino *et al.* 2002). La presencia de enterococos ha sido documentada en leche y derivados lácteos. Especies de este género han sido recuperadas de leche y de quesos como *Cebreiro*, *Tolminc*, *Comté* y *Saint Neclaire*, elaborados con leche cruda de vaca; *Cheddar*, elaborado con leche de vaca pasteurizada; *Semicotto*, elaborado con leche cruda de cabra; *Serra* y *Fiore Sardo*, elaborados con leche cruda de oveja;

Feta, elaborado con leche pasteurizada de cabra y oveja (Faría *et al.* 2002, Ogier & Serror 2008).

Se han aislado enterococos de materia prima cruda como carne de pollo, de vaca y de cerdo. En productos fermentados de España, Italia y Alemania como *Chorizo*, *Espetec* y *Landjager* también se han observado recuentos significativos de estas bacterias (Foulquié Moreno *et al.* 2006)

1.3. Caracterización fenotípica de *Enterococcus* spp.

El género *Enterococcus* está integrado por cocos Gram positivos de forma ovoide, que se presentan solos, de a pares (diplococos) o como cadenas cortas. Son anaerobios facultativos y no producen catalasa (Foulquié Moreno *et al.* 2006).

Estas bacterias presentan una temperatura óptima de desarrollo de 35°C, aunque la mayoría de las especies de enterococos puede crecer en un rango de 10°C a 45°C. Pueden desarrollar en medios de cultivo líquidos que contienen cloruro de sodio (6,5%), hidrolizan esculina en presencia de sales biliares al 40% y contienen la enzima pirrolidonil aril amidasa (Murray 1990, Foulquié Moreno *et al.* 2006).

Estas propiedades biológicas pueden ser utilizadas en una primera etapa de caracterización fenotípica para distinguir a nivel de género entre los enterococos y otras bacterias Gram positivas, no productoras de catalasa como *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* spp. (Sparo & Mallo 2001).

Para la caracterización fenotípica de enterococos a nivel de especie el procedimiento utilizado incluye diversas pruebas como el estudio de la fermentación de hidratos de carbono (Cuadro 1).

Cuadro 1. Pruebas para la caracterización fenotípica de *Enterococcus* spp a nivel de especie.

1-Fermentación de hidratos de carbono	
<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa • Melibiosa • Adobitol • Rafinosa • Lactosa • Melezitosa • Ramnosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Manitol • Sorbitol • Arabinosa • Sorbosa • Trehalosa • Xilosa • Sacarosa
2-Utilización de piruvato de sodio	
3-Utilización de arginina	
4-Motilidad	
5-Producción de pigmento	
6-Tolerancia al telurito de potasio 0,04%	
7-Formación de ácido en caldo con metil- α -D-glucopiranosido1% y rojo de fenol	

Una herramienta alternativa disponible para la fenotipificación de enterococos consiste en el análisis de perfiles de proteínas solubles totales mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, SDS-PAGE. Se trata de una técnica de referencia para la caracterización fenotípica de enterococos a nivel de especie debido a que ha sido validada mediante métodos de Biología Molecular (Merquior *et al.* 1994, Alves *et al.* 2004). Andrighetto *et al.* (2001) observaron que al caracterizar enterococos recuperados de productos lácteos existió una buena co-relación entre SDS-PAGE y la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa-ADN Poimórfico Amplificado al Azar (RAPD-PCR), ya que coincidieron en la asignación de especies para el 96,3% de los aislamientos.

1.4. Impacto de *Enterococcus* spp.

Los enterococos presentan un comportamiento dual al ser considerados como microorganismos beneficiosos o como patógenos oportunistas. En ese sentido

deben ser considerados ciertos aspectos que ratifican o restan fuerza a esta hipótesis.

Existe evidencia de que los alimentos de origen animal contienen cepas de *Enterococcus* spp. con propiedades biotecnológicas deseables. Se ha observado que los enterococos tienen un impacto favorable en la elaboración y la maduración de quesos tales como *Armada Picante*, *Caprino*, *Fontina*, *Majoero*, *Manchego*, *Monte Veronese*, *Mozzarella*, *Teleme* y *Venaco*. Los enterococos contribuyen con el sabor y el aroma (*flavour*) de estos productos mediante su metabolismo primario y secundario junto con la producción de enzimas que interactúan con componentes de la leche. Dentro de las propiedades biotecnológicas de los enterococos que son de interés para la industria láctea se encuentran su capacidad de producir ácido, la actividad proteolítica y peptidolítica relacionada con la maduración, producción de enzimas lipolíticas que contribuyen con la textura del queso, el metabolismo de citrato y piruvato que llevan a la formación de compuestos involucrados en las características organolépticas del producto (Giraffa 2003).

El papel biotecnológico de los enterococos en alimentos cárnicos ha sido estudiado en menor medida que en los derivados lácteos. En países mediterráneos ciertos productos cárnicos fermentados tanto tradicionales como artesanales se elaboran en establecimientos familiares. En este tipo de producción a pequeña escala no se agregan cultivos iniciadores (*starters*). Los enterococos como integrantes de la microbiota indígena participan en el mantenimiento de las características organolépticas de los productos. A través de sus actividades glucolítica, proteolítica y lipolítica pueden contribuir con el aroma de este tipo de alimentos (Foulquié Moreno *et al.* 2006).

En las últimas décadas se ha comunicado el aislamiento de enterococos de diversos orígenes productores de bacteriocinas. Las enterocinas son compuestos proteicos con actividad bactericida (bacteriocinas) producidos por enterococos. Se han detectado cepas de *Enterococcus* spp. productoras de bacteriocinas provenientes de alimentos cárnicos, alimentos lácteos y de origen ambiental. Las

bacteriocinas descritas son activas generalmente contra bacterias Gram positivas presentes en alimentos, tales como *Listeria* spp. y *Clostridium* spp. y en menor grado contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*. Hasta el momento los estudios de estas cepas y/o sus bacteriocinas como protectores biológicos (bioprotectores) han obtenido resultados diversos y no concluyentes (Foulquié Moreno *et al.* 2006). El péptido AP-CECT7121 es producido por la cepa probiótica de origen animal *E. faecalis* CECT7121. Se comprobó la capacidad bioprotectora de esta bacteriocina en salamines artesanales y queso de oveja artesanal. AP-CECT7121 demostró actividad bactericida sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas potencialmente patógenas, mientras que no afectó la presencia de bacterias como *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp., que contribuyen con las características organolépticas de los productos (Sparo *et al.* 2008, Sparo *et al.* 2012).

Ciertas cepas de enterococos, particularmente *E. faecalis* y *E. faecium*, han sido investigadas para su utilización como probióticos en humanos y animales. Se ha comunicado la administración de enterococos probióticos en el hombre para el tratamiento de cuadros diarreicos, la prevención de diarrea asociada a los antimicrobianos, el tratamiento de síndrome de intestino irritable, disminuir el nivel sérico de colesterol y para la inmuno-regulación (Franz *et al.* 2011).

En el hombre los enterococos se encuentran mayormente integrando la microbiota intestinal, aunque en menores proporciones pueden hallarse en secreciones (orofaríngea, vaginal) y en la piel. Gran variedad de cepas de distintas especies de enterococos causa un amplio espectro de infecciones, como intraabdominales, urinarias, bacteriemias y endocarditis. En las últimas dos décadas los enterococos han emergido como patógenos oportunistas en infecciones severas humanas a nivel hospitalario (Kayser 2003). La creciente incidencia de infecciones enterocócicas asociadas a los cuidados de la salud es el resultado de la conjunción de factores como la capacidad de estas bacterias para transferir material genético, que incrementa su virulencia y / o multi-resistencia. Los enterococos también presentan tolerancia a los detergentes y antisépticos

utilizados en los distintos niveles de atención en Salud Pública, permitiendo su diseminación ambiental (Garza-Velasco *et al.* 2002). El origen de las infecciones en el hombre por estos microorganismos se ha establecido clásicamente como endógeno, pero en la actualidad cobra relevancia la infección exógena (Kayser 2003).

En infecciones y colonizaciones producidas por enterococos documentadas en países europeos y americanos se han aislado cepas que expresaban factores de virulencia y/o de resistencia antimicrobiana (Huycke *et al.* 1991, Panesso *et al.* 2010, Kuch *et al.* 2012). En Argentina, en salud humana, se han documentado infecciones severas por distintas especies de enterococos y colonizaciones por enterococos vancomicina-resistente (EVR)(Toledo *et al.* 2004, Littvik *et al.* 2006).

El doble papel desempeñado por los enterococos ha planteado la inquietud sobre el riesgo de propagación de cepas potencialmente patógenas y/o resistentes y su impacto en Salud Pública. Sin embargo, en Argentina existen escasas comunicaciones en cuanto a su presencia ambiental y en alimentos de origen animal.

1.5. Factores de virulencia

Las características o rasgos auxiliares que son adquiridas por una especie y que exacerbaban la capacidad de un microorganismo para causar infecciones se denominan factores de virulencia (Mundy *et al.* 2000). La patogenicidad de los enterococos es controvertida y se la puede relacionar con la presencia de diferentes factores de virulencia. Las infecciones enterocócicas pueden ser consideradas como procesos que se desarrollan en etapas.

En una primera fase se produce la colonización gastrointestinal. Los enterococos pueden colonizar el tracto gastro-intestinal, pues son integrantes de su microbiota habitual. La adhesión tisular de las bacterias es el primer paso fundamental para que se produzca una infección, pues si los enterococos no se adhieren son eliminados por la motilidad intestinal (Kayser 2003).

En una segunda etapa, a través de factores que exacerban la infectividad bacteriana, se produce la destrucción tisular o toxicidad. Este hecho contribuye a la alteración de la integridad estructural a nivel gastrointestinal o en otros sitios, generando una enfermedad infecciosa (Mundy *et al.* 2000).

Existe escasa bibliografía acerca de los factores de virulencia que condicionan la patogenicidad de los enterococos ya que las diferencias entre cepas de enterococos patógenos e ino cuas no están aún dilucidadas (Mundy *et al.* 2000).

Aunque la mayoría de los factores de virulencia descritos corresponden a cepas de origen clínico, también se han detectado en enterococos de alimentos de origen animal (Franz *et al.* 2001). En enterococos de origen clínico se ha observado una mayor portación de factores de virulencia que en cepas provenientes de alimentos (Eaton & Gasson 2001).

1.5.1. Hemolisina

La hemolisina o citolisina es una proteína secretada con actividad lítica sobre células procariontas y eucariotas como eritrocitos humanos, de caballo, de vaca y de conejo. Está involucrada en el ingreso de los enterococos en los tejidos y contribuye con toxemia y daño tisular, en una etapa previa a la manifestación clínica de las infecciones enterocócicas (Garza-Velasco *et al.* 2002). Una consecuencia de su acción lítica sobre eritrocitos y otras células es la liberación de nutrientes esenciales a los que no tienen acceso las cepas de enterococos no productoras de hemolisina. La captación de la hemina procedente de eritrocitos permite a los enterococos ensamblar la cadena de transporte en la cual participan los citocromos, permitiendo la generación de energía en condiciones aeróbicas. La hemolisina es tóxica para las células epiteliales intestinales, pudiendo contribuir con la invasión bacteriana. Luego de atravesar la barrera intestinal la hemolisina contribuye a la patogenicidad enterocócica por un efecto anti-fagocítico y por la evasión de la respuesta inmune del hospedador mediada por la acción tóxica sobre células como macrófagos y neutrófilos (Coburn & Gilmore 2003).

En *E. faecalis* para la producción de hemolisina participan ocho genes que pueden estar codificados a nivel cromosómico, en islas de patogenicidad, o en plásmidos conjugativos que responden a feromonas. Se ha comprobado que en la misma isla de patogenicidad hay genes codificantes de otros factores de virulencia como la Sustancia Agregativa.

1.5.2. Sustancia Agregativa

La Sustancia Agregativa es una proteína de superficie propia de ciertas cepas de enterococos, cuya expresión es inducida a través de feromonas sexuales. Esta proteína promueve la formación de agregados durante la conjugación bacteriana. Es un componente importante del sistema de intercambio genético dependiente de feromonas y permite un contacto eficiente entre las células donantes y las receptoras, facilitando la transferencia de plásmidos conjugativos. Uno de los sistemas más estudiados de plásmidos conjugativos que responden a feromonas sexuales es el que involucra al plásmido pAD1 de *E. faecalis*. Se trata de un elemento genético móvil que favorece la expresión de la Sustancia Agregativa y dentro de su material genético también está la información necesaria para la síntesis de hemolisina (Clewell 1993).

El sistema de feromonas asociado a la transferencia de plásmidos otorga una ventaja comparativa a los enterococos que lo poseen. Para que una cepa portadora de plásmido lo transfiera es necesaria la presencia de una bacteria receptora, carente del elemento genético móvil. Por lo tanto, la bacteria que contiene al plásmido ahorra energía (Garza-Velasco *et al.* 2002).

A diferencia de otros factores de virulencia se ha detectado una alta incidencia de Sustancia Agregativa en enterococos aislados de alimentos de origen animal (Eaton & Gasson 2001, Franz *et al.* 2001).

La expresión de Sustancia Agregativa sobre la superficie de los enterococos lleva a un aumento de su hidrofobicidad, acompañado por la re-localización del colesterol en el fagosoma lo cual retrasaría o evitaría la formación de los fagolisosomas (Fisher & Phillips 2009).

La Sustancia Agregativa permite la adherencia de los enterococos a varios tipos celulares eucariotas. Se demostró *in vitro* la capacidad que poseen cepas de enterococos productoras de Sustancia Agregativa para unirse a la superficie de los neutrófilos. Se trata de un mecanismo independiente de la opsonización, en el que están involucrados varios receptores. Asimismo, este factor de virulencia promueve la supervivencia de enterococos una vez que ingresan en los neutrófilos (Mundy *et al.* 2000).

Se ha comprobado que existen ligandos para la Sustancia Agregativa en la matriz extracelular. Esta adhesina puede unirse a compuestos como fibronectina, vitronectina y colágeno tipo I. En cambio la expresión de Sustancia Agregativa no incrementa la adherencia a colágeno tipo IV (Tendolkar *et al.* 2003).

1.5.3. Gelatinasa

La gelatinasa es una metalo-endopeptidasa extracelular de codificación cromosómica. Su producción está controlada por un sistema de regulación de expresión génica que responde a fluctuaciones de la densidad celular llamado *quorum sensing*, en el que están involucrados tres genes del locus *fsr* de *E. faecalis*. El *quorum sensing* se produce cuando una población bacteriana genera una señal a través de un péptido inductor, el cual desencadena una cascada de regulación transcripcional (Fisher *et al.* 2009). Este factor de virulencia ha sido detectado en cepas de enterococos de origen humano y alimentario (Foulqué Moreno *et al.* 2006).

Este factor de virulencia tiene acción hidrolítica sobre diversos sustratos como caseína, gelatina, hemoglobina y otros péptidos biológicamente activos. Su principal rol relacionado con la patogenicidad de los enterococos consiste en la degradación tisular del hospedador para aportar nutrientes a las bacterias y también contribuye en el proceso de formación de biopelículas (Fisher *et al.* 2009).

La gelatinasa puede degradar proteínas de superficie celular anómalas. Se demostró que la gelatinasa ejerce una función lítica sobre la Sustancia Agregativa Asc10 codificada por el plásmido pFC10, cuando se encuentra plegada

incorrectamente. La eliminación de proteínas no funcionales tiene relevancia biológica pues libera espacio en la superficie celular que puede ser ocupado por otros compuestos (Waters *et al.* 2003).

La presencia de gelatinasa influye en la disposición morfológica de los enterococos y aumenta la autólisis de las cepas productoras. Se determinó que existía una relación entre los dos fenómenos. En cepas productoras de gelatinasa se observó la formación de cadenas más cortas debido a que el factor de virulencia estaba involucrado en la maduración de una autolisina (Waters *et al.* 2003).

Al investigar la capacidad de *E. faecalis* para adherirse a fibrina polimerizada se comprobó que la gelatinasa tiene un efecto degradativo sobre este componente. Esta actividad lítica del factor de virulencia contribuye con la patogenicidad de los enterococos pues trae aparejado daño tisular posibilitando la migración y diseminación de las bacterias (Waters *et al.* 2003).

En un estudio sobre la translocación de *E. faecalis* los factores involucrados se investigó el papel de la gelatinasa en este proceso. En un experimento *in vitro*, utilizando enterococos productores y no productores de gelatinasa, se determinó la capacidad de las cepas para translocar a través de una monocapa de células epiteliales intestinales. Se observó la translocación de la totalidad de los enterococos productores de gelatinasa mientras que en aquellos sin expresión del factor de virulencia, la translocación fue escasa o nula (Zeng *et al.* 2005).

1.5.4. Biofilm

El *biofilm* o biopelícula es una comunidad bacteriana unida irreversiblemente entre sí o a una interfase, envuelta en una matriz de polímeros extracelulares (Figura 2). Estos microorganismos muestran un fenotipo alterado con respecto a las bacterias planctónicas en lo concerniente a la tasa de crecimiento y a la expresión genética (Donlan & Costerton 2002).

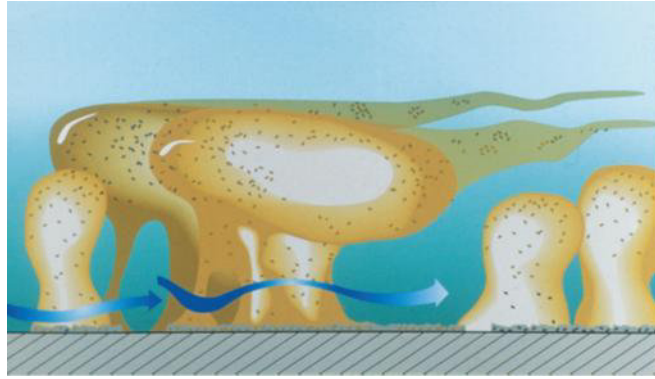


Figura 2. Esquema representativo de un *biofilm*.

Fuente: Donlan & Costerton 2002

En la formación de *biofilm* cobran relevancia los factores ambientales. Cuando las bacterias detectan modificaciones de las condiciones ambientales habituales se produce una transición desde la forma planctónica hacia el crecimiento en una superficie. Las etapas de formación de un *biofilm* son las siguientes: unión a una superficie, adherencia con otras bacterias, formación de microcolonias y maduración dentro de una capa de exopolisacárido (Herrera Mendoza 2004).

En la formación de *biofilm* participa una adhesina, la proteína de superficie extracelular de los enterococos. Su presencia aumenta la hidrofobicidad celular y favorece la adhesión de las células productoras a superficies bióticas o abióticas (Tendolkar *et al.* 2003).

Una de las características fundamentales del *biofilm* es que protege a las bacterias en forma inherente frente a la acción de los antimicrobianos. Existen varios mecanismos que pueden ser responsables de este fenómeno: retraso en el ingreso de los antimicrobianos a través de la matriz del *biofilm*, tasa de crecimiento alterada de las bacterias que conforman el *biofilm* y otras modificaciones fisiológicas relacionadas con el modo de crecimiento del *biofilm* (Donlan & Costerton 2002).

Los antimicrobianos tienen que difundir a través de la matriz del *biofilm* para actuar sobre las bacterias de su entorno. Los exopolisacáridos se comportan como una barrera difusional, por influir en la tasa de transporte de compuestos hacia el

interior del *biofilm* o por la reacción de los antimicrobianos con componentes de la matriz (Donlan & Costerton 2002).

Otro mecanismo relacionado con la resistencia antimicrobiana y *biofilm* puede estar vinculado al hecho de que las bacterias involucradas crecen más lentamente que las bacterias planctónicas, resultando en una captación más lenta de antimicrobianos (Donlan & Costerton 2002).

Se ha comunicado que las bacterias que se encuentran dentro de los *biofilm* presentan una resistencia a los antimicrobianos mil veces mayor que las bacterias planctónicas. Este fenómeno podría estar vinculado con el hecho de que los síntomas de las infecciones relacionadas con *biofilm* son recurrentes durante el tratamiento antimicrobiano (Herrera Mendoza 2004).

La presencia del *biofilm* tiene efectos diversos sobre el sistema inmune del hospedador. Libera antígenos y estimula la producción de inmunoglobulinas. Debido a la inducción de prostaglandina E₂, el *biofilm* bacteriano inhibe la proliferación de monocitos periféricos y de linfocitos T. Interfiere en los procesos de coagulación, opsonización, fagocitosis y en la blastogénesis de células B. Además, el *biofilm* inhibe las actividades metabólicas dependientes de oxígeno en los leucocitos polimorfonucleares (Herrera Mendoza 2004).

La asociación entre microorganismos productores de *biofilm* y cuadros infecciosos ha sido sugerida para patologías como otitis media, prostatitis bacteriana crónica, fibrosis quística y periodontitis (Donlan & Costerton 2002).

Asimismo, se ha demostrado la formación de *biofilm* en una variedad amplia de dispositivos utilizados en la práctica médica tales como válvulas cardíacas protésicas, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, lentes de contacto y dispositivos intra-uterinos (Donlan & Costerton 2002).

1.5.5. Evasión de la respuesta inmune

La opsonización optimiza el proceso de endocitosis y requiere la interacción de las moléculas que serán fagocitadas con las opsoninas, que son factores del suero

de naturaleza diversa. Dentro de las opsoninas pueden incluirse anticuerpos y otros tipos de proteínas. El papel de las opsoninas en la fagocitosis está vinculado con la existencia de receptores para estos compuestos en las células fagocíticas (Rojas Espinosa & Arce Paredes 2004).

La ausencia de membrana externa en las bacterias Gram positivas determina que no sea posible la existencia de actividad bactericida directa de los anticuerpos junto con el Complemento. Para que se produzca la opsonización es necesaria la interacción de anticuerpos, el Sistema de Complemento y los fagocitos, que son los componentes principales de la respuesta inmune contra las infecciones bacterianas. Aunque todos los anticuerpos protectores se comportan como opsonizantes, no todos los anticuerpos opsonizantes son protectores (Hufnagel *et al.* 2003).

La muerte bacteriana por opsonofagocitosis representa el ensayo *in vitro* más apropiado para evaluar la respuesta inmune frente a enterococos patógenos. Con esta metodología se está evaluando fundamentalmente el papel de los leucocitos polimorfonucleares, pues en suero humano de personas sanas existen bajos títulos de anticuerpos específicos contra los enterococos (Hufnagel *et al.* 2003).

El Sistema de Complemento contribuye con la respuesta inmune del hospedador. Puede actuar junto con los anticuerpos cuando se activa la vía clásica o mediante el componente C3b, que está involucrado en la vía alternativa (Hufnagel *et al.* 2003). Estudios realizados sobre la eliminación de enterococos mediante fagocitosis sugirieron que el Sistema de Complemento contribuía principalmente a través de la activación de la vía alternativa (Harvey *et al.* 1992, Arduino *et al.* 1994).

Para investigar el papel de los polisacáridos capsulares sobre la capacidad de las bacterias para evitar la acción del Complemento en el proceso de fagocitosis, se puede recurrir al ensayo de sensibilidad al efecto bactericida del suero. Con esta prueba se evalúa si las bacterias son capaces o no de sobrevivir en la sangre del hospedador. La característica clave de este ensayo radica en que se inactiva

la vía clásica del Complemento, permitiendo observar la respuesta de los microorganismos frente a la activación de la vía alternativa del Complemento (Pelkonen & Finne 1987).

1.6. Resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp.

Una característica fenotípica distintiva del género *Enterococcus* es su resistencia a un número amplio de antimicrobianos. Los enterococos presentan resistencia intrínseca y adquirida a los antimicrobianos.

La resistencia intrínseca es inherente o propia de una especie y está presente en la mayoría de las cepas de esa especie. Los enterococos expresan resistencia intrínseca a penicilinas resistentes a penicilinasas, cefalosporinas, bajo nivel de resistencia a los aminoglucósidos y bajo nivel de resistencia a clindamicina (Murray 1990).

Los enterococos pueden adquirir resistencia a través de la transferencia de genes extracromosómicos tanto inter-especie como intra-especie (resistencia horizontal). Dentro de esta categoría puede incluirse resistencia a tetraciclinas, macrólidos, ampicilina, cloranfenicol, quinolonas, vancomicina y alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos como gentamicina (ANRG) y estreptomina, ANRE (Foulquié Moreno *et al.* 2006).

La resistencia a β -lactámicos, glucopéptidos y aminoglucósidos tiene relevancia clínica debido a que son los antimicrobianos de elección para el tratamiento de infecciones enterocócicas invasivas (Cercenado 2011). Sin embargo, en aislamientos clínicos de EVR se ha comunicado la expresión de resistencia a otros antimicrobianos no utilizados habitualmente para la terapéutica en este tipo de infecciones tales como eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y cloranfenicol (Corso *et al.* 2007).

Los antimicrobianos en los animales de cría destinados a la producción de alimentos, se utilizan para prevenir y tratar las enfermedades infecciosas. Sin embargo, con frecuencia también se utilizan en dosis sub-terapéuticas para

promover el crecimiento de los animales. Dentro de los antimicrobianos utilizados en producción animal se han incluido drogas que también se utilizan en el hombre como glucopéptidos, estreptograminas, macrólidos y tetraciclinas (Hammerum 2012). Estos antimicrobianos pueden favorecer la selección y amplificación de bacterias potencialmente patógenas con resistencia múltiple, como los enterococos, que pueden transmitirse al hombre a través de la cadena alimentaria (Hammerum 2012). En Europa y América del Norte, se han aislado enterococos con resistencia a los antimicrobianos en animales destinados a la industria alimenticia (Donabedian et al. 2003, Ruzauskas *et al.* 2009). Asimismo, se ha observado la expresión de resistencia antimicrobiana en enterococos recuperados de productos cárnicos y lácteos (Franz *et al.* 2001, Messi *et al.* 2006, Sánchez Valenuela *et al.* 2013).

Existe una relación epidemiológica entre el uso de antimicrobianos en medicina humana y en la cría de animales y la emergencia, diseminación y persistencia de cepas resistentes en productos animales (Van den Bogaard & Stobberingh 2000).

En un estudio realizado en Francia sobre enterococos de origen clínico y recuperados de alimentos, se observó un patrón de electroforesis de campo pulsado (PFGE) común entre cepas resistentes a los antimicrobianos de *E. faecalis* aisladas de quesos y humanas. De esa investigación se desprende que el queso puede actuar como reservorio para estas cepas resistentes, permitiéndoles persistir y diseminarse en la comunidad (Bertrand *et al.* 2000). Sorensen *et al.* (2001) comprobaron que cepas de *Enterococcus* spp. con resistencia múltiple a los antimicrobianos tenían como reservorio los alimentos derivados de aves de corral y cerdos y podían resistir el pasaje gástrico; facilitando así su portación sostenida en el intestino.

1.6.1. β -lactámicos

Los β -lactámicos constituyen la familia más grande de antimicrobianos disponibles actualmente. Su sitio activo es un anillo β -lactámico y por sucesivas modificaciones químicas se originaron distintos subgrupos. Dentro del grupo de las penicilinas se puede incluir al referente del grupo, la penicilina y a las

aminopenicilinas como la ampicilina (Figura 3). Los β -lactámicos son antimicrobianos bactericidas que ejercen su efecto a través de dos mecanismos, la inhibición de la síntesis proteica y la inducción de la autólisis bacteriana (Calvo & Martínez-Martínez 2009).



Figura 3. Estructura de las penicilinas.

Fuente: Suarez & Gudiol 2009

Los compuestos β -lactámicos actúan en la última etapa de la síntesis de la pared celular, inhibiendo la organización del péptidoglucano. En esta fase los pentapéptidos se convierten en tetrapéptidos por acción de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP). Los β -lactámicos presentan una similitud estructural con la región del pentapéptido a la cual se unen estas enzimas, bloqueando su acción e impidiendo la síntesis de pared celular (Suárez & Gudiol 2009).

La baja afinidad que presentan las PBP del género *Enterococcus* por los β -lactámicos explica su resistencia natural a estos antimicrobianos. Esa resistencia intrínseca difiere según los compuestos. Las penicilinas en general son las más activas contra los enterococos y dentro de este grupo la de mayor actividad *in vitro* es la ampicilina. En enterococos de origen clínico se ha observado la expresión de alto nivel de resistencia a penicilinas, como es el caso de la ampicilina con una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) $\geq 256 \mu\text{g mL}^{-1}$. La hiperproducción de una PBP particular, PBP 5, es la principal causa del alto nivel de resistencia a penicilinas debido a que es capaz de reemplazar en su funciones a las PBP susceptibles a los β -lactámicos y además es naturalmente poco afín a las penicilinas. En algunas cepas de enterococos se ha detectado la producción de una β -lactamasa, enzima que hidroliza β -lactámicos, equivalente a una expresada por *Staphylococcus* spp. Los enterococos que codifican esta enzima presentan resistencia a las penicilinas (Cercenado 2011).

1.6.2. Glucopéptidos

Los glucopéptidos como vancomicina y teicoplanina son compuestos de gran tamaño. Solamente son activos frente a bacterias Gram positivas pues no pueden pasar a través de la pared de las bacterias Gram negativas. Estos antimicrobianos actúan a nivel de la pared celular inhibiendo la organización estructural del glucopéptido, aunque en una etapa previa a la de los β -lactámicos. El mecanismo de acción de los glucopéptidos consiste en impedir la transferencia de una nueva unidad de N-acetil murámico-pentapéptido-N-acetil glucosamina, ligada a un transportador de naturaleza lipídica, hacia el péptidoglucano en crecimiento (Figura 4). Los glucopéptidos se unen al extremo D-alanina-D-alanina del disacárido pentapéptido, que es el sustrato de las enzimas involucradas en la elongación del péptidoglucano. Frente a *Enterococcus* spp. los glucopéptidos son bacteriostáticos (Calvo & Martínez-Martínez 2009, Pigrau & Almirante 2009).

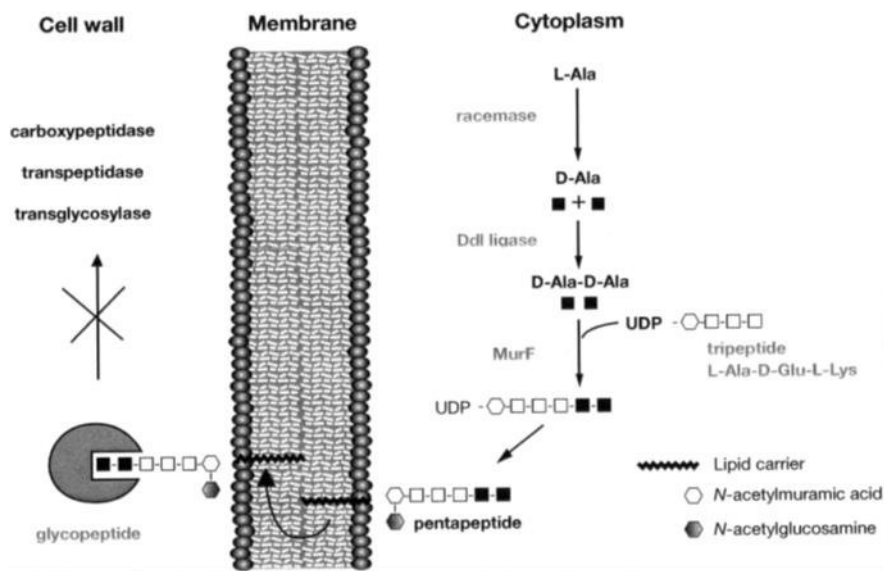


Figura 4. Mecanismo de acción de glucopéptidos.

Fuente: Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-Positive cocci. Clin Infect Dis. 2009; 42: S25-S34.

En enterococos la resistencia a glucopéptidos está mediada por la modificación del sitio blanco de los antimicrobianos. Se produce una modificación en el

pentapéptido de la pared celular (D-alanina-D-alanina), que puede cambiar a D-alanina-D-serina o D-alanina-D-lactato (Cercenado 2011).

Hasta el momento se han reconocido nueve fenotipos de resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus* spp; ocho son adquiridos (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN) y uno es intrínseco (VanC).

La resistencia intrínseca a glucopéptidos se expresa en tres especies de enterococos móviles: *E. gallinarum*, *E. flavescens* y *E. casseliflavus*. Se manifiesta como susceptibilidad intermedia o resistencia de bajo nivel a vancomicina (CIM: 2-32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y sensibilidad a teicoplanina. El fenotipo VanC es de codificación cromosómica y se expresa constitutivamente.

Los aislamientos con fenotipo VanA expresan alto nivel de resistencia a vancomicina (CIM: > 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y a teicoplanina (CIM: > 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se trata de resistencia inducible transferida por elementos genéticos móviles, como el transposon *Tn1546* o aquellos relacionados con la familia de transposones *Tn3*. El fenotipo VanB produce resistencia de bajo o alto nivel a vancomicina (CIM: 4-> 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y sensibilidad a teicoplanina. No es inducible y los genes codificantes son transmitidos por plásmidos o transposones como *Tn1547* o *Tn5382*. (Cercenado 2011).

1.6.3. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son una familia compleja de compuestos que se caracterizan por poseer un núcleo aminociclitol ligado con carbohidratos mediante uniones glucosídicas (Figura 5). Dentro de los aminoglucósidos se incluye a estreptomina (primer aminoglucósido), gentamicina y la familia kanamicina integrada por kanamicina, amikacina y tobramicina. Cuando se administran combinados con otros antimicrobianos pueden utilizarse para el tratamiento de algunas infecciones causadas por cocos Gram positivos (Molina *et al.* 2009).

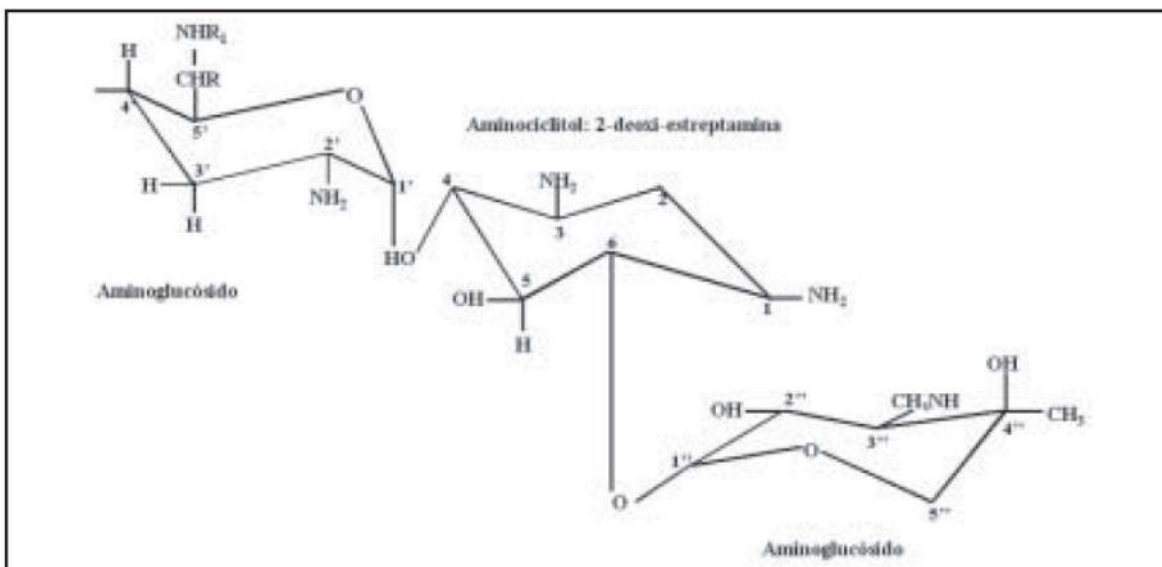


Figura 5. Estructura de un antimicrobiano aminoglucósido.

Fuente: Mella S, et al. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infect.* 2004; 21: 330-338.

Los aminoglucósidos son antimicrobianos bactericidas que actúan a nivel de los ribosomas inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Esta familia de antimicrobianos actúa en la fase inicial de la síntesis proteica. A nivel ribosomal, estos compuestos ejercen su efecto principalmente sobre la subunidad 30S, al unirse a componentes ribosomales como varias proteínas S y ARN 16S. Como resultado de la unión de los antimicrobianos al ribosoma, afectan el normal funcionamiento del complejo ARNm-ARNt-formilmetionina (Complejo de iniciación), impiden el inicio de la síntesis proteica y producen errores de lectura del ARNm. Esta falla lleva a la síntesis de proteínas anómalas que se unen a la membrana bacteriana, alterando su integridad estructural y favoreciendo de esta manera una difusión más rápida de los aminoglucósidos hacia el interior celular (Calvo & Martínez-Martínez2009).

Los enterococos presentan resistencia natural de bajo nivel a los aminoglucósidos como consecuencia de una baja eficiencia del transporte hacia el interior bacteriano, manifestado por valores de CIM_{gen} : 4-64 $\mu g mL^{-1}$ y CIM_{str} : 16-256 $\mu g mL^{-1}$ (Cercenado 2011).

Sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia que contribuyen a la expresión de alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos. En aislamientos de enterococos se ha detectado ANRG con $CIM_{gen} \geq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ y ANRE, con $CIM_{str} \geq 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los enterococos son capaces de adquirir determinantes genéticos que codifican proteínas que inactivan a los aminoglucósidos (enzimas modificadoras de aminoglucósidos) o pueden producirse modificaciones del sitio blanco de estos compuestos (Cetinkaya *et al.* 2000).

En la actualidad se ha descrito un gran número de enzimas modificadoras de aminoglucósidos que han sido agrupadas en tres grandes familias con clases y subclases de enzimas. Las aminoglucósido N-acetil transferasas (AAC) catalizan la acetilación, utilizando a la acetil-coenzima A como donante, de grupos amino en las moléculas de aminoglucósidos en las posiciones 1 [AAC(1)], 3 [AAC(3)], 2' [AAC(2')], o 6' [AAC(6')]. Las enzimas aminoglucósido-O-nucleotidil transferasas (ANT) inactivan a los aminoglucósidos mediante la transferencia de un grupo adenosina monofosfato, cedido por una molécula de ATP, hacia un grupo oxhidrido del antimicrobiano. Existen cinco clases de ANT, que catalizan la adenilación de aminoglucósidos en las posiciones 6 [ANT(6)], 9 [ANT(9)], 4' [ANT(4')], 2'' [ANT(2'')] y 3'' [ANT(3'')]. Las aminoglucósido-O-fosfotransferasas (APH) participan en la transferencia de un grupo fosfato hacia los aminoglucósidos. Existen siete clases de esta familia enzimática que fosforilan a los antimicrobianos en las posiciones 4, 6, 9, 3', 2'', 3'' y 7'' (Ramírez & Tomalsky 2010).

La enzima bifuncional con actividad acetilasa y fosforilasa AAC(6')-APH(2''), está codificada en plásmidos y transposones. Confiere resistencia a gentamicina ($CIM_{gen} \geq 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$), tobramicina, amicacina y kanamicina. Las fosforilasas APH(2'')-Ic, APH(2'')-Id, APH(2'')-Ie y APH(2'')-Ib también producen ANRG. La resistencia de alto nivel a gentamicina puede extrapolarse a otros aminoglucósidos, excepto estreptomina (Cercenado 2011).

El ANRE puede deberse a dos mecanismos, la inactivación enzimática del aminoglucósido mediada por dos nucleotidiltransferasas ANT(6)-Ia y ANT(3'') o la modificación de la subunidad ribosomal 30S con la consiguiente disminución de

afinidad por la estreptomina. El alto nivel de resistencia a este aminoglucósido no permite hacer inferencias de resistencia simultánea hacia otros compuestos de esta familia (Cercenado 2011).

