

Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia

Virulence Factors of *Enterococcus* Strains Isolated from Wild Birds and Poultry in Patagonia

Ledesma P¹, Parada RB², Vallejo M², Marguet ER^{2*}

¹Cátedra de Química Orgánica; ²Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB). Roca 115, (9100) Trelew, Argentina. *Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: emarguet@yahoo.com.ar

Resumen: En este estudio se analizaron la frecuencia y la distribución de la resistencia a vancomicina y de factores de virulencia en cepas del género *Enterococcus* aisladas de muestras de materia fecal de aves silvestres y aves de corral. Un total de 128 aislamientos de enterococos fueron recuperados utilizando medios de cultivo selectivos a partir de 250 muestras de materia fecal. Dentro de las cepas que exhibieron al menos uno de los factores de virulencia estudiados, *Enterococcus faecalis* fue la especie más frecuentemente detectada (30 cepas), seguida por *E. faecium* (23 cepas), *E. durans/hirae* (3 cepas) y *E. avium* (1 cepa). Al evaluar la presencia de factores de virulencia se encontraron 16 cepas β -hemolíticas, mientras que 47 cepas exhibieron actividad gelatinasa. Mediante el uso de métodos estándares se detectaron 17 cepas resistentes a vancomicina. Sin embargo, la presencia de los genes *vanA*, *vanB* y *vanC* no pudo ser confirmada mediante técnicas de PCR. Estos datos sugieren que las aves silvestres, así como las aves de corral, tienen la posibilidad de dispersar en el ambiente cepas de *Enterococcus* que albergan factores de virulencia, con potencial de transferir estos factores tanto a otros animales como a seres humanos.

Palabras clave: resistencia a vancomicina, factores de virulencia, *Enterococcus*, aves silvestres, aves de corral.

Abstract: In this study, the frequency and distribution of vancomycin resistance and virulence factors in *Enterococcus* strains isolated from faecal samples of wild birds and poultry were analysed. A total of 128 enterococci isolates were recovered using selective culture media from 250 faecal samples. Within the strains that displayed at least one of the studied virulence factors, *Enterococcus faecalis* was the most prevalent detected species (30 isolates), followed by *E. faecium* (23 isolates), *E. durans/hirae* (3 isolates) and *E. avium* (1 isolate). Screening of virulence factors resulted in 16 β -hemolytic strains, while 47 strains exhibited gelatinase activity. Vancomycin resistance was detected in 17 strains using standard method for clinical samples. However, the presence of *vanA*, *vanB* and *vanC* genes could not be confirmed by PCR techniques. The data shown suggest that wild birds and poultry have the potential to disseminate in the environment *Enterococcus* strains that harbour virulent traits, which in turn might be transferred either to other animals or to humans.

Key words: vancomycin resistance, virulence factors, *Enterococcus*, wild birds, poultry.

Introducción

Los enterococos son microorganismos ubicuos y comprenden una parte de la microbiota intestinal normal de la mayoría de los mamíferos y aves.

Su presencia en alimentos puede resultar perjudicial debido a que son responsables del deterioro de carne, cerveza, jugo de frutas y derivados lácteos. Sin embargo, bajo condiciones controladas, como ocurre en los procesos de fermentación de alimentos, se los incluye con el propósito de mejorar la calidad de los productos. En los últimos años la producción de bacteriocinas ha sido investigada con profundidad en este género, lo que ha permitido seleccionar cepas para incluirlas como probióticos en alimentos y suplementos dietarios.

En contraste con estas características positivas, los enterococos son reconocidos como importantes patógenos nosocomiales y están dentro de los organismos más prevalentes en infecciones hospitalarias (European Centre for Disease Prevention and Control 2011; Fisher y Phillips 2009; Kayser 2003). En este sentido, de las 54 especies incluidas en el género *Enterococcus*, las infecciones en seres humanos se deben fundamentalmente a dos especies, *E. faecalis* y *E. faecium* (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, Sharifi *et al* 2012). Sin embargo, otras especies, incluyendo *E. hirae* y *E. durans* se han identificado ocasionalmente en los aislamientos de origen clínico (Fisher y Phillips 2009).

Además de su reconocida capacidad para adquirir resistencia a antibióticos, los enterococos desarrollan, gracias al intercambio de información genética a través de elementos genéticos móviles, características que aumentan su virulencia. Dentro de estas características podemos mencionar: la adherencia a tejidos del huésped, la invasión y formación de abscesos, la modulación de la respuesta inflamatoria, la secreción de productos tóxicos y la síntesis de enzimas hidrolíticas (Werner *et al* 2013).

No existe un único agente responsable de su virulencia como ocurre en otros microorganismos, sino que pueden ser varios los factores que juegan un papel en su patogénesis, siendo la mayoría de los descritos hasta ahora productos de secreción, como la citolisina y la gelatinasa, o factores de adhesión como la sustancia de agregación (*Agg*) y la proteína de superficie de los enterococos (*Esp*).

Debido a su alta tolerancia al calor y capacidad de supervivencia bajo condiciones ambientales adversas, se han aislado cepas de *Enterococcus* potencialmente patógenas de vegetación acuática y terrestre, aguas superficiales, efluentes cloacales, arenas y sedimentos costeros, suelos terrestres y materia fecal de mamíferos y aves (Byappanahalli *et*

al 2012). La resistencia a antimicrobianos en bacterias del ambiente es una preocupación en salud pública debido a la transferencia de organismos virulentos y genes de virulencia a los humanos a través de la cadena alimentaria.

La fauna silvestre, y en particular las aves, pueden considerarse importantes dispersores de microorganismos patógenos y sus determinantes genéticos, debido a su habilidad para trasladarse a grandes distancias. Esta característica y el frecuente contacto con los núcleos urbanos llevan a considerar a las poblaciones de aves como reservorios de *Enterococcus* patógenos, de potencial impacto sanitario tanto