1.6.4. Macrólidos

Los macrólidos son compuestos formados por un anillo lactónico macrocíclico que los caracteriza, al que se unen uno o varios azúcares. Se los puede clasificar de acuerdo al número de carbonos (C) que constituyen el anillo en macrólidos de 14C, 15C y 16C. Dentro de los compuestos con anillo de 14 C se encuentra la eritromicina (Figura 6), a la cual se le fueron realizando modificaciones en su estructura que dieron lugar a derivados semi-sintéticos como claritromicina y roxitromicina. A partir de los macrólidos se generó otra familia de antimicrobianos denominada cetólidos, cuyo representante es la telitromicina (Cobos-Trigueros *et al.* 2009).

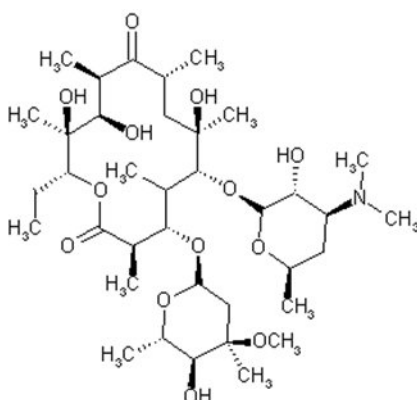


Figura 6. Estructura del antimicrobiano macrólido eritromicina.

Fuente: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos2.htm#macrolidos>

Los macrólidos actúan a nivel de la síntesis de proteínas inhibiendo la fase de elongación de este proceso (Calvo & Martínez-Martínez 2009).

El mecanismo de resistencia a macrólidos en *Enterococcus* spp. más frecuente es la modificación del sitio blanco del antimicrobiano. La afinidad de estos compuestos por el ribosoma disminuye debido a que los enterococos producen una enzima metilasa que cataliza la metilación del ARN 23S del ribosoma. Como

consecuencia de esta modificación enzimática del ribosoma se produce alto nivel de resistencia a los macrólidos y a otros antimicrobianos que comparten el sitio de acción con estos compuestos (Cercenado 2011).

Los enterococos pueden presentar otro mecanismo de resistencia a los macrólidos: el mecanismo de eflujo. Debido a la adquisición del gen *mefA* por conjugación, se sintetiza una proteína que funciona como una bomba de eflujo. Como consecuencia de su expresión se produce resistencia de bajo nivel a eritromicina y a otros macrólidos (Cercenado 2011).

1.6.5. Quinolonas

Las quinolonas son antimicrobianos formados por dos anillos (Figura 7). Su actividad y espectro se ampliaron mediante la fluoración en la posición 6. Estos compuestos se clasifican en generaciones considerando su espectro de acción.

Las quinolonas de primera generación como el ácido nalidíxico no son activas frente a bacterias Gram positivas y en la actualidad su utilización es cada vez menos frecuente. Las quinolonas de segunda generación como norfloxacin tienen una actividad moderada frente a Gram positivos. Las quinolonas de tercera generación, representadas por ciprofloxacina, levofloxacina y ofloxacina tienen una mayor actividad contra las bacterias Gram positivas que los compuestos pertenecientes a la segunda generación de quinolonas (Alós 2009).

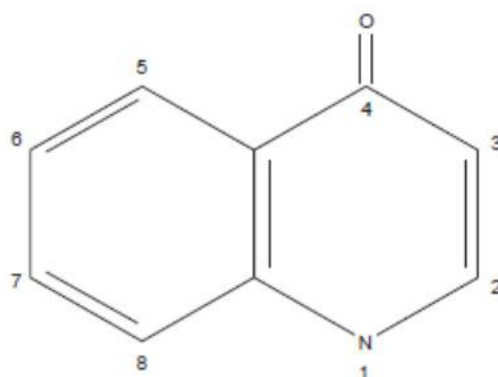


Figura 7. Estructura base de las quinolonas.

Fuente: Alós 2009

Las quinolonas actúan a nivel de los ácidos nucleicos, interfiriendo en los procesos de replicación y transcripción. Cuando las quinolonas están presentes en el medio, se unen al ADN roto y a su blanco, las topoisomerasas II (ADN girasa) y IV. De esta manera se forma un complejo ADN-topoisomerasa-fluorquinolona que es irreversible, llevando a que no pueda proseguir el proceso de replicación o transcripción (Calvo & Martínez-Martínez 2009).

En enterococos la resistencia a quinolonas fluoradas como la ciprofloxacina se debe a la mutación del sitio blanco del antimicrobiano. Es el resultado de mutaciones escalonadas. En un primer paso se producen mutaciones en el gen que codifica la subunidad ParC de la topoisomerasa IV. En una siguiente etapa pueden producirse mutaciones de la subunidad GyrA de la topoisomerasa II, que se manifiesta por un aumento de la resistencia a quinolonas. En la mayoría de los enterococos la resistencia a estos antimicrobianos es el resultado de los dos tipos de mutaciones en forma simultánea (Cercenado 2011).

1.6.6. Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas constituyen una familia de antimicrobianos relativamente nueva, cuyo representante utilizado actualmente en la terapéutica clínica es un compuesto tricíclico denominado linezolid (Figura 8). Estos antimicrobianos son bacteriostáticos frente a la mayoría de las especies sobre las cuales actúan (Pigrau & Almirante 2009).

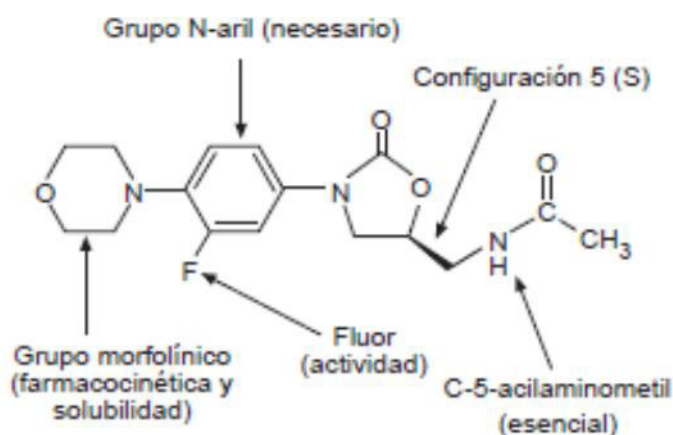


Figura 8. Estructura del antimicrobiano linezolid.

Fuente: Pigrau & Almirante 2009

Estos compuestos son antimicrobianos bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica, en la fase de inicio al igual que los aminoglucósidos. El linezolid se une al dominio V del ARN 23S de la subunidad ribosomal 50S. En consecuencia afecta al lugar de unión de ARNt-formilmetionina y no puede formarse el complejo de iniciación 70S, integrado por ARNt, proteínas y las subunidades ribosomales 30S y 50S. Como el sitio blanco de las oxazolidinonas es único, no lo comparten con otros antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis proteica y por lo tanto no existe resistencia cruzada (Calvo & Martínez-Martínez 2009).

La resistencia a linezolid es poco frecuente, aunque ha sido descrita en *E. faecalis* y en *E. faecium*. Se produce por una mutación en la subunidad 23S del ARN ribosomal. En *Enterococcus* spp. existen copias múltiples del gen que codifica ARN 23S. Cuanto mayor sea el número de alelos mutados mayor será el nivel de resistencia a linezolid. Además, en enterococos se ha comunicado un mecanismo de resistencia transferible, en el cual está involucrada una metilasa ribosomal (Cercenado 2011).

1.6.7. Tetraciclinas

Las tetraciclinas constituyen una familia de antimicrobianos bacteriostáticos naturales y semi-sintéticos. Las tetraciclinas poseen un núcleo lineal de estructura tetracíclica formado por cuatro anillos fusionados (Figura 9). Estos compuestos pueden agruparse en tres generaciones de acuerdo a su orden de aparición, el espectro de actividad antimicrobiana y características de índole farmacológica. Dentro de la primera generación puede incluirse a tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina. Estos agentes representan a las tetraciclinas más antiguas. Como integrantes de la segunda generación de tetraciclinas se puede mencionar a doxiciclina y minociclina. La tercera generación de tetraciclinas comprende a compuestos pertenecientes a las glicilciclinas (Vicente & Pérez-Trallero 2010).

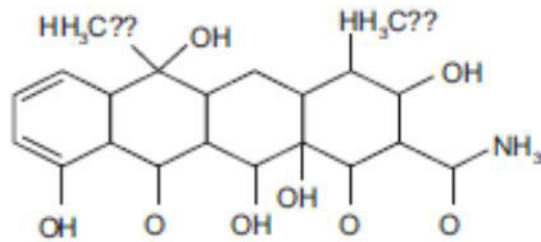


Figura 9. Estructura de la tetraciclina.

Fuente: Vicente & Pérez-Tallero 2010

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica. Mediante un proceso dependiente de energía pueden ingresar al citoplasma bacteriano y unirse reversiblemente a la subunidad ribosomal 30S. El resultado de su acción es el bloqueo de la fijación al ribosoma de complejos ARNt-aminoácido y tiene como consecuencia el impedimento de la continuación de la síntesis proteica (Calvo & Martínez-Martínez 2009).

Existen dos mecanismos principales de resistencia a tetraciclinas. Mediante el mecanismo de protección ribosomal las bacterias evitan la unión de los antimicrobianos a su sitio blanco, el ribosoma. En cambio, a través de bombas de eflujo las tetraciclinas son expulsadas de la bacteria. Los genes que codifican estos mecanismos son transferibles pues están dentro de elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y transposones ((Vicente & Pérez-Trallero 2010)). Aunque en bacterias Gram positivas la protección ribosomal es el mecanismo predominante se han detectado genes de bombas de eflujo en enterococos (Murray 1990).

1.6.8. Cloranfenicol

Es un antimicrobiano natural de amplio espectro sintetizado por levaduras del género *Streptomyces*(Figura 10). Debido a su tamaño y composición lipídica difunde sin inconvenientes por la membrana bacteriana (Stratton 2002).

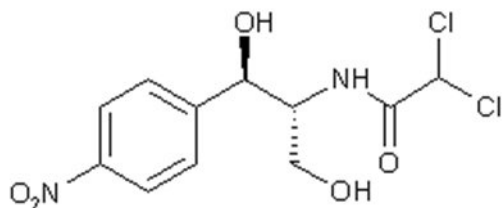


Figura 10. Estructura del antimicrobiano cloranfenicol.

Fuente: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos2.htm#anfenicoles>

Este compuesto es bacteriostático y actúa inhibiendo la síntesis proteica por bloqueo del proceso de transpeptidación. Se une reversiblemente a la subunidad 50S, impidiendo la formación de enlaces peptídicos (Calvo & Martínez-Martínez 2009).

El mecanismo más frecuente de resistencia a cloranfenicol es la inactivación enzimática del compuesto. La cloranfenicol acetil transferasa cataliza la acetilación del cloranfenicol con la consecuente disminución de afinidad del antimicrobiano por el ribosoma. La enzima es en general la responsable del alto nivel de resistencia al antimicrobiano. La cloranfenicol acetil transferasa es de codificación cromosómica o puede estar presente en elementos genéticos móviles, como ha sido comunicado para enterococos (Murray 1990, Stratton 2002).

1.7. Producción de alimentos de origen animal en el Centro de la Provincia de Buenos Aires

En el Centro de la provincia de Buenos Aires (Argentina), limitado por los cordones de Tandilia y Ventania, se encuentra un sector deprimido que constituye la pampa inter-serrana; su red de drenaje está dirigida hacia todos los rumbos, sólo los ríos y arroyos de la pendiente atlántica alcanzan el mar.

El sistema de las Sierras de Tandilia, abarca los partidos de Tandil, Olavarría, Azul, Balcarce, Lobería y General Pueyrredón. En los mismos se puede establecer dos grandes sectores productivos: agrícola-ganadero (bovinos de carne, porcinos

y ovinos) y sistema ganadero-agrícola (tambo). A partir de la información censal expresado en un informe del INTA de Balcarce, más del 45% de los productores se dedican a la agricultura y ganadería en diversa proporción, cerca del 20% hace sólo ganadería y aproximadamente el 13% solo actividades agrícolas. En esta zona del centro de la Provincia de Buenos Aires, los quesos y chacinados son identificados como productos típicos, aportando el 50% del valor bruto de la producción agroindustrial y el 60% del empleo (Ghezán & Acuña 2007, Petrantonio *et al.* 2007). Estos productos son consumidos en el partido de Tandil, Azul y Olavarría (Figura 11). Asimismo, los productos cárnicos son comercializados en otros centros urbanos densamente poblados del país y exportados hacia países limítrofes (Figura 12).

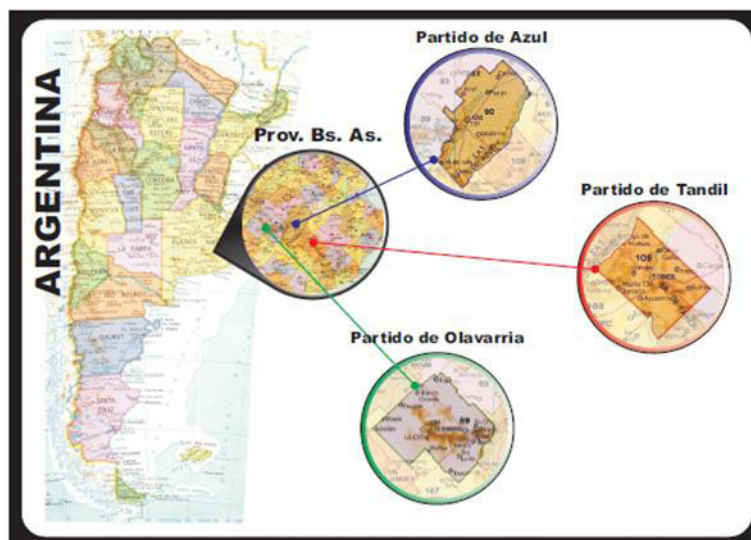


Figura 11. Región del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Partidos de Azul, Olavarría y Tandil.

Fuente: el autor



Figura 12. Áreas geográficas de comercialización de productos cárnicos y lácteos externas a la región de elaboración en la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Fuente: el autor

Los productores son firmas familiares con diferentes niveles de industrialización, desde una elaboración totalmente artesanal hasta aquella en la cual se ha tecnificado gran parte del proceso.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente y determinar el perfil de resistencia *in vitro* de especies de enterococos aislados de alimentos de origen animal provenientes de un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1

Aislar y caracterizar fenotípicamente a nivel de especie enterococos recuperados de alimentos de origen cárnico y lácteo elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

OBJETIVO 2

Detectar la expresión de distintos factores de virulencia en los aislamientos de *Enterococcus* spp.

OBJETIVO 3

Determinar el perfil de resistencia asociada a antimicrobianos de utilización clínica para *Enterococcus* spp. mediante pruebas de sensibilidad *in vitro* cualitativas y cuantitativas

OBJETIVO 4

Detectar los fenotipos de resistencia a glucopéptidos en los enterococos recuperados

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBJETIVO 1

Aislar y caracterizar fenotípicamente a nivel de especie enterococos recuperados de alimentos de origen cárnico y lácteo elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

1.1. Período y área de estudio

El presente estudio fue de tipo observacional, prospectivo y transversal. El mismo se realizó durante el período 2009-2012 en la región del Centro de la Provincia de Buenos Aires, en el área geográfica comprendida por el Partido de Tandil (Figura 13).



Figura 13. Región bajo estudio del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Fuente: el autor.

1.2. Toma de muestras

Se estudiaron muestras de alimentos cárnicos y lácteos artesanales tomadas en forma representativa a través de un muestreo probabilístico aleatorio simple de diferentes establecimientos rurales dedicados a la elaboración artesanal (EEZR), en el Partido de Tandil; de establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC) y de la zona periférica (ECZP) de la ciudad de Tandil. Se incluyeron los cuatro períodos estacionales. La obtención de las muestras se efectuó siguiendo las recomendaciones del *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food* (2001).

Los criterios de inclusión para la toma de muestras fueron los siguientes: alimentos de origen bovino, ovino, porcino y caprino, elaborados artesanalmente, provenientes del Partido de Tandil de la Provincia de Buenos Aires. Quedaron excluidos los alimentos artesanales del mismo origen que no fueron elaborados en la zona bajo estudio (Partido de Tandil).

Durante el período del estudio se efectuaron seis series de muestreo de productos lácteos y cárnicos. La población quedó conformada por $N = 1937$ muestras de alimentos de origen animal elaborados artesanalmente (Tabla 1). Se registraron variaciones cuantitativas en la toma de muestras de leche de cabra, queso de cabra y queso de oveja, como consecuencia de factores vinculados con el patrón estacional de elaboración y la consiguiente asequibilidad de los mismos.

Tabla 1. Distribución de alimentos cárnicos y lácteos obtenidos en cada serie de muestreo.

Alimento	Serie						Total (n)
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Quinta	Sexta	
Salamín	18	30	123	177	120	174	642
Carne picada	18	60	246	327	201	228	1080
Leche de cabra	30	0	0	0	0	0	30

Queso de cabra	0	42	0	0	0	0	42
Queso de vaca	15	40	8	16	16	24	119
Queso de oveja	0	0	4	4	0	16	24
Total (N)	81	172	381	524	337	442	1937

1.2.1. Salamín artesanal

Se estudió un total de $n = 642$ salamines artesanales. Primera serie de muestreo: se seleccionaron tres salamines/lote de dos lotes/establecimiento, en tres establecimientos rurales dedicados a la elaboración artesanal de productos (EEZR1-EEZR3). Segunda serie de muestreo: cinco salamines/lote de dos lotes/establecimiento, obtenidos en los establecimientos rurales EEZR1-EEZR3. Tercera serie de muestreo: en cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5), se recolectaron tres salamines/lote de cinco lotes/establecimiento y en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4), tres salamines/lote originados de cuatro lotes/establecimiento seleccionados. Cuarta serie de muestreo: tres salamines/lote de siete lotes/establecimiento, procedentes de cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) y tres salamines/lote, de seis lotes/establecimiento adquiridos en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4). Quinta serie de muestreo: tres salamines/lote, cuatro lotes/establecimiento, de cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) y tres salamines/lote, cinco lotes/establecimiento, de cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4). Sexta serie de muestreo: tres salamines/lote, de seis lotes/establecimiento, a partir de cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) y tres salamines/lote, de siete lotes/establecimiento, recolectados en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4).

1.2.2. Carne picada

Se estudiaron $n = 1080$ muestras de carne picada para elaboración de hamburguesas.

Primera serie de muestreo: tres muestras/establecimiento adquiridas en tres establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC3) y en tres establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP3). Segunda serie de muestreo: tres muestras/establecimiento recolectadas en cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) y en cinco establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP5). Tercera serie de muestreo: tres muestras/lote, de diez lotes/establecimiento en cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) y en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4) se obtuvieron tres muestras/lote, de ocho lotes/ establecimiento. Cuarta serie de muestreo: tres muestras/lote, de 13 lotes/establecimiento, proporcionadas por cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) junto con tres muestras/lote de 11 lotes/establecimiento en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4). Quinta serie de muestreo: tres muestras/lote a partir de siete lotes/establecimiento, seleccionados en cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) y tres muestras/lote, adquiridas de ocho lotes/establecimiento en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4). Sexta serie de muestreo: tres muestras/lote, ocho lotes/establecimiento, de cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZC1-ECZC5) y tres muestras/lote, de nueve lotes/establecimiento, provenientes de cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (ECZP1-ECZP4).

1.2.3. Leche de cabra

Se obtuvieron $n = 30$ muestras de leche de cabra de tres establecimientos agropecuarios elaboradores de quesos de cabra artesanales (EEZRqc1-

EEZqc3) de la zona rural del Partido de Tandil, Prov. Bs. As. Se seleccionaron diez muestras por establecimiento.

1.2.4. Queso de cabra artesanal

Se recolectaron $n = 42$ quesos de cabra en siete establecimientos agropecuarios elaboradores de quesos de cabra artesanales (EEZRqc1-EEZqc7) de la zona rural del Partido de Tandil. Se obtuvieron seis quesos/establecimiento.

1.2.5. Queso de vaca artesanal

Se procesaron $n = 119$ quesos de vaca en total.

Primera serie de muestreo: se seleccionaron cinco quesos/establecimiento en tres establecimientos elaboradores de quesos de vaca artesanales (EEZRqv1-EEZRqv3). Segunda serie de muestreo: se adquirieron ocho quesos/establecimiento en cinco establecimientos elaboradores de quesos de vaca artesanales (EEZRqv1-EEZRqv8). Tercera serie de muestreo: dos quesos/lote, de un lote/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZCqv1-ECZCqv2) y dos quesos/lote, un lote/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (ECZPqv1-ECZCqv2). Cuarta serie de muestreo: dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZCqv1-ECZCqv2) y dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (ECZPqv1-ECZCqv2). Quinta serie de muestreo: dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZCqv1-ECZCqv2) y dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (ECZPqv1-ECZCqv2). Sexta serie de muestreo: dos quesos/lote, obtenidos de tres lotes/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZCqv1-ECZCqv2) y dos quesos/lote, obtenidos de tres lotes/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (ECZPqv1-ECZCqv2).

1.2.6. Queso de oveja artesanal

Se estudiaron $n = 24$ quesos de oveja artesanales.

En la primera, segunda y tercera series de muestreo no se obtuvieron muestras de queso de vaca. Tercera serie de muestreo: dos muestras de un lote en un establecimiento comercial de la zona céntrica (ECZcqv1) y de un lote en un establecimiento comercial de la zona periférica (ECZPqv1). Cuarta serie de muestreo: dos muestras de un lote en un establecimiento comercial de la zona céntrica (ECZcqv1) y de un lote en un establecimiento comercial de la zona periférica (ECZPqv1). Sexta serie de muestreo: dos muestras/lote, de dos lotes/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (ECZCqv1-ECZCqv2) y en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (ECZPqv1-ECZCqv2).

1.3. Procesamiento de las muestras

1.3.1. Obtención de homogenatos a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales

1.3.1.1. Salamín artesanal

Se pesaron en condiciones de esterilidad 10 g de salamín artesanal y transfirieron a un recipiente plástico estéril con tapa a rosca de cierre hermético. Luego se llevó a un volumen final de 100 mL utilizando como diluyente Agua Peptonada (Lab. Britania, Argentina) estéril 1,5% p/v. Se agregó Tween 80 (1,0%) para favorecer la disolución de la materia grasa presente. La solución se homogeneizó utilizando un agitador mecánico Viking M23 durante 25 min a 245 rpm.

1.3.1.2. Carne picada

Se pesaron en condiciones de esterilidad 10 g de carne picada y se transfirieron a un recipiente plástico estéril con tapa a rosca de cierre hermético. Luego se llevó a un volumen final de 100 mL utilizando como diluyente Agua Peptonada estéril 1,5% p/v. No se agregó Tween 80 a aquellas muestras de bajo tenor graso. La

solución se homogeneizó utilizando un agitador mecánico Vicking M23 durante 18 min a 245 rpm.

1.3.1.3. Leche de cabra

Debido a su naturaleza líquida las muestras de leche de cabra fueron procesadas directamente. No se les agregó diluyente o Tween 80. No fueron sometidas a agitación mecánica.

1.3.1.4. Queso de vaca artesanal, queso de cabra artesanal y queso de oveja artesanal

Se pesaron en condiciones de esterilidad 10 g de queso y se transfirieron a una bolsa plástica estéril con cierre hermético. Se completó a un volumen final de 100 mL utilizando como diluyente Agua Peptonada estéril 1,5% p/v. Como la variedad de quesos en estudio contenía un alto porcentaje de materia grasa se agregó al diluyente Tween 80 (1,0%). Para favorecer la disgregación de la muestra y la acción del detergente, se homogeneizó la mezcla utilizando un instrumento mecánico de mayor potencia (Stomacher 400, Lab System). Se realizaron tres ciclos de mezclado a velocidad media durante 60 s.

1.4. Caracterización fenotípica de aislamientos de enterococos

1.4.1. Aislamiento inicial a partir de homogenatos de productos cárnicos y lácteos

1.4.1.1. Preparación de diluciones

Se realizaron diluciones apropiadas de los homogenatos de productos cárnicos y lácteos, utilizando Agua Peptonada estéril 0,1% p/v como diluyente. Se consideraron las diluciones en las que se obtuvieron recuentos comprendidos en un rango de 30 a 300 colonias en Agar Tripteína Soya (TSA; Lab. Britania) luego de incubar a 35°C durante 48 h.

1.4.1.2. Aislamiento inicial a partir de homogenatos

Para el aislamiento inicial a partir de los homogenatos de productos cárnicos y lácteos, se utilizó el medio de cultivo Agar Bilis Esculina Azida (BEA; Lab. Britania).

Se realizaron cultivos en profundidad de las diluciones preparadas a partir de los homogenatos de productos artesanales de origen animal. Se inocularon en placas de Petri estériles alícuotas de 1,0 mL de cada dilución y se agregaron 20 mL de agar BEA estéril disuelto a 44°C. Se agitó suavemente la placa de Petri para favorecer la homogeneización de la alícuota y el medio de cultivo. Una vez solidificado el agar se llevó a estufa de cultivo para incubación a 35°C durante 48 h en atmósfera ordinaria.

1.4.2. Obtención de cultivos puros

A partir de cada colonia presuntiva de enterococo desarrollada en Agar BEA se realizaron dos repiques sucesivos con incubación a 35°C durante 24 h en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Lab. Britania) y posteriormente un cultivo en medio sólido, TSA, a 35°C durante 24 h.

1.4.3. Conservación y recuperación de aislamientos

Los aislamientos compatibles con enterococos recuperados de alimentos se almacenaron en caldo BHI-glicerol 30 % v/v en tubos estériles a -20°C y a -70°C, por duplicado, para su posterior caracterización fenotípica.

Los aislamientos almacenados fueron descongelados en heladera a 4°C y posteriormente llevados a temperatura ambiente. Luego fueron inoculadas en medios de cultivo adecuados para realizar la caracterización fenotípica.

1.4.4. Caracterización fenotípica a nivel de género y especie

La caracterización fenotípica a nivel de género y de especie se realizó a partir de los cultivos puros en TSA siguiendo las recomendaciones de Facklam & Collins (1989), *Bergey's Manual of determinative bacteria* (1994) y Sparo & Mallo (2001).

1.4.4.1. Coloración de Gram

La morfología bacteriana se investigó mediante la realización de la coloración de Gram y observación al Microscopio Óptico (1000X). En caso de encontrar la disposición esperada se continuó con las pruebas de tipificación. Como controles de la coloración se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 (Gram positivo), y *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativo).

1.4.4.2. Producción de catalasa

La producción de la enzima bacteriana catalasa se evaluó utilizando el método en portaobjetos con peróxido de hidrógeno. Una colonia del aislamiento en estudio desarrollado en agar nutritivo, luego de incubar a 35°C durante 24 h, se transfirió con ansa estéril a un portaobjetos limpio de vidrio. Se agregó sobre la colonia una gota de peróxido de hidrógeno 3% v/v. Para mejorar la visualización, la reacción se realizó sobre fondo oscuro. El desarrollo de burbujas se consideró como un resultado positivo. La ausencia de burbujas fue considerada como un resultado negativo. Como controles de reacción se emplearon las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (productor de catalasa) y *E. faecalis* ATCC 29212 (no productor de catalasa).

1.4.4.3. Desarrollo en caldo con cloruro de sodio 6,5% p/v

El género *Enterococcus* puede desarrollar en medios de cultivo que contienen NaCl 6,5% p/v. Se inocularon 0,2 mL de un cultivo fresco en caldo BHI; del aislamiento en estudio (incubado a 35°C durante 18 h) en 2,0 mL de caldo BHI estéril al que se le agregó previamente cantidad suficiente de cloruro de sodio para obtener una concentración final de 6,5% p/v. Se incubó a 35°C durante 48 h en atmósfera ordinaria. Transcurrido este tiempo se observó si hubo desarrollo bacteriano manifestado por turbidez del medio de cultivo (prueba positiva) o ausencia de desarrollo indicada por la no turbidez del caldo (prueba negativa). Como control de reactivo, se incubó en las mismas condiciones y en forma simultánea un tubo con 2,0 mL de caldo BHI al que se le agregó cloruro de sodio 6,5% p/v, sin inóculo bacteriano. La ausencia de turbidez indicó la ausencia de desarrollo bacteriano. Cepas de referencia utilizadas como controles: *E. faecalis*

ATCC 29212 (control positivo) y *Streptococcus gallolyticus* ATCC 9809 (control negativo).

1.4.4.4. *Hidrólisis de esculina en presencia de 40% de bilis*

Esta prueba se realizó en el medio de cultivo Agar BEA. Se trata de un medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento e identificación de enterococos. La bilis y la azida actúan como agentes selectivos pues inhiben el desarrollo de la microbiota acompañante. A partir de un cultivo bacteriano fresco en TSA durante 18 h a 35°C se tomaron cuatro colonias aisladas y se sembraron en agar BEA. Se incubó a 35°C durante 18 h en atmósfera ordinaria. El desarrollo de coloración “negruzca” se consideró como resultado positivo. Como controles de reacción se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC29212 (control positivo) y *E. coli* ATCC 25922 (control negativo).

1.4.4.5. *Actividad de pirrolidonil arilamidasa*

Se determinó la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa a través de su acción sobre el sustrato pirrolidonil-beta-naftilamida. Se utilizó el equipo comercial PYR-A-ENT (Lab. Britania). A partir de un cultivo fresco a 35°C durante 18 h en TSA del aislamiento en estudio, se realizó una suspensión densa (equivalente al tubo 2 de la escala de McFarland) en 0,05 mL de solución fisiológica estéril. Se agregó un disco de PYR-A-ENT, incubando luego a 35°C durante 30 min. Se agregó una gota de reactivo revelador y se procedió a la lectura luego de incubar a temperatura ambiente durante 5 min. La prueba se consideró positiva al observar coloración “rosada” en el disco. Se consideró como resultado negativo cuando la suspensión y/o el disco permanecieron incoloros o de color amarillo. Controles de reacción: *E. faecalis* ATCC 29212 (control positivo) y *S. agalactiae* ATCC 13813 (control negativo).

1.4.4.6. *Fermentación de hidratos de carbono*

Se estudió en los aislamientos el perfil de fermentación de hidratos de carbono. Los azúcares ensayados fueron: glucosa, melibiosa, adonitol, rafinosa, lactosa,

melezitosa, ramnosa, manitol, sorbitol, arabinosa, sorbosa, trehalosa, xilosa y sacarosa.

1.4.4.6.1. Preparación de las soluciones de hidratos de carbono 10% p/v

Para cada hidrato de carbono se esterilizaron en autoclave, a 121°C durante 15 min, 50 mL de agua destilada en envase de vidrio. Una vez enfriado, se agregaron 5,0 g de hidrato de carbono y se agitó hasta disolución completa. Se agregaron 5 mL de cloroformo, seguido por agitación vigorosa. Se ajustó a pH: 7,2 y se almacenó a 4°C en heladera. Para utilizar la solución, se sacó de la heladera 20 min antes de comenzar la prueba.

1.4.4.6.2. Reacción de fermentación de hidratos de carbono

La reacción se realizó a partir de un cultivo fresco de los aislamientos en TSA, luego de incubar a 35°C durante 18 h. Se trabajó con tres tubos, cada uno conteniendo 2,25 mL de medio de cultivo base estéril, Cisteína Tripteína Agar (CTA, Lab. Britania). Este medio de cultivo contiene un indicador de pH que vira de color dependiendo de las condiciones ácido-base. La fermentación de los hidratos de carbono produce la acidificación del medio con viraje del indicador.

En el tubo 1 se inocularon con pinche colonias de la bacteria en estudio, correspondiendo al control de medio de cultivo.

En el tubo 2 se re-disolvió el agar base y se agregaron 0,25 mL de la solución de hidrato de carbono 10% p/v cuando el agar llegó a 44 °C. Este tubo correspondió al control de reactivo.

En el tubo 3 se re-disolvió el CTA y se agregaron 0,25 mL de la solución de hidrato de carbono 10% p/v cuando el agar base alcanzó una temperatura de 44 °C. Una vez solidificado el agar se inocularon colonias del aislamiento en estudio.

Los tubos se incubaron a 35°C durante 7 días en atmósfera ordinaria y fueron revisados diariamente. La reacción fue considerada positiva cuando se observó desarrollo y el medio de cultivo viró del color rojo inicial hacia amarillo. Los

resultados se consideraron válidos cuando los controles de medio de cultivo y de reactivo fueron negativos. Como controles de reacción se utilizaron las cepas de referencia *E. avium* ATCC 14025, *E. durans* ATCC 19432, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 35667, *E. gallinarum* ATCC 700425, *E. hirae* ATCC 8043 y *E. raffinosus* ATCC 49427.

1.4.4.7. Utilización de piruvato de sodio

Esta determinación se fundamenta en que ciertas especies de enterococos pueden utilizar piruvato de sodio y producen el viraje del indicador de pH presente en el medio de cultivo.

1.4.4.7.1. Preparación de la solución de piruvato de sodio 10% p/v

Se esterilizaron en autoclave (121°C, 20 min) 50 mL de agua destilada en un recipiente de vidrio. Una vez enfriado, se agregaron 5,0 g de piruvato de sodio (Lab. Britania) y se agitó hasta disolución completa. Se agregaron 5,0 mL de cloroformo, seguido por agitación vigorosa. Se ajustó a pH: 7,2 y se almacenó a 4°C en heladera. Para utilizar la solución, se la sacó 20 min antes de forma que alcanzara la temperatura ambiente.

1.4.4.7.2. Desarrollo de la reacción

La reacción de utilización de piruvato de sodio se realizó a partir de un desarrollo en TSA, luego de incubar a 35°C durante 18 h. Se trabajó con tres tubos, cada uno conteniendo 2,5 mL de CTA.

En el tubo 1 se inocularon con pinche varias colonias del aislamiento en estudio, correspondiendo al control de medio de cultivo.

En el tubo 2 se re-disolvió el agar base y cuando llegó a 44°C se agregaron 0,5 mL de la solución de piruvato de sodio 10% p/v. Este tubo correspondió al control de reactivo.

En el tubo 3 se re-disolvió el CTA y cuando llegó a una temperatura de 44°C se agregaron 0,5 mL de la solución de piruvato 10% p/v. Una vez solidificado el agar se inocularon varias colonias del aislamiento en estudio.

Los tubos se incubaron a 35°C durante 7 días en atmósfera ordinaria y fueron revisados diariamente. La reacción fue considerada positiva cuando se observó desarrollo y el medio de cultivo viró del color rojo inicial hacia amarillo debido a su acidificación. Los resultados se consideraron como válidos cuando los controles de medio de cultivo y de reactivo fueron negativos (no se observó cambio de color del medio). Se utilizaron como controles las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 (control positivo) y *E. faecium* ATCC 35667 (control negativo).

1.4.4.8. Hidrólisis de arginina

Dentro del género *Enterococcus* determinadas especies hidrolizan al aminoácido arginina. Esta reacción puede detectarse en medios como el CTA que contienen indicadores que cambian de color debido a variaciones en el pH como consecuencia de la hidrólisis de arginina.

1.4.4.8.1. Preparación de la solución de arginina 10% p/v

Se esterilizó en autoclave (121°C, 15 min) un frasco de vidrio con 50 mL de agua destilada. Una vez enfriado, se agregaron 5,0 g de arginina (Anedra) y se agitó hasta disolución completa. Se agregaron 5,0 mL de cloroformo, seguido por agitación vigorosa. Se ajustó a pH: 7,2 y se almacenó a 4°C en heladera. Se sacó la solución de la heladera 20 min antes de su utilización.

1.4.4.8.2. Desarrollo de la reacción

La reacción para evaluar la hidrólisis de arginina se realizó a partir de un desarrollo en TSA, luego de incubar a 35°C durante 18 h. Se trabajó con tres tubos, cada uno conteniendo 2,25 mL de CTA.

En el tubo 1 se inocularon con pinche varias colonias de la cepa en estudio, correspondiendo al control de medio de cultivo.

En el tubo 2 se re-disolvió el agar base y cuando llegó a 44°C se agregaron 0,25 mL de la solución de arginina 10% p/v. Este tubo correspondió al control de reactivo.

En el tubo 3 se re-disolvió el CTA y cuando llegó a una temperatura de 44°C se agregaron 0,25 mL de la solución de arginina 10% p/v. Una vez solidificado el agar se inoculó el aislamiento en estudio.

Los tubos se incubaron a 35°C durante 7 días en atmósfera ordinaria y fueron revisados diariamente.

La reacción fue considerada positiva cuando se observó desarrollo y viraje del color rojo inicial hacia rosa fuerte, indicando alcalinización de medio de cultivo debida a la hidrólisis de arginina. Los resultados se consideraron válidos cuando los controles de medio de cultivo y de reactivo fueron negativos. Para el control de reacción se emplearon las cepas de referencia *E. faecium* ATCC 35667 (control positivo) y *E. avium* ATCC 14025 (control negativo).

1.4.4.9. Motilidad

Las especies *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* presentan un patrón característico de motilidad en medios líquidos, que los diferencia de otros integrantes del género *Enterococcus*. En caldo Tripteína Soya (TS, Lab. Britania) se preparó una suspensión de cada aislamiento en estudio, ajustando a un valor de DO₆₂₀: 0,6. Se transfirieron 0,05 mL de la suspensión a un tubo con 3 mL de caldo TS. Se incubó a 35°C durante 2 h en atmósfera ordinaria. Una gota de cultivo se colocó en un portaobjetos limpio y se selló con un cubreobjetos. Se observó en Microscopio de Campo Oscuro (400X y 1000X). La prueba se consideró positiva cuando se observaron células con morfología cocoide o cocos en cadena que mostraban movilidad rápida y direccional. Las cepas inmóviles solamente presentaron movimiento browniano. Se utilizaron las cepas de referencia *E. gallinarum* ATCC 700425 como control positivo y *E. faecalis* ATCC 29212 como control negativo.

1.4.4.10. Producción de pigmento

A partir de un cultivo puro en caldo BHI de cada aislamiento, se realizó una siembra en agar nutritivo inoculando con ansa estéril. Se incubó a 35°C durante 18 h en atmósfera ordinaria. Se observó la presencia o ausencia de pigmento tomando colonias con un hisopo estéril. Se utilizaron las cepas de referencia *E. casseliflavus* ATCC 25788 (control positivo) y *E. faecalis* ATCC 29212 (control negativo).

1.4.4.11. Tolerancia al telurito de potasio 0,04%

La prueba se realizó con un cultivo puro de cada aislamiento estudiado en caldo BHI luego de incubar a 35°C durante 18 h. Se realizó una siembra masiva con hisopo estéril sobre una placa de TSA y se agregó una tableta de telurito 0,04% (Lab. Britania). Se incubó a 35°C durante 18 h en atmósfera ordinaria. La reacción fue positiva cuando se observaron colonias “grises-negras” cerca del borde de la tableta, correspondiendo a un diámetro de halo < 12 mm (cepa resistente a telurito). Un resultado negativo se evidenció por el desarrollo de colonias relativamente lejos del disco, observando un diámetro de halo > 15 mm (cepa sensible a telurito). Como controles de la reacción se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 (cepa resistente) y *Streptococcus bovis* ATCC 15351 (cepa sensible).

1.4.4.12. Formación de ácido en caldo con metil- α -D-glucopiranosido 1% y rojo de fenol

Se preparó caldo BHI con metil- α -D-glucopiranosido 1% p/v y rojo de bromocresol 0,006% p/v. Se fraccionó en alícuotas de 2,0 mL y se esterilizó en autoclave durante 10 min. Se inoculó el caldo con una gota de un cultivo fresco de cada aislamiento en caldo BHI. Se incubó a 35°C durante 7 días, controlando cada 24 h. El desarrollo de color amarillo indicó una reacción positiva. Se utilizaron las cepas de referencia *E. casseliflavus* ATCC 25788 como control positivo y *E. faecalis* ATCC 29212 como control negativo.

1.4.5. Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida

Como técnica de referencia para la tipificación a nivel de especie, se utilizó el análisis de perfiles de proteínas solubles totales mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a lo descrito por Sparo *et al.* (2008).

1.4.5.1. Preparación de extractos proteicos

Se obtuvieron cultivos frescos de los aislamientos estudiados en Agar Base Columbia (ABC, Lab. Britania) con 5% v/v de sangre humana por incubación a 35°C durante 24 h. Se realizó una suspensión, equivalente al tubo 2 de la escala de Mc Farland en 0,5 mL de una solución acuosa de lisozima de 10 mg mL⁻¹ (Sigma, Argentina). Las suspensiones se incubaron en baño de agua a 37°C durante 2 h con agitación intermitente.

Los extractos proteicos fueron obtenidos mediante la mezcla de una parte de la suspensión bacteriana con lisozima y una parte del buffer de muestra conteniendo: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, 2-mercaptoetanol 10% v/v y azul de bromofenol 0,001% p/v; se llevó la muestra a baño hirviendo por 5 min. Se fraccionó en alícuotas y se llevó a -20°C para su posterior análisis.

1.4.5.2. Corrida electroforética

Para las corridas electroforéticas se utilizó el sistema de electroforesis vertical Mini Protean II (Bio Rad), siguiendo el protocolo propuesto por Merquior *et al.* (1994).

Se prepararon dos geles: un gel concentrador de acrilamida 4% p/v (Tris-HCl 0,125 M, pH: 6,8) y un gel separador de acrilamida 10% p/v (Tris-HCl 0,375 M, pH: 8,8). Los geles se polimerizaron en presencia de N, N, N', N' tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1% v/v, y una solución fresca de persulfato de amonio (APS) 0,5 % p/v. Las corridas se efectuaron a un voltaje constante de 20 mA, hasta la salida del frente de avance de los colorantes. El buffer de corrida utilizado contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v.

1.4.5.3. Tinción de proteínas

La tinción de proteínas se llevó a cabo sumergiendo los geles de acrilamida durante una hora en una solución conteniendo Azul de Coomassie 25% p/v, ácido acético glacial 10% v/v y metanol 30% v/v. Transcurrido el tiempo de coloración, se limpió el gel con agua destilada durante 2 min para eliminar los excedentes de la solución de tinción.

1.4.5.4. Decoloración de geles

El exceso de colorante se eliminó por lavados sucesivos con una mezcla de ácido acético glacial 10% v/v y metanol 10% v/v. El proceso de revelado de bandas se realizó durante 12 h.

1.4.5.5. Secado y conservación de geles

Para comenzar con el secado se lavó varias veces el gel con agua bidestilada. Luego se dejó empapar el gel y las hojas de celofán a utilizar con la solución de secado durante toda una noche. Se colocó una hoja de celofán, empapada en la solución de secado, en la parte inferior del gel y otra en la parte superior. Se sacaron las burbujas y el exceso de solución de secado con papel absorbente. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 5-7 días. El secado y la conservación de los geles se llevaron a cabo con papel celofán Hoeffler.

La preparación de los reactivos necesarios para las corridas de SDS-PAGE se encuentra detallada en el Apéndice 1.

1.4.5.6. Análisis de geles de poliacrilamida

El perfil obtenido se analizó comparando visualmente con el patrón de bandas de cepas de referencia ATCC, observando en un transiluminador. Se realizó un análisis densitométrico a cada perfil proteico obtenido empleando el software *Image Pro and Origin* 6.0. El porcentaje de homología se calculó utilizando el coeficiente de Dice (Dice 1945).

1.4.5.7. Cepas de referencia utilizadas para SDS-PAGE

En la Tabla 2 se observan las cepas de referencia utilizadas para esta técnica.

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas para electroforesis vertical en gel de poliacrilamida.

Cepa	Origen
<i>E. avium</i> ATCC 14025	N/D ^a
<i>E. casseliflavus</i> ATCC 25788	Vegetal
<i>E. cecorum</i> ATCC 43198	Ciego de pollo
<i>E. columbae</i> ATCC 51263	Hígado de pollo
<i>E. dispar</i> ATCC 51266	Humano
<i>E. durans</i> ATCC 19432	N/D
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Humano
<i>E. faecium</i> ATCC 35667	N/D
<i>E. flavescens</i> ATCC 49996	Humano
<i>E. gallinarum</i> ATCC 700425	N/D
<i>E. hiraе</i> ATCC 8043	N/D
<i>E. malodoratus</i> ATCC 43197	Queso Gouda
<i>E. mundtii</i> ATCC 43186	Suelo
<i>E. porcinus/villorum</i> ATCC 700913	Porcino
<i>E. pseudoavium</i> ATCC 49372	Bovino
<i>E. raffinosus</i> ATCC 49427	Humano
<i>E. saccharolyticus</i> ATCC 43076	Heno
<i>E. seriolicida</i> ATCC 49156	Hígado de pescado
<i>E. solitarius</i> ATCC 49428	N/D
<i>E. sulfureus</i> ATCC 49903	N/D

N/D: no declarado por ATCC

Fuente: American Type Culture Collection (ATCC)

2. OBJETIVO 2

Detectar la expresión de distintos factores de virulencia en los aislamientos de *Enterococcus* spp.

2.1. Obtención de cultivos puros

Para el estudio de la expresión de factores de virulencia se reactivaron las cepas almacenadas en caldo BHI-glicerol 30% v/v mediante tres repiques sucesivos en caldo BHI a 35°C durante 18 h. A partir del último repique se obtuvo un cultivo puro en TSA incubando a 35°C durante 18 h en atmósfera ordinaria.

2.2. Detección de producción de hemolisina

Los aislamientos se repicaron a caldo BHI y se incubaron a 35°C durante 18 h. Luego se repicó a ABC con 5% v/v de sangre humana desfibrinada conteniendo los cuatro grupos sanguíneos. Se incubó a 35°C durante 48 h en atmósfera ordinaria. Se observó la presencia de hemólisis completa (β), hemólisis parcial (α) o ausencia de hemólisis (γ) alrededor de las colonias bacterianas. Como control positivo se utilizó la cepa *E. faecalis* DS16 (Gilmore Collection, USA) y como control negativo la cepa *E. faecalis* CECT 7121 (Sparo *et al.* 2008).

2.3. Detección de gelatinasa

A partir del cultivo primario en TSA se repicó en caldo BHI y se incubó a 35°C durante 18 h. Se inocularon 0,05 mL del cultivo en agar nutritivo suplementado con leche en polvo descremada 1,5% p/v y se incubó a 35°C durante 48 h en atmósfera ordinaria. La prueba fue considerada positiva cuando se observó hidrólisis del medio de cultivo manifestada por la presencia de un halo claro alrededor de las colonias. La cepa *E. faecalis* JH2-2 (Gilmore Collection, USA) fue utilizada como control positivo y la cepa *E. faecalis* CECT 7121 como control negativo (Sparo *et al.* 2008).

2.4. Producción de Sustancia Agregativa

La producción de Sustancia Agregativa se estudió mediante el ensayo de aglutinación en presencia de feromona sexual siguiendo el protocolo de Franz *et al.* (2001) con modificaciones.

La feromona sexual se obtuvo por cultivo de la cepa productora de feromonas, *E. faecalis* JH2-2, en caldo BHI a 37°C durante 18 h. Luego de centrifugar a 13.000 *g* se obtuvo un sobrenadante que contenía feromona, se lo esterilizó en autoclave durante 15 min y se diluyó 1/5 en caldo BHI estéril.

Luego se inocularon volúmenes iguales de la cepa en estudio y de la cepa *E. faecalis* JH2-2 y se incubó a 37°C. Se observó la presencia de aglutinación en

Microscopio Óptico (100X) a las 2, 4, 8 y 24 h. La cepa *E. faecalis* CECT 7121 fue utilizada como control negativo de la producción de feromona sexual.

2.5. Producción de *biofilm* en microplacas de poliestireno

A partir de un cultivo en caldo TS con glucosa 0,25% p/v, luego de incubar a 37 °C durante 24 h, se realizó una dilución 1/40 en caldo TS-glucosa 0,25% p/v. Se realizaron inóculos (200 µL) en microplacas de poliestireno estériles. Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 h en atmósfera con CO₂ 5 % v/v. Se lavaron las microplacas, tres veces, con 200 µL de buffer fosfato salino (PBS). Luego las microplacas se secaron durante 18 h y, finalmente, el *biofilm* se tiñó con cristal violeta 1% p/v, solubilizado en etanol:acetona (80:20). Se midió la DO₅₉₅ de cada celda usando un lector de microplacas. Cada ensayo se realizó por triplicado (Toledo Arana *et al.* 2001).

La cepa *E. faecalis* MMH594 (Huycke *et al.* 1991) se utilizó como control positivo de formación de *biofilm* y como control negativo se empleó a la cepa *E. faecalis* CECT 7121.

Con los valores de lectura a DO₅₉₅ se estableció un rango semi-cuantitativo de resultados:

DO₅₉₀ ≤ 1, no hubo formación de *biofilm*. Resultado negativo (-).

1 ≤ DO₅₉₀ ≤ 2, formación de *biofilm*. Resultado positivo débil (1+).

2 ≤ DO₅₉₀ ≤ 3, formación de *biofilm*. Resultado positivo moderado (2+).

DO₅₉₀ > 3, formación de *biofilm*. Resultado positivo fuerte (3+).

2.6. Ensayo de resistencia a la opsonofagocitosis

La resistencia a la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (PMNs) humanos se estudió mediante el ensayo de opsonofagocitosis de acuerdo al protocolo de Hufnagel *et al.* (2003).

Se mezclaron 100 μL de la cepa a ensayar viable ($2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, confirmado por recuento de viables), 100 μL de una suspensión de PMNs ($2,6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$), 100 μL de suero normal de conejo (dilución 1/500 en solución fisiológica) y 100 μL de suero humano normal adsorbido diluido 1/20 en solución fisiológica. Se incubó a 37°C durante 90 min y se sembraron muestras a tiempo 0 y después de 90 min.

El porcentaje de muerte se calculó comparando el recuento de colonias viables en el inóculo (T_0) con el recuento luego de los 90 min de incubación a 37°C (T_{90}). La cepa *E. faecalis* DS16 fue utilizada como control positivo (resistencia a la opsonofagocitosis por PMNs humanos).

2.7. Resistencia al efecto bactericida del suero normal

Se evaluó la actividad bactericida del suero normal sobre las cepas estudiadas según el protocolo de Pelkonen & Finne (1987). Se preparó un *pool* de sueros humanos normales mediante tratamiento térmico a 56°C durante 30 min y se agregó etilenglicol 10 mM y MgCl_2 5mM para inactivar la vía clásica del Complemento. Se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Luego un cultivo de cada aislamiento en estudio obtenido por incubación durante 18 h en caldo BHI, se diluyó 1/10 en caldo BHI fresco. Se incubó a 37°C durante 90 min y se centrifugó a 1500 *g* durante 15 min, a 4°C . El sedimento se resuspendió en PBS(pH: 7,4) diluyendo hasta una concentración del orden de 10^9 UFC mL^{-1} . Se utilizó una microplaca de 96 pocillos. Se inocularon 175 μL de PBS, 175 μL de suspensión de cada aislamiento y 100 μL del *pool* de sueros humanos normales. Luego de mezclar durante 30 s en agitador mecánico se incubó a 37°C . Se midió la absorbancia a 630 nm a los 30, 60, 90, 120 y 180 min. En cada tiempo de lectura se realizó un recuento de bacterias viables. Las cepas ensayadas se clasificaron como sensibles, intermedias o resistentes al efecto bactericida del suero humano normal, de acuerdo al esquema propuesto por Taylor (1974). Como control de resistencia al efecto bactericida del suero fue utilizada la cepa *E. faecalis* DS16 y como control de sensibilidad se empleó a la cepa *E. faecalis* CECT 7121.

3. OBJETIVO 3

Determinar el perfil de resistencia asociada a antimicrobianos de utilización clínica para *Enterococcus* spp. mediante pruebas de sensibilidad *in vitro* cualitativas y cuantitativas.

3.1. Pruebas cualitativas

3.1.1. Prueba de difusión en agar

El estudio de sensibilidad *in vitro* cualitativa se realizó mediante la prueba de difusión en agar siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2006).

Se obtuvo un inóculo de cada aislamiento en 3,0 mL de solución fisiológica estéril 0,85 % p/v a partir de un cultivo fresco en TSA. Se ajustó la densidad de la suspensión para lograr un inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, correspondiendo al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

Se ensayaron los antimicrobianos ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomina (alta carga, 300 µg), gentamicina (alta carga, 120 µg), eritromicina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg), linezolid (30 µg), vancomicina (30 µg) y teicoplanina (30 µg). Los mono-discos utilizados fueron de potencia certificada (Lab. Britania).

Un hisopo estéril se embebió en la suspensión bacteriana y se inoculó en Agar Mueller-Hinton (MHA, Lab. Britania). Se colocaron los mono-discos de antimicrobiano sobre la superficie del agar. Luego de incubar a 35°C durante 18 h se realizó la medición de los diámetros de los halos de inhibición. Se interpretaron los resultados como *sensible* (S), *intermedio* (I) o *resistente* (R), siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI 2012). Como control se utilizaron las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299.

En la Tabla 3 se observan los puntos de corte para los antimicrobianos ensayados mediante la prueba de difusión en agar.

Tabla 3. Puntos de corte para los antimicrobianos ensayados mediante la prueba de difusión en agar.

ATM ^b	Categoría ^a		
	S	I	R
AMP	≥17	-----	≤16
TET	≥19	15-18	≤14
CMP	≥18	13-17	≤12
ERY	≥23	14-22	≤13
CIP	≥21	16-20	≤15
LZD	≥23	21-22	≤20
VAN	≥17	15-16	≤14
TEI	≥14	13-11	≤10

^aLos valores corresponden a los diámetros de halos de inhibición, expresados en mm. S: sensible, I: intermedio, R: resistente. ^b ATM: antimicrobianos.

Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute (2012)*.

El alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos se detectó mediante el siguiente criterio de estratificación de los diámetros de halos de inhibición:

-Halo de estreptomina y/o gentamicina 6 mm: Resistente. Indica alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos. Predice ausencia de sinergia cuando se asocian con agentes activos sobre la pared celular.

-Halo de estreptomina y/o gentamicina 7-9 mm: indeterminado. Precisa confirmación con curvas de letalidad.

-Halo de estreptomina y/o gentamicina ≥ 10 mm: Sensible. Excluye alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos. Predice sinergia cuando se asocian con agentes activos sobre la pared celular.

3.1.2. Producción de β -lactamasa

La producción de β -lactamasa se investigó mediante el método del disco de nitrocefina (BBL). En un portaobjetos se colocó un disco de nitrocefina y se hidrató

con una gota de agua destilada estéril. Se tomaron colonias con ansa estéril de un cultivo puro de cada aislamiento en TSA y se colocaron sobre el disco. La prueba fue considerada positiva cuando se observó la aparición de color amarillo o rojo en el área del disco que contenía las colonias bacterianas. La cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 fue utilizada como control positivo de reacción y la cepa *E. faecalis* CECT 7121 se empleó como control negativo.

3.2. Pruebas cuantitativas

3.2.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Para la determinación de la CIM se utilizó el método de dilución en agar, siguieron las recomendaciones del CLSI (CLSI 2000).

Se preparó el inóculo a partir de un cultivo fresco en TSA. Una vez alcanzada una turbidez equivalente al tubo 0,5 de McFarland en solución fisiológica estéril, se ajustó la concentración para obtener un inóculo bacteriano de 1×10^4 UFC mL⁻¹ final.

Se utilizaron drogas antimicrobianas de pureza analítica certificada. Se realizaron diluciones seriadas al medio de los antimicrobianos, en el rango de 0,015 a 2048 µg mL⁻¹. Para estudiar el ANRG se evaluó a partir de 500 µg mL⁻¹ y para ANRE desde 2048 µg mL⁻¹. Las diluciones de antimicrobiano se agregaron en una proporción 1/10 con respecto al MHA fundido cuando la temperatura fue adecuada (50-55°C). Luego se sembraron 4 µL de la suspensión bacteriana sin extender por el medio de cultivo (siembra en *spot*). Se incubó a 35°C durante 18 h en atmósfera ordinaria. El valor de la CIM (µg mL⁻¹) correspondió a la placa con menor concentración de antimicrobiano en la cual se observó inhibición completa de crecimiento visible. Se utilizaron las cepas *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299 como controles de la metodología. En la Tabla 4 se muestran los criterios de interpretación para determinar la CIM en cepas de enterococos.

Tabla 4. Criterios de interpretación para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima.

ATM ^b	Categoría ^a		
	S	I	R
AMP	≤8	-----	≥16
TET	≤4	8	≥16
CMP	≤8	16	≥32
ERY	≤0,5	1-4	≥8
CIP	≤1	2	≥4
LZD	≤2	4	≥8
VAN	≤4	8-16	≥32
TEI	≤8	16	≥32

^aLos valores corresponden a concentración de antimicrobianos expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$. S: sensible, I: intermedio, R: resistente. ^b ATM: antimicrobianos.

Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute (2012)*.

4. OBJETIVO 4

Detectar los fenotipos de resistencia a glucopéptidos en los enterococos recuperados

4.1. Detección *in vitro* de resistencia intrínseca a vancomicina

Se estudió la expresión fenotípica de resistencia intrínseca a vancomicina. Se inocularon 10 μL de una suspensión bacteriana, en agar BHI con 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de vancomicina. Luego de incubar a 35°C durante 24 h se observó la presencia o ausencia de desarrollo bacteriano. Como controles se utilizaron las cepas de referencia *E. casseliflavus* ATCC 25788 (control positivo) y *E. faecalis* ATCC 29212 (control negativo).

4.2. Categorización de fenotipos de resistencia a glucopéptidos

Los resultados de las pruebas de difusión en agar y determinación de CIM para vancomicina y teicoplanina se utilizaron para categorizar los distintos fenotipos de resistencia a glucopéptidos expresados por los aislamientos de enterococos investigados.

5. Análisis estadístico de los resultados

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 $p < 0,05$.

La correlación entre la ocurrencia de resistencia a los antimicrobianos y factores de virulencia fue calculada usando el test exacto de Fisher.

Apéndice 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA SDS-PAGE

1.1 Preparación de geles

1.1.1. Gel separador 10% p/v

Agua destilada.....	3,35 mL
Tris-HCl 0,375M (pH: 8,8).....	2,5 mL
SDS 10% p/v.....	0,10 mL
Acrilamida/bis-acrilamida (30/08%).....	3,3 mL

Esta solución se mantuvo al vacío durante 15 min para desgasificarla, pues el oxígeno es un potente inhibidor de la polimerización. Seguidamente se añadieron los siguientes componentes:

APS 10% p/v.....	0,05 mL
TEMED.....	0,02 mL

La solución recién preparada se inyectó entre los vidrios de soporte del gel y se dejó en reposo 30 min.

1.1.2. Gel concentrador 4% p/v

Agua destilada.....	1,54 mL
Tris-HCl 0,125 M (pH: 6,8).....	0,625 mL
SDS 10 % p/v	0,025 mL
Acrilamida/bis-acrilamida (30/0.8 %).....	0,335 mL
APS 10 % p/v.....	0,0125 mL
TEMED.....	0,005 mL

El gel iniciador se inyectó entre los vidrios de soporte, sobre el gel separador y previamente a su polimerización se colocó el peine para los carriles.

1.2. Soluciones para el gel

1.2.1. Buffer de corrida (10x)

Tris-HCl.....0,25 M

Glicina.....1,92 M

SDS.....1% p/v

pH: 8,3

1.2.2. Solución para la muestra (5x)

Glicerol.....20% v/v

β -mercaptoetanol.....10 % v/v

SDS.....4 % p/v

Tris-HCl.....0,5 M

Azul de bromofenol.....0,001 % p/v

pH: 6.8

1.2.3. Solución de coloración para tinción de geles

Azul de Coomassie GPB-R.....0,125 g

Isopropanol.....62, 5 mL

Ácido acético glacial.....25 mL

Agua destilada..... c.n.p 250 mL

1.2.4. Solución de decoloración

Metanol.....25 mL

Ácido acético glacial.....25 mL

Agua destilada.....csp para 250 mL

1.2.5. Solución de secado de geles

Glicerol.....3 mL

Metanol.....30 mL

Agua destilada.....67 mL

RESULTADOS

1. OBJETIVO 1

Aislar y caracterizar fenotípicamente a nivel de especie enterococos recuperados de alimentos de origen cárnico y lácteo elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

1.1. Caracterización fenotípica de aislamientos de enterococos

1.1.1. Aislamiento inicial a partir de homogenatos de productos cárnicos y lácteos

La población de alimentos de origen animal elaborados de forma artesanal procesada fue N = **1937**. En **215** muestras se recuperaron *Enterococcus* spp. a partir de los medios selectivos (11,1%). Se detectó una mayor positividad en muestras de origen cárnico (139/215) con respecto a las de origen lácteo (76/215). Se observó que el número de muestras positivas fue variable según el tipo de alimento. Dentro de los productos cárnicos el número de muestras positivas fue mayor para carne picada (86/139) que para salami artesanal (53/139). Se aislaron enterococos en los cuatro tipos de alimentos lácteos estudiados: queso de vaca (50/76), queso de oveja (11/76), queso de cabra (8/76) y leche de cabra (7/76).

1.1.2. Caracterización fenotípica a nivel de género y especie

Mediante pruebas bioquímicas fueron caracterizados fenotípicamente N = **252** aislamientos como *Enterococcus* spp., a partir de cultivos puros en TSA (Figura 14). En la totalidad se observó: presencia de cocos de coloración violeta (Gram positivos) dispuestos en cadenas cortas, al Microscopio Óptico (Figura 15 A); ausencia de reacción frente al agregado peróxido de hidrógeno 3% v/v (prueba de catalasa negativa); aparición de turbidez en caldo BHI adicionado con cloruro de sodio 6,5% p/v, indicando desarrollo bacteriano (Figura 15 B, desarrollo en caldo con cloruro de sodio 6,5% p/v, positivo), desarrollo de colonias con coloración “negruzca” en Agar BEA (Figura 15 C, hidrólisis de esculina en presencia de 40% de bilis positiva); viraje de incoloro a “rosado” de los discos del equipo comercial

PYR-A-ENT (Lab. Britania) para detección de actividad de pirilidonil arilamidasa (Figura 15 D, prueba positiva).

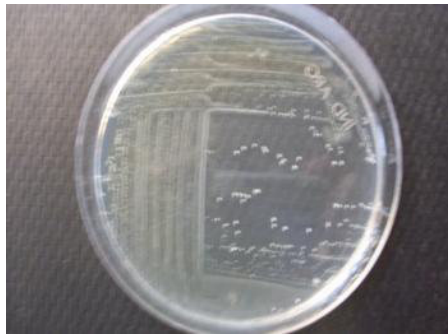


Figura 14. Cultivo bacteriano puro en Agar Tripteína Soya.

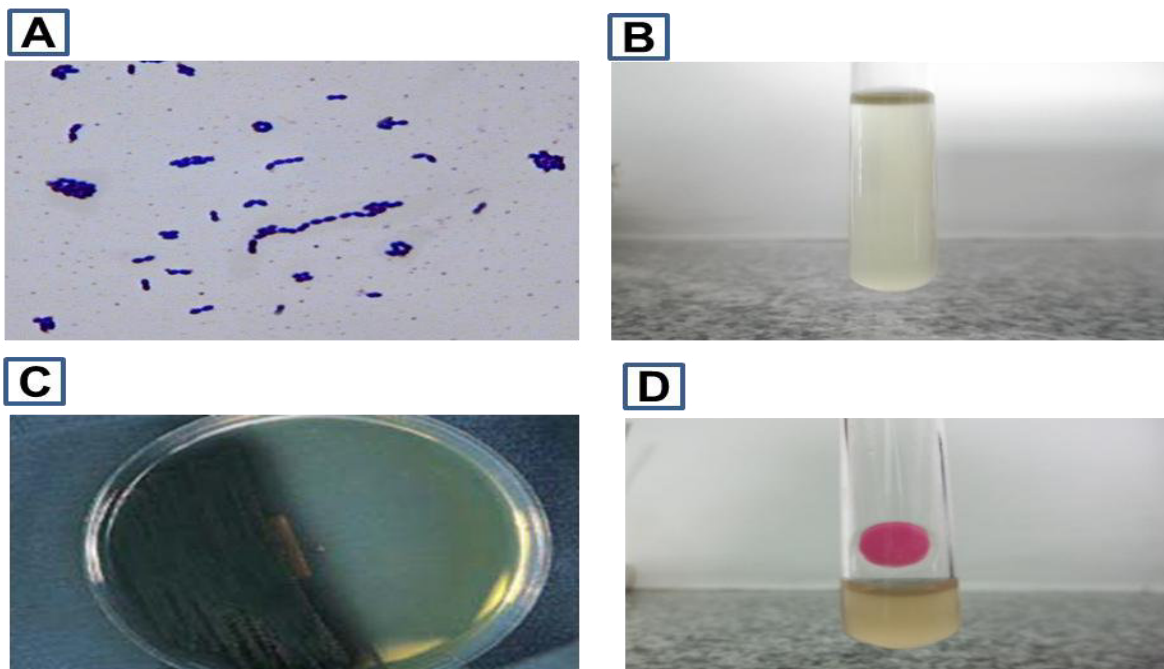


Figura 15. Pruebas bioquímicas para la caracterización fenotípica del género *Enterococcus*. A) Coloración de Gram. Cocos en cadena con coloración violeta, observados al Microscopio Óptico (1000X). B) Desarrollo de turbidez de cultivo en caldo adicionado con cloruro de sodio 6,5% p/v. C) Cultivo en agar BEA. Desarrollo de coloración "negruzca". D) Detección de actividad pirilidonil arilamidasa. Prueba positiva (disco "rosado").

Los aislamientos (N= **252**) fueron caracterizados como pertenecientes a siete especies del género *Enterococcus*. En la Tabla 5 se observa la distribución de especies de enterococos recuperados de productos cárnicos y lácteos.

Tabla 5. Distribución de especies de enterococos recuperados de productos cárnicos y lácteos.

Especie	n ^a	Alimentos	
		Cárnicos	Lácteos
<i>E. faecalis</i>	165	135	30
<i>E. faecium</i>	81	14	67
<i>E. raffinosus</i>	2	0	2
<i>E. avium</i>	1	0	1
<i>E. durans</i>	1	0	1
<i>E. gallinarum</i>	1	0	1
<i>E. hirae</i>	1	0	1
TOTAL	252	149	103

^an: número de aislamientos

Se observó una mayor frecuencia de recuperación de enterococos en alimentos cárnicos (59,1%) que en productos lácteos (40,9%). La especie más prevalente fue *E. faecalis* (165/252, 65,5%) seguida por *E. faecium* (81/252, 32,1%). En menor número se aislaron *E. raffinosus* (0,8%), *E. avium* (0,4%), *E. durans* (0,4%), *E. gallinarum* (0,4%) y *E. hirae* (0,4%).

E. faecalis fue la especie más frecuentemente recuperada en alimentos de origen cárnico ($p < 0,001$). Sin embargo, *E. faecium* fue la especie aislada con mayor frecuencia de alimentos de origen lácteo ($p < 0,01$), seguida por *E. faecalis*.

Productos cárnicos

En la Tabla 6 se muestra la distribución de enterococos recuperados de productos cárnicos.

Tabla 6. Distribución de enterococos recuperados de productos cárnicos.

Especie	Carne picada		TOTAL
	Salamín (%)	(%)	
<i>E. faecalis</i>	47 (81)	88 (96,7)	135
<i>E. faecium</i>	11 (19)	3 (3,3)	14
TOTAL	58	91	149

En productos cárnicos se recuperaron $n = 149$ aislamientos de *Enterococcus* spp. La distribución fue la siguiente: *E. faecalis*, 135/149 (90,6%) y *E. faecium*, 14/149 (9,4%). En muestras de carne picada se aisló el 61,1% de los enterococos de origen cárnico y el 38,9% se recuperó de muestras de salamín. La relación *E. faecalis*/*E. faecium* fue menor en salamín (4:1) que en carne picada (29:1). En

salamines artesanales y carne picada no se aislaron *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum* o *E. hirae*.

Productos lácteos

Se recuperaron $n = 103$ enterococos de productos lácteos (Tabla 7). Los aislamientos de origen lácteo provinieron de queso de vaca (50,5%), queso de oveja (29,1%), queso de cabra (13,6%) y leche de cabra (6,8%).

Tabla 7. Aislamientos de enterococos recuperados de productos lácteos.

Especie	Leche de cabra (%)	Queso de cabra (%)	Queso de oveja (%)	Queso de vaca (%)	TOTAL (n)
<i>E. faecalis</i>	4 (57,1)	6 (42,9)	6 (20)	14 (26,9)	30
<i>E. faecium</i>	1 (14,3)	8 (57,1)	22 (73,4)	36 (69,3)	67
<i>E. raffinosus</i>	2 (28,6)	0	0	0	2
<i>E. avium</i>	0	0	1 (3,3)	0	1
<i>E. durans</i>	0	0	0	1 (1,9)	1
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	1 (1,9)	1
<i>E. hirae</i>	0	0	1 (3,3)	0	1
TOTAL (N)	7	14	30	52	103

En leche de cabra la relación *E. faecalis*/*E. faecium* fue de 4:1, mientras que en queso de cabra fue de 2:3. La leche de cabra fue en el único alimento lácteo en el que se recuperó un mayor porcentaje de *E. faecalis* que de *E. faecium*.

En los productos lácteos se recuperaron especies de *Enterococcus* spp. distintas a *E. faecalis* y *E. faecium*: 2/103 (2%) aislamientos de *E. raffinosus*; 1/103 (1%), *E. avium*; 1/103 (1%), *E. gallinarum*; 1/103 (1%), *E. durans*; 1/103 (1%), *E. hirae*. Los aislamientos de estas especies presentaron distintas prevalencias de acuerdo al alimento de origen: 2/7 (28,6), *E. raffinosus* en leche de cabra; 1/30 (3,3%), *E. avium* en queso de oveja; 1/52 (1,9%), *E. gallinarum* en queso de vaca; 1/52 (1,9%), *E. durans* en queso de vaca; 1/30 (3,3%), *E. hirae* en queso de oveja. En quesos de cabra no se aislaron especies del género *Enterococcus* distintas a *E. faecalis* y *E. faecium*. La mayor diversidad de especies se observó en queso de oveja (cuatro especies), queso de vaca (tres especies) y leche de cabra (tres especies).

La prevalencia de *Enterococcus* spp. mostró variabilidad de acuerdo a la especie y al tipo de producto del cual se realizaron los aislamientos.

Se recuperó *E. faecalis* en: 16,7% de las muestras de queso de oveja, 13,3% de las muestras de leche de cabra, 11,8% de muestras de queso de vaca, 9,5% de los quesos de cabra, 7,7% de las muestras de carne picada y 6,5% de los salamines artesanales.

Los aislamientos de *E. faecium* recuperados de alimentos de origen animal provinieron de: 28,6% de los quesos de vaca, 20,8% de los queso de oveja, 9,5% de los quesos de cabra, 3,3% de las muestras de leche de cabra, 1,7% de los salamines artesanales seleccionados y de 0,3% de las muestras de carne picada.

Se observó la presencia de *E. raffinosus* en 6,7% de las muestras de leche de cabra estudiadas. En 8,4% de las muestras de queso de oveja analizadas se detectó la presencia de *E. avium* (4,2%) y *E. hirae* (4,2%). En las muestras de queso de vaca se observó una prevalencia equivalente (0,8%) para *E. durans* y *E. gallinarum*.

1.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

En N = **252** enterococos caracterizados fenotípicamente a nivel de especie, se realizó el análisis de perfiles de proteínas solubles totales mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). En el 100% de los aislamientos caracterizados como *E. faecalis* y *E. faecium* se observó una correlación entre la fenotipificación mediante pruebas bioquímicas y los patrones de bandas de SDS-PAGE (Figura 16). Se observaron discrepancias entre la tipificación mediante pruebas bioquímicas y los perfiles proteicos de SDS-PAGE para los aislamientos no caracterizados como *E. faecalis* o *E. faecium*. Los resultados de SDS-PAGE fueron confirmados mediante técnicas de amplificación génica realizadas en un Centro Nacional de Referencia.

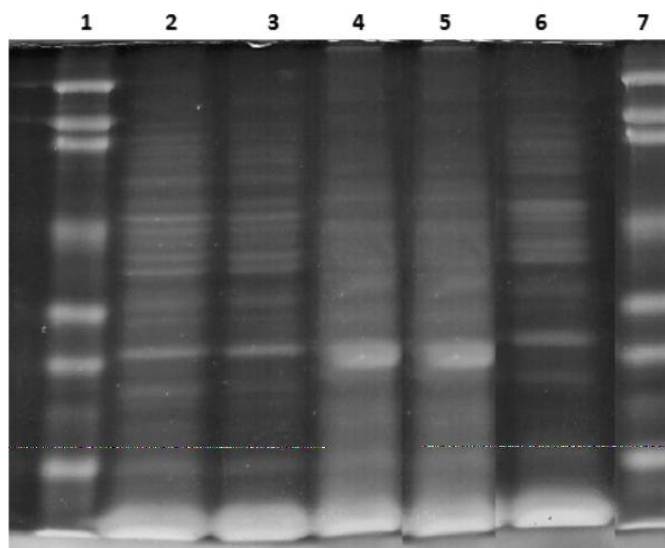


Figura 16. Perfiles de proteínas totales mediante SDS-PAGE de aislamientos de enterococos de alimentos artesanales de origen animales y de cepas de referencia. Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Calle 3: *E. faecalis* Sa106 (salamín). Calle 4: *E. faecium* ATCC 35667. Calle 5: *E. faecium* Qv614 (queso de vaca). Calle 6: *E. gallinarum* ATCC 700425. Calle 7: marcador de peso molecular.

2. OBJETIVO 2

Detectar la expresión de distintos factores de virulencia en los aislamientos de *Enterococcus* spp.

Se detectó la producción de factores de virulencia en **72/252** (28,5%) enterococos recuperados de alimentos de origen animal. Los alimentos cárnicos conformaron de forma significativa ($p < 0,01$) el principal reservorio de enterococos con factores de virulencia (gelatinasa, hemolisina y Sustancia Agregativa). Los aislamientos cárnicos que expresaron factores de virulencia se recuperaron de carne picada (30/49) y de salamín artesanal (19/49). Los enterococos productores de factores de virulencia de origen lácteo fueron aislados de queso de vaca (10/23), queso de oveja (8/23) y leche de cabra (5/23).

La especie *E. faecalis* fue la que presentó mayor expresión de factores de virulencia ($p < 0,001$). El factor de virulencia predominante fue gelatinasa aunque

no se observaron diferencias significativas con hemolisina y Sustancia Agregativa ($p > 0,05$).

El 65,3% (47/72) de los aislamientos expresó un factor de virulencia, representando una prevalencia de 18,5% (47/252) mientras que la producción conjunta de dos o tres factores de virulencia se observó en 25/72 (34,7%) enterococos, comprendiendo al 10,0% (25/252) de los aislamientos.

2.1. Detección de producción de hemolisina

Se detectó la producción de hemolisina en $n = 24$ (9,5%) enterococos recuperados de alimentos artesanales de origen animal (Tabla 8). El factor de virulencia se expresó en 23/165 (13,9%) aislamientos de *E. faecalis* y en 1/81 (1,2%) *E. faecium*. Se observó una mayor frecuencia de enterococos positivos para hemolisina en muestras de alimentos cárnicos, 20/24 (83,3%). Se aislaron 7/20 (35%) *E. faecalis* productores de hemolisina en salami artesanal y 13/20 *E. faecalis* en carne picada (65%). En productos lácteos se detectó un menor porcentaje de aislamientos que expresaron hemolisina (16,7%): en queso de oveja, un aislamiento de *E. faecalis*; dos aislamientos de *E. faecalis* y uno de *E. faecium* de queso de vaca. No se observó la expresión de hemolisina en aislamientos de *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. raffinosus*.

Tabla 8. Producción de hemolisina en enterococos aislados de productos artesanales cárnicos y lácteos.

Especie	Salamín	Carne picada	Leche de cabra	Queso de cabra	Queso de vaca	Queso de oveja	Total (n)
<i>E. faecalis</i>	7	13	0	0	2	1	23
<i>E. faecium</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>E. avium</i>	0	0	0	NA ^a	0	0	0
<i>E. durans</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. hirae</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. raffinosus</i>	0	0	0	NA	0	0	0
Total (N)	7	13	0	0	3	1	24

^aNA: no se recuperaron aislamientos

2.2. Detección de gelatinasa

Se detectó la producción de gelatinasa en $n = 43$ (17%) enterococos (Tabla 9), aislados de productos cárnicos (65,1%) y lácteos (34,9%).

Tabla 9. Detección de gelatinasa en enterococos aislados de productos artesanales cárnicos y lácteos.

Especie	Salamín	Carne picada	Leche de cabra	Queso de cabra	Queso de vaca	Queso de oveja	Total (n)
<i>E. faecalis</i>	9	18	3	0	5	3	38
<i>E. faecium</i>	0	1	0	0	2	0	3
<i>E. avium</i>	0	0	0	NA ^a	0	0	0
<i>E. durans</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. hirae</i>	0	0	0	NA	0	1	1
<i>E. raffinosus</i>	0	0	1	NA	0	0	1
Total (N)	9	19	4	0	7	4	43

^aNA: no se recuperaron aislamientos

El aislamiento de enterococos productores de gelatinasa fue mayor en carne picada (67,9%) que en salamines (32,1%). Los porcentajes de expresión en enterococos de queso de oveja (26,7%) y de leche de cabra (26,7%) fueron menores que en enterococos de queso de vaca (46,6%). No se recuperaron enterococos positivos para gelatinasa en queso de cabra. Se detectó la producción de gelatinasa en 38/165 *E. faecalis* (23%), 3/81 *E. faecium* (3,7%), 1/1 *E. hirae* (100%) y 1 *E. raffinosus* (50%). No se observó expresión de gelatinasa en *E. avium*, *E. durans* y *E. gallinarum*. Se observaron porcentajes variados de especies de enterococos productoras de gelatinasa de acuerdo al alimento de origen animal: *E. faecalis* en salamines artesanales (100%); *E. faecalis* (94,7%) y *E. faecium* (5,3%) en carne picada; *E. faecalis* (75%) y *E. raffinosus* (25%) en leche de cabra; *E. faecalis* (75%) y *E. hirae* (25%) en queso de oveja; *E. faecalis* (71,4%) y *E. faecium* (28,6%) en queso de vaca.

2.3. Producción de Sustancia Agregativa

Se detectó la producción de Sustancia Agregativa en $n = 33$ (13,1%) enterococos recuperados de alimentos artesanales de origen animal (Tabla 10).

Tabla 10. Producción de Sustancia Agregativa en enterococos aislados de productos artesanales cárnicos y lácteos.

Especie	Salamín	Carne picada	Leche de cabra	Queso de cabra	Queso de vaca	Queso de oveja	Total (n)
<i>E. faecalis</i>	7	12	3	0	4	3	29

<i>E. faecium</i>	0	1	0	0	1	2	4
<i>E. avium</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. durans</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. hirae</i>	0	0	0	NA	0	0	0
<i>E. raffinosus</i>	0	0	0	NA	0	0	0
Total (n)	7	13	3	0	5	5	33

^aNA: no se recuperaron enterococos de esta especie

En los alimentos de origen animal estudiados, los aislamientos productores de Sustancia Agregativa fueron caracterizados como *E. faecalis* (87,9%) y como *E. faecium* (12,1%). No se observó la producción de Sustancia Agregativa en *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* o *E. raffinosus*.

Se observó la expresión de este factor de virulencia en productos cárnicos (60,6%) y en lácteos (39,4%). El porcentaje de aislamientos con Sustancia Agregativa fue menor en salami artesanal (35%) con respecto a carne picada (65%). El 95% de los enterococos productores de Sustancia Agregativa fue caracterizado como *E. faecalis* y el 5% como *E. faecium*. En salami el 100% de los aislamientos correspondió a *E. faecalis* mientras que en carne picada fue de 92,3% para esta especie y de 7,6% para *E. faecium*. En leche de cabra los aislamientos positivos para Sustancia Agregativa fueron menos frecuentes (23,0%) que en quesos de vaca (38,5%) y de oveja (38,5%). No se observó la producción de Sustancia Agregativa por *E. faecium* de leche de cabra. Se recuperaron *E. faecalis* (80%) y *E. faecium* (20%) positivos para este factor de virulencia en queso de vaca. En queso de oveja los porcentajes de positividad fueron de 60% y 40% para *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. No se detectó la expresión de Sustancia Agregativa en enterococos de queso de cabra.

En la Figura 17 se observa la producción de los factores de virulencia hemolisina (A), gelatinasa (B) y Sustancia Agregativa (C) en enterococos recuperados de alimentos de origen animal.

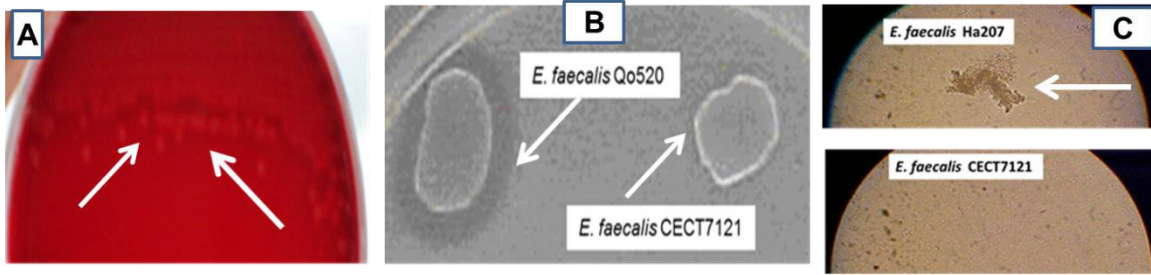


Figura 17. Producción de factores de virulencia en aislamientos de enterococos provenientes de alimentos artesanales de origen animal. **A)** *E. faecalis* aislado de salami artesanal (Sa103) productor de hemolisina. Se observa hemólisis completa en cultivo realizado en agar sangre (flechas blancas). **B)** Producción de gelatinasa. Izquierda: *E. faecalis* de queso de oveja (Qo520) positivo para gelatinasa. Derecha: *E. faecalis* CECT 7121: no productor de gelatinasa. **C)** Producción de Sustancia Agregativa. Arriba: *E. faecalis* Ha207 (carne picada) positivo para Sustancia Agregativa. Abajo: *E. faecalis* CECT 7121 negativo para Sustancia Agregativa.

Aislamientos que expresaron un factor de virulencia

Se observó la producción de un factor de virulencia en 42 aislamientos de *E. faecalis* (89,3%), cuatro aislamientos de *E. faecium* (8,5%) y un aislamiento de *E. raffinosus* (2,2%). Los aislamientos fueron recuperados de productos cárnicos (70,2%) y de productos lácteos (29,8%). Se aislaron 16 *E. faecalis* de salami que expresaron gelatinasa (7/16), Sustancia Agregativa (5/16) o hemolisina (4/16). En 17 aislamientos de *E. faecalis* de carne picada se detectó la producción de hemolisina (9/17), gelatinasa (6/17) o Sustancia Agregativa (2/17). Se recuperaron tres enterococos positivos para un factor de virulencia en leche de cabra: dos aislamientos de *E. faecalis*, uno productor de gelatinasa y uno productor de Sustancia Agregativa mientras que un tercer aislamiento (*E. raffinosus*) expresó gelatinasa. En queso de vaca dos aislamientos de *E. faecalis* y dos aislamientos de *E. faecium* fueron productores de gelatinasa o de hemolisina exclusivamente. En cambio se detectó la expresión de Sustancia Agregativa en *E. faecalis* (2/4) y en *E. faecium* (2/4) y tres aislamientos de *E. faecalis* productores de gelatinasa recuperados de queso de oveja.

Expresión simultánea de factores de virulencia

En alimentos de origen cárnico como lácteo no se observó un fenotipo de asociación de factores de virulencia predominante de forma significativa ($p > 0,05$).

Hemolisina-gelatinasa

Se detectó la expresión conjunta de hemolisina y gelatinasa en cuatro (1,6%) enterococos recuperados de alimentos artesanales de origen animal (Tabla 11).

Tabla 11. Producción asociada de hemolisina y gelatinasa en enterococos aislados de alimentos de origen animal.

Alimento	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Total
Salamín artesanal	1	--	1
Carne picada	2	--	2
Queso de vaca	1	0	1
Queso de oveja	0	--	0
Total	4	0	4

La producción de los factores de virulencia se observó en *E. faecalis* provenientes de productos cárnicos (75%) y lácteos (25%). La asociación hemolisina-gelatinasa en salamín comprendió al 14,2% de los *E. faecalis* productores de hemolisina (1/7) y al 11,1% (1/9) de los productores de gelatinasa; en carne picada, 15,4% (2/3) de *E. faecalis* productores de hemolisina y 11,1% (2/18) de gelatinasa positivos; en queso de vaca la expresión conjunta se observó en 50% de *E. faecalis* productores de hemolisina (1/2) y 20% (1/5) de gelatinasa. No se detectó la producción conjunta de hemolisina y gelatinasa en *E. faecalis* de queso de oveja y *E. faecium* de queso de vaca.

Hemolisina-Sustancia Agregativa

Se observó la expresión simultánea de hemolisina y Sustancia Agregativa (Tabla 12) en tres (1,2%) *E. faecalis* recuperados de productos cárnicos (33,3%) y de productos lácteos (66,7%).

Tabla 12. Producción asociada de hemolisina y Sustancia Agregativa en enterococos aislados de alimentos de origen animal.

Alimento	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Total
Salamín artesanal	1	--	1
Carne picada	0	--	0
Queso de vaca	1	0	1
Queso de oveja	1	--	1

Total	3	0	3
-------	---	---	---

Se detectó la asociación de estos factores de virulencia en carne picada en 1/7 (14,2%) *E. faecalis* productores de hemolisina y de Sustancia Agregativa; en queso de oveja, 1/1 *E. faecalis* productor de hemolisina y de Sustancia Agregativa (3/5); en queso de vaca, *E. faecalis* productor de hemolisina (1/3) y Sustancia Agregativa (1/4). No se observó la producción de hemolisina y Sustancia Agregativa conjunta en aislamientos de *E. faecium* de queso de vaca.

Gelatinasa-Sustancia Agregativa

Se detectó la expresión conjunta de gelatinasa y Sustancia Agregativa en 15 (6,0%) aislamientos de productos de origen animal (Tabla 13).

Tabla 13. Producción asociada de gelatinasa y Sustancia Agregativa en enterococos aislados de alimentos de origen animal.

Alimento	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Total
Salamín artesanal	0	--	0
Carne picada	8	1	9
Queso de vaca	3	1	4
Leche de cabra	2	--	2
Total	13	2	15

La producción conjunta de gelatinasa y Sustancia Agregativa se detectó en productos cárnicos (60%) y lácteos (40%). Se observó en 13 aislamientos de *E. faecalis* (86,7%) aislados de carne picada, 8/13 (61,5%); de queso de vaca, 3/13 (23,1%); de leche de cabra, 2/13 (15,4%); y dos aislamientos de *E. faecium* (13,3%) recuperados de carne picada (50%) y de queso de vaca (50%). La expresión simultánea de gelatinasa y Sustancia Agregativa se observó en 8/13 (61,5%) y 8/12 (66,7%) *E. faecalis* productores de gelatinasa y Sustancia Agregativa (carne picada); 1/1 *E. faecium* productor de gelatinasa y Sustancia Agregativa (carne picada); 3/5 (60%) y 3/4 (75%) de *E. faecalis* productores de gelatinasa y Sustancia Agregativa (queso de vaca); 1/2 y 1/1 *E. faecium* productores de gelatinasa y Sustancia Agregativa (queso de vaca); 2/3

(66,7%) *E. faecalis* productores de gelatinasa y de Sustancia Agregativa (leche de cabra).

Hemolisina-Gelatinasa-Sustancia Agregativa

Se observó la expresión asociada de hemolisina, gelatinasa y Sustancia Agregativa en tres (1,2%) enterococos recuperados de productos de origen animal (Tabla 14).

Tabla 14. Producción asociada de hemolisina, gelatinasa y Sustancia Agregativa en enterococos aislados de alimentos de origen animal.

Alimento	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Total
Salamín artesanal	1	--	1
Carne picada	2	--	2
Queso de vaca	0	0	0
Queso de oveja	0	--	0
Total	3	0	3

La mayor frecuencia de expresión conjunta de hemolisina, gelatinasa y Sustancia Agregativa se detectó en aislamientos de *E. faecalis* provenientes de carne picada (66,7%) y en menor medida de salamín artesanal (33,3%). No se observó la producción simultánea de los tres factores de virulencia en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de queso de vaca.

2.4. Producción de *biofilm* en microplacas de poliestireno

Para estudiar la producción de *biofilm* *in vitro* se utilizó la técnica en microplacas de poliestireno. No se observó la formación de *biofilm* en la totalidad de los aislamientos de enterococos recuperados de productos cárnicos y lácteos.

2.5. Ensayo de resistencia a la opsonofagocitosis

Para evaluar la evasión de la respuesta inmune por parte de enterococos recuperados de alimentos de origen animal se realizó el ensayo *in vitro* de muerte bacteriana por opsonofagocitosis. Se observó muerte bacteriana por opsonofagocitosis en el 100% de los aislamientos.

2.6. Resistencia al efecto bactericida del suero normal

Otra prueba que se realizó para estudiar la evasión *in vitro* de la respuesta inmunitaria del hospedador fue la de sensibilidad de los aislamientos de origen alimentario a la actividad bactericida del suero. La totalidad de los enterococos evaluados presentó sensibilidad a la actividad bactericida del suero.

3. OBJETIVO 3

Determinar el perfil de resistencia asociada a antimicrobianos de utilización clínica para *Enterococcus* spp. mediante pruebas de sensibilidad *in vitro* cualitativas y cuantitativas.

Se observó resistencia antimicrobiana en $n = 114$ (45,2%) enterococos recuperados de alimentos de origen animal: 59 aislamientos de *E. faecalis* (51,8%), 54 aislamientos de *E. faecium* (47,4%) y el aislamiento de *E. gallinarum* (0,8%). En 56 aislamientos (49,1%) se evidenció resistencia a un antimicrobiano y en 58 aislamientos (50,9%) a dos o más antimicrobianos en forma simultánea.

La especie que presentó mayor espectro de resistencia a los antimicrobianos fue *E. faecium* ($p < 0,01$). El principal reservorio de cepas con multi-resistencia lo constituyeron los alimentos lácteos ($p < 0,01$); este dato coincide con el predominio de la especie *E. faecium* en estos productos.

3.1. Pruebas cualitativas

3.1.1. Prueba de difusión en agar

Se detectó resistencia cualitativa *in vitro* a la totalidad de los antimicrobianos ensayados (Tabla 15).

Tabla 15. Resistencia antimicrobiana *in vitro* cualitativa en enterococos aislados de alimentos artesanales de origen animal.

Especie	Antimicrobianos ^a									
	AMP	TET	CIP	ERY	CMP	LZD	GEN	STR	VAN	TEI
<i>E. faecalis</i>	7(14,9) ^b	18(64,3)	11(47,8)	19(59,4)	12(100)	7(50)	24(75)	18(69,2)	0	0

<i>E. faecium</i>	39(85,1)	10(35,7)	12(52,2)	12(37,5)	0	7(50)	8(25)	8(30,8)	31(100)	31(100)
<i>E. avium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. durans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	1(3,1)	0	0	0	0	0	0
<i>E. hirae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. raffinosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	46	28	23	32	12	14	32	26	31	31

^aAMP: ampicilina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; ERY: eritromicina; CMP: cloranfenicol; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; STR: estreptomina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina. ^bPorcentaje de resistencia antimicrobiana (%)

En la Figura 18 (A, B) se muestra un antibiograma por difusión en agar para un aislamiento de *E. faecalis* (queso de cabra) y un antibiograma por difusión en agar de un aislamiento de *E. faecium* recuperado de salami artesanal.

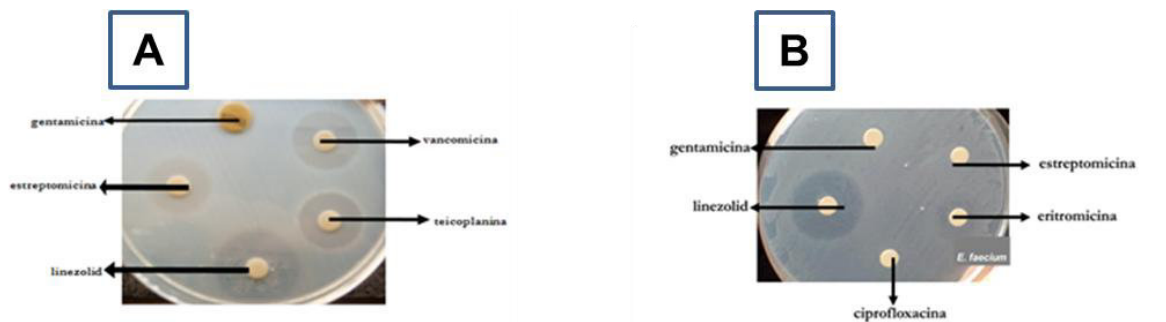


Figura 18. Antibiogramas por difusión en agar de enterococos recuperados de alimentos artesanales de origen animal. **A)** *E. faecalis* aislado de queso de cabra resistente a gentamicina (disco de alta carga) y sensible a vancomicina, teicoplanina, linezolid, estreptomina (disco de alta carga). **B)** *E. faecium* aislado de salami artesanal resistente a gentamicina (disco de alta carga), estreptomina (disco de alta carga), eritromicina, ciprofloxacina y sensible a linezolid.

Se detectó resistencia a los siguientes antimicrobianos: ampicilina en 46 enterococos (18,3%) de los cuales 39 correspondieron a *E. faecium* (15,5%) y siete a *E. faecalis* (2,8%); tetraciclina en 28 enterococos (11,1%), de los cuales 18 fueron *E. faecalis* (7,1%) y diez *E. faecium* (4,0%); ciprofloxacina en 23 (9,1%), 12 *E. faecium* (4,8%) y 11 *E. faecalis* (4,3%); eritromicina en 32 enterococos (12,7%), 19 en *E. faecalis* (7,5%), 12 en *E. faecium* (4,8%) y el aislamiento de *E. gallinarum* (0,4%); cloranfenicol en 12 (4,8%) *E. faecalis* solamente; linezolid en 14 (5,6%) enterococos, 7 *E. faecalis* (50%) y 7 *E. faecium* (50%); ANRG en 32 (12,7%), 24 *E. faecalis* (9,6%) y 8 *E. faecium* (3,1%); ANRE en 26 (10,3%), 18 *E. faecalis* (7,2%) y 8 *E. faecium* (3,1%); vancomicina en 31 (12,3%) *E. faecium* solamente; teicoplanina en 31 (12,3%) *E. faecium* únicamente.

En el aislamiento de *E. gallinarum* se observó susceptibilidad intermedia a vancomicina (15 mm) y susceptibilidad a teicoplanina (18 mm) en la prueba de difusión en agar.

En la totalidad de los aislamientos no se detectaron halos de inhibición intermedios para gentamicina. Por lo tanto, no se realizaron las curvas de muerte para estudiar la cinética bactericida del antimicrobiano sobre los aislamientos de enterococos.

Se observaron distintas frecuencias de resistencia antimicrobiana a nivel intra-especie.

Resistencia en aislamientos de *E. faecalis*: ANRG, 24/165 (14,5%); eritromicina, 19/165 (11,5%); ANRE, 18/165 (10,9%); tetraciclina, 18/165 (10,9%); cloranfenicol, 12/165 (7,3%); ciprofloxacina, 11/165 (6,7%); ampicilina, 7/165 (4,2%); linezolid, 7/165 (4,2%). Resistencia en *E. faecium*: ampicilina, 39/81 (48,1%); vancomicina, 31/81 (38,3%); teicoplanina, 31/81 (38,3%); ciprofloxacina, 12/81 (14,8%); eritromicina, 12/81 (14,8%); tetraciclina, 10/81 (12,3%); ANRE, 8/81 (9,9%); ANRG, 8/81 (9,9%); linezolid, 7/81 (8,6%). Se observó resistencia a eritromicina en *E. gallinarum* (100%).

En las siguientes Tablas se observan los perfiles cualitativos de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp. aislados de salamines artesanales (Tabla 16), carne picada (Tabla 17), leche de cabra (Tabla 18), queso de cabra (Tabla 19), queso de oveja (Tabla 20) y queso de vaca (Tabla 21).

Tabla 16. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp. aislados de salamines artesanales.

Especie	Antimicrobiano ^a (%)									
	AMP	TET	CIP	ERY	CMP	LZD	GEN	STR	VAN	TEI
<i>E. faecalis</i>	6(75)	6(54,5)	1(16,7)	6(54,5)	3(100)	2(50)	4(57,1)	6(66,7)	0	0
<i>E. faecium</i>	2(25)	5(45,5)	5(83,3)	5(45,5)	0	2(50)	3(42,9)	3(33,3)	5(100)	5(100)
TOTAL	8	11	6	11	3	4	7	9	5	5

^aAMP: ampicilina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; ERY: eritromicina; CMP: cloranfenicol; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; STR: estreptomina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina

Tabla 17. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp. aislados de carne picada.

Especie	Antimicrobiano ^a (%)									
	AMP	TET	CIP	ERY	CMP	LZD	GEN	STR	VAN	TEI
<i>E. faecalis</i>	0	8(100)	7(100)	9(100)	6(100)	4(100)	13(100)	11(100)	0	0
<i>E. faecium</i>	3(100)	0	0	0	0	0	0	0	3(100)	3(100)
TOTAL	3	8	7	9	6	4	13	11	3	3

^aAMP: ampicilina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; ERY: eritromicina; CMP: cloranfenicol; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; STR: estreptomicina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina

Tabla 18. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp. aislados de leche de cabra.

Especie	Antimicrobiano ^a (%)									
	AMP	TET	CIP	ERY	CMP	LZD	GEN	STR	VAN	TEI
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	0	0	1(100)	1(100)	0	0	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)
<i>E. raffinosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1

^aAMP: ampicilina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; ERY: eritromicina; CMP: cloranfenicol; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; STR: estreptomicina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina

Tabla 19. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp. aislados de queso de cabra.

Especie	Antimicrobiano ^a (%)									
	AMP	TET	CIP	ERY	CMP	LZD	GEN	STR	VAN	TEI
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	1(33,3)	0	0	0
<i>E. faecium</i>	2(100)	2(100)	2(100)	2(100)	0	0	2(66,7)	2(100)	2(100)	2(100)
TOTAL	2	2	2	2	0	0	3	2	2	2

^aAMP: ampicilina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; ERY: eritromicina; CMP: cloranfenicol; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; STR: estreptomicina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina

Tabla 20. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp. aislados de queso de oveja.

Especie	Antimicrobiano ^a (%)									
	AMP	TET	CIP	ERY	CMP	LZD	GEN	STR	VAN	TEI
<i>E. faecalis</i>	1(3,2)	0	0	0	0	0	4(100)	1(100)	0	0
<i>E. faecium</i>	15(93,8)	0	0	0	0	4(100)	0	0	9(100)	9(100)
<i>E. avium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. hirae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	16	0	0	0	0	4	4	1	9	9

^aAMP: ampicilina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; ERY: eritromicina; CMP: cloranfenicol; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; STR: estreptomicina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina

Tabla 21. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp. aislados de queso de vaca

Especie	Antimicrobiano ^a (%)									
	AMP	TET	CIP	ERY	CMP	LZD	GEN	STR	VAN	TEI
<i>E. faecalis</i>	0	4(57,1)	3(42,9)	4(44,4)	3(100)	1(50)	2(50)	0	0	0

<i>E. faecium</i>	17(100)	3(42,9)	4(57,1)	4(44,4)	0	1(50)	2(50)	2(100)	11(100)	11(100)
<i>E. durans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	0	1(11,1)	0	0	0	0	0	0
TOTAL	17	7	7	9	3	2	4	2	11	11

Se detectó ampicilino-resistencia en enterococos provenientes de productos lácteos (35/46) y cárnicos (11/46): *E. faecium* aislados de queso de vaca (17/46), queso de oveja (15/46), carne picada (3/46), salami (2/46), queso de cabra (2/46); *E. faecalis* de salami (6/46) y de queso de oveja (1/46). No se detectó resistencia a este antimicrobiano en *E. faecalis* de carne picada, leche de cabra, queso de cabra, queso de vaca y en *E. faecium* de leche de cabra. Los principales reservorios de enterococos con resistencia al antimicrobiano ampicilina fueron el queso de vaca y de oveja ($p < 0,01$). Los enterococos aislados de alimentos cárnicos expresaron menor ampicilino-resistencia ($p < 0,01$).

Se recuperaron EVR de productos lácteos (23/31) y cárnicos (8/31): *E. faecium* de queso de vaca (11/31), *E. faecium* de queso de oveja (9/31), *E. faecium* de salami (5/31), *E. faecium* de carne picada (3/31), *E. faecium* de queso de cabra (2/31) y *E. faecium* de leche de cabra (1/31). Los quesos de vaca y oveja fueron los reservorios más importantes de aislamientos con resistencia a vancomicina; sin embargo no se detectó una diferencia significativa ($p > 0,05$) con las otras variedades de alimento de origen cárnico y lácteo analizadas.

Se detectó resistencia a teicoplanina en *Enterococcus* spp. de origen lácteo (23/31) y cárnico (8/31): *E. faecium* de queso de vaca (11/31), *E. faecium* de queso de oveja (9/31), *E. faecium* de salami (5/31), *E. faecium* de carne picada (3/31), *E. faecium* de queso de cabra (2/31) y *E. faecium* de leche de cabra (1/31). No se observó resistencia a teicoplanina en *E. faecalis* de salami, carne picada de leche de cabra, queso de cabra, queso de oveja y queso de vaca y *E. raffinosus* de leche de cabra.

Se observó ANRG en aislamientos cárnicos (20/32) y lácteos (12/32): *E. faecalis* de carne picada (13/32), *E. faecalis* de salami (4/32), *E. faecalis* de queso de oveja (4/32), *E. faecalis* de queso de vaca (2/32), *E. faecalis* de queso de cabra, *E.*

faecium de salami (3/32), *E. faecium* de queso de vaca (2/32), *E. faecium* de queso de cabra (2/32) y *E. faecium* de leche de cabra (1/32). No se detectó ANRGen *E. faecalis* de leche de cabra y en *E. faecium* (carne picada, queso de oveja).

Se detectó resistencia a eritromicina en enterococos aislados de alimentos cárnicos (20/32) y lácteos (12/32): *E. faecalis* de carne picada (9/32), *E. faecalis* de salami (6/32), *E. faecalis* de queso de vaca (4/32), *E. faecium* de salami (5/32), *E. faecium* de queso de vaca (4/32), *E. faecium* de queso de cabra (2/32), *E. faecium* de leche de cabra (1/32) y *E. gallinarum* (1/32). No se aislaron: *E. faecalis* eritromicina-resistentes de leche de cabra, queso de cabra, queso de oveja; *E. faecium* de carne picada o queso de oveja.

Se observó resistencia a tetraciclina en productos cárnicos (19/28) y lácteos (9/28): en *E. faecalis* de carne picada (8/28), salami (6/28), queso de vaca (4/28) y en *E. faecium* de salami (5/28), queso de vaca (3/28), queso de cabra (2/28). No se detectó resistencia a tetraciclina en *E. faecalis* de leche de cabra, queso de cabra, queso de oveja y en *E. faecium* de carne picada, leche de cabra o queso de oveja.

Se observó ANRE en *Enterococcus* spp. de alimentos cárnicos (20/26) y lácteos (6/26): *E. faecalis* de carne picada (11/26), de salami (6/26) y de queso de oveja (1/26); *E. faecium* de salami (3/26), de queso de vaca (2/26), de queso de cabra (2/26) y de leche de cabra (1/26). No se detectó ANRE en *E. faecalis* de leche de cabra, queso de cabra, queso de vaca y en *E. faecium* de carne picada o de queso de oveja.

Se recuperaron enterococos con resistencia a ciprofloxacina de origen cárnico (12/23) y lácteo (11/23): *E. faecium* de salami (5/23), queso de vaca (4/23), queso de cabra (2/23), leche de cabra (1/23) y *E. faecalis* de carne picada (7/23), queso de vaca (3/23), salami (1/23). No se detectó resistencia a ciprofloxacina en *E. faecium* de carne picada y de queso de oveja. No se recuperaron *E. faecalis* resistentes de leche de cabra, queso de cabra o queso de oveja.

Se aislaron enterococos resistentes a linezolid de origen cárnico (8/14) y lácteo (6/14): *E. faecalis* de carne picada (4/14), salami (2/14), queso de vaca, *E. faecium* de queso de oveja (4/14), de salami (2/14), de queso de vaca (1/14). No se observó resistencia a linezolid en *E. faecalis* de leche de cabra, queso de cabra, queso de oveja y en *E. faecium* de carne picada, leche de cabra o queso de cabra.

Se observó resistencia a cloranfenicol en *E. faecalis* aislados de productos cárnicos (9/12) y lácteos (3/12): carne picada (6/12), salami (3/12) y de queso de vaca (3/12). No se detectó resistencia a cloranfenicol en *E. faecalis* de leche de cabra, queso de cabra o queso de oveja.

3.1.2. Producción de β -lactamasa

Se investigó la producción de β -lactamasa en los aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium*. Se detectó producción de la enzima en un aislamiento, *E. faecalis* Sa101, recuperado de salami artesanal que había presentado susceptibilidad a la ampicilina en la prueba de difusión en agar aunque se lo consideró posteriormente como resistente al determinar la CIM para ampicilina.

3.2. Pruebas cuantitativas

3.2.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se determinó la CIM en los aislamientos de *Enterococcus* spp. de origen cárnico y lácteo. En las Tablas 22 a 31 se observan las CIM de cada antimicrobiano, de los aislamientos que expresaron resistencia o susceptibilidad intermedia en la prueba de difusión en agar. En el caso de los antimicrobianos aminoglucósidos se determinó la CIM de los aislamientos con halos de inhibición compatibles con ANRG y/o ANRE.

Tabla 22. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **ampicilina** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	32	<i>E. faecium</i> Qo510	16

<i>E. faecium</i> Sa101	32	<i>E. faecium</i> Qo511	32
<i>E. faecium</i> Sa102	32	<i>E. faecium</i> Qo512	32
<i>E. faecalis</i> Sa103	32	<i>E. faecium</i> Qo513	16
<i>E. faecalis</i> Sa104	32	<i>E. faecium</i> Qo514	16
<i>E. faecalis</i> Sa105	32	<i>E. faecalis</i> Qo515	16
<i>E. faecalis</i> Sa106	32	<i>E. faecium</i> Qv600	32
<i>E. faecalis</i> Sa107	32	<i>E. faecium</i> Qv601	16
<i>E. faecalis</i> Sa108	32	<i>E. faecium</i> Qv602	32
<i>E. faecium</i> Ha199	16	<i>E. faecium</i> Qv603	64
<i>E. faecium</i> Ha200	16	<i>E. faecium</i> Qv604	32
<i>E. faecium</i> Ha201	16	<i>E. faecium</i> Qv605	64
<i>E. faecium</i> Qc400	16	<i>E. faecium</i> Qv606	32
<i>E. faecium</i> Qc401	32	<i>E. faecium</i> Qv607	64
<i>E. faecium</i> Qo500	16	<i>E. faecium</i> Qv608	32
<i>E. faecium</i> Qo501	16	<i>E. faecium</i> Qv609	32
<i>E. faecium</i> Qo502	16	<i>E. faecium</i> Qv610	32
<i>E. faecium</i> Qo503	16	<i>E. faecium</i> Qv611	64
<i>E. faecium</i> Qo504	16	<i>E. faecium</i> Qv612	32
<i>E. faecium</i> Qo505	16	<i>E. faecium</i> Qv613	32
<i>E. faecium</i> Qo506	32	<i>E. faecium</i> Qv614	32
<i>E. faecium</i> Qo507	32	<i>E. faecium</i> Qv615	32
<i>E. faecium</i> Qo508	16	<i>E. faecium</i> Qv616	32
<i>E. faecium</i> Qo509	16		

Sa: salamín artesanal; Ha: carne picada; Qc: queso de cabra; Qo: queso de oveja; Qv: queso de vaca

Tabla 23. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **tetraciclina** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	32	<i>E. faecalis</i> Ha206	32
<i>E. faecium</i> Sa101	32	<i>E. faecalis</i> Ha207	64
<i>E. faecium</i> Sa102	16	<i>E. faecalis</i> Ha208	16
<i>E. faecium</i> Sa109	64	<i>E. faecalis</i> Ha209	64
<i>E. faecium</i> Sa110	32	<i>E. faecalis</i> Ha210	32

<i>E. faecalis</i> Sa111	64	<i>E. faecium</i> Qc400	16
<i>E. faecalis</i> Sa112	64	<i>E. faecium</i> Qc401	32
<i>E. faecalis</i> Sa113	32	<i>E. faecium</i> Qv600	16
<i>E. faecalis</i> Sa114	32	<i>E. faecium</i> Qv617	16
<i>E. faecalis</i> Sa115	32	<i>E. faecium</i> Qv618	32
<i>E. faecalis</i> Sa116	16	<i>E. faecalis</i> Qv619	16
<i>E. faecalis</i> Ha203	64	<i>E. faecalis</i> Qv620	16
<i>E. faecalis</i> Ha204	64	<i>E. faecalis</i> Qv621	32
<i>E. faecalis</i> Ha205	64	<i>E. faecalis</i> Qv622	16

^aSa: salami artesanal; Ha: carne picada; Qc: queso de cabra; Qv: queso de vaca

Tabla 24. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **ciprofloxacina** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	16	<i>E. faecalis</i> Ha216	32
<i>E. faecium</i> Sa101	16	<i>E. faecium</i> Lc300	64
<i>E. faecium</i> Sa102	16	<i>E. faecium</i> Qc400	32
<i>E. faecium</i> Sa109	32	<i>E. faecium</i> Qc401	16
<i>E. faecium</i> Sa110	32	<i>E. faecium</i> Qv600	8
<i>E. faecalis</i> Sa113	64	<i>E. faecium</i> Qv617	8
<i>E. faecalis</i> Ha203	16	<i>E. faecium</i> Qv618	16
<i>E. faecalis</i> Ha208	16	<i>E. faecalis</i> Qv619	32
<i>E. faecalis</i> Ha212	32	<i>E. faecalis</i> Qv620	32
<i>E. faecalis</i> Ha213	8	<i>E. faecium</i> Qv624	16
<i>E. faecalis</i> Ha214	8	<i>E. faecalis</i> Qv625	64
<i>E. faecalis</i> Ha215	8		

^aSa: salami artesanal; Ha: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: queso de cabra; Qv: queso de vaca

Tabla 25. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **eritromicina** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	16	<i>E. faecalis</i> Ha214	32
<i>E. faecium</i> Sa101	16	<i>E. faecalis</i> Ha216	32
<i>E. faecium</i> Sa102	64	<i>E. faecalis</i> Ha217	16
<i>E. faecium</i> Sa109	32	<i>E. faecalis</i> Ha218	32
<i>E. faecium</i> Sa110	32	<i>E. faecium</i> Lc300	8
<i>E. faecalis</i> Sa111	32	<i>E. faecium</i> Qc400	8
<i>E. faecalis</i> Sa112	32	<i>E. faecium</i> Qc401	16
<i>E. faecalis</i> Sa113	32	<i>E. faecium</i> Qv600	8
<i>E. faecalis</i> Sa115	16	<i>E. faecium</i> Qv617	8
<i>E. faecalis</i> Sa116	8	<i>E. faecium</i> Qv618	8
<i>E. faecalis</i> Sa118	8	<i>E. faecalis</i> Qv621	8
<i>E. faecalis</i> Ha203	32	<i>E. faecalis</i> Qv625	16
<i>E. faecalis</i> Ha204	32	<i>E. faecium</i> Qv626	8
<i>E. faecalis</i> Ha206	64	<i>E. faecalis</i> Qv627	16
<i>E. faecalis</i> Ha208	64	<i>E. faecalis</i> Qv628	32
<i>E. faecalis</i> Ha209	64	<i>E. gallinarum</i> Qv629	16

^aSa: salami artesanal; Ha: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: queso de cabra; Qv: queso de vaca

Tabla 26. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **cloranfenicol** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecalis</i> Sa111	64	<i>E. faecalis</i> Ha217	32
<i>E. faecalis</i> Sa113	64	<i>E. faecalis</i> Ha219	64
<i>E. faecalis</i> Sa116	64	<i>E. faecalis</i> Ha220	32
<i>E. faecalis</i> Ha208	32	<i>E. faecalis</i> Qv620	64
<i>E. faecalis</i> Ha214	32	<i>E. faecalis</i> Qv630	64
<i>E. faecalis</i> Ha216	32	<i>E. faecalis</i> Qv631	64

^aSa: salami artesanal; Ha: carne picada; Qv: queso de vaca

Tabla 27. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **linezolid** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
--------------------------	-------------------------------	-------------	-------------------------------

<i>E. faecium</i> Sa109	16	<i>E. faecalis</i> Ha215	64
<i>E. faecium</i> Sa110	8	<i>E. faecium</i> Qo516	16
<i>E. faecalis</i> Sa111	64	<i>E. faecium</i> Qo517	8
<i>E. faecalis</i> Sa115	64	<i>E. faecium</i> Qo518	8
<i>E. faecalis</i> Ha207	64	<i>E. faecium</i> Qo519	8
<i>E. faecalis</i> Ha208	32	<i>E. faecalis</i> Qv618	64
<i>E. faecalis</i> Ha210	32	<i>E. faecium</i> Qv620	8

^aSa: salami artesanal; Ha: carne picada; Qo: queso de oveja; Qv: queso de vaca

Tabla 28. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **gentamicina** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	512	<i>E. faecalis</i> Ha224	1024
<i>E. faecium</i> Sa101	512	<i>E. faecalis</i> Ha225	1024
<i>E. faecium</i> Sa102	512	<i>E. faecalis</i> Ha226	512
<i>E. faecalis</i> Sa111	1024	<i>E. faecalis</i> Ha227	1024
<i>E. faecalis</i> Sa113	512	<i>E. faecium</i> Lc300	512
<i>E. faecalis</i> Sa119	1024	<i>E. faecium</i> Qc400	512
<i>E. faecalis</i> Sa120	1024	<i>E. faecium</i> Qc401	512
<i>E. faecalis</i> Ha203	1024	<i>E. faecalis</i> Qc402	512
<i>E. faecalis</i> Ha206	2048	<i>E. faecalis</i> Qo520	512
<i>E. faecalis</i> Ha208	1024	<i>E. faecalis</i> Qo521	512
<i>E. faecalis</i> Ha214	512	<i>E. faecalis</i> Qo522	1024
<i>E. faecalis</i> Ha216	512	<i>E. faecalis</i> Qo523	1024
<i>E. faecalis</i> Ha217	2048	<i>E. faecium</i> Qv600	512
<i>E. faecalis</i> Ha221	2048	<i>E. faecium</i> Qv617	512
<i>E. faecalis</i> Ha222	512	<i>E. faecalis</i> Qv621	512
<i>E. faecalis</i> Ha223	1024	<i>E. faecalis</i> Qv632	512

^aSa: salami artesanal; Ha: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: queso de cabra; Qo: queso de oveja; Qv: queso de vaca

Tabla 29. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **estreptomycin** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	2048	<i>E. faecalis</i> Ha216	2048
<i>E. faecium</i> Sa101	2048	<i>E. faecalis</i> Ha221	2048
<i>E. faecium</i> Sa102	2048	<i>E. faecalis</i> Ha222	2048
<i>E. faecalis</i> Sa111	2048	<i>E. faecalis</i> Ha223	2048
<i>E. faecalis</i> Sa113	2048	<i>E. faecalis</i> Ha224	2048
<i>E. faecalis</i> Sa118	2048	<i>E. faecalis</i> Ha228	2048
<i>E. faecalis</i> Sa119	2048	<i>E. faecalis</i> Ha229	2048
<i>E. faecalis</i> Sa120	2048	<i>E. faecium</i> Lc300	2048
<i>E. faecalis</i> Sa121	2048	<i>E. faecium</i> Qc400	2048
<i>E. faecalis</i> Ha203	2048	<i>E. faecium</i> Qc401	2048
<i>E. faecalis</i> Ha208	2048	<i>E. faecalis</i> Qo524	2048
<i>E. faecalis</i> Ha209	2048	<i>E. faecium</i> Qv600	2048
<i>E. faecalis</i> Ha214	2048	<i>E. faecium</i> Qv617	2048

^aSa: salami artesanal; Ha: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: queso de cabra; Qo: queso de oveja; Qv: queso de vaca

Tabla 30. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **vancomicina** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes o con susceptibilidad intermedia en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	128	<i>E. faecium</i> Qo511	64
<i>E. faecium</i> Sa101	64	<i>E. faecium</i> Qo512	128
<i>E. faecium</i> Sa102	128	<i>E. faecium</i> Qo513	64
<i>E. faecium</i> Sa109	64	<i>E. faecium</i> Qo514	64
<i>E. faecium</i> Sa110	64	<i>E. faecium</i> Qv600	128
<i>E. faecium</i> Ha199	1024	<i>E. faecium</i> Qv601	128
<i>E. faecium</i> Ha200	128	<i>E. faecium</i> Qv604	512
<i>E. faecium</i> Ha201	128	<i>E. faecium</i> Qv605	128
<i>E. faecium</i> Lc300	64	<i>E. faecium</i> Qv611	512
<i>E. faecium</i> Qc400	64	<i>E. faecium</i> Qv616	64
<i>E. faecium</i> Qc401	128	<i>E. faecium</i> Qv617	64
<i>E. faecium</i> Qo500	64	<i>E. faecium</i> Qv618	128
<i>E. faecium</i> Qo503	64	<i>E. gallinarum</i> Qv629	8
<i>E. faecium</i> Qo504	128	<i>E. faecium</i> Qv633	512

<i>E. faecium</i> Qo507	512	<i>E. faecium</i> Qv634	512
<i>E. faecium</i> Qo509	64	<i>E. faecium</i> Qv635	1024

^aSa: salamín artesanal; Ha: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: queso de cabra; Qo: queso de oveja; Qv: queso de vaca

Tabla 31. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para **teicoplanina** en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar.

Aislamiento ^a	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislamiento	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecium</i> Sa100	64	<i>E. faecium</i> Qo511	32
<i>E. faecium</i> Sa101	32	<i>E. faecium</i> Qo512	128
<i>E. faecium</i> Sa102	64	<i>E. faecalis</i> Qo513	64
<i>E. faecium</i> Sa109	32	<i>E. faecalis</i> Qo514	64
<i>E. faecium</i> Sa110	64	<i>E. faecium</i> Qv600	64
<i>E. faecium</i> Ha199	512	<i>E. faecium</i> Qv601	128
<i>E. faecium</i> Ha200	128	<i>E. faecium</i> Qv604	512
<i>E. faecium</i> Ha201	64	<i>E. faecium</i> Qv605	128
<i>E. faecium</i> Lc300	32	<i>E. faecium</i> Qv611	256
<i>E. faecium</i> Qc400	64	<i>E. faecium</i> Qv616	32
<i>E. faecium</i> Qc401	128	<i>E. faecium</i> Qv617	64
<i>E. faecium</i> Qo500	32	<i>E. faecium</i> Qv618	128
<i>E. faecium</i> Qo503	32	<i>E. faecium</i> Qv633	512
<i>E. faecium</i> Qo504	164	<i>E. faecium</i> Qv634	512
<i>E. faecium</i> Qo507	128	<i>E. faecium</i> Qv635	256
<i>E. faecium</i> Qo509	32		

^aSa: salamín artesanal; Ha: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: queso de cabra; Qo: queso de oveja; Qv: queso de vaca

En un aislamiento de *E. faecium* (Sa101) se detectó susceptibilidad al antimicrobiano ampicilina en la prueba de difusión en agar, aunque en la prueba cuantitativa se observó ampicilino-resistencia ($\text{CIM}_{\text{amp}} = 32 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Se detectó susceptibilidad intermedia a vancomicina ($\text{CIM}_{\text{van}} = 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) y susceptibilidad a teicoplanina ($\text{CIM}_{\text{tei}} = 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) en el aislamiento de *E. gallinarum* recuperado de queso de vaca.

Aislamientos con mono-resistencia antimicrobiana

Se detectó resistencia a un antimicrobiano en 32 aislamientos de *E. faecalis*, 23 aislamientos de *E. faecium* y un aislamiento de *E. gallinarum*. Los enterococos mono-resistentes fueron recuperados de alimentos cárnicos (33,9%) y de productos lácteos (66,1%). Los enterococos de origen cárnico se aislaron de carne picada (57,9%) y de salami artesanal (42,1%), mientras que los de origen lácteo provinieron de queso de vaca (54,1%), de queso de oveja (43,2%) y de queso de cabra (2,7%). Los aislamientos mono-resistentes de carne picada ($n = 11$), de salami artesanal ($n = 8$) y de queso de cabra ($n = 1$) fueron caracterizados como *E. faecalis*. Se recuperaron diez aislamientos de *E. faecium* y seis aislamientos de *E. faecalis* resistentes a un antimicrobiano de queso de oveja. Se aislaron 13 *E. faecium*, seis *E. faecalis* y un *E. gallinarum* de queso de vaca que no presentaron resistencia antimicrobiana múltiple.

Se observó únicamente ampicilino-resistencia en 11 aislamientos de *E. faecium* (queso de vaca), seis aislamientos de *E. faecium* (queso de oveja), seis aislamientos de *E. faecalis* (salami artesanal) y un aislamiento de *E. faecalis* de queso de oveja. No se detectó resistencia conjunta en *E. faecalis* de salami (1/3), de carne picada (1/3) y de queso de vaca (1/3) resistentes a tetraciclina. Se recuperaron enterococos que expresaron exclusivamente resistencia a ciprofloxacina (3/23): *E. faecalis* de carne picada (2/3) y un aislamiento de *E. faecium* de queso de vaca. En cinco enterococos caracterizados previamente como *E. faecalis* recuperados de carne picada (1/5), *E. faecalis* (2/5) de queso de vaca, *E. faecium* (1/5) de queso de vaca y *E. gallinarum* (1/5) aislado de queso de vaca se detectó solo resistencia a eritromicina. *E. faecalis* de carne picada (2/4) y de queso de vaca (2/4) presentaron únicamente resistencia a cloranfenicol. La totalidad de los aislamientos de *E. faecium* resistentes a linezolid, provenientes de queso de oveja (4/4), no expresó resistencia a otros antimicrobianos. Nueve aislamientos con ANRG no expresaron resistencia simultánea a otros agentes: *E. faecalis* de queso de oveja (4/9), de carne picada (3/9), de queso de cabra (1/9) y de queso de vaca (1/9). En dos aislamientos de *E.*

faecalis de carne picada, un aislamiento de *E. faecalis* de queso de oveja y un aislamiento de *E. faecalis* de salami artesanal se observó exclusivamente ANRE.

No se observaron diferencias significativas entre la presencia de aislamientos con fenotipo de resistencia a un antimicrobiano y asociación de resistencia en los aislamientos de los diferentes productos cárnicos y lácteos ($p > 0,05$).

Detección de resistencia simultánea a dos o más antimicrobianos

Se observó resistencia simultánea en un rango de dos a ocho antimicrobianos en **58** (23,0%) aislamientos de enterococos. Se detectó resistencia antimicrobiana múltiple en *E. faecalis* (27/58) y *E. faecium* (31/58) de productos cárnicos (53,4%) y lácteos (46,6%). La distribución de enterococos multi-resistentes de acuerdo al tipo de producto animal fue la siguiente: salami artesanal, ocho aislamientos de *E. faecalis* y cinco de *E. faecium*; carne picada: 15 aislamientos de *E. faecalis* y tres de *E. faecium*; queso de cabra, dos aislamientos de *E. faecium*; leche de cabra. Un aislamiento de *E. faecium*; queso de oveja, nueve aislamientos de *E. faecium*; queso de vaca, cuatro aislamientos de *E. faecalis* y 11 aislamientos de *E. faecium*.

El fenotipo de resistencia conjunta a diferentes antimicrobianos predominante fue ampicilina-vancomicina-teicoplanina ($p < 0,01$).

En la Tabla 32 se observan los aislamientos de *Enterococcus* spp. provenientes de alimentos de origen animal que presentaron resistencia conjunta a dos o más antimicrobianos.

Tabla 32. Aislamientos de *Enterococcus* spp. con resistencia conjunta a dos o más antimicrobianos de acuerdo al tipo de alimento de origen animal.

Especie	Origen	Número de antimicrobianos							Total
		2	3	4	5	6	7	8	
<i>E. faecalis</i>	Cárnico	12	5	0	3	2	1	0	23
	Lácteo	2	1	1	0	0	0	0	4
<i>E. faecium</i>	Cárnico	0	3	0	0	2	0	3	8

Lácteo	3	14	0	0	2	1	3	23
Total	17	23	1	3	6	2	6	58

Se detectó resistencia a **dos** antimicrobianos (17/58) en aislamientos de *E. faecalis* de productos cárnicos (12/15) y lácteos (2/15) y en aislamientos de *E. faecium* de origen lácteo (3/15).

Se observó resistencia a **tres** antimicrobianos (23/58) en aislamientos de *E. faecium* de productos lácteos (14/22), *E. faecium* recuperados de alimentos cárnicos (3/22) y en *E. faecalis* aislados de alimentos cárnicos (5/22) y lácteos (1/22).

Se expresó resistencia a **cuatro** antimicrobianos (1/58) en *E. faecalis* de origen lácteo. No se observó este perfil de resistencia en *E. faecalis* de origen cárnico o en *E. faecium* de ningún tipo de alimento.

Se aislaron *E. faecalis* (3/58) de alimentos cárnicos resistentes en forma conjunta a **cinco** antimicrobianos. No se observó este patrón en *E. faecalis* lácteos o en *E. faecium* recuperados de alimentos de origen animal.

Se detectó resistencia a **seis** antimicrobianos en *E. faecium* cárnicos (2/58), *E. faecium* lácteos (1/58) y *E. faecalis* cárnicos (2/58). No se observó este patrón en *E. faecalis* de alimentos lácteos.

Un aislamiento de *E. faecium* lácteo y un aislamiento *E. faecalis* de origen cárnico presentaron resistencia a **siete** antimicrobianos. No se detectó este patrón de resistencia en *E. faecium* de origen cárnico o en *E. faecalis* de origen lácteo.

Se recuperaron seis aislamientos de *E. faecium* de productos cárnicos y lácteos resistentes a **ocho** antimicrobianos.

En la Tabla 33 se muestran los perfiles de resistencia a **dos** antimicrobianos en enterococos aislados de alimentos de origen animal.

Tabla 33. Perfiles de resistencia a dos antimicrobianos en aislamientos de enterococos de alimentos de origen animal.

Especie	Origen	Perfil de resistencia antimicrobiana ^a							
		GEN-STR	TET-ERY	ERY-STR	ERY-CIP	TET-LZD	CIP-LZD	VAN-TEI	TET-CIP
<i>E. faecalis</i> (n:14)	Sa ^b	2	1	1	0	0	0	0	0
	Cp	4	1	0	0	2	1	0	0
	Lc	0	0	0	0	0	0	0	0
	Qc	0	0	0	0	0	0	0	0
	Qo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Qv	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>E. faecium</i> (n: 3)	Sa	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cp	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lc	0	0	0	0	0	0	0	0
	Qc	0	0	0	0	0	0	0	0
	Qo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Qv	0	0	0	0	0	0	3	0
Total		6	2	1	1	2	1	3	1

^aTET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; ERY: eritromicina; LZD: linezolid; GEN: gentamicina; STR: estreptomicina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina. ^bSa: salami artesanal; Cp: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: Queso de cabra; Qo: queso de oveja, Qv: queso de vaca.

Se observaron ocho perfiles de resistencia a dos antimicrobianos en *E. faecalis* provenientes de carne picada (8/17), salami (4/17), queso de vaca (2/17) y *E. faecium* de queso de vaca (3/17).

Se observó ANRG y ANRE en seis *E. faecalis*, cuatro en carne picada y dos en salami. No se detectó esta combinación en *E. faecalis* lácteos.

Se detectó resistencia conjunta a tetraciclina y a eritromicina en dos *E. faecalis*, uno en salami y uno en carne picada. No se expresó este perfil en *E. faecalis* de origen lácteo.

Se observó resistencia a eritromicina y ANRE en un aislamiento de *E. faecalis* de salami artesanal.

Un aislamiento de *E. faecalis* de queso de vaca expresó resistencia conjunta a eritromicina y a ciprofloxacina. No se recuperaron otros aislamientos con este perfil de resistencia antimicrobiana.

Se detectó resistencia simultánea a tetraciclina y a linezolid en un *E. faecalis* aislado de carne picada. No se aislaron *E. faecalis* resistentes a estos antimicrobianos en salami o productos lácteos.

En un aislamiento de *E. faecalis* de carne picada se observó la expresión de resistencia simultánea a ciprofloxacina y a linezolid.

Se recuperaron tres *E. faecium* de queso de vaca resistentes a vancomicina y a teicoplanina que no presentaron resistencia conjunta a antimicrobianos no glucopéptidos.

Se observó resistencia simultánea a tetraciclina y a ciprofloxacina en un aislamiento de *E. faecalis* de queso de vaca.

En la Tabla 34 se muestran los perfiles de resistencia a **tres** antimicrobianos en enterococos aislados de alimentos de origen animal.

Tabla 34. Perfiles de resistencia a tres antimicrobianos en aislamientos de enterococos de alimentos de origen animal.

Especie	Origen	Perfil de resistencia antimicrobiana ^a					
		TET-GEN-ERY	TET-LZD-ERY	TET-ERY-STR	TET-ERY-CMP	GEN-ERY-CMP	AMP-VAN-TEI
<i>E. faecalis</i>	Sa ^b	0	1	0	1	0	0
	Cp	1	0	1	0	1	0
	Lc	0g	0	0	0	0	0
	Qc	0	0	0	0	0	0
	Qo	0	0	0	0	0	0
	Qv	1	0	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	Sa	0	0	0	0	0	0
	Cp	0	0	0	0	0	3
	Lc	0	0	0	0	0	0
	Qc	0	0	0	0	0	0
	Qo	0	0	0	0	0	9
	Qv	0	0	0	0	0	5
Total		2	1	1	1	1	17

^aTET: tetraciclina; GEN: gentamicina; ERY: eritromicina; LZD: linezolid; CMP: cloranfenicol; VAN: vancomicina, TEI: teicoplanina; AMP: ampicilina. ^bSa: salami artesanal; Cp: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: Queso de cabra; Qo: queso de oveja, Qv: queso de vaca.

Se detectaron seis perfiles de resistencia a tres antimicrobianos en 17 *E. faecium* y en seis *E. faecalis* de productos cárnicos y lácteos.

Se observó resistencia a tetraciclina, eritromicina y ANRG en un aislamiento de *E. faecalis* de queso de vaca (1/23). No se detectó este perfil de resistencia

antimicrobiana en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de otros alimentos lácteos o de productos cárnicos.

Dos *E. faecalis*: recuperados de salami artesanal expresaron resistencia simultánea a tres antimicrobianos: uno presentó resistencia a tetraciclina-linezolid-eritromicina y otro a tetraciclina-eritromicina-cloranfenicol. Estos fenotipos de resistencia conjunta no se observaron en enterococos recuperados de carne picada o de productos lácteos.

En un aislamiento de *E. faecalis* de queso de vaca se observó resistencia a tetraciclina, eritromicina y ANRE.

En 17 aislamientos de *E. faecium* se detectó resistencia a vancomicina, teicoplanina y ampicilino-resistencia: nueve de queso de oveja, cinco de queso de vaca y tres de carne picada.

En un aislamiento de *E. faecalis* de origen cárnico se detectó en forma conjunta resistencia a eritromicina, cloranfenicol y ANRG.

En enterococos recuperados de productos de origen animal se detectó resistencia simultánea a **cuatro** antimicrobianos. En un aislamiento de *E. faecalis* de queso de vaca se detectó resistencia a tetraciclina, linezolid, cloranfenicol y a ciprofloxacina.

En enterococos aislados de productos cárnicos se observó la expresión de resistencia a **cinco** antimicrobianos (Tabla 35).

Tabla 35. Resistencia a cinco antimicrobianos en *E. faecalis* recuperados de alimentos de origen animal.

Especie	Origen	GEN-STR-ERY-CIP-CMP	GEN-STR-ERY-CIP-TET
<i>E. faecalis</i> (n:3)	Sa ^b	0	0
	Cp	2	1
	Lc	0	0
	Qc	0	0
	Qo	0	0
	Qv	0	0
Total		2	1

^aGEN: gentamicina; STR: estreptomina; ERY: eritromicina; CIP: ciprofloxacina; CMP: cloranfenicol; VAN: vancomicina; TEL: teicoplanina; TET: tetraciclina. ^bSa: salami artesanal; Cp: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: Queso de cabra; Qo: queso de oveja, Qv: queso de vaca.

En dos aislamientos provenientes de carne picada se observó ANRG y ANRE junto con resistencia a eritromicina, ciprofloxacina y cloranfenicol. En un aislamiento de *E. faecalis* se observó resistencia a eritromicina, ciprofloxacina y a tetraciclina en simultáneo con ANRG y ANRE.

Se detectó resistencia conjunta a **seis** antimicrobianos en aislamientos de *Enterococcus* spp. de productos cárnicos y lácteos (Tabla 36).

Tabla 36. Perfiles de resistencia a seis antimicrobianos en aislamientos de enterococos de alimentos de origen animal.

Especie	Origen	Perfil de resistencia antimicrobiana ^a			
		CIP-ERY-TET- -LZD-VAN-TEI	GEN-STR-ERY- -TET-CMP-LZD	GEN-STR-ERY- -CIP-TET-CMP	ERY-CIP-GEN- -STR--VAN-TEI
<i>E. faecalis</i> (n:2)	Sa ^b	0	1	1	0
	Cp	0	0	0	0
	Lc	0	0	0	0
	Qc	0	0	0	0
	Qo	0	0	0	0
	Qv	0	0	0	0
<i>E. faecium</i> (n:4)	Sa	2	0	0	0
	Cp	0	0	0	0
	Lc	0	0	0	1
	Qc	0	0	0	0
	Qo	0	0	0	0
	Qv	1	0	0	0
Total		3	1	1	1

^aCIP: ciprofloxacina ; ERY: eritromicina; TET: tetraciclina; LZD: linezolid; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina; GEN: gentamicina; STR: estreptomicina; CMP: cloranfenicol. ^bSa: salamín artesanal; Cp: carne picada; Lc: leche de cabra; Qc: Queso de cabra; Qo: queso de oveja, Qv: queso de vaca.

Se aislaron dos *E. faecium* de salamín artesanal y uno de queso de vaca resistentes a glucopéptidos con resistencia simultánea a ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina y a linezolid. Un *E. faecium* recuperado de leche de cabra expresó resistencia a glucopéptidos, eritromicina, ciprofloxacina, ANRG y ANRE.

En dos aislamientos de *E. faecalis* de salamín artesanal se observó ANRG y ANRE. En uno de ellos se detectó además resistencia conjunta a eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina y a linezolid, mientras que el otro aislamiento presentó resistencia simultánea a eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y cloranfenicol.

Dos aislamientos expresaron resistencia conjunta a **siete** antimicrobianos. Un *E. faecalis* aislado de carne picada presentó resistencia a tetraciclina, eritromicina,

ciprofloxacina, cloranfenicol y linezolid junto con ANRG y ANRE. En un aislamiento de *E. faecium* recuperado de queso de vaca se detectó resistencia a vancomicina y a teicoplanina junto con resistencia a tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, ANRG y ANRE.

Se observó resistencia a **ocho** antimicrobianos en tres *E. faecium* recuperados de salami artesanal, dos de queso de cabra y uno de queso de vaca. La totalidad de los aislamientos presentó ANRG y ANRE con resistencia simultánea a eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, vancomicina, teicoplanina y ampicilino-resistencia.

Expresión conjunta de resistencia antimicrobiana y factores de virulencia

Se detectó la expresión simultánea de factores de virulencia y de resistencia a los antimicrobianos en $n=32$ (12,7%) enterococos recuperados de alimentos de origen animal, 26 *E. faecalis* (10,3%) y seis *E. faecium* (2,4%). No se observó correlación entre la presencia de factores de virulencia y la ocurrencia de resistencia a los antimicrobianos en los aislamientos de los productos analizados.

En la Tabla 37 se observa la distribución de los aislamientos que expresaron en forma simultánea factores de virulencia y resistencia antimicrobiana, de acuerdo al tipo de alimento.

Tabla 37. Distribución de aislamientos de *Enterococcus* spp. de alimentos de origen animal con expresión simultánea de factores de virulencia y de resistencia antimicrobiana.

Especie	Salamín (%)	Carne picada (%)	Queso de oveja (%)	Queso de vaca (%)	Total (%)
<i>E. faecalis</i>	8(100)	10(90,9)	6(75)	2 (40)	26(81,2)
<i>E. faecium</i>	0	1(9,1)	2(25)	3 (60)	6(18,8)
Total	8	11	8	5	32

La expresión simultánea de factores de virulencia y de resistencia antimicrobiana fue mayor en alimentos cárnicos (59,4%) que en los lácteos (40,6%). Los aislamientos provinieron de carne picada (11/32), salami (8/32), queso de oveja

(8/32) y queso de vaca (5/32). No se detectó expresión conjunta en enterococos de leche de cabra y queso de cabra.

La mayor prevalencia de enterococos respecto a la expresión simultánea varió de acuerdo al tipo de alimento y la especie aislada. Los aislamientos de *E. faecalis* fueron recuperados de carne picada (11/26), de salami (8/26), queso de oveja (6/26) y queso de vaca (2/26). En cambio, se aislaron *E. faecium* de queso de vaca (3/6), queso de oveja (2/6) y de carne picada (1/6).

En la Tabla 38 se muestran los fenotipos de resistencia antimicrobiana-factores de virulencia expresados por *E. faecalis* y *E. faecium* de alimentos de origen animal.

Tabla 38. Fenotipos de virulencia y resistencia antimicrobiana de aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium* recuperados de productos cárnicos y lácteos.

Aislamiento	Origen	Fenotipo ^a
<i>E. faecalis</i> Sa103	Salami	Hem-AMP
<i>E. faecalis</i> Sa105	Salami	Hem-AMP
<i>E. faecium</i> Qv609	Queso de vaca	Hem-AMP
<i>E. faecalis</i> Ha203	Carne picada	Hem-TET-GEN-ERY-CIP-STR
<i>E. faecalis</i> Sa111	Salami	Hem-TET-CMP-GEN-LZD-ERY-STR
<i>E. faecalis</i> Qo520	Queso de oveja	Gel-GEN
<i>E. faecalis</i> Qo523	Queso de oveja	Gel-GEN
<i>E. faecalis</i> Qo524	Queso de oveja	Gel-STR
<i>E. faecalis</i> Sa106	Salami	Gel-AMP
<i>E. faecium</i> Qv601	Queso de vaca	Gel-AMP-VAN-TEI
<i>E. faecalis</i> Ha209	Carne picada	Gel-TET-ERY-STR
<i>E. faecalis</i> Ha216	Carne picada	Gel-CMP-GEN-ERY-CIP-STR
<i>E. faecalis</i> Ha208	Carne picada	Gel-TET-CMP-GEN-LZD-ERY-CIP-STR
<i>E. faecalis</i> Sa104	Salami	SA-AMP
<i>E. faecalis</i> Qo521	Queso de oveja	SA-GEN
<i>E. faecalis</i> Qo522	Queso de oveja	SA-GEN
<i>E. faecalis</i> Ha207	Carne picada	SA-TET-LZD
<i>E. faecalis</i> Ha210	Carne picada	SA-TET-LZD
<i>E. faecalis</i> Sa107	Salami	Gel-Hem-AMP
<i>E. faecium</i> Qo507	Queso de oveja	SA-AMP-VAN-TEI
<i>E. faecium</i> Qo513	Queso de oveja	SA-AMP-VAN-TEI
<i>E. faecalis</i> Qv627	Queso de vaca	Gel-SA-ERY
<i>E. faecalis</i> Ha204	Carne picada	Gel-SA-TET-ERY

<i>E. faecium</i> Qv616	Queso de vaca	Gel-SA-AMP-VAN-TEI
<i>E. faecium</i> Ha200	Carne picada	Gel-SA-AMP-VAN-TEI
<i>E. faecalis</i> Ha217	Carne picada	Gel-SA-ERY-CMP-GEN
<i>E. faecalis</i> Qv620	Queso de vaca	Gel-SA-TET-CMP-LZD-CIP
<i>E. faecalis</i> Sa108	Salamín	Hem-SA-AMP
<i>E. faecalis</i> Qo515	Queso de oveja	Hem-SA-AMP
<i>E. faecalis</i> Ha206	Carne picada	Gel-Hem-SA-TET-GEN-ERY
<i>E. faecalis</i> Ha214	Carne picada	Gel-Hem-SA-CMP-GEN-ERY-CIP-STR
<i>E. faecalis</i> Sa113	Salamín	Gel-Hem-SA-TET-CMP-GEN-ERY-CIP-STR

^aHem: hemolisina; SA: sustancia agregativa; Gel: gelatinasa; AMP: ampicilina; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina; ERY: eritromicina; TET: tetraciclina; LZD: linezolid; CMP: cloranfenicol; MN: minocilina; GEN: gentamicina; STR: estreptomina; CIP: ciprofloxacina;

Se detectaron 24 fenotipos de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en forma conjunta. Los más frecuentes fueron hemolisina-ampicilina en dos aislamientos de *E. faecalis* de salamín y un aislamiento de *E. faecium* de queso de vaca; gelatinasa-ANRG en dos aislamientos de *E. faecalis* de queso de oveja; Sustancia Agregativa-ANRG en *E. faecalis* de queso de oveja (2/2); Sustancia Agregativa-tetraciclina-linezolid en *E. faecalis* de carne picada (2/2); Sustancia Agregativa-ampicilina-vancomicina-teicoplanina en *E. faecium* de queso de oveja (2/3); gelatinasa-Sustancia Agregativa-ampicilina-vancomicina-teicoplanina en un aislamiento de *E. faecium* de carne picada y un aislamiento de *E. faecium* de queso de vaca; hemolisina-Sustancia Agregativa-ampicilina en un aislamiento de *E. faecalis*, de salamín y un aislamiento de *E. faecalis* de queso de oveja.

Los antimicrobianos expresados en forma simultánea con factores de virulencia por los aislamientos de enterococos en orden decreciente fueron: ampicilina (12/32), ANRG (12/32), tetraciclina (10/32), eritromicina (10/32), ANRE (7/32), ciprofloxacina (6/32), vancomicina (5/32), teicoplanina (5/32), cloranfenicol (5/32) y linezolid (5/32).

La expresión conjunta de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana resultó ser en orden decreciente la siguiente: gelatinasa (8/32), Sustancia Agregativa (7/32), gelatinasa-Sustancia Agregativa (6/32), hemolisina (5/32), gelatinasa-

hemolisina-Sustancia Agregativa (3/32), hemolisina-Sustancia Agregativa (2/32), gelatinasa-hemolisina (1/32).

Se observó la expresión simultánea de factores de virulencia en cinco aislamientos de EVR. En 5/5 se observó resistencia conjunta al antimicrobiano ampicilina. En dos aislamientos de *E. faecium* de queso de oveja se detectó la producción de Sustancia Agregativa. En un aislamiento de *E. faecium* de carne picada y uno de queso de vaca se observó la expresión de gelatinasa y Sustancia Agregativa. Un aislamiento de *E. faecium* resistente a vancomicina de queso de oveja fue gelatinasa-positivo.

Se observó en seis *E. faecalis* ampicilino-resistentes recuperados de salami la presencia de hemolisina en dos de ellos, mientras que en los cuatro restantes se detectó en uno Sustancia Agregativa, en otro solo gelatinasa, en otro solo gelatinasa-hemolisina y en otro solo hemolisina-Sustancia Agregativa. En un aislamiento de *E. faecium* resistente a ampicilina de queso de vaca se observó la producción de hemolisina.

En seis aislamientos de *E. faecalis* con ANRG y ANRE recuperados de carne picada y de salami se detectó hemolisina en dos de ellos, mientras que en otros dos se detectó gelatinasa y hemolisina-gelatinasa-Sustancia Agregativa en los dos restantes. La expresión conjunta de ANRG y factores de virulencia se detectó en seis aislamientos de *Enterococcus* spp. En dos *E. faecalis* de queso de oveja se observó junto con gelatinasa y en dos junto con Sustancia Agregativa, mientras que en *E. faecalis* de carne picada se detectó uno junto con gelatinasa y otro con gelatinasa-hemolisina-Sustancia Agregativa. Se observó la producción de gelatinasa en un *E. faecalis* de queso de oveja y en uno de carne picada asociada con ANRE.

En dos *E. faecalis* resistentes a linezolid de carne picada se observó la producción de Sustancia Agregativa. En un *E. faecalis* recuperado de queso de vaca se detectó la expresión simultánea de gelatinasa y de resistencia a

linezolid. Un *E. faecalis* de carne picada y uno de queso de vaca presentaron resistencia a eritromicina con producción de gelatinasa y de Sustancia Agregativa.

4. OBJETIVO 4

Detectar los fenotipos de resistencia a glucopéptidos en las cepas recuperadas

4.1. Detección *in vitro* de resistencia intrínseca a vancomicina

Se investigó la expresión fenotípica de resistencia intrínseca a vancomicina. Se detectó desarrollo bacteriano en un *E. gallinarum* recuperado de leche de cabra. No se observó desarrollo en el resto de los aislamientos de enterococos.

4.2. Categorización de fenotipos de resistencia a glucopéptidos

De acuerdo a los resultados de la prueba de difusión en agar y de la determinación de la CIM se realizó la categorización de los fenotipos de resistencia a glucopéptidos expresados por los aislamientos de *Enterococcus* spp. recuperados de alimentos artesanales de origen animal (Tabla 39).

Tabla 39. Fenotipos de resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus* spp. aislados de alimentos artesanales de origen animal.

Especie	VanA	VanB	VanC	Total
<i>E. faecium</i>	31	0	0	31
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	1	1
<i>E. avium</i>	0	0	0	0
<i>E. durans</i>	0	0	0	0
<i>E. hirae</i>	0	0	0	0
<i>E. raffinosus</i>	0	0	0	0
Total	31	0	1	32

Se detectó resistencia adquirida a glucopéptidos en $n = 31$ (12,3%) enterococos recuperados de productos lácteos (23) y cárnicos (8). En cambio, se observó susceptibilidad intermedia en **1** (0,4%) enterococo, correspondiendo al aislamiento de *E. gallinarum* de origen lácteo.

En 31 aislamientos de *E. faecium* de queso de vaca (11/31), queso de oveja (9/31), salami (5/31), carne picada (3/31), queso de cabra (2/31), leche de cabra (1/31), se observaron en la prueba de difusión en agar halos de inhibición < 14 mm para vancomicina y < 10 mm para teicoplanina, acompañado por CIM_{van} : 64-1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y por CIM_{tei} : 32-512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La totalidad de los aislamientos de *E. faecium* resistentes a glucopéptidos expresó el fenotipo VanA. No se recuperaron aislamientos con nivel variable de resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina (fenotipo VanB).

En un aislamiento de *E. gallinarum* se observaron en la prueba de difusión en agar halos de inhibición que indicaron la expresión de susceptibilidad intermedia a vancomicina (15 mm) y sensibilidad a teicoplanina (18 mm). Se determinaron una CIM_{van} : 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y CIM_{tei} : 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados determinaron que el aislamiento fuera categorizado como fenotipo VanC.

DISCUSIÓN

Los estudios realizados, en el marco de la presente tesis doctoral, tuvieron la finalidad de iniciar la caracterización fenotípica y determinar el perfil de resistencia antimicrobiana *in vitro* de aislamientos de *Enterococcus* spp., recuperados de alimentos de origen animal; en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Para esta investigación se seleccionaron seis productos cárnicos y lácteos considerados como prototípicos de la elaboración de alimentos en la región estudiada: carne picada, salamines artesanales, leche de cabra, queso de cabra artesanal, queso de oveja artesanal y queso de vaca artesanal. Para el análisis de alimentos se realizaron, durante el período del estudio, seis series de tomas de muestra. Sin embargo, en determinados alimentos no fue posible obtener piezas en todas las series, debido a que su elaboración y comercialización no se realizan a lo largo de todo el año. La disponibilidad de muestras fue un factor que influyó en las diferencias cuantitativas observadas entre los distintos alimentos de origen animal estudiados, como sucedió con la leche de cabra, queso de cabra y queso de oveja. En cambio, esta restricción estacional no fue observada para carne picada, salami artesanal y queso de vaca.

En una primera etapa se estandarizaron e implementaron protocolos para la recuperación seguida de la caracterización fenotípica a nivel de especie de aislamientos de *Enterococcus* spp. Para realizar la recuperación bacteriana, se utilizaron protocolos específicos considerando las variabilidades inherentes derivadas de las distintas matrices que componen a cada tipo de producto analizado. En los alimentos de consistencia sólida o semi-sólida se efectuó un paso de disgregación mecánica para lograr la homogeneización del producto. En el único tipo de producto en que se realizó el procesamiento directo fue con el alimento líquido (leche de cabra). El agregado de un agente tensioactivo (Tween 80) demostró contribuir a un mejor procesamiento de las muestras que presentaban un tenor graso medio o alto al favorecer la disolución del material graso.

Para la caracterización fenotípica de enterococos a nivel de especie el procedimiento utilizado tradicionalmente comprende la biotipificación. En esta investigación para la fenotipificación de enterococos también se realizó el análisis de perfiles de proteínas totales mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Entre las ventajas metodológicas de la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida podemos destacar que cada especie del género *Enterococcus* posee un patrón de bandas proteicas que le es específico. Por lo tanto permite la caracterización y diferenciación de especies de enterococos que normalmente son difíciles de distinguir con las pruebas fenotípicas tradicionales. Asimismo, los resultados pueden obtenerse más rápidamente que con algunas pruebas bioquímicas.

Al realizar e interpretar las determinaciones de los rasgos fisiológicos evaluados es necesario tener en cuenta la variabilidad vinculada con el ambiente en el que se encuentran los enterococos, pues un aislamiento de origen humano no está expuesto a los mismos elementos o componentes favorables o adversos que integran el nicho ecológico de los enterococos presentes en un derivado cárnico o lácteo. Estas discrepancias ambientales pueden traducirse en diferencias concernientes a la detección fenotípica de características bioquímicas que asimismo es posible extrapolar a la expresión de factores de virulencia y/o resistencia antimicrobiana.

En esta investigación se aislaron enterococos de productos cárnicos y lácteos que fueron caracterizados fenotípicamente en los cuales se observó una correspondencia entre las pruebas bioquímicas convencionales y los perfiles de proteínas totales específicos de *E. faecalis* y de *E. faecium* obtenidos mediante SDS-PAGE. Estos resultados son alentadores en cuanto a la implementación de esta metodología para la identificación de enterococos recuperados de alimentos de origen animal.

Esta metodología fue propuesta para la caracterización de enterococos provenientes de alimentos de origen animal como parte de una estrategia polifásica en la que se combinan pruebas bioquímicas convencionales, el análisis

de perfiles proteicos y técnicas de Biología Molecular. En una investigación sobre esta estrategia se observó que era posible lograr una identificación confiable de enterococos de origen lácteo recurriendo al análisis de proteínas celulares totales. Asimismo, se identificó un porcentaje considerable de enterococos (89%) mediante la combinación secuencial del estudio de los perfiles proteicos seguido por una metodología basada en el análisis del material genético de las bacterias (Alves *et al.* 2004).

En la presente investigación se recuperaron enterococos en el 11,1% de las muestras obtenidas de productos de origen animal. Otros autores han comunicado mayores porcentajes de recuperación de enterococos en alimentos producidos fuera de Argentina. En un estudio realizado con quesos elaborados en Francia se recuperaron enterococos en al menos la mitad de las muestras analizadas. En cambio, se observó una frecuencia de aislamiento de enterococos del 67,5% en carnes y productos cárnicos fermentados elaborados en Canadá (Jamet *et al.* 2012, Jahan *et al.* 2013).

En esta investigación el aislamiento de enterococos fue mayor en alimentos de origen cárnico (64,7%) que en los de origen lácteo (35,3%). En otros estudios realizados con alimentos de origen animal se han observado variaciones tanto en la preponderancia de aislamientos de enterococos a partir de muestras de origen lácteo y cárnico como en la prevalencia de recuperación. Al analizar la presencia de enterococos en alimentos elaborados en Brasil, se observó también un mayor aislamiento de enterococos de productos cárnicos en comparación con alimentos lácteos. Los autores comunicaron que la recuperación fue del 100% en muestras cárnicas y del 72% en muestras lácteas (Fracalanza *et al.* 2007). La prevalencia de recuperación a partir de muestras lácteas fue mayor a la detectada en esta tesis. En cambio, en un trabajo sobre alimentos de origen lácteo y cárnico elaborados en España se recuperaron mayoritariamente enterococos de muestras lácteas. La recuperación en alimentos lácteos fue superior a la de este estudio (84%), aunque los enterococos cárnicos fueron aislados con menor frecuencia (16%) respecto de la presente investigación (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

En esta tesis se observó una positividad distinta entre los productos de origen cárnico y entre aquellos de origen lácteo. La recuperación de enterococos de muestras de carne picada fue mayor respecto de las de salamines artesanales. Dentro de los alimentos lácteos se registró una preponderancia de muestras positivas para enterococos en queso de vaca, seguidas por las de queso de oveja con una similar detección en muestras de leche y queso de cabra. Se recuperaron y caracterizaron fenotípicamente 252 aislamientos de enterococos provenientes de alimentos de origen animal en el área bajo estudio. La especies más frecuentemente aisladas fueron *E. faecalis* (65,5%) y *E. faecium* (32,1%), coincidiendo en prevalencia con las especies recuperadas tanto en muestras clínicas como en animales de cría y alimentos de origen animal.

En Estados Unidos los enterococos son considerados como la segunda causa de infecciones urinaria, bacteriemias asociadas a catéteres e infecciones de piel y partes blandas. Durante el período 1970-1990 el mayor porcentaje de las infecciones enterocócicas fue causado por *E. faecalis*. En la actualidad *E. faecium* y *E. faecalis* presentan una frecuencia similar como agentes de infecciones asociadas al cuidado de la salud (Arias & Murray 2012).

En un estudio epidemiológico multi-céntrico realizado sobre cepas de enterococos productoras de infecciones en países de América del Sur (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) se observó una mayor prevalencia de *E. faecalis* (77,4%) seguido por *E. faecium* (15,4%) y una menor frecuencia (7,2%) de otras especies de enterococos (Panesso *et al.* 2010). En una investigación multi-céntrica realizada en Brasil se concluyó que las especies más frecuentes eran *E. faecalis* (82,9%) y *E. faecium* (13,5%). El género *Enterococcus* ocupaba el tercer lugar entre las bacterias Gram positivas como agente de infecciones en sangre, mientras que *E. faecalis* fue el séptimo productor de infecciones de piel y partes blandas (Gales *et al.* 2009). En Argentina las especies de enterococos más prevalentes en el ámbito sanitario son las mismas que en otros países de América del Norte y América del Sur. En un estudio realizado sobre aislamientos de *Enterococcus* spp. causantes de cuadros clínicos se detectó un predominio de *E.*

faecalis (82,6%) y de *E. faecium* (7,6%) frente a otras especies del género (Toledo *et al.* 2004).

La presencia del género *Enterococcus* se ha investigado en animales destinados a la producción de alimentos. En un estudio realizado en Lituania se recuperaron principalmente *E. faecalis* (47,6%) y *E. faecium* (38,1%) a partir de cerdos, pollos y ganado bovino (Ruzauskas *et al.* 2009). En Estados Unidos al determinar la presencia de *Enterococcus* spp. en animales de granja se observó que las especies más prevalentes fueron *E. faecalis* (53%) y *E. faecium* (31%), recuperadas de muestras ambientales (Hayes *et al.* 2004).

En los alimentos de origen animal analizados en esta tesis se observó un predominio divergente de *E. faecalis* y *E. faecium*. En alimentos cárnicos predominó *E. faecalis* mientras que en productos lácteos la especie más prevalente fue *E. faecium*. Otros autores comunicaron que *E. faecalis* fue la especie más frecuentemente recuperada en pollos (50,8%) y leche de vaca pasteurizada (77,9%) comercializados en Brasil (Fracalanza *et al.* 2007). En cambio, en quesos elaborados en Europa se observó que la especie más prevalente era *E. faecium* y en tercer lugar se encontraba *E. faecalis*, representando en conjunto el 70,8% de los enterococos aislados (Jurkovic *et al.* 2006). El predominio de *E. faecium* (64%) sobre *E. faecalis* (36%) fue detectado en un estudio sobre enterococos en alimentos de origen animal elaborados artesanalmente en España (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

En la presente tesis se caracterizaron fenotípicamente aislamientos de especies de enterococos poco frecuentes en muestras clínicas o de alimentos de origen animal, tales como *E. raffinosus* (0,8%), *E. avium* (0,4%), *E. durans* (0,4%), *E. gallinarum* (0,4%) y *E. hirae* (0,4%).

En un estudio realizado en India durante un período de dos años sobre la prevalencia de especies poco frecuentes de enterococos en muestras clínicas se recuperaron especies distintas a *E. faecalis* y a *E. faecium*. Entre los aislamientos caracterizados fenotípicamente se encontraban *E. gallinarum* (6,2%), *E. avium*

(4,1%), *E. raffinosus* (2,5%), *E. hirae* (2,5%) y *E. durans* (0,8%). La tipificación se realizó utilizando pruebas bioquímicas convencionales y el perfil de proteínas totales (Prakash *et al.* 2005).

En Argentina, son escasas las comunicaciones sobre enterococos poco usuales. En una investigación sobre la prevalencia de enterococos como agentes de infecciones en pacientes ambulatorios y hospitalizados se recuperaron aislamientos de *E. raffinosus* y *E. avium* (Toledo *et al.* 2004). Asimismo, en 2003 se logró documentar el primer caso de bacteriemia causada por *E. gallinarum*, con expresión de alto nivel de resistencia antimicrobiana (Togneri *et al.* 2003).

En esta investigación los aislamientos inusuales de enterococos fueron recuperados en productos lácteos y no se observó su presencia en alimentos cárnicos. Estudios previos han detectado la presencia de algunas de estas especies de enterococos poco frecuentes, en animales destinados a la producción agropecuaria y en productos de origen animal, principalmente de origen cárnico. Se detectó la presencia de *E. hirae* en materia prima cárnica estudiada en Lituania (17,2%). Las muestras fueron obtenidas antes del faenamiento de los animales. En derivados cárnicos de Australia se observó una frecuencia de aislamiento de *E. hirae* inferior a la comunicada para los animales (2,5%), aunque fue superior a la observada en la presente tesis (Ruzauskas *et al.* 2010, Obeng *et al.* 2013).

En animales y productos de ese origen ha sido comunicado el aislamiento de *E. durans*. En animales estudiados en Lituania no se recuperaron enterococos pertenecientes a esta especie, a diferencia de lo observado en animales de granja de Portugal (2,6%). En leche pasteurizada de Brasil se observó una frecuencia de recuperación de *E. durans* (12,6%) resultando en ambos casos ser mayor a la detectada en esta investigación (Poeta *et al.* 2006a, Fracalanza *et al.* 2007, Ruzauskas *et al.* 2010).

En un estudio realizado sobre alimentos de distinto origen en Estados Unidos, que incluyó carnes de pollo, cerdo, vaca, pavo y avestruz, se aisló *E. gallinarum* en muestras de pollo (9,5%), aunque no se observó positividad en los restantes

productos cárnicos (McGowan *et al.* 2006). En otro estudio realizado en China se detectó la recuperación de *E. gallinarum* (1,3%) en animales de granja. El aislamiento de enterococos se produjo a partir de muestras fecales de pollo y de cerdo (Liu *et al.* 2013).

En la presente investigación se recuperaron *E. avium* y *E. raffinosus* de distintos tipos de alimentos de origen animal. Otros autores comunicaron el aislamiento de las dos especies en pollos australianos en estudios realizados en Australia durante distintos períodos. En el período 2008-2009 entre las especies caracterizadas se encontraban *E. avium* y *E. raffionosus*, aunque en el primer grupo (año 2000) no fueron detectados. A diferencia de lo encontrado en esta investigación, los autores del trabajo de Australia comunicaron una prevalencia equivalente (0,5%) para las dos especies de enterococos (Obeng *et al.* 2013).

Durante el desarrollo de esta tesis en los productos cárnicos, como se mencionó anteriormente, se observó un predominio de *E. faecalis* sobre *E. faecium* aunque las frecuencias de recuperación variaron de acuerdo al tipo de alimento. En las muestras de carne picada procesadas el 96,7% de los aislamientos correspondió a *E. faecalis* mientras que el 3,3% restante se caracterizó fenotípicamente como *E. faecium*. En una investigación reciente sobre enterococos recuperados de carnes se observó que *E. faecalis* era más prevalente que *E. faecium* aunque las frecuencias de recuperación de los mismos fue de 41% y 25% respectivamente, siendo menores que la de la carne analizada en esta tesis (Kibi *et al.* 2013). Por el contrario, en Estados Unidos se observó una mayor prevalencia de *E. faecium* (61%) que de *E. faecalis* (29%), recuperados de muestras de carne obtenidas al azar en 263 establecimientos comerciales (Hayes *et al.* 2003).

En salamines artesanales las prevalencias de *E. faecalis* (81%) y de *E. faecium* (19%) fueron menor y mayor, respectivamente, que las observadas en carne picada. En un estudio realizado para evaluar la calidad microbiológica de dos tipos de productos cárnicos fermentados en España, *chorizo* y *fuet*, se observó, a diferencia de los resultados de esta tesis, que *E. faecium* era la especie más frecuentemente aislada (51,9%) seguido por *E. faecalis* (14,2%) y otras especies

con menores frecuencias (Martín *et al.* 2005). En una investigación posterior sobre los enterococos en uno de los productos (*fuet*) españoles se detectó al estudiar el alimento y el ambiente de elaboración, que había una inversión de la prevalencia con un ligero predominio de *E. faecalis* (31,4%) sobre *E. faecium* (30,7%), no mostrando concordancia con los resultados de esta tesis. Los autores concluyeron que las fuentes de los enterococos en el producto final fueron el equipamiento utilizado para la elaboración, las materias primas e incluso la presencia de cepas de origen humano provenientes de los trabajadores de los establecimientos (Martín *et al.* 2009). En un estudio sobre productos cárnicos fermentados tradicionales de Portugal se observó que la totalidad de los aislamientos de enterococos fue caracterizada como *E. faecalis*. En esa investigación se tomaron muestras de las materias primas, del producto luego de un período de reposo, de las envolturas y del producto final previamente a su comercialización (Ribeiro *et al.* 2011).

En los alimentos de origen lácteo analizados en esta tesis se observó una mayor diversidad que en los productos cárnicos pues fueron caracterizados aislamientos como pertenecientes a siete especies del género *Enterococcus*. Asimismo, se observó variabilidad en las frecuencias de recuperación en los distintos tipos de alimentos tanto a nivel intra-especie como inter-especie. Se recuperaron *E. faecalis* (57,1%), *E. raffinosus* (28,6%) y *E. faecium* (14,3%) de muestras de leche de cabra. En un estudio sobre enterococos aislados de leche cruda en Venezuela se observó el predominio de *E. faecium* sobre *E. faecalis* y *E. raffinosus*. Sin embargo, las prevalencias comunicadas fueron inferiores a las de la presente tesis. En la leche venezolana las frecuencias de recuperación para *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. raffinosus* fueron respectivamente del 23,4%, 11,7% y 5,9%. En las muestras del estudio de Venezuela se detectó una mayor diversidad de especies de enterococos pues también se recuperaron aislamientos de tres especies diferentes a las ya citadas (Faría *et al.* 2002). Al evaluar microbiológicamente leche cruda de Turquía se detectó la presencia de aislamientos de enterococos, distribuidos en siete especies. En coincidencia con lo observado en esta tesis *E. faecalis* fue la especie más recuperada con una frecuencia similar (54,2%). Sin

embargo, los autores comunicaron una mayor frecuencia de recuperación de *E. faecium* (28,8%) y un menor porcentaje (0,6%) de *E. raffinosus* que en las muestras de leche provenientes de la región de la Provincia de Buenos Aires bajo estudio (Citak *et al.* 2005).

En las muestras de queso de cabra analizadas en esta investigación se detectó la presencia de *E. faecium* (57,1%) y de *E. faecalis* (42,9%). En otros estudios se observaron resultados variados en cuanto a las especies de enterococos aisladas y a la frecuencia de recuperación. En enterococos aislados de quesos de cabra elaborados en tres establecimientos españoles, se recuperaron aislamientos de cinco especies diferentes. No se detectó la presencia de *E. faecium* mientras que la proporción de *E. faecalis* fue inferior (18/95) a la de la presente investigación (6/14) y la recuperación de esta especie se produjo en las tres fábricas evaluadas (Martín Platero *et al.* 2009). En un estudio epidemiológico realizado sobre muestras de queso de cabra elaborado en Turquía se observó una mayor prevalencia de *E. faecium* que de *E. faecalis*. Sin embargo, las frecuencias de aislamiento comunicadas tanto para *E. faecium* (43,58%) como para *E. faecalis* (28,21%) de quesos de cabra turcos fueron inferiores a las de los quesos de cabra elaborados en el Partido de Tandil (Tuncer 2009). La inversión del predominio entre *E. faecalis* y *E. faecium* observada en las muestras de leche de cabra y de queso de cabra analizadas en la presente tesis puede deberse a una amplia variedad de factores relacionados con el proceso de elaboración. En un estudio sobre la caracterización de bacterias ácido-lácticas en fábricas de queso de cabra se evaluó su distribución en distintas etapas de la producción, incluyendo a la materia prima, estadios intermedios y el producto final. En cada fase se observó una composición diferente de la microbiota ácido-láctica. En la leche cruda no se recuperaron enterococos pero al progresar en el proceso de elaboración y maduración se aislaron distintas especies con distintas frecuencia, incluyendo a *E. faecalis* y *E. faecium*. En el producto final se observó una prevalencia de *E. faecium* superior a la de *E. faecalis* (Colombo *et al.* 2010).

Al analizar las muestras de queso de oveja seleccionadas en la zona de Tandil, los aislamientos de *Enterococcus* spp. se caracterizaron fenotípicamente como *E. faecium* (73,4%), *E. faecalis* (20%), *E. avium* (3,3%) y *E. hirae* (3,3%). En quesos de oveja semi-duros elaborados en establecimientos ubicados en una región de la Patagonia argentina se estudió la presencia de enterococos. A diferencia de lo observado en esta tesis se recuperaron únicamente *E. faecium* y *E. faecalis*. Las frecuencias de aislamiento fueron similares a las observadas en la presente tesis pues el 80% de los aislamientos correspondió a *E. faecium* y el 20% a *E. faecalis* (Marguet *et al.* 2008). En cambio, en una investigación sobre la inocuidad de quesos de oveja manufacturados en establecimientos de España se recuperaron aislamientos de *E. faecalis* (81,8%), *E. avium* (9,8%), *E. faecium* (7,6%) y *E. hirae* (0,8%). Al igual que con los resultados de la presente tesis, los autores comunicaron el aislamiento de otras especies diferentes a *E. faecalis* y *E. faecium*, aunque las frecuencias de los mismos no fueron coincidentes con las observadas en esta tesis (Nieto-Arribas *et al.* 2011).

En los quesos elaborados con leche de vaca que se evaluaron en esta tesis se recuperaron aislamientos de enterococos distribuidos en cuatro especies. La mayor prevalencia se observó para *E. faecium* (69,3%) seguido en orden descendente por *E. faecalis* (26,9%), *E. durans* (1,9%) y *E. gallinarum* (1,9%). Otros autores han comunicado que estas son las especies más frecuentes de enterococos en derivados lácteos. Sin embargo, se detectaron variaciones en las prevalencias en las regiones geográfica donde fueron elaborados los alimentos. A diferencia de lo observado en esta tesis, *E. faecium* no fue la especie más recuperada. En enterococos aislados de productos lácteos italianos se detectó el predominio de *E. faecalis* (51,5%) sobre *E. faecium* (39,7%) y *E. durans* (8,8%). En ese estudio los porcentajes de recuperación fueron mayores a los observados en esta investigación (Morandi *et al.* 2006). En un trabajo sobre la diversidad de especies de enterococos en quesos suizos se concluyó que la especie más recuperada fue *E. faecalis* (80,7%), seguida por *E. durans* (11,7%) y por *E. faecium* (5,1%) en menor proporción, donde se observó una inversión de prevalencias excepto para *E. faecalis* como una mayor frecuencia de *E. durans* y

una menor recuperación de *E. faecium* que en los quesos de vaca analizados en esta tesis (Templer & Baumgartner 2007).

Para evaluar la heterogeneidad de especies de enterococos en alimentos lácteos italianos se analizaron muestras de diversos tipos de quesos. Una de las especies que presentó mayor diversidad fue *E. gallinarum* pues se recuperó de quesos elaborados con leche de vaca, de cabra o de búfalo. En quesos de vaca la prevalencia de esta especie fue del 0,9%, menor a la comunicada en esta investigación (Andrighetto *et al.* 2001). La escasa documentación de la presencia de *E. gallinarum* en quesos de vaca junto con su baja prevalencia podrían estar vinculadas con que esta especie no es un integrante habitual de la microbiota de los alimentos lácteos. Estudios previos han demostrado que *E. gallinarum* es particularmente aislado de productos de origen cárnico en menor frecuencia que *E. faecalis* y que *E. faecium* (Kibi *et al.* 2013, Obeng *et al.* 2013).

Para dar cumplimiento al objetivo 2 de la presente tesis se investigó la expresión de factores de virulencia tales como hemolisina, gelatinasa y Sustancia Agregativa.

Estudios previos han demostrado que la hemolisina tiene relevancia en los cuadros clínicos causados por enterococos y exagera su virulencia en modelos animales de infecciones enterocócicas.

En una investigación efectuada con enterococos de origen humano se determinó que la hemolisina estaba asociada con un incremento en el riesgo de muerte cinco veces mayor en pacientes con bacteriemia, luego de tres semanas, en comparación con pacientes con bacteriemia enterocócica causada por cepas de enterococos que no expresaban este factor de virulencia (Huycke *et al.* 1991). La toxicidad de este factor de virulencia se demostró por primera vez en un modelo de letalidad murino, en el cual se evidenció que las cepas de *E. faecalis* productoras de hemolisina eran más tóxicas que las cepas no productoras de la misma, observándose incluso un mayor efecto en *E. faecalis* hiper-productores de hemolisina (Coburn & Gilmore 2003). En un estudio donde se administró a un

grupo de ratones cepas de *E. faecalis* deficientes en hemolisina y/o Sustancia Agregativa y a otro cepas productoras de ambos factores de virulencia se observó una mayor letalidad en aquellos ratones que habían recibido las cepas productoras de hemolisina asociada a Sustancia Agregativa al comparar con las que solamente producían alguno de los dos factores de virulencia por separado (Coburn & Gilmore 2003). En un modelo de endo-oftalmitis en conejo se observó que las cepas de *E. faecalis* productoras de hemolisina causaban daño tisular que no podía resolverse a pesar del tratamiento con antimicrobianos y/o compuestos anti-inflamatorios. Con estos modelos experimentales se demostró que la hemolisina cumple un papel en la patogenia de este tipo de infección enterocócica y la importancia que la misma reviste en la participación de las secuelas inflamatorias (Coburn & Gilmore 2003).

La relevancia de la Sustancia Agregativa en la patogénesis de endocarditis enterocócica se comprobó en un modelo animal. Se observó que se formaban vegetaciones cardíacas de mayor tamaño que las producidas por cepas de enterococos no productoras de Sustancia Agregativa (Mundy *et al.* 2000).

El papel de la gelatinasa en la patogenicidad de ciertas infecciones enterocócicas también fue demostrado en modelos animales. En un modelo murino se estudió el impacto de la ausencia o presencia de gelatinasa sobre la patogenia de peritonitis causada por enterococos. En ratones infectados con cepas de enterococos que no expresaban gelatinasa se observó una mayor supervivencia o mayor retraso de letalidad que en los enterococos productores de dicho factor de virulencia. Estos resultados sugieren que la gelatinasa cumpliría un papel en la fisiopatogenia de peritonitis enterocócica (Singh *et al.* 1998). Un modelo utilizado para investigar el papel de la comunicación bacteriana (*quorum sensing*) y la gelatinasa en las infecciones enterocócicas es el de endo-oftalmitis en conejo. Al estudiar la contribución de la gelatinasa se comprobó que en los animales infectados con enterococos productores de gelatinasa la evolución del cuadro infeccioso era más significativa que en las cepas que no expresaban el factor de virulencia (Engelbert *et al.* 2004). La contribución de la gelatinasa a la

patogénesis de la endocarditis causada por enterococos se estudió utilizando un modelo experimental en conejo. Se observó que la carga bacteriana era mayor en tejido infectado con cepas productoras de gelatinasa al comparar con cepas mutantes no productoras del factor de virulencia. En las vegetaciones infectadas con cepas gelatinasa-positivas se detectó una disminución en el depósito de material fibrinoso y en el reclutamiento de células similares a neutrófilos, sugiriendo que la gelatinasa al actuar como fibrinolítico contribuye con la diseminación bacteriana desde las vegetaciones primarias y que también cumple un papel importante en la quimiotaxis de células inflamatorias. Se comprobó que la gelatinasa puede degradar a un componente del Sistema de Complemento, C5a. Esta proteína inflamatoria tiene un espectro amplio de acciones, incluyendo la quimioatracción de neutrófilos. La acción lítica de la gelatinasa sobre C5a estaría involucrada en la disminución del reclutamiento de neutrófilos observada *in vitro* (Thurlow *et al.* 2010).

Asimismo se han estudiado fenómenos vinculados con la virulencia y la patogenia de las infecciones enterocócicas, investigados mayormente en enterococos de origen clínico con posible expresión en aislamientos de otros orígenes: formación de *biofilm* y la presencia de polisacáridos capsulares que contribuyan a la evasión de la respuesta inmune.

La capacidad de formar *biofilm* es fundamental en ciertas patologías causadas por enterococos, como infecciones del tracto urinario y endocarditis (Fisher & Phillips 2009).

En animales de experimentación se ha demostrado que ciertos aislamientos de enterococos poseen la capacidad de evadir a la respuesta inmune del hospedador. En cepas clínicas de enterococos se ha comprobado la síntesis de un polisacárido capsular que contribuye con la evasión de la respuesta inmunológica, mediante la resistencia a la fagocitosis y mediante la persistencia en nódulos linfáticos observados en un modelo murino (Tendolkar *et al.* 2003).

En esta investigación se detectó en el 9,5% de los enterococos recuperados de productos animales la producción de hemolisina, manifestada por la presencia de hemólisis completa o β -hemólisis en cultivos desarrollados en medios suplementados con sangre. El remanente de enterococos no β -hemolíticos presentó ausencia de hemólisis o γ -hemólisis. Otros autores han comunicado la producción de este factor de virulencia en aislamientos de alimentos elaborados en otros países. En aislamientos de origen animal de Portugal se observó una frecuencia de producción del factor de virulencia del 6% y en productos animales eslovacos del 7%. Estos resultados fueron similares a los observados en la presente tesis. Los autores concluyeron que la expresión de hemolisina era variable de acuerdo a la procedencia de los enterococos, fueran de origen alimentario o clínico, con mayores porcentajes de producción en los aislamientos clínicos (Semedo *et al.* 2003, Drahovská *et al.* 2004).

En esta tesis dos especies del género *Enterococcus* expresaron hemolisina. Se registró una mayor producción entre los aislamientos de *E. faecalis* (13,9%) que entre los de *E. faecium* (1,2%). Diferentes resultados fueron obtenidos en los estudios mencionados sobre enterococos de alimentos elaborados en Portugal y Eslovaquia, donde se detectó la producción de hemólisis completa por parte de *E. faecalis* pero no por *E. faecium* (Semedo *et al.* 2003, Drahovská *et al.* 2004).

En esta investigación se recuperaron enterococos productores de hemolisina, principalmente de productos cárnicos (83,3%) y en menor medida de alimentos lácteos (13,7%). En estudios previos que evaluaron comparativamente la virulencia de enterococos de origen cárnico y lácteo no se han observado resultados similares a los de esta tesis. En productos cárnicos y lácteos elaborados en Marruecos se detectaron determinantes genéticos de hemolisina pero no se observó la expresión de β -hemólisis en ninguno de los aislamientos. En otro cohorte de productos artesanales de origen español se comprobó la portación de genes codificantes de hemolisina en derivados lácteos y su ausencia en alimentos cárnicos. A pesar de ello, no se observó hemólisis completa en los aislamientos que contaban con genes de hemolisina. En esos estudios se

comprobó que la portación de genes de virulencia no implica necesariamente la expresión del producto que codifican (Sánchez Valenzuela *et al.* 2008, Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

Los aislamientos de *E. faecalis* de alimentos cárnicos productores de hemolisina fueron recuperados de carne picada (65%) y de salami (35%). En otros estudios sobre enterococos provenientes de alimentos cárnicos se observaron resultados distintos de los presentados en esta tesis. En una investigación realizada a partir de muestras cárnicas frescas de pollo, pavo, vaca y oveja no se detectó β -hemólisis en los enterococos estudiados (Kibi *et al.* 2013). Por el contrario, se observó ausencia de hemólisis, hemólisis parcial y hemólisis completa (0,5%) en aislamientos recuperados de productos cárnicos elaborados en el norte de Portugal. En otra investigación en la cual se evaluaron alimentos cárnicos fermentados producidos en la región norteña de Portugal se detectó la producción de hemolisina en el 5% de los enterococos estudiados. Estos resultados comunicados por otros autores indicaron que en enterococos aislados de carnes y derivados cárnicos elaborados en otros países la frecuencia de producción de hemolisina fue inferior a la observada en esta tesis (Barbosa *et al.* 2010, Ribeiro *et al.* 2011).

En alimentos lácteos la producción de hemolisina se detectó en *E. faecalis* de queso de vaca y de queso de oveja y en *E. faecium* de queso de vaca. No se observó la expresión del factor de virulencia en aislamientos provenientes de leche y queso de cabra. No se detectó el factor de virulencia en *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum* o *E. hirae*. A diferencia de lo observado en esta investigación, en un estudio en el cual se caracterizaron los enterococos de quesos de cabra elaborados con leche cruda, se detectó la producción de hemólisis completa en el 29,4% de *E. durans* analizados (Psoni *et al.* 2006). En esta investigación se recuperó solo un aislamiento caracterizado como *E. durans*, por lo tanto no es posible descartar que en futuros aislamientos de esta especie se detecte la expresión de hemolisina.

Estudios previos han comunicado que la observación de hemólisis completa en enterococos aislados de derivados lácteos es heterogénea. En una investigación sobre la virulencia de enterococos recuperados de quesos de oveja elaborados en la región patagónica de Argentina no fue detectada actividad hemolítica en ninguno de los enterococos estudiados. A diferencia de lo observado en esta tesis tampoco se observó hemólisis completa en enterococos recuperados de dos tipos de quesos elaborados en Egipto (Marguet *et al.* 2008, Malek *et al.* 2012). En cambio, en quesos elaborados en el sud-este de Brasil se detectó β -hemólisis en *E. faecalis* (17%) como también en *E. faecium* (6%). En una investigación posterior realizada en otra región del sud-este de Brasil se observó hemólisis completa en el 95,3 % de los enterococos recuperados de quesos y leche cruda (Gomes *et al.* 2008, Moraes *et al.* 2012).

Se debe recalcar el hecho de que en esta tesis se detectó la expresión de hemolisina en *E. faecalis*, la especie del género *Enterococcus* que más frecuentemente produce hemólisis completa en aislamientos de muestras clínicas. Sin embargo, en los alimentos analizados en la región bajo estudio también se observó la presencia de aislamientos hemolisina-positivos de *E. faecium*, que representa otra de las especies de enterococos prevalentes en materiales clínicos como en alimentos de origen animal.

En esta investigación se detectó la producción de gelatinasa en los enterococos aislados (17%). En un estudio sobre la caracterización de enterococos provenientes de productos cárnicos y lácteos adquiridos en una granja elaboradora y en establecimientos comerciales de Brasil se observó producción de gelatinasa en 46/263 (17,5%) aislamientos, un porcentaje similar al detectado en los aislamientos evaluados en esta tesis (Gomes *et al.* 2008). Este factor de virulencia fue el que presentó la mayor distribución inter-especie pues se observó actividad lítica en aislamientos de *E. hirae* (100%), *E. raffinosus* (50%), *E. faecalis* (23%) y *E. faecium* (3,7%). No se recuperaron *E. avium*, *E. durans* o *E. gallinarum* productores de gelatinasa. En enterococos aislados de alimentos europeos se detectó una frecuencia de producción de gelatinasa superior (48,9%) a la de esta

investigación para *E. faecalis* mientras que no se aislaron *E. faecium* que expresaran para este factor de virulencia (Franz *et al.* 2001). Al estimar los porcentajes relativos de expresión de gelatinasa para cada especie de enterococos recuperados de animales, utilizados para la producción de alimentos cárnicos en Portugal se detectaron 38/43 *E. faecalis* (88,4%) con expresión de gelatinasa mayor a la comunicada en esta tesis, como también 1/33 (3%) *E. faecium* con capacidad lítica, una frecuencia en el mismo orden de la detectada en la presente tesis. En ese trabajo no se detectaron aislamientos de *E. durans* o *E. hirae* positivos para gelatinasa (Poeta *et al.* 2006b).

La expresión de gelatinasa en *E. raffinosus* y en *E. hirae* es destacable considerando que su recuperación fue poco frecuente en los alimentos de origen animal analizados en esta investigación. No se cuenta en la región estudiada con evidencia que indique que la expresión de este factor de virulencia sea prevalente en los aislamientos de estas especies.

Al igual que para la expresión de hemolisina se detectó una mayor frecuencia de producción de gelatinasa en enterococos de origen cárnico (65,1%) con respecto a aquellos recuperados de productos lácteos (34,9%). En el estudio publicado por Gomes *et al.* (2008) sobre alimentos elaborados en Brasil, se pudo comprobar una situación inversa a la de esta tesis de acuerdo al tipo de alimento del cual fueron recuperados los enterococos productores de gelatinasa. Se detectó la producción de gelatinasa en 48 aislamientos de enterococos procedentes de alimentos, 37/48 (77,1%) de productos lácteos y 9/48 (18,8%) de derivados cárnicos.

En la presente investigación se observaron diferencias en la frecuencia de recuperación y en la distribución de especies de enterococos que expresaron gelatinasa de acuerdo al tipo de alimento cárnico. Los aislamientos de origen cárnico productores de gelatinasa provinieron principalmente de carne picada (67,9%) y en menor medida (32,1%) de productos cárnicos fermentados de elaboración artesanal (salamines). En carne picada los enterococos positivos para este factor de virulencia fueron caracterizados como *E. faecalis* (94,7%) y *E. faecium* (5,3%), mientras que en salamines artesanales la totalidad de los

enterococos fue tipificada como *E. faecalis*. En investigaciones previas realizadas en otros países se estudiaron en forma no simultánea enterococos aislados de materias primas cárnicas y derivados fermentados. En carnes de origen tunecino se observó la producción de gelatinasa en el 40,3% de los enterococos incluidos. La especie que presentó mayor expresión de gelatinasa fue *E. faecalis* (83,3%) seguida por *E. faecium* (12,5%) y a diferencia de lo detectado en esta tesis se aisló una tercera especie positiva para gelatinasa, *E. gallinarum* (Kibi *et al.* 2013). Al estudiar la expresión de gelatinasa en enterococos aislados de alimentos cárnicos fermentados de Portugal se comprobó una frecuencia de producción de 26% en muestras de productos elaborados en una región del norte del país, mientras que fue del 20% en alimentos cárnicos fermentados obtenidos en el sur portugués. En los alimentos norteños se recuperaron *E. faecalis* (92%), *E. faecium* (2%) y enterococos pertenecientes a otras especies. En cambio, en coincidencia con lo comunicado en esta tesis, el 100% de los enterococos productores de gelatinasa recuperados de alimentos sureños fue tipificado como *E. faecalis* (Barbosa *et al.* 2010, Ribeiro *et al.* 2011).

En esta tesis la producción de gelatinasa se detectó en enterococos de alimentos lácteos como queso de vaca (46,6%), queso de oveja (26,7%) y leche de cabra (26,7%). No se observó expresión de este factor de virulencia en aislamientos de queso de cabra. De queso de vaca se recuperaron las especies *E. faecalis* (71,4%) y *E. faecium* (28,6%) productores de gelatinasa, mientras que en queso de oveja presentaron actividad lítica *E. faecalis* (75%) y *E. hirae* (25%), a diferencia de leche de cabra donde se aislaron *E. faecalis* (75%) y *E. raffinosus* (25%) positivos para gelatinasa. Al estudiar enterococos aislados de queso ovino elaborado en el sur argentino se observó en *E. faecalis* y en *E. faecium* la ausencia de producción de gelatinasa, aunque se había detectado la portación de determinantes genéticos para esta enzima en el 80% de los aislamientos. En esa investigación se observó una discrepancia entre la caracterización genotípica y fenotípica de la gelatinasa. Estos autores no comunicaron el aislamiento de *E. hirae* como en la presente tesis (Marguet *et al.* 2008). En los últimos años se han realizado estudios para determinar la presencia de aislamientos de enterococos

productores de gelatinasa en otros derivados lácteos como quesos de cabra y de vaca, aunque algunos se han enfocado en la caracterización genotípica y otros en la correspondencia fenotípica-genotípica. Al investigar la inocuidad de enterococos aislados de quesos de cabra españoles se observó que el 100% de los aislamientos de *E. faecalis* recuperados era portador del gen que codifica para gelatinasa mientras que no fue detectado en otras especies como *E. avium* (Martin-Platero *et al.* 2009). En esa investigación no se comunicó el aislamiento de *E. raffinosus*. En un estudio sobre enterococos de distinto origen se incluyeron aislamientos de *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans* recuperados de leche y derivados lácteos. Se detectó la producción de gelatinasa en 4/15 (26,7%) de los enterococos, en la totalidad de los casos correspondiendo a *E. faecalis* (Eaton & Gasson 2001).

Al investigar la expresión de Sustancia Agregativa en enterococos recuperados de alimentos artesanales elaborados en la región estudiada se observó la expresión de este factor de virulencia en el 13,1% de los aislamientos. Otros autores han estudiado la presencia de Sustancia Agregativa en alimentos aunque son escasas las comunicaciones sobre la caracterización fenotípica de este factor de virulencia en enterococos de ese origen. En enterococos recuperados de productos de origen europeo se detectó la expresión de Sustancia Agregativa en 23/95 (24,2%) aislamientos (Franz *et al.* 2001).

En la presente tesis se detectó un mayor porcentaje de enterococos positivos para Sustancia Agregativa en productos cárnicos (60,6%) que en alimentos lácteos (39,4%). La producción de Sustancia Agregativa fue observada en aislamientos de *E. faecalis* (95%) y de *E. faecium* (5%). Se detectaron distintos patrones de distribución de especies de acuerdo a los distintos tipos de productos cárnicos o lácteos. En salami se observó la expresión de Sustancia Agregativa solo en aislamientos de *E. faecalis* mientras que en carne picada se detectó en *E. faecalis* (92,3%) y en *E. faecium* (7,6%).

En los enterococos recuperados de productos lácteos analizados en esta investigación también se observaron variaciones de especie y de frecuencia de

aislamiento. Se aislaron *E. faecalis* (80%) y *E. faecium* (20%) productores de Sustancia Agregativa en queso de vaca. En cambio, en queso de oveja los porcentajes de positividad fueron de 60% y 40% para *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. No se detectó la expresión de Sustancia Agregativa en enterococos provenientes de queso de cabra. No se aislaron *E. faecium* de leche de cabra productores de Sustancia Agregativa.

En gran medida las investigaciones recientes se han enfocado en la búsqueda de los determinantes genéticos que codifican para Sustancia Agregativa en enterococos de productos cárnicos y lácteos sin estudiar en paralelo la expresión del factor de virulencia. Dos estudios demostraron la portación genética en el 56% y 22,2%, respectivamente, de *E. faecalis* recuperados de productos lácteos de diferentes países europeos, aunque no se detectó en ninguno de los aislamientos de *E. faecium* recuperados en dichos estudios (Eaton & Gasson 2001, Sánchez Valenzuela *et al.* 2009). Esos resultados refuerzan la afirmación de que la Sustancia Agregativa ha sido tradicionalmente considerada como un factor de virulencia presente exclusivamente en *E. faecalis* (Foulquié Moreno *et al.* 2006).

En esta tesis se ha demostrado la expresión de Sustancia Agregativa en aislamientos de las dos especies de enterococos, *E. faecalis* y *E. faecium*. Sin embargo, otros autores han comunicado la detección de determinantes que codifican para una proteína agregativa en *E. faecium* de origen animal. Se debe destacar que en estas investigaciones el porcentaje de aislamientos de *E. faecium* productores de Sustancia Agregativa fue siempre marcadamente inferior al observado para los aislamientos de *E. faecalis* (Barbosa *et al.* 2010, Ribeiro *et al.* 2011).

La producción de Sustancia Agregativa en *E. faecium* aislados en esta investigación podría ser la consecuencia de la transferencia horizontal de los determinantes de virulencia. Un estudio realizado en Italia en donde se realizaron experimentos de conjugación *in vitro* entre *E. faecalis* donantes que portaban genes codificantes de Sustancia Agregativa y dos receptores, una cepa de *E. faecalis* y una de *E. faecium* fue concluyente en este sentido. Los estudios

moleculares demostraron la presencia de los genes en *E. faecalis* y *E. faecium* en el 85% y 40% de los transconjugantes, respectivamente. Asimismo, en *E. faecium* transconjugantes se observó la positividad (57,9%) de la prueba fenotípica para detectar la presencia de Sustancia Agregativa. En ese estudio se comprobó la transferencia intra-especie e inter-especie de Sustancia Agregativa y se sugirió que esta capacidad de compartir estos genes codificantes del factor de virulencia sería una característica distintiva de aislamientos de *E. faecalis* (Paoletti *et al.* 2007).

En la presente tesis se detectó la producción de un factor de virulencia en el 18,6% de los enterococos recuperados de alimentos de origen animal. Los aislamientos positivos para un factor de virulencia correspondieron a *E. faecalis* (89,3%), *E. faecium* (8,5%) y *E. raffinosus* (2,2%), provenientes de productos cárnicos (71,4%) y lácteos (28,6%). En una investigación sobre factores que contribuyen con la patogenicidad en enterococos recuperados de alimentos de origen animal se observó la expresión de un factor de virulencia en el 31,8% (7/22) de los aislamientos. A diferencia de lo hallado en esta tesis, la producción de factores de virulencia fue detectada en siete enterococos de productos lácteos (85,7%) y en un aislamiento (14,3%) cárnico. Los autores comunicaron que la única especie positiva para un factor de virulencia fue *E. faecalis* con ausencia de producción por parte de *E. faecium* y *E. durans* (Eaton & Gasson 2001). En esta tesis se observó la expresión de factores de virulencia con predominio de *E. faecalis*, aunque se recuperaron aislamientos de *E. faecium* y *E. raffinosus* positivos para un factor de virulencia.

En $n = 25$ (10,0%) enterococos de alimentos de origen animal estudiados, provenientes del Partido de Tandil, se detectó la expresión conjunta de dos o tres factores de virulencia. Los enterococos productores de hemolisina-gelatinasa (1,6%) fueron tipificados como *E. faecalis* procedentes de carne picada (2/4), salami (1/4) y queso de vaca (1/4). Los aislamientos positivos para hemolisina y gelatinasa recuperados de salami representaron al 14,2% de los *E. faecalis* productores de hemolisina y 11,1% de los productores de gelatinasa. De carne

picada el 15,4% correspondió a *E. faecalis* productores de hemolisina y 11,1% de gelatinasa. El 50% de *E. faecalis* recuperados de queso de vaca fue productor de hemolisina y el 20% de gelatinasa.

En una investigación sobre enterococos de alimentos europeos se observó que el 48,9% de los aislamientos de *E. faecalis* era productor de gelatinasa mientras que el 21,3% de *E. faecalis* era productor de hemolisina. Se detectó la expresión simultánea de gelatinasa y hemolisina en 1/47 (2,1%) de los enterococos pertenecientes a esta especie, representando el fenotipo simultáneo al 4,3% (1/23) de los aislamientos productores de gelatinasa y al 10% (1/10) de los que expresaron hemolisina (Franz *et al.* 2001). En un estudio sobre enterococos recuperados de productos fermentados cárnicos se investigó la expresión de factores de virulencia. En 1/20 (5%) *E. faecalis* se detectó la producción de gelatinasa y de hemólisis completa. Estos aislamientos comprendieron al 100% de los enterococos hemolisina-positivos y al 25% de los aislamientos productores de gelatinasa (Ribeiro *et al.* 2011).

En enterococos recuperados de alimentos de origen animal elaborados en la zona de estudio se detectó en forma conjunta la producción de hemolisina y Sustancia Agregativa (1,2%). La totalidad de los aislamientos fue caracterizada como *E. faecalis* de origen cárnico y lácteo. Otros autores comunicaron la presencia de los dos factores de virulencia en forma conjunta en 2/47 (4,2%) enterococos recuperados de alimentos de origen animal. Este hallazgo correspondió al 20% de los *E. faecalis* positivos para hemolisina y al 8,3% de los aislamientos productores de agregados (Franz *et al.* 2001).

El 6,0% de los enterococos investigados en esta tesis presentó en forma simultánea la expresión de gelatinasa y Sustancia Agregativa. Los aislamientos fueron de origen cárnico (60%) y lácteo (40%), caracterizados como *E. faecalis* ($n = 13$) y *E. faecium* ($n = 2$). En concordancia con lo observado en esta tesis, otros autores comunicaron para enterococos de alimentos de origen animal que la expresión conjunta de estos factores de virulencia fue la más frecuente en *E. faecalis*. En el estudio mencionado, 7/47 (14,9%) de los enterococos de esa

especie presentaron ese fenotipo. Sin embargo, debe recalcar que no detectaron la producción simultánea en los aislamientos de *E. faecium* analizados (Franz *et al.* 2001).

En la presente tesis, la expresión de los tres factores de virulencia se observó en el 1,2% de los enterococos recuperados de alimentos de origen animal. Los aislamientos correspondieron a *E. faecalis* de salami y de carne picada, mientras que en un estudio europeo realizado sobre alimentos de origen animal el 10,6% de los *E. faecalis* investigados presentó el mismo fenotipo (Franz *et al.* 2001).

La producción de *biofilm* *in vitro* fue estudiada mediante una técnica fenotípica en placas de poliestireno. En la totalidad de los aislamientos de enterococos de alimentos de origen animal no se observó la formación de *biofilm*. Es escasa la documentación sobre la producción de biopelículas por enterococos recuperados de alimentos, pues su estudio ha sido orientado hacia el potencial papel de la formación de *biofilm* en cuadros infecciosos de origen humano, particularmente estudiado en aislamientos de *E. faecalis* (Toledo-Arana *et al.* 2001, Herrera-Mendoza 2004). En un estudio sobre enterococos y la expresión de factores de virulencia en productos cárnicos fermentados se investigó la producción de *biofilm*. En el estudio mencionado se realizaron dos variaciones de un método para estudiar la influencia de los nutrientes. Tanto en la forma convencional como en una alterna, en la cual se agregaron nutrientes, se detectó la formación de *biofilm* con resultados positivos débiles, moderados o fuertes. Sin embargo, en la variante con agregado de nutrientes se detectó la formación de *biofilm* en todos los aislamientos. Con el método tradicional solo fueron productores los aislamientos de *E. faecalis* aunque con la variante se detectó la formación de *biofilm* tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium* (Barbosa *et al.* 2010). Por el contrario, en una investigación sobre alimentos realizada en Brasil, se observó en *E. faecalis* la ausencia de *biofilm* (27,6%) o un resultado positivo débil (72,4%) mientras que en *E. faecium* un mayor número de aislamientos fue negativo (87,0%). No fueron detectados aislamientos productores moderados o positivos fuertes para la formación de *biofilm* (Gomes *et al.* 2008). Considerando que en esta tesis se

realizó el estudio fenotípico de la formación de *biofilm*, no es posible descartar la presencia de determinantes genéticos en los aislamientos estudiados.

Para evaluar la capacidad de evasión de la respuesta inmune por parte de los enterococos provenientes de alimentos de origen animal se realizaron dos ensayos *in vitro*. En el 100% de los aislamientos se observó muerte bacteriana por opsonofagocitosis y sensibilidad a la actividad bactericida del suero. Otros autores han evaluado mediante la técnica de opsonofagocitosis la respuesta de enterococos de origen clínico o con propiedades probióticas aunque no se cuenta con información sobre aislamientos recuperados de alimentos de origen animal. En un estudio realizado para evaluar enterococos de origen no alimentario se observó la muerte por opsonofagocitosis en un rango de 0% a 97% para *E. faecalis* de origen humano y del 90% para un *E. faecalis* probiótico (Hufnagel *et al.* 2003).

El objetivo 3 de la presente investigación fue determinar el perfil de resistencia asociada de los enterococos aislados a los antimicrobianos mediante pruebas de sensibilidad *in vitro* cualitativas y cuantitativas. Se estudiaron diez antimicrobianos de uso en terapéutica humana y/o en la cría de animales destinados a la producción de alimentos.

El antibiograma por difusión en agar es una metodología cuyos resultados se expresan en términos cualitativos. Un aislamiento será sensible, intermedio o resistente a los antimicrobianos ensayados. Por este motivo, es recomendable utilizar además métodos cuantitativos, pues los resultados se expresan en términos de concentración. Con estas técnicas es posible determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), entendiéndose como la mínima concentración de antimicrobiano que inhibe el desarrollo visible del aislamiento estudiado. Los resultados cuantitativos son de gran utilidad pues permiten ratificar o rectificar las categorizaciones realizadas por el método de difusión en agar.

En esta investigación se detectó resistencia a los antimicrobianos en el 45,2% de los enterococos recuperados de productos cárnicos y lácteos. Los aislamientos

resistentes pertenecieron a tres especies: *E. faecalis* (51,8%), *E. faecium* (47,4%) y *E. gallinarum* (0,8%). Al investigar la resistencia antimicrobiana en alimentos de origen animal franceses se observó que las mayores frecuencias de enterococos resistentes a los antimicrobianos correspondieron a *E. faecalis* (81%) y a *E. faecium* (13%), aunque no se recuperaron aislamientos de *E. gallinarum* (Jamet *et al.* 2012). En leche cruda proveniente de Costa Rica, el porcentaje de resistencia antimicrobiana fue mayor en *E. faecalis* (71%) con respecto a *E. faecium* (19%), si bien el 4% de los aislamientos resistentes fue caracterizado como *E. gallinarum* (Araya *et al.* 2005). En productos cárnicos y lácteos elaborados en España se detectó que la frecuencia de resistencia antimicrobiana se invertía, siendo mayor para *E. faecium* (64%) que para *E. faecalis* (36%), (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

Los enterococos investigados en la presente tesis presentaron resistencia a uno (49,1%) o a múltiples antimicrobianos (50,9%), aunque se detectaron diferencias en cuanto a los especies más prevalentes. Se observó resistencia a un antimicrobiano en *E. faecalis* (57,1%), *E. faecium* (41,1%) y *E. gallinarum* (1,8%) mientras que los aislamientos de *E. faecium* (53,5%) y de *E. faecalis* (46,5%) presentaron multi-resistencia antimicrobiana.

En enterococos recuperados de alimentos artesanales españoles se detectó resistencia antimicrobiana múltiple en 27/55 (49,1%) aislamientos. Los autores comunicaron que el 70,4% de los enterococos resistentes fue caracterizado como *E. faecium* y el 29,6% restante como *E. faecalis*. En ese estudio se observó un marcado predominio de *E. faecium* como especie que expresaba resistencia múltiple a los antimicrobianos (Sánchez Valenzuela *et al.* 2013). En aislamientos recuperados de productos cárnicos y lácteos de Brasil se detectó resistencia por lo menos a dos antimicrobianos en seis especies de enterococos. Se observó multi-resistencia en 47 aislamientos de *E. faecalis* (70,1%), cuatro aislamientos de *E. gallinarum* (6,0%) y dos aislamientos de *E. faecium* (3,0%). Los restantes aislamientos multi-resistentes fueron identificados como *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. gilvus* (Fracalanza *et al.* 2007).

En alimentos lácteos de origen suizo se detectó resistencia antimicrobiana en los aislamientos de enterococos estudiados. Se observó resistencia a un antimicrobiano en *E. faecalis* (22,5%) y *E. faecium* (5,0%). El 76,8% de *E. faecalis* y el 85% de *E. faecium* presentaron resistencia antimicrobiana múltiple (Templer & Baumgartner 2007). En otro estudio se investigaron 52 aislamientos de enterococos resistentes a los antimicrobianos recuperados de productos lácteos y cárnicos. En *E. faecalis* se observó resistencia a un antimicrobiano en 10/29 (34,5%) aislamientos y resistencia múltiple en el 65,5% de los enterococos de esta especie. Por el contrario, se observó una mayor frecuencia de mono-resistencia (82,6%) que de multi-resistencia (17,4%) en los aislamientos de *E. faecium* (Gomes *et al.* 2008).

En un estudio sobre las propiedades tecnológicas y la seguridad microbiológica de enterococos recuperados de productos lácteos se investigó el perfil de resistencia mediante la prueba de difusión en agar, presentando resistencia solo a ocho de los 20 (40%) antimicrobianos ensayados, a diferencia de lo observado para los enterococos incluidos en la presente tesis (Malek *et al.* 2012).

En esta investigación se detectó ampicilino-resistencia en el 18,3% de los enterococos. Los aislamientos fueron caracterizados como *E. faecium* (15,5%) y *E. faecalis* (2,8%). En un estudio sobre enterococos aislados de alimentos cárnicos italianos se detectó 1,78% de ampicilino-resistencia (Messi *et al.* 2006). En cambio, en el 100% de alimentos artesanales cárnicos y lácteos españoles no se observó resistencia a este antimicrobiano para *E. faecalis* y *E. faecium*, al igual que en una investigación realizada con alimentos de Egipto. (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009, Malek *et al.* 2012).

Ampicilina es uno de los antimicrobianos más utilizados actualmente para el tratamiento de infecciones enterocócicas y este fenómeno se manifiesta por el nivel de resistencia que se observa en aislamientos clínicos. En algunos establecimientos sanitarios se ha llegado a comunicar una frecuencia de ampicilino-resistencia superior al 90% para *E. faecium* (Cercenado 2011). Este antimicrobiano ha sido utilizado en animales de cría tales como vacas lecheras,

vacas para la industria cárnica, pollos y cerdos posiblemente con fines terapéuticos pues no se utiliza como componente de la alimentación de los animales (Mathew *et al.* 2007).

La expresión de resistencia a eritromicina (12,7%) se observó en *E. faecalis* (7,5%), *E. faecium* (4,8%) y *E. gallinarum* (0,8%) recuperados de productos de origen animal de la zona bajo estudio. En enterococos provenientes de alimentos de Brasil se detectó resistencia en el 9,6% (21/219) de los aislamientos. A diferencia de los resultados de la presente investigación, la frecuencia de *E. faecalis* eritromicina-resistentes correspondió al 3,7% mientras que para *E. faecium* fue del 5,9% (Gomes *et al.* 2008). En otra investigación realizada previamente en Brasil para caracterizar enterococos de alimentos cárnicos se detectó 24,1% de resistencia a eritromicina, aunque los aislamientos de *E. gallinarum* no presentaron resistencia al antimicrobiano (Fracalanza *et al.* 2007). La expresión de resistencia a eritromicina podría estar asociada al empleo del antimicrobiano en el tratamiento de animales. Este compuesto no es una de las alternativas terapéuticas para enterococos de origen clínico humano, aunque su uso en Medicina Veterinaria favorece la selección de cepas resistentes a este agente terapéutico. Se ha comunicado que un integrante de los antimicrobianos macrólidos, tilosina, se emplea para el tratamiento de infecciones en animales de cría destinados a la producción pecuaria. Existe un determinante genético de resistencia a macrólidos que codifica resistencia en forma conjunta a tilosina y a eritromicina (Hammerum 2012).

En la presente tesis el 12,7% de los enterococos estudiados presentó ANRG. Los aislamientos resistentes fueron tipificados como *E. faecalis* (9,6%) y *E. faecium* (3,1%). Al investigar la resistencia antimicrobiana en enterococos recuperados de productos de origen animal europeos se observó que el 13,7% de los aislamientos presentó ANRG. De igual modo, se detectó una mayor frecuencia de *E. faecalis* (12,6%) que de *E. faecium* (1,1%) con expresión de ANRG (Franz *et al.* 2001).

En esta investigación se detectaron enterococos resistentes a vancomicina y a teicoplanina. El porcentaje observado de EVR fue del 12,3%. El 100% de los EVR fue identificado como *E. faecium*. En enterococos recuperados de alimentos de origen animal españoles se observó resistencia a vancomicina (12%) y a teicoplanina (8%) en los aislamientos estudiados. A diferencia de lo comunicado en la presente tesis, se recuperó de los productos españoles un *E. faecalis* resistente a vancomicina aunque susceptible a teicoplanina (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

En el 11,1% de los enterococos de origen alimentario investigados se detectó resistencia a tetraciclina. El 7,1% de los aislamientos resistentes fue tipificado como *E. faecalis* y el 4,0% como *E. faecium*. En enterococos recuperados de alimentos artesanales cárnicos y lácteos españoles se observó resistencia a tetraciclina en 5/25 (20%) aislamientos. Los enterococos resistentes al antimicrobiano fueron 4/5 (80%) *E. faecalis* y 1/5 (20%) *E. faecium* (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009). En otro estudio sobre enterococos de quesos europeos se detectó 24% de resistencia a tetraciclina. Esta resistencia se observó en *E. faecalis* (33/45), *E. durans* (7/45), *E. faecium* (3/45), *E. gallinarum* (1/45) y 1/45 *E. casseliflavus* (Huys *et al.* 2004). La expresión de resistencia a tetraciclina podría estar asociada al empleo del antimicrobiano en Medicina Veterinaria. Este compuesto no es una de las opciones para enterococos de origen clínico humano, aunque su uso en terapéutica favorece la selección de cepas resistentes a este antimicrobiano (Hammerum 2012).

El 10,3% de los enterococos aislados en la presente tesis expresó ANRE. Este fenotipo de resistencia se detectó en *E. faecalis* (7,2%) y *E. faecium* (3,1%). Otros autores comunicaron una frecuencia de ANRE del 25,3% (24/95), presentando *E. faecalis* mayor porcentaje de resistencia de alto nivel que *E. faecium*, dado que 22/95 (23,2%) enterococos resistentes correspondieron a la primera especie y 2/95 (2,1%) a la segunda especie. Si bien las frecuencias de resistencia fueron superiores a las observadas en esta investigación coincidieron con respecto a las especies aisladas (Franz *et al.* 2001). Aunque frecuentemente gentamicina es

empleada en combinación con otros antimicrobianos para lograr un efecto sinérgico, estreptomicina también ha sido otro aminoglucósido recomendado para tratar infecciones causadas por enterococos administrada junto con agentes activos sobre la pared celular, debido a que no es hidrolizada por las mismas enzimas modificadoras de aminoglucósidos que actúan sobre la gentamicina (Arias *et al.* 2010).

El 9,1% de los enterococos recuperados procedentes de alimentos de origen animal presentó resistencia a ciprofloxacina. Para este antimicrobiano se observó una mayor frecuencia de resistencia en *E. faecium* (4,8%) que en *E. faecalis* (4,3%). En una investigación de alimentos listos para consumir se estudió la resistencia antimicrobiana de los enterococos aislados, detectándose resistencia a ciprofloxacina en 14/152 (29,9%) *E. faecium* aunque el 100% de los aislamientos de *E. faecalis* no presentó resistencia a este antimicrobiano (Baumgartner *et al.* 2001). Han sido detectados enterococos de origen animal con susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina como resultado de la aplicación de sistemas de producción mixtos. En estos sistemas se utiliza abono orgánico el cual actúa como reservorio de estos microorganismos (Petersen & Jensen 2004). Por lo expuesto, es posible considerar que la Medicina Veterinaria contribuye con la diseminación de la resistencia a ciprofloxacina.

Se observó la presencia de resistencia a linezolid (5,6%) en *E. faecalis* (50%) y *E. faecium* (50%) recuperados de los productos animales de la zona bajo estudio. En enterococos recuperados de alimentos de origen animal listos para consumir elaborados en Polonia se detectó una frecuencia de resistencia a linezolid del 1,1%, inferior a la comunicada en esta investigación. En el estudio polaco se recuperaron *E. faecalis* resistentes a linezolid aunque la totalidad de los aislamientos de *E. faecium* fueron susceptibles a este antimicrobiano (Chajęcka-Wierzchowska *et al.* 2012). Linezolid es un agente antimicrobiano nuevo con actividad frente a bacterias Gram positivas como los enterococos, particularmente *E. faecalis* y *E. faecium*. Su eficacia clínica ha sido estudiada en escasas infecciones humanas, sobre todo en aquellas producidas por bacterias multi-

resistentes (Pigrau & Almirante 2009). Sin embargo, se ha comunicado la existencia de enterococos resistentes a linezolid de origen ambiental. En un estudio realizado en Lituania el 1,0% de los aislamientos del género *Enterococcus* recuperados de animales de cría presentó resistencia a linezolid (Ruzauskas *et al.* 2009).

Se detectó resistencia a cloranfenicol en 4,8% de los enterococos aislados en la presente tesis. El 100% de los aislamientos cloranfenicol-resistentes fue caracterizado como *E. faecalis*. En un estudio sobre alimentos cárnicos y lácteos al determinar la presencia de enterococos resistentes a los antimicrobianos se observó que el 4,8% de aislamientos presentaba resistencia a cloranfenicol. En ese estudio, al discriminar a nivel de especie, se observó que el 100% de la resistencia se expresó en *E. faecalis* (Fracalanza *et al.* 2007). Este antimicrobiano se utiliza en terapéutica humana y ha sido empleado en Medicina Veterinaria. En una investigación publicada en 2009 sobre enterococos recuperados de animales destinados a la producción de alimentos, se observó resistencia a cloranfenicol en aislamientos provenientes de ganado bovino (8%) y de porcinos (24%), no detectándose resistencia a dicho antimicrobiano en pollos. Sin embargo, en otro estudio del año 2010 se comunicó que en el 6,9% de los enterococos recuperados de pollos se expresó resistencia a cloranfenicol (Ruzauskas *et al.* 2009, Ruzauskas *et al.* 2010).

En los alimentos de origen animal estudiados en la presente investigación se observó resistencia al β -lactámico ampicilina en el 48,1% de la especie *E. faecium* y en 4,2% del total de la especie *E. faecalis* recuperados. Otros autores han comunicado que en alimentos de origen animal la ampicilino-resistencia es más frecuente en *E. faecalis*. En enterococos aislados de alimentos elaborados en Brasil se detectó ampicilino-resistencia en el 11,1% del total de la especie *E. faecalis* aunque no se recuperó la especie *E. faecium* resistente al antimicrobiano. En enterococos recuperados de alimentos polacos se observó ampicilino-resistencia en 2,3% de los aislamientos de la especie *E. faecalis*, mientras que en productos animales de origen turco se detectó ampicilino-resistencia en las

especies *E. faecium* y *E. faecalis*, con frecuencias respectivas de 47% y 36% (Citak *et al.* 2005, Riboldi *et al.* 2009, Chajęcka-Wierzchowska *et al.* 2012).

En esta investigación se detectó resistencia a eritromicina en el 14,8% de los enterococos identificados como *E. faecium* y en el 11,5% de los tipificados como *E. faecalis*. En enterococos recuperados de alimentos elaborados en Brasil se observaron porcentajes similares de resistencia a eritromicina en *E. faecalis* (10%) y en *E. faecium* (9%) (Gomes *et al.* 2008). En otro estudio realizado en Brasil se detectó resistencia a este macrólido en un 13% de *E. faecium* y un 11,1% de *E. faecalis* (Riboldi *et al.* 2009).

En esta investigación se detectó resistencia a eritromicina en 1/1 (100%) *E. gallinarum* de origen alimentario, mientras que otros autores comunicaron resistencia a eritromicina en enterococos recuperados en animales que dan origen a alimentos de este tipo y no en el alimento propiamente dicho. En animales australianos se detectó resistencia a eritromicina en 2/13 (15,4%) de los aislamientos de *E. gallinarum* (Obeng *et al.* 2013).

El 14,5% de los aislamientos caracterizados como *E. faecalis* y el 9,9% de los tipificados como *E. faecium* recuperados en esta investigación expresaron ANRG. En alimentos de Brasil el 6,0% de los aislamientos identificados como *E. faecalis* presentó ANRG mientras que en *E. faecium* se observó la ausencia de expresión de resistencia de alto nivel a este antimicrobiano (Fracalanza *et al.* 2007). Otros autores que investigaron la resistencia antimicrobiana en productos tradicionales fermentados, comunicaron que en el 100% de los enterococos categorizados como *E. faecalis* y *E. faecium*, a pesar de expresar resistencia a múltiples antimicrobianos, no presentaron ANRG (Sánchez Valenzuela *et al.* 2013).

En la presente tesis se detectó únicamente resistencia a los glucopéptidos vancomicina y teicoplanina en la especie *E. faecium* (38,3%). En un estudio sobre enterococos recuperados de alimentos de origen animal, publicado en el año 2001, se observó una baja incidencia de *E. faecium* resistentes a vancomicina (2,1%) y no se recuperaron EVR tipificados como *E. faecalis* (Franz *et al.* 2001).

Aunque es poco frecuente, otros autores han detectado la expresión de resistencia a vancomicina en enterococos diferentes a *E. faecium*. En alimentos procedentes del sur de Brasil se recuperaron EVR (3,7%) aunque en esa investigación los aislamientos correspondieron a *E. faecalis* en su totalidad (Riboldi *et al.* 2009). En alimentos elaborados en Marruecos se detectó resistencia conjunta a vancomicina y teicoplanina en 1/15 (6,7%) *E. faecium* y en 1/23 (4,3%) *E. faecalis*. En esa investigación se aisló un *E. faecalis* resistente a vancomicina con susceptibilidad intermedia a teicoplanina aunque no se determinó el genotipo de resistencia a glucopéptidos (Sánchez Valenzuela *et al.* 2008).

En esta investigación se observó resistencia a tetraciclina en aislamientos de *E. faecium* (12,3%) y *E. faecalis* (10,9%). Al estudiar la resistencia antimicrobiana en enterococos de alimentos elaborados en Brasil se detectaron aislamientos resistentes a tetraciclina aunque el porcentaje de resistencia fue mayor para *E. faecalis* (33,3%) que para *E. faecium* (8,7%), discrepando con los resultados de esta tesis (Riboldi *et al.* 2009). En enterococos recuperados de alimentos de origen animal europeo se halló resistencia a tetraciclina en el 37% y 5% de los enterococos caracterizados como *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente (Huys *et al.* 2004).

En esta investigación se observó resistencia de alto nivel a estreptomicina en el 10,9% de los enterococos tipificados como *E. faecalis* y en el 9,9% de los identificados como *E. faecium*. En alimentos cárnicos y lácteos de Brasil se detectó exclusivamente ANRE en 25/179 (14,0%) *E. faecalis*. En ese estudio no se detectaron *E. faecium* con expresión de resistencia de alto nivel al aminoglucósido (Fracalanza *et al.* 2007). En una investigación posterior otros autores del mismo país comunicaron el aislamiento de *E. faecalis* y de *E. faecium* con porcentajes de ANRE del 18,5% y 9,3%, respectivamente (Riboldi *et al.* 2009).

En esta investigación se observó una situación diferente para la resistencia a ciprofloxacina pues este fenotipo lo expresó el 14,8% de los enterococos tipificados como *E. faecium* y el 6,7% de los caracterizados como *E. faecalis*. En coincidencia con lo detectado en la presente tesis, se comunicó una mayor

frecuencia de resistencia a ciprofloxacina para *E. faecium* (56,3%) con respecto a *E. faecalis* (27,7%) recuperados de productos animales europeos (Franz *et al.* 2001). Del mismo modo, una mayor prevalencia de resistencia a ciprofloxacina fue observada para *E. faecium* (75%) y *E. faecalis* (66,7%), siendo uno de los antimicrobianos con menor susceptibilidad para los enterococos recuperados de alimentos artesanales españoles (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

En la presente investigación se observó que el 8,6% de los aislamientos de *E. faecium* expresó resistencia a linezolid contraponiéndose al 4,2% de *E. faecalis* resistentes al antimicrobiano. La documentación disponible sobre resistencia a linezolid está referida principalmente a los enterococos aislados de animales criados para la producción de alimentos. En un estudio del año 2007 se investigó la resistencia a linezolid en enterococos de productos lácteos y cárnicos. La totalidad de los aislamientos de *E. faecium* fue susceptible a linezolid y lo mismo se observó para el 95% de los aislamientos de *E. faecalis*. A pesar de ello, el 0,5% de los enterococos de esta última especie presentó susceptibilidad disminuida a linezolid. Sin embargo, no pudo comprobarse si se produjo la selección de *E. faecalis* francamente resistentes a linezolid en este tipo de productos al no realizarse el seguimiento por parte de los autores (Fracalanza *et al.* 2007).

Se observó resistencia a cloranfenicol en el 7,3% de *E. faecalis* recuperados de alimentos de origen animal del área bajo estudio. Otros autores comunicaron la expresión de resistencia a este antimicrobiano en enterococos aislados de productos animales. A diferencia de los resultados expuestos en la presente investigación, en enterococos de alimentos europeos se detectó una incidencia del 63,8% de *E. faecalis* resistentes a cloranfenicol junto con el 10,4% de *E. faecium* cloranfenicol-resistentes (Franz *et al.* 2001). En otro estudio más reciente se observó un cuadro similar al presentado en esta tesis, pues un 7,4% de los aislamientos de *E. faecalis* expresó resistencia a cloranfenicol mientras que la totalidad de los aislamientos de *E. faecium* fue susceptible a este antimicrobiano (Riboldi *et al.* 2009).

En la presente tesis se observaron diferencias en el predominio de resistencia para los antimicrobianos en alimentos cárnicos y lácteos. Los enterococos ampicilino-resistentes y con resistencia a gluco péptidos se aislaron con mayor frecuencia de productos lácteos que cárnicos. En alimentos listos para consumir de Polonia también se detectó mayor frecuencia de *E. faecalis* ampicilino-resistentes en productos lácteos con respecto a derivados cárnicos. En cambio en productos artesanales estudiados en España se observó un mayor aislamiento de EVR de productos cárnicos con respecto a los alimentos lácteos (Chajęcka-Wierzchowska *et al.* 2012, Sánchez Valenzuela *et al.* 2013).

Los aislamientos que expresaron resistencia a gentamicina (alto nivel), eritromicina, tetraciclina, estreptomicina (alto nivel), ciprofloxacina, linezolid y cloranfenicol fueron recuperados mayoritariamente de alimentos cárnicos y en menor número de productos lácteos. Otros autores comunicaron la misma tendencia en alimentos cárnicos y lácteos de Brasil en los cuales observaron que los enterococos recuperados de productos cárnicos expresaron ANRG y ANRE en mayor medida que los aislados de alimentos lácteos (Fracalanza *et al.* 2007). En un estudio reciente sobre enterococos de productos artesanales españoles se detectó mayor resistencia a eritromicina en aislamientos de alimentos lácteos ($n = 14$) que en derivados cárnicos ($n = 4$) a diferencia de lo comunicado en la presente tesis. Estos investigadores detectaron una mayor prevalencia de resistencia a ciprofloxacina en enterococos recuperados de productos lácteos que en aquellos aislados de productos cárnicos (Sánchez Valenzuela *et al.* 2013). En enterococos de productos polacos se observaron frecuencias de resistencia a tetraciclina distintas de acuerdo a si se trataba de productos cárnicos o lácteos. En los aislamientos cárnicos se detectó 20,0% de resistencia a este antimicrobiano mientras que el 14,7% de los enterococos provenientes de alimentos lácteos expresó un fenotipo resistente a tetraciclina. En este estudio también se observó resistencia a linezolid en enterococos de alimentos cárnicos aunque la totalidad de los aislamientos de productos lácteos fue susceptible a ese antimicrobiano (Chajęcka-Wierzchowska *et al.* 2012). Otras investigaciones han demostrado que la resistencia a cloranfenicol es más frecuente en enterococos recuperados de

productos lácteos pues no se han recuperado aislamientos resistentes a este antimicrobiano provenientes de alimentos cárnicos (Sánchez Valenzuela *et al.* 2013).

En enterococos recuperados de salamines artesanales se detectó resistencia al antimicrobiano ampicilina (*E. faecalis* >*E. faecium*)* como también a tetraciclina (*E. faecalis* >*E. faecium*), ciprofloxacina (*E. faecium* >*E. faecalis*), eritromicina (*E. faecalis* >*E. faecium*), cloranfenicol (*E. faecalis*), linezolid (*E. faecalis* = *E. faecium*), vancomicina (*E. faecium*), teicoplanina (*E. faecium*), ANRG (*E. faecalis* >*E. faecium*) y ANRE (*E. faecalis* >*E. faecium*).

En los alimentos cárnicos y lácteos analizados en esta investigación se observó resistencia a los antimicrobianos ensayados con variaciones de acuerdo al tipo de producto.

En salamines artesanales españoles al evaluar la resistencia antimicrobiana de aislamientos de enterococos se observaron mayores porcentajes de resistencia a eritromicina, linezolid y tetraciclina en *E. faecalis* que en *E. faecium*. En cambio se detectaron con mayor frecuencia *E. faecium* ampicilino-resistentes, resistentes a ciprofloxacina y resistentes a glucopéptidos. A diferencia de lo observado en esta tesis, se recuperaron *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a cloranfenicol aunque no se aislaron enterococos con alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos (Martín *et al.* 2005). En otro estudio realizado para evaluar la calidad microbiológica de productos cárnicos fermentados portugueses se observó que los aislamientos de *E. faecalis* expresaron ANRG (10/20). Los autores comunicaron además que los enterococos presentaron resistencia a eritromicina, tetraciclina, vancomicina y ampicilina (Ribeiro *et al.* 2011). En las investigaciones mencionadas no se determinó si los enterococos recuperados presentaban ANRE pues el único aminoglucósido ensayado fue gentamicina.

*>: mayor, =: igual

En aislamientos de carne picada se observó resistencia a tetraciclina, ciprofloxacina, eritromicina, cloranfenicol, linezolid, alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos (gentamicina, estreptomina) exclusivamente en *E. faecalis*. Por su parte la resistencia al β -láctamico ampicilina como a los glucopéptidos vancomicina y teicoplanina se expresó únicamente en aislamientos caracterizados como *E. faecium*. En enterococos recuperados de carnes tunecinas se detectó resistencia a tetraciclina, eritromicina y ANRE. Los aislamientos resistentes a estos antimicrobianos fueron tipificados como *E. faecalis* y *E. faecium*. Se observó resistencia a cloranfenicol en *E. faecalis* y ANRG en un aislamiento de *E. faecium* (Kibi *et al.* 2013). En carnes estudiadas en Canadá se detectó un mayor número de *E. faecium* resistentes a cloranfenicol y eritromicina. La resistencia a tetraciclina fue más prevalente en *E. faecalis*. Igual número de aislamientos de *E. faecalis* y de *E. faecium* expresaron ANRE, aunque se detectó solamente resistencia a ciprofloxacina en *E. faecium* y ANRG en *E. faecalis* (Jahan *et al.* 2013). En otra investigación realizada en Canadá se evaluó el perfil de resistencia antimicrobiana en enterococos recuperados de carne de pollo, vaca, cerdo y pavo. En el 100% de los aislamientos no se detectó resistencia a linezolid o a glucopéptidos (Aslam *et al.* 2012). En un estudio reciente sobre ampicilino-resistencia, en enterococos de origen cárnico no se recuperaron aislamientos resistentes a este antimicrobiano (Sánchez Valenzuela *et al.* 2013).

En la presente tesis, enterococos recuperados de leche cruda de cabra expresaron resistencia a seis antimicrobianos. Se detectó resistencia a ciprofloxacina, eritromicina, vancomicina, teicoplanina, resistencia de alto nivel a gentamicina y a estreptomina. Los aislamientos resistentes fueron *E. faecium* en su totalidad. En alimentos artesanales procedentes de Marruecos se estudió la resistencia antimicrobiana de los enterococos recuperados. En aislamientos de *E. faecalis* provenientes de leche de cabra se observó la expresión de resistencia a ciprofloxacina y tetraciclina. No se detectó resistencia a eritromicina, cloranfenicol, vancomicina, teicoplanina, ANRG, ANRE y ampicilina (Sánchez Valenzuela *et al.* 2008).

En la presente investigación los enterococos recuperados de queso de cabra presentaron un perfil de resistencia antimicrobiana diferente al de los enterococos de leche de cabra. Los aislamientos de *E. faecium* expresaron resistencia a tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, glucopéptidos, alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos y ampicilina. Asimismo, un *E. faecalis* presentó resistencia de alto nivel a gentamicina. En enterococos recuperados de queso de cabra elaborado en Turquía se investigó la resistencia a vancomicina. En la totalidad de los aislamientos evaluados no se detectó la expresión de resistencia al antimicrobiano (Tuncer 2009). En quesos tradicionales y comerciales elaborados en Marruecos se aislaron *E. faecalis* que presentaron resistencia a eritromicina (2/7), tetraciclina (7/7), cloranfenicol (1/7), ciprofloxacina (5/7) y ANRE (3/7). No se detectó resistencia a estos antimicrobianos en *E. faecium* aislados de quesos de cabra. En un estudio posterior en quesos de cabra artesanales españoles los aislamientos caracterizados como *E. faecium* presentaron mayor frecuencia de resistencia que *E. faecalis* a eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacina. En cambio, se observó resistencia a cloranfenicol, vancomicina y teicoplanina únicamente en *E. faecalis*. En los estudios mencionados no se detectó ANRG o ampicilino-resistencia (Sánchez Valenzuela *et al.* 2008, Sánchez Valenzuela *et al.* 2013).

En la presente tesis los enterococos aislados de queso de oveja expresaron resistencia a linezolid (*E. faecium*), glucopéptidos (*E. faecium*), ANRG y ANRE (*E. faecalis*) y ampicilino-resistencia (*E. faecium* mayor que *E. faecalis*). En quesos de oveja de una región del sur de Argentina se aislaron *E. faecalis* y *E. faecium* en los cuales solamente se evaluó la resistencia a vancomicina, observándose que el 100% de los enterococos aislados no presentó resistencia al glucopeptido (Marguet *et al.* 2008). Otros autores realizaron un estudio más amplio de la resistencia antimicrobiana en enterococos recuperados de quesos de oveja (*Manchego*) elaborados en una región específica de España. No se observó resistencia a gentamicina o ampicilino-resistencia en la totalidad de los aislamientos; en un enterococo caracterizado como *E. faecalis* se detectó resistencia a vancomicina y los aislamientos de *Enterococcus* spp.

también presentaron resistencia a eritromicina, ciprofloxacina y cloranfenicol (Nieto-Arribas *et al.* 2011).

Los enterococos recuperados de queso de vaca en esta investigación presentaron resistencia antimicrobiana a todos los agentes ensayados. Se observó resistencia a tetraciclina (*E. faecalis* > *E. faecium*), ciprofloxacina (*E. faecium* > *E. faecalis*), eritromicina (*E. faecalis* = *E. faecium*), cloranfenicol (*E. faecalis*), linezolid (*E. faecalis* = *E. faecium*), glucopéptidos (*E. faecium*), ANRG (*E. faecalis* = *E. faecium*), ANRE (*E. faecium*) y ampicilina (*E. faecium*).

En enterococos de quesos de vaca artesanales españoles se observó mayor resistencia a ciprofloxacina y a vancomicina en *E. faecium* que en *E. faecalis*. En cambio, en aislamientos de *E. faecalis* fue superior la expresión de resistencia a eritromicina y a tetraciclina. Asimismo, se detectó ANRE en igual número de aislamientos de *E. faecalis* y de *E. faecium*. Se observó resistencia a teicoplanina exclusivamente en *E. faecium* (Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

En un estudio sobre enterococos recuperados de quesos franceses, al investigar el alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos, se observaron diferencias significativas de acuerdo al tipo de producto. Aislamientos de enterococos provenientes de quesos elaborados con leche cruda presentaron ANRE aunque no se expresó esta resistencia en aislamientos procedentes de quesos elaborados con leche pasteurizada (Jamet *et al.* 2012).

Al determinar la CIM de los aislamientos de enterococos de la presente investigación se observaron similitudes y diferencias con la prueba cualitativa de difusión en agar, si bien se comprobó una co-relación para los resultados de la mayoría de los aislamientos. En *E. gallinarum* se detectó susceptibilidad intermedia a vancomicina que fue luego confirmada por una CIM intermedia para este antimicrobiano. En cambio, un aislamiento tipificado como *E. faecium* fue considerado ampicilino-sensible por el método cualitativo mientras que la CIM para ese antimicrobiano lo clasificó como resistente. Ese aislamiento de *E. faecium* fue positivo para la prueba que permite detectar la producción de β -lactamasa. Este

hallazgo es de gran relevancia pues la resistencia a este antimicrobiano por este mecanismo es muy poco frecuente, incluso en enterococos productores de infecciones humanas (Arias *et al.* 2010).

En 56/114 (49,1%) enterococos de alimentos de origen animal estudiados en la presente investigación se detectó resistencia exclusivamente a un antimicrobiano. En orden decreciente los aislamientos mono-resistentes fueron tipificados como *E. faecalis* ($n = 32$), *E. faecium* ($n = 23$) y *E. gallinarum* ($n = 1$). Se observó una mayor recuperación de aislamientos mono-resistentes a partir de productos lácteos y en menor frecuencia de alimentos cárnicos. Los enterococos cárnicos provinieron de carne picada (57,9%) y de salami artesanal (42,1%). A nivel de especie se recuperaron *E. faecalis* de carne picada y salami artesanal. Los enterococos de origen lácteo se aislaron de queso de vaca (54,1%), de queso de oveja (43,2%) y de queso de cabra (2,7%). De queso de vaca se recuperaron en orden decreciente *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum* con mono-resistencia antimicrobiana. Se aislaron enterococos resistentes a un antimicrobiano de queso ovino (*E. faecium* en mayor número que *E. faecalis*) y de queso de cabra (*E. faecalis*).

En alimentos listos para consumir estudiados en Suiza se detectó resistencia a un antimicrobiano en el 25,5% (36/141) de los enterococos estudiados. Los aislamientos mono-resistentes fueron caracterizados como *E. casseliflavus* (34,8%), *E. durans* (26,3%) mientras que el 26,1% y 21,2% fueron tipificados como *E. faecium* y *E. faecalis*, respectivamente (Baumgartner *et al.* 2001). En alimentos de Marruecos se detectó resistencia a un antimicrobiano en un *E. faecalis* y dos *E. faecium* recuperados de productos lácteos (Sánchez Valenzuela *et al.* 2008). En otro estudio realizado en Costa Rica sobre enterococos de origen lácteo identificados como *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. gallinarum* no se observó la expresión de resistencia a un solo antimicrobiano (Araya *et al.* 2005).

En esta investigación se aislaron *E. faecalis* y *E. faecium* ampicilino-resistentes y *E. faecium* con resistencia a linezolid exclusivamente. Otros autores al estudiar la presencia de enterococos en alimentos cárnicos y lácteos no detectaron

ampicilino-resistencia en forma aislada sino en forma simultánea con resistencia a otros antimicrobianos (Baumgartner *et al.* 2001). En estudios previos se investigó la resistencia a linezolid expresada por enterococos recuperados de animales y de alimentos de ese origen. Sin embargo, solo se comunicaron las frecuencias de resistencia al antimicrobiano sin especificar si los aislamientos presentaron únicamente resistencia a linezolid (Martín *et al.* 2005, Ruzauskas *et al.* 2009).

En esta investigación se recuperaron enterococos de alimentos cárnicos y lácteos que expresaron mono-resistencia a otros antimicrobianos. En aislamientos de *E. faecalis* se detectó resistencia a tetraciclina (aislados de salami, carne picada, queso de vaca), ciprofloxacina (recuperados de carne picada), eritromicina (carne picada, queso de vaca), cloranfenicol (provenientes de carne picada, queso de vaca), ANRG (aislados de carne picada, queso de cabra, queso de oveja, queso de vaca) y ANRE (recuperados de carne picada, salami artesanal, queso de oveja). Se observó además mono-resistencia a ciprofloxacina en *E. faecium* (queso de vaca) y a eritromicina tanto en *E. faecium* como en *E. gallinarum* aislados de queso de vaca.

En alimentos de origen animal europeos recuperaron enterococos con resistencia individual a los antimicrobianos. Se observó resistencia a cloranfenicol (5/47), eritromicina (3/47), tetraciclina (2/47), ciprofloxacina (1/47), ANRG (1/47) y ANRE en *E. faecalis*. Se observó la expresión de mono-resistencia a ciprofloxacina (9/48) y a eritromicina (1/48) en aislamientos de *E. faecium*. Al igual que en esta investigación se detectó predominio de resistencia individual en *E. faecalis* con respecto a *E. faecium* (Franz *et al.* 2001). En el aislamiento de *E. gallinarum* de esta investigación se detectó resistencia a un antimicrobiano (eritromicina). Otros autores detectaron enterococos de esta especie en alimentos de origen animal aunque expresaron resistencia a múltiples antimicrobianos. En enterococos recuperados de leche un 50% de los aislamientos de *E. gallinarum* presentó resistencia a dos antimicrobianos y en el 50% restante se observó resistencia a cuatro o más compuestos (Araya *et al.* 2005).

En la presente tesis se observó la expresión de resistencia conjunta a dos o más antimicrobianos en el 23,0% de los aislamientos. Se detectó resistencia múltiple en un mayor número de *E. faecium* (31/58) que de *E. faecalis* (27/58) provenientes de alimentos cárnicos (53,4%) y lácteos (46,6%). En productos cárnicos y lácteos suizos se detectó resistencia simultánea a dos o más antimicrobianos en 41/157 (26,1%) enterococos. La mayor proporción de aislamientos multi-resistentes se observó en *E. faecium* (recuperados de salami artesanal, carne picada, leche de cabra, queso de cabra, queso de oveja, queso de vaca) seguida por *E. faecalis* (aislados de salami artesanal, carne picada, queso de vaca) aunque se recuperaron cinco *E. durans* con resistencia antimicrobiana múltiple (Baumgartner *et al.* 2001). En otra investigación se comunicó la expresión de resistencia simultánea a varios antimicrobianos en 25 aislamientos de productos animales sobre un total de 38 enterococos recuperados de alimentos de origen animal y vegetal. Los autores comunicaron que la multi-resistencia fue presentada en mayor proporción por aislamientos de *E. faecalis* que por los tipificados como *E. faecium*. Asimismo, a diferencia de lo observado en la presente tesis, los enterococos multi-resistentes fueron recuperados en mayor porcentaje de alimentos lácteos (72%) mientras que los restantes fueron de origen cárnico (Sánchez Valenzuela *et al.* 2008).

En esta investigación los aislamientos de enterococos de alimentos cárnicos y lácteos expresaron resistencia simultánea en un rango comprendido entre dos y ocho antimicrobianos. Se detectaron 24 perfiles de resistencia antimicrobiana múltiple. Se halló, en orden decreciente, resistencia conjunta a tres antimicrobianos (23/58), dos antimicrobianos (17/58), seis antimicrobianos (6/58), ocho antimicrobianos (6/58), cinco antimicrobianos (3/58), siete antimicrobianos (2/58) y cuatro antimicrobianos (1/58).

En un estudio reciente en el cual se caracterizaron enterococos aislados de productos de origen animal, al evaluar la resistencia a diez antimicrobianos, se encontraron 17 perfiles de multi-resistencia antimicrobiana. Los aislamientos

presentaron resistencia simultánea a cinco (15/30), tres (6/30), cuatro (5/30), dos (2/30), seis (1/30) o siete (1/30) antimicrobianos (Jamet *et al.* 2012).

En el conjunto de perfiles se observó resistencia a la totalidad de los antimicrobianos ensayados. Se debe destacar que se recuperaron aislamientos de EVR que presentaron resistencia simultánea a otros compuestos como ampicilina, tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, ANRG y ANRE. En una investigación donde se aislaron enterococos de productos cárnicos se detectó resistencia a vancomicina y teicoplanina en el 10,7% de los aislamientos. Además se observó resistencia simultánea a eritromicina, ANRG, ANRE aunque no se recuperaron enterococos ampicilino-resistentes (Messi *et al.* 2006). En enterococos productores de infecciones humanas la resistencia acompañante detectada fue similar a la observada en esta investigación. En un estudio multi-céntrico se detectó en EVR resistencia simultánea a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, ciprofloxacina, ampicilino-resistencia, ANRG y ANRE (Corso *et al.* 2007).

Los aislamientos de esta investigación presentaron ANRG y/o ANRE junto con resistencia a otros antimicrobianos no aminoglucósidos. Ciertos perfiles de multi-resistencia observados en esta tesis fueron comunicados por otros autores para enterococos recuperados de alimentos. En esta investigación se observó en forma conjunta ANRG y ANRE en *E. faecalis* de origen cárnico. En enterococos aislados de productos animales de Brasil se detectó en forma simultánea ANRG y ANRE en 3/294 (1,0%). Los enterococos que presentaron ese perfil de resistencia antimicrobiana fueron tipificados como *E. gallinarum*, aunque no se recuperaron *E. faecalis* con expresión simultánea de alto nivel de resistencia a los dos aminoglucósidos (Fracalanza *et al.* 2007).

En la presente tesis se detectó resistencia conjunta a tetraciclina, eritromicina y ANRG en *E. faecalis* provenientes de salami artesanal. Este perfil de resistencia fue observado en el 2,4% de *E. faecalis* aislados de productos cárnicos de Brasil y en 1/20 (5%) *E. faecalis* recuperados de productos cárnicos fermentados tradicionales elaborados en Portugal. En cambio, en esta investigación un *E. faecalis* recuperado de carne picada expresó ANRE con resistencia simultánea a

eritromicina y tetraciclina. En alimentos provenientes de Brasil, *E. faecalis* aislados de productos cárnicos (26,8%) y lácteos (16,7%) presentaron resistencia a esos antimicrobianos (Fracalanza *et al.* 2007, Ribeiro *et al.* 2011).

En un aislamiento de *E. faecalis* recuperado de salami artesanal se detectó resistencia a eritromicina y ANRE. Al investigar la multi-resistencia antimicrobiana en enterococos de alimentos brasileños se observó que el 2,4% de *E. faecalis* de origen cárnico y el 50% de los aislamientos de esta especie recuperados de productos lácteos presentaron ese perfil de resistencia antimicrobiana (Fracalanza *et al.* 2007).

En un *E. faecalis* aislado de salami artesanal se observó ANRG, ANRE, con resistencia asociada a eritromicina, ciprofloxacina, tetramicina y cloranfenicol. En enterococos recuperados de alimentos europeos se detectó este perfil de resistencia antimicrobiana múltiple en el 2,1% de los aislamientos de *E. faecalis* (Franz *et al.* 2001). Sin embargo, otros autores no aislaron enterococos de alimentos que expresaran ANRG junto con resistencia a cloranfenicol y a eritromicina; ANRG y ANRE en simultáneo con eritromicina, ciprofloxacina o ANRG y ANRE junto con eritromicina, ciprofloxacina y cloranfenicol (Franz *et al.* 2001, Fracalanza *et al.* 2007).

En esta investigación la mayoría de los perfiles de resistencia antimicrobiana múltiple observada en los aislamientos incluyeron a linezolid. Se detectó resistencia a este antimicrobiano en cinco fenotipos de resistencia antimicrobiana múltiple: 1) tetraciclina-linezolid, 2) tetraciclina-eritromicina-linezolid, 3) tetraciclina-ciprofloxacina-cloranfenicol-linezolid, 4) ciprofloxacina-eritromicina-tetraciclina-vancomicina-teicoplanina-linezolid, 5) eritromicina-tetraciclina-cloranfenicol-ANRG-ANRE-linezolid). Otros investigadores que evaluaron la susceptibilidad a linezolid en enterococos recuperados de alimentos de origen animal no comunicaron resistencia a este antimicrobiano (Fracalanza *et al.* 2007).

En esta investigación se recuperó un aislamiento de *E. faecalis* de queso de vaca que presentó resistencia simultánea a eritromicina y a ciprofloxacina. En cambio, en enterococos aislados de productos animales europeos se observó este

perfil de resistencia en el 6,2% de los aislamientos de *E. faecium* (Franz *et al.* 2001).

En la presente tesis un *E. faecalis* aislado de queso de vaca expresó resistencia conjunta a tetraciclina y a ciprofloxacina. En investigaciones realizadas en Marruecos y España no se recuperaron enterococos resistentes en forma conjunta a tetraciclina y a ciprofloxacina exclusivamente, aunque en 2/92 (2,2%) *E. faecium* aislados de pollos portugueses se detectó el fenotipo de resistencia tetraciclina-ciprofloxacina (Poeta *et al.* 2006a, Sánchez Valenzuela *et al.* 2008, Sánchez Valenzuela *et al.* 2009).

En la presente investigación dos aislamientos de *E. faecalis* de origen cárnico presentaron resistencia simultánea a tetraciclina y a eritromicina. Ese perfil es frecuentemente observado en enterococos recuperados de alimentos de origen animal. En un estudio sobre la resistencia a tetraciclina de enterococos recuperados de quesos europeos se observó que el 6% de *E. faecalis* resistentes a tetraciclina presentaba resistencia conjunta a eritromicina. Este fenotipo de resistencia se observó en *E. faecalis* (41,5%), *E. casseliflavus* (30%), *E. durans* (50%) y *E. gilvus* (100%) aislados de alimentos cárnicos comercializados en una región de Brasil. Asimismo, la resistencia conjunta a estos dos antimicrobianos se detectó en *E. faecalis* (5%) aislados de productos cárnicos fermentados portugueses (Huys *et al.* 2004, Fracalanza *et al.* 2007, Ribeiro *et al.* 2011).

En esta investigación se detectó resistencia simultánea a tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol en *E. faecalis* aislado de salami artesanal. En un estudio sobre enterococos recuperados de alimentos suizos listos para consumir se detectó este perfil de resistencia antimicrobiana en 7/52 (13,5%) de los aislamientos tipificados como *E. faecalis*. El 100% fue recuperado de productos lácteos. En otro estudio sobre alimentos lácteos europeos el 24,2% (8/33) de los enterococos aislados resistentes a tetraciclina (*E. faecalis*) expresó resistencia a eritromicina y a cloranfenicol en forma conjunta. En cambio, en un estudio sobre alimentos cárnicos y lácteos de Brasil se detectó resistencia simultánea a los tres antimicrobianos en *E. faecalis* (9,8%) recuperados de productos cárnicos. Este

perfil de multi-resistencia antimicrobiana no fue expresado por *E. faecalis* de origen lácteo (Baumgartner *et al.* 2001, Huys *et al.* 2004, Fracalanza *et al.* 2007).

El 12,7% de los enterococos recuperados de alimentos de origen animal estudiados en la presente tesis expresó en forma simultánea factores de virulencia y resistencia antimicrobiana, principalmente en *E. faecalis* (10,3%) y en menor medida en *E. faecium* (2,4%). Los aislamientos provinieron en mayor número de productos cárnicos que lácteos.

Aislamientos de EVR de origen cárnico y lácteo expresaron en forma simultánea gelatinasa y/o de Sustancia Agregativa. Asimismo, se observó en enterococos con alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos la producción de gelatinasa, hemolisina y Sustancia Agregativa en forma individual o conjunta. Se detectó la presencia de gelatinasa y Sustancia Agregativa junto con uno de los fenotipos de resistencia más frecuentes en enterococos de origen alimentario, tetraciclina-eritromicina. También se detectó resistencia a tetraciclina en forma simultánea con otros antimicrobianos y con Sustancia Agregativa.

Otros investigadores han observado algunas de las combinaciones de resistencia antimicrobiana y factores de virulencia que fueron detectadas en esta tesis.

En enterococos recuperados de productos cárnicos fermentados se observaron cuatro fenotipos de expresión simultánea de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana. Aislamientos de *E. faecalis* expresaron en forma simultánea combinaciones tales como gelatinasa-eritromicina-tetraciclina, gelatinasa-eritromicina-tetraciclina-vancomicina, y gelatinasa-eritromicina-ANRG-vancomicina (Ribeiro *et al.* 2011). En cambio, en enterococos recuperados de alimentos de origen europeo en 24/95 (25,2%) aislamientos se observó la expresión conjunta de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana aunque los fenotipos no coincidieron con los comunicados en la presente investigación (Franz *et al.* 2001). En un estudio realizado sobre enterococos de origen animal y humano en Corea del Sur se observó la expresión conjunta de alto nivel de resistencia a los

aminoglucoósidos, gelatinasa y hemolisina en *E. faecalis* recuperados de animales destinados a la producción de alimentos aunque no se detectó esta asociación en aislamientos de esas especies de origen humano (Han *et al.* 2011). En una investigación previa, en Estados Unidos, en *E. faecalis* de origen humano el 35,8% de los aislamientos presentó ANRG. Asimismo el 91,2% de los enterococos con ANRG presentó actividad hemolítica (Huycke *et al.* 1991).

En la presente tesis el 12,7% de los aislamientos de enterococos de productos animales estudiados fue categorizado para fenotipos de resistencia a glucopéptidos (objetivo 4) como VanA (12,3%) y VanC (0,4%). No se detectó la presencia de enterococos que expresaran el fenotipo VanB. El 100% de los EVR VanA (resistencia a vancomicina y a teicoplanina) fue tipificado como *E. faecium* de productos cárnicos y lácteos, mientras que el aislamiento con fenotipo VanC fue tipificado como *E. gallinarum* de origen lácteo. En un estudio en el que se caracterizaron EVR recuperados de alimentos de origen animal, los aislamientos cárnicos fueron asignados a los fenotipos VanA (10,7%), VanB (8,3%) y VanC (16%). En ese estudio observaron que el fenotipo VanA se detectó en aislamientos de cuatro especies: *E. faecium* (11/18), *E. faecalis* (3/18), *E. casseliflavus* (3/18) y *E. gallinarum* (1/18). En cambio, los EVR con fenotipo VanC fueron tipificados mayormente (16/27) como *E. gallinarum* (Messi *et al.* 2006).

El predominio del fenotipo VanA también se ha observado en aislamientos de *E. faecium* productores de infecciones clínicas en Argentina. En un estudio publicado en el año 2007 se comunicó que el 100% de los enterococos presentó resistencia a vancomicina aunque el 99,7% expresó resistencia a teicoplanina. Mediante técnicas moleculares se demostró que solamente un *E. faecium* era portador del determinante genético asociado con el fenotipo VanB (Corso *et al.* 2007). En una investigación previa se había observado que un aislamiento de *E. gallinarum* expresó el fenotipo VanA, a diferencia del recuperado en la presente investigación que fue categorizado como VanC (Togneri *et al.* 2003).

En la presente tesis la prevalencia de los aislamientos de enterococos fue variada de acuerdo a la especie y para los distintos tipos de alimentos de origen

animal estudiados. Para *E. faecium* y *E. faecalis* se observó una mayor prevalencia en alimentos lácteos que en productos cárnicos. Por su parte, los aislamientos de *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. raffinosus* fueron prevalentes únicamente en derivados lácteos. En estudios previos sobre enterococos aislados de alimentos de origen animal es escasa la información sobre la prevalencia en las muestras analizadas. En productos animales canadienses se observó que la especie más prevalente en alimentos cárnicos era *E. faecalis* pues se recuperó en un rango comprendido entre el 73% y más del 94% de las muestras estudiadas, seguido por los aislamientos de *E. hirae*, aunque se registraron bajas frecuencias de recuperación de *E. faecium* (Aslam *et al.* 2012).

CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis permitió:

- Aislar enterococos de alimentos de origen animal elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina
- Detectar una mayor positividad en muestras de origen cárnico (139/215) con respecto a las de origen lácteo (76/215).
- Caracterizar fenotípicamente enterococos a nivel de especie, resultando *E. faecalis* la especie más prevalente seguida por *E. faecium*, *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum* y *E. hirae*
- Demostrar la correlación entre la caracterización fenotípica mediante pruebas bioquímicas y los patrones de bandas de SDS-PAGE en el 100% de los aislamientos caracterizados como *E. faecalis* y *E. faecium*.
- Investigar la expresión de distintos factores de virulencia (producción de hemolisina, gelatinasa, Sustancia Agregativa, *biofilm*) en los aislamientos recuperados de los alimentos de origen animal
- Evaluar la evasión de la respuesta inmune del hospedador *in vitro* (muerte bacteriana por opsonofagocitosis y sensibilidad a la actividad bactericida del suero).
- Determinar el perfil de resistencia asociada a antimicrobianos de utilización clínica para *Enterococcus* spp. mediante pruebas de sensibilidad *in vitro*, cualitativas (difusión en agar, producción de beta-lactamasa) y cuantitativas (Concentración Inhibitoria Mínima).
- Categorizar los fenotipos de resistencia a glucopéptidos en los aislamientos de alimentos de origen animal
- Detectar la expresión simultánea de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en los aislamientos provenientes de alimentos de origen animal
- Establecer la prevalencia de *Enterococcus* spp. en las muestras analizadas

Al realizar el análisis comparativo de los resultados obtenidos en este estudio con los comunicados por otros autores se observó una tendencia en investigaciones previas de no co-relacionar la portación de determinantes genéticos de virulencia con su expresión. Esto puede llevar a una ponderación inexacta de la presencia

de aislamientos de enterococos productores de factores de virulencia pues se ha demostrado que la presencia de los determinantes de virulencia no redundan indefectiblemente en su detección fenotípica. Esta discrepancia genotípica-fenotípica contribuye a favor de la necesidad de realizar pruebas fenotípicas para evaluar la producción de factores de virulencia y no limitarse a la detección de los genes codificantes mediante técnicas moleculares, como ha sido observado en los últimos años en las investigaciones de la inocuidad de los enterococos de alimentos de origen animal. Por lo tanto, se enfatiza la relevancia de las pruebas fenotípicas en el estudio de la contribución de los factores de virulencia en la patogenicidad de los enterococos.

La recuperación de enterococos productores de hemolisina a partir de alimentos de origen animal debe ser tomada en cuenta al momento de evaluar la inocuidad de estos productos pues como se ha mencionado previamente, este factor de virulencia puede estar codificado por elementos genéticos móviles. La existencia de los determinantes genéticos de hemolisina como parte integrante de material extracromosómico posibilita su transferencia horizontal contribuyendo a su diseminación hacia bacterias no patógenas y a la generación de reservorios que permiten su persistencia.

Al evaluar la capacidad de evasión de la respuesta inmune por parte de los enterococos provenientes de alimentos de origen animal los resultados obtenidos sugieren que en los aislamientos investigados no hubo expresión de componentes polisacáridos capsulares o estos aislamientos no poseen los determinantes genéticos que los codifican.

Al investigar el perfil de resistencia antimicrobiana de los enterococos recuperados de alimentos de origen animal mediante la prueba cualitativa de difusión en agar se observó resistencia a todos los compuestos ensayados.

El alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos, principalmente a gentamicina, constituye un motivo de preocupación en el ámbito de la Salud Pública Humana. La expresión de esta resistencia tiene como consecuencia la pérdida del

sinergismo entre los aminoglucósidos y compuestos que actúan sobre la pared celular bacteriana tales como ampicilina y vancomicina. Estas combinaciones de antimicrobianos son empleadas para el tratamiento de cuadros infecciosos graves como la endocarditis causada por enterococos

El EVR ha sido declarado como una problemática acuciante de Salud Pública debido a su creciente prevalencia y a la presencia de resistencia acompañante. En Argentina se han comunicado aislamientos de EVR con resistencia antimicrobiana múltiple productores de cuadros infecciosos, siendo mayor en *E. faecium* que en *E. faecalis*, coincidiendo con lo comunicado para los enterococos de origen alimentario.

Al analizar las frecuencias de resistencia a los antimicrobianos se observaron diferencias para los compuestos a nivel intra-especie, tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*.

En los alimentos cárnicos y lácteos analizados en esta investigación se observó resistencia a los antimicrobianos ensayados con variaciones de acuerdo al tipo de producto. Los enterococos ampicilina-resistentes y con resistencia a glucopéptidos se aislaron con mayor frecuencia de productos lácteos que cárnicos.

El aislamiento de enterococos en alimentos de origen animal resistentes a los antimicrobianos ensayados refuerza la posibilidad de la diseminación de la resistencia a los seres humanos a través de la cadena alimentaria. Está demostrada la portación intestinal transitoria en humanos de enterococos resistentes a los antimicrobianos de productos animales.

En la región estudiada del Centro de la Provincia de Buenos Aires no se cuenta con resultados previos en alimentos de origen animal que permitan realizar un análisis comparativo, para determinar si se produjo un incremento, mantenimiento o disminución de la presencia de *Enterococcus* spp. recuperados de alimentos cárnicos y lácteos elaborados a nivel local. En esta tesis no fue posible evaluar el papel de los factores ambientales sobre la presencia de enterococos en la microbiota de los alimentos, pues solo se tuvo acceso a los productos de origen

animal terminados. No fue posible realizar tomas de muestras para estudiar al equipamiento o al personal involucrado en la elaboración de los alimentos. Estas consideraciones deberían ser tenidas en cuenta a la hora de realizar futuras investigaciones.

Con este estudio se realizó un importante aporte al conocimiento sobre el papel de los alimentos de origen animales elaborados artesanalmente en una región del Centro de la Provincia de Buenos Aires como potenciales reservorios de enterococos que expresan factores de virulencia y/o múltiple resistencia antimicrobiana. Estos microorganismos pueden transmitirse a los seres humanos a través de la cadena alimenticia, constituyendo un importante riesgo para la Salud Pública. La vigilancia de la resistencia antimicrobiana y de los factores de virulencia en enterococos aislados de alimentos artesanales de origen animal es fundamental para preservar el valor terapéutico de los antimicrobianos y detectar la presencia de componentes que contribuyen con la patogenia de las infecciones causadas por estas bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alós JI. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27: 290-297.
2. Alves PI, Martins MP, Semedo T, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Barreto Crespo MT. Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2004; 85: 237-252.
3. Andrighetto C, Kniff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J Dairy Res*. 2001; 68: 303-316.
4. Araya M, Davidovich G, Chavez C, Arias ML. Identificación de *Enterococcus* sp. en muestras de leche cruda del área metropolitana de Costa Rica y evaluación del patrón de sensibilidad a antibióticos. *Arch Latinoam Nutr*. 2005; 55: 161–166.
5. Arduino RC, Murray BE, Rakita RM. Roles of antibodies and Complement in phagocytic killing of enterococci. *Infect Immun*. 1994; 62: 887-893.
6. Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16: 555–562.
7. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10: 266-278.
8. Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk S, 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: 222-230.
9. Baumgartner A, Kueffer M, Rohner P. Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in various ready-to-eat foods. *Arch Liebensm Hyg*. 2001; 52:16–19.
10. Barbosa J, Gibbs PA, Teixeira P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*. 2010; 21: 651-656.
11. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9th ed. Holt JG (Ed.). Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 1994.

12. Bertrand X, Mulin B, Viel JF, Thouverez M, Talon D. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. Food Microbiol. 2000; 17: 543-551.
13. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27: 44-52.
14. Cercenado E. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29: 59-65.
15. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 686–707.
16. Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Nalepa B, Laniewska-Trokenheim L. Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in ready-to-eat food of animal origin. African J Microbiol Res. 2012; 6: 6773-6780.
17. Citak S, Yucel N, Mendi A. Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. J Food Process Preserv. 2005; 29: 183-195.
18. Clewell D.B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. Cell. 1993; 73: 9–12.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Approved standard. M7-A5. Wayne, PA. 2000.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for disk diffusion antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. CLSI. Document M2-A9. Wayne, PA. 2006.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22nd informational supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA. 2012.

22. Cobos-Trigueros N, Oteka A, Pitart C, Vila J. Macrólidos y cetólidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27: 412-418.
23. Coburn PS, Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolyisin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol.* 2003; 5: 661-669.
24. Colombo E, Franzetti L, Frusca M, Scarpellini M. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid Bacteria isolated from artisanal Italian goat cheese. *J Food Prot.* 2010; 73: 657-662.
25. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food, 4th ed., American Public Health Association. Washington D.C., Estados Unidos. 2001.
26. Corso AC, Gagetti PS, Rodríguez MM, Melano RG, Ceriana PG, Faccione DG, Galas MF. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int J Infect Dis.* 2007; 11: 69–75.
27. de Niederhäusern S, Bondi M, Messi P, Iseppi R, Sabia C, Manicardi G, Anacarso I. Vancomycin resistance transferability from VanA enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol.* 2011; 62: 1363–1367.
28. Devriese L, Baele M, Butaye P. The genus *Enterococcus*: taxonomy. En: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria.* Vol 4. Pp. 163-174. Dworkin M, Falkow M, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt (Eds.). New York, NY: Springer. 2006.
29. Dice LR. Measures of amounts of ecologic association between species. *Ecology.* 1945; 26: 297-302.
30. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, Chow JW, Bartlett P, Jones R, Joyce K, Rossiter S, Gay K, Johnson J, Mackinson C, Debess E, Madden J, Angulo F, Zervos MJ. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: Evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:1109–1113.

31. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:167-193.
32. Drahovská H, Slobodníková L, Kocinková D, Seman M, Končecová R. Antibiotic resistance and virulence factors among clinical and food enterococci isolated in Slovakia. *Folia Microbiol.* 2004; 49: 763-768.
33. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 1628-1635.
34. Engelbert M, Mylonakis E, Ausubel FM, Calderwood SB, Gilmore MS. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun.* 2004; 72: 3628-3633.
35. Euzéby P. Genus *Enterococcus*. En: List of prokaryotic names with standing in nomenclature.2013. Disponible en: www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html
Acceso: 05 de julio de 2013.
36. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 731-734.
37. Faría Reyes JF, Valero Leal K, Izquierdo Córser P, García Urdaneta A, Allara Cagnasso M. Resistencia a los antimicrobianos de Enterococos aislados de leche cruda. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2002; 12: 29-35.
38. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009; 155: 1749-1757.
39. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106: 1–24.
40. Fracalanza SAP, Scheidegger EMD, dos Santos PF, Leitte PC, Teixeira LM. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and

pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 853–859.

41. 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: 4385-4389.

42. Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol. 2003; 88: 105-122.

43. Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int J Food Microbiol. 2011; 151: 125-140.

44. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005–2008). Braz J Infect Dis. 2009; 13: 90–98.

45. Garza Velasco R, Hernández Acosta K, Mejía Chávez AG. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. Lab Acta. 2002; 14:11-20.

46. Gelsomino R, Vancanneyt M, Cogan TM, Condon S, Swings J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 3560-3565.

47. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. Int J Food Microbiol. 2003; 88: 215-222.

48. Ghezán G, Acuña AM. Caracterización y evolución de las agroindustrias alimentarias regionales. Área de influencia del Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS). Boletín Técnico. 2007; 158. Balcarce, Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA).

49. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, Franco BDGM, De Martinis ECP. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 2008; 25: 668–675.
50. Hammerum AM. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 619-625.
51. Han D, Unno T, Jang J, Lim K, Lee SN, Ko GP, Sadowsky MJ, Hur HG. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. *Int J Food Microbiol.* 2011; 144: 387-392.
52. Harvey BS, Baker CJ, Edwards MS. Contributions of Complement and immunoglobulin to neutrophil-mediated killing of enterococci. *Infect Immun.* 1992; 60: 3635-3640.
53. Hayes JR, English LL, Carter PJ, Poescholdt T, Lee KY, Wagner DD, White DG. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 68: 7153-7160.
54. Hayes JR, English LL, Carr LE, Wagner DD, Joseph SW. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 6006-6011.
55. Herrera Mendoza MT. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova.* 2004; 2: 71-80.
56. Hufnagel M, Koch S, Kropec A, Huebner J. Opsonophagocytic assay as a potentially useful tool for assessing safety of enterococcal preparations. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88: 263-267.
57. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35:1626–1634.

58. Huys G, D`Haene K, Collard JM, Swings J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 1555-1562.
59. Jahan M, Krause DO, Holley RO. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *Int J Food Microbiol.* 2013; 163: 189-195.
60. 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: 191-198.
61. Jurkovič D, Križková L, Dušinský R, Belicová A, Sojka M, Krajčovič J, Ebringer L. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Lett Appl Microbiol.* 2006; 42: 553-559.
62. Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88: 255–262.
63. Kibi N, ben Said L, Jouini A, ben Slama K, López M, ben Sallem R, Boudabous A, Torres C. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Science.* 2013; 93: 675-680.
64. Kuch A, Willems RJL, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Sundsfjord A, Klare I, Ruiz-Garbajosa P, Simonsen GS, van Luit-Asbroek M, Hryniewicz W, Sadowy E. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 551-558.
65. Littvik AM, López TN, González SE, Fernández CM, Pavan JV. Colonization with vancomycin-resistant enterococci (VRE) in intensive care unit patients in Cordoba City, Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2006; 38: 28-30.

66. 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: 555-563.
67. Malek R, El-Attar A, Mohamed M, Anwar S, El-Soda M, Béal C. Technological and safety properties display biodiversity among enterococci isolated from two Egyptian cheeses, “Ras” and “Domiat”. *Int J Food Microbiol.* 2012; 153: 314-322.
68. Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioq Clin Latinoam.* 2008; 42: 543-548.
69. Martín B, Garriga M, Hugas M, Aymerich T. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J Appl Microbiol.* 2005; 98: 1177-1190.
70. Martín B, Corominas L, Garriga M, Aymerich T. Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *J Appl Microbiol.* 2009; 106: 66-77.
71. Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2009; 132: 24-32.
72. 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: 115-133.
73. McGowan LL, Jackson CR, Barrett JB, Hiott LM, Fedorka-Cray PJ. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables and meats. *J Food Prot.* 2006; 69: 2976-2982.
74. Merquior VLC, Peralta JM, Facklam RR, Teixeira LM. Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterisation of *Enterococcus* species. *Curr Microbiol.* 1994; 28: 149-153.

75. Messi P, Guerrieri E, de Niederhäusern S, Sabia C, Bondi M. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *Int J Food Microbiol.* 2006; 107: 218–222.
76. Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos y polimixinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27: 178-188.
77. Moraes PM, Perin LM, Todorov SD, Silva Jr A, Franco BDGM, Nero LA. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *J Appl Microbiol.* 2012; 113: 318-328.
78. Morandi S, Brasca M, Adrighetto C, Lombardi A, Lodi R. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. *Int Dairy J.* 2006; 16: 867-875.
79. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 513-522.
80. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3: 46-65.
81. Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón R, Cabezas L, Pallop L. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol.* 2011; 28: 891-899.
82. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. Comparison of antimicrobial resistance patterns in enterococci from intensive and free range chickens in Australia. *Avian Pathol.* 2013; 42: 45-54.
83. Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008; 126: 291–301.
84. Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, Carrillo C, Merentes A, Guzmán M, Adachi JA, Murray BE, Arias CE. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: A prospective multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 1562–1569.

85. Paoletti C, Foglia G, Princivalli MS, Magi G, Guaglianone E, Donelli G, Pruzzo C, Biavasco F, Facinelli B. Co-transfer of *vanA* and aggregation substance genes from *Enterococcus faecalis* isolates in intra- and interspecies matings. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 1005-1009.
86. Pelkonen S, Finne J. A rapid turbidimetric assay for the study of serum sensitivity of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1987; 42: 53-57.
87. Petersen A, Jensen LB. Analysis of *gyrA* and *parC* mutations in enterococci from environmental samples with reduced susceptibility to ciprofloxacin. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 231: 73-76.
88. Petrantonio M, Acuña AM, Goizueta M. Entramado Institucional y Dinámica de las MiPyMEs Agroindustriales: Dos Estudios de Casos. Primer Congreso Argentino de Estudios Sociales de la Ciencia y la Tecnología. San Martín, Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), 2007.
89. Pigrau C, Almirante B. Oxazolidinonas, glucopéptidos y lipopéptidos cíclicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27: 236-246.
90. Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* 2006a; 27: 131-137.
91. Poeta P, Costa D, Klibi N, Rodrigues J, Torres C. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and β -haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006b; 53: 203-208.
92. Prakash VP, Rao SR, Parija SC. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 14.
93. Psoni L, Kotzanamides C, Andrighetto C, Lombardi A, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int J Food Microbiol.* 2006; 109: 109-120.

94. Ramírez MS, Tomalsky M. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010; 13: 151–171.
95. Ribeiro T, Oliveira M, Fraqueza MJ, Lauková A, Elias M, Tenreiro R, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. Antibiotic resistance and virulence factors among enterococci isolated from Chouriço, a traditional Portuguese dry fermented sausage. *J Food Protect.* 2011; 74: 465-469.
96. Riboldi GP, Frazzon J, Alves d’Azevedo P, Guedes Frazzon P. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* isolated from food in southern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2009; 40: 125–128.
97. Rojas Espinosa O, Arce Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias: Segunda parte. *Bioquímica.* 2004; 29: 18-31.
98. Ruzauskas M, Virgailis M, Šlugždinienė R, Sužiedėlienė V, Daugelavičius R, Zieinius D, Šengaut J, and Pavilonis A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from livestock in Lithuania. *Vet Arhiv.* 2009; 79: 439-449.
99. Ruzauskas M, Suziedeliene E, Siugzdiniene R, Seputiene V, Povilonis J. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. spread in poultry products in Lithuania. *J Food Safety.* 2010; 30: 902-915.
100. Sánchez Valenzuela A, ben Omar N, Abriouel H, Lucas López R, Ortega E, Martínez Cañamero M, Gálvez A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 2648–2652.
101. Sánchez Valenzuela A, ben Omar N, Abriouel H, Lucas López R, Veljovic K, Martinez Cañamero M, Topisirovic MKL, Gálvez A. Virulence factors, antibiotic resistance and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control.* 2009; 20: 381–385.
102. Sánchez Valenzuela A, Lavilla Lerma L, ben Omar N, Gálvez A, Pérez Pulido R, Abriouel H. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of

Enterococcus faecalis and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. Foodborne Pathog Dis. 2013; 10: 143-149.

103. Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tereiro R, Barreto Crespo MT. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. J Clin Microbiol. 2003; 41: 2569-2576.

104. Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. J Infect Dis. 1998; 178: 1416-1420.

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

106. Sparo MD, Mallo RA. Evaluación de la flora bacteriana en un ensilado natural de maíz. Rev Argent Microbiol. 2001; 33: 75–80.

107. Sparo M, Nuñez GG, Castro M, Calcagno ML, García Allende MA, Ceci M, Najle R, Manghi M. Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121 and its effects as additive on craft dry fermented sausages. Food Microbiology. 2008; 25:607-615.

108. Sparo MD, Corso A, Gagetti P, Delpech G, Ceci M, Confalonieri A, Urbizu L, Sánchez Bruni SF. *Enterococcus faecalis* CECT712: biopreservation of crafted goat cheese. Int J Prob Preb. 2012; 7: 145-152.

109. Stratton CW. Cloramphenicol. Antimicrob Infect Dis Newsletter. 2002; 18: 89-91.

110. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clín. 2009; 27: 116-129.

111. Taylor PW. Sensitivity of some smooth strains of *Escherichia coli* to the bactericidal action of normal human serum. J Clin Path. 1974; 27: 625-629.

112. Templer SP, Baumgartner A. Enterococci from Appenzeller and Schabziger raw milk cheese: Antibiotic resistance, virulence factors and persistence of particular strains in the products. *J Food Prot.* 2007; 70: 450–455.
113. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Moll Life Sci.* 2003; 60: 2622-2636.
114. Thurlow LR, Chittezhram Thomas V, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2010; 78: 4936-4943.
115. Togneri A, Lopardo H, Corso A. Bacteriemia por *Enterococcus gallinarum* con alto nivel de resistencia a glucopéptidos: primer caso documentado en Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2003; 35: 96-99.
116. Toledo C, Pérez ME, Rocchi M, Gribaudo G, Mangiaterra S, Monterisi A. Aislamiento de especies de enterococos cuasantes de infecciones y su sensibilidad a los antimicrobianos. *Rev Argent Microbiol.* 2004; 36: 31–35.
117. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 4538-4545.
118. Tuncer Y. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish Tulum cheese. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8: 7008–7016.
119. Van der Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 14: 315-319.
120. Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 2010: 122-130.

121. Vignaroli C, Zabdry G, Aquilanti L, Pasquaroli S, Biavasco F. Multi-drug resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol.* 2011; 62:1438–1447.

122. Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol.* 2003; 185: 3613-3623.

123. Zeng J, Teng F, Murray BE. Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized human enterocyte-like T84 cells. *Infect Immun.* 2005; 73: 1606-1612.

GLOSARIO

AAC: aminoglucósido N-acetil transferasas

ABC: agar base Columbia

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMP: ampicilina

ANRE: alto nivel de resistencia a estreptomicina

ANGE: alto nivel de resistencia a gentamicina

ANT: aminoglucósido-O-nucleotidil transferasas

APH: aminoglucósido-O-fosfotransferasas

APS: persulfato de amonio

ARN: ácido ribonucleico

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

ATCC: american Type Culture Collection

ATM: antimicrobiano

BEA: bilis esculina azida

BHI: infusión cerebro-corazón

C: átomos de carbono

°C: grados Celsius

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIM_{str}: concentración inhibitoria mínima para estreptomicina

CIM_{gen}: concentración inhibitoria mínima para gentamicina

CIP: ciprofloxacina

CLSI: clinical and Laboratory Standards Institute

CMP: cloranfenicol

CO₂: dióxido de carbono

CTA: cisteína tripteína agar

csp: cantidad suficiente para

DO: densidad óptica

ERY: eritromicina

EVR: enterococos vancomicina-resistentes

g: gramo

Gel: gelatinasa

GEN: gentamicina

h: horas

Ha: carne picada para elaboración de hamburguesas

Hem: hemolisina

I: intermedio

Lc: leche de cabra

LZD: linezolid

mg: miligramo

µg: microgramo

mM: mili molar

M: molar

MgCl₂: cloruro de magnesio

MH: caldo Mueller-Hinton

MHA: agar Mueller-Hinton

min: minuto

mL: mililitro

µL: microlitro

mm: milímetro

n: número

N/D: no declarado

nm: nanometro

PAGE: electroforesis vertical con gel de poliacrilamida

PBP: penicillin binding protein

PBS: buffer fosfato salino

PMNs: leucocitos polimorfonucleares

p/V: relación peso-volumen

Qc: queso de cabra

Qo: queso de oveja

Qv: queso de vaca

R: resistente

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

S: sensible

Sa: salamín artesanal

SA: sustancia agregativa

SDS: dodecilsulfato de sodio

STR: estreptomicina

TEI: teicoplanina

TEMED: N, N, N', N' tetrametiletildiamina

TET: tetraciclina

TS: caldo tripteina soja

TSA: agar tripteina soya

UFC: unidades formadoras de colonias

van: gentoipo de resistencia a glucopéptidos

Van:fenotipo de resistencia a glucopéptidos

VAN: vancomicina

ÍNDICE DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS

TABLAS

1. Distribución de alimentos cárnicos y lácteos obtenidos en cada serie de muestreo	35
2. Cepas de referencia utilizadas para electroforesis en gel de poliacrilamida	51
3. Puntos de corte para los antimicrobianos ensayados mediante la prueba de difusión en agar	56
4. Criterios de interpretación para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima	58
5. Distribución de especies de enterococos recuperados de productos cárnicos y lácteos	66
6. Distribución de enterococos recuperados de productos cárnicos	66
7. Aislamientos de enterococos recuperados de productos lácteos	67
8. Producción de hemolisina en enterococos aislados de productos artesanales cárnicos y lácteos	70
9. Detección de gelatinasa en enterococos aislados de productos artesanales cárnicos y lácteos	71
10. Producción de Sustancia Agregativa en enterococos aislados de productos artesanales cárnicos y lácteos	71
11. Producción asociada de hemolisina y gelatinasa en enterococos aislados de alimentos de origen animal	74
12. Producción asociada de hemolisina y Sustancia Agregativa en enterococos aislados de alimentos de origen animal	74
13. Producción asociada de gelatinasa y Sustancia Agregativa en enterococos aislados de alimentos de origen animal	75
14. Producción asociada de hemolisina, gelatinasa y Sustancia	76

Agregativa en enterococos aislados de alimentos de origen animal	
15. Resistencia antimicrobiana <i>invitro</i> cualitativa en enterococos aislados de alimentos artesanales de origen animal	77
16. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp. aislados de salamines artesanales	79
17. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp. aislados de carne picada	80
18. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp. aislados de leche de cabra	80
19. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp. aislados de queso de cabra	80
20. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp. aislados de queso de oveja	80
21. Perfil cualitativo de resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp. aislados de queso de vaca	80
22. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) paraampicilina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	83
23. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) paratetraciclina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	84
24. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para ciprofloxacina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	85
25. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para eritromicina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	86
26. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para cloranfenicol en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	86
27. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para linezolid en	86

aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	
28. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para gentamicina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	87
29. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para estreptomycinina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	88
30. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para vancomicina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes o con susceptibilidad intermedia en la prueba de difusión en agar	88
31. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para teicoplanina en aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de productos cárnicos y lácteos, resistentes en la prueba de difusión en agar	89
32. Aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. con resistencia conjunta a dos o más antimicrobianos de acuerdo al tipo de alimento de origen animal	91
33. Perfiles de resistencia a dos antimicrobianos en aislamientos de enterococos de alimentos de origen animal	92
34. Perfiles de resistencia a tres antimicrobianos en aislamientos de enterococos de alimentos de origen animal	94
35. Resistencia a cinco antimicrobianos en <i>E. faecalis</i> recuperados de alimentos de origen animal	95
36. Perfiles de resistencia a seis antimicrobianos en aislamientos de enterococos de alimentos de origen animal	96
37. Distribución de aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. de alimentos de origen animal con expresión simultánea de factores de virulencia y de resistencia antimicrobiana	97
38. Fenotipos de virulencia y resistencia antimicrobiana de aislamientos de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> recuperados de productos cárnicos y lácteos	98

39. Fenotipos de resistencia a glucopéptidos en <i>Enterococcus</i> spp. aislados de alimentos artesanales de origen animal	101
---	-----

CUADROS

1. Pruebas para la caracterización fenotípica de <i>Enterococcus</i> spp nivel de especie	6 a
---	-----

FIGURAS

1. Ubicación taxonómica del género <i>Enterococcus</i>	3
2. Esquema representativo de un <i>biofilm</i>	14
3. Estructura de las penicilinas	19
4. Mecanismo de acción de glucopéptidos	20
5. Estructura de un antimicrobiano aminoglucósido	22
6. Estructura del antimicrobiano macrólido eritromicina	24
7. Estructura base de las quinolonas	25
8. Estructura del antimicrobiano linezolid	26
9. Estructura de la tetraciclina	28
10. Estructura del antimicrobiano coloranfenicol	29
11. Región del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Partidos de Azul, Olavarría y Tandil	30
12. Áreas geográficas de comercialización de productos cárnicos y lácteos externas a la región de elaboración en la Provincia de Buenos Aires, Argentina	31
13. Región bajo estudio del Centro de la Provincia de Buenos Aires	34
14. Cultivo bacteriano puro en Agar Tripteína Soya	65
15. Pruebas bioquímicas para la caracterización fenotípica del género <i>Enterococcus</i>	65
16. Perfiles de proteínas totales mediante SDS-PAGE de aislamientos de enterococos de alimentos artesanales de origen animales y de cepas de referencia	69
17. Producción de factores de virulencia en aislamientos de enterococos provenientes de alimentos artesanales de	73

origen animal

18. Antibiógramas por difusión en agar de enterococos recuperados de alimentos artesanales de origen animal.

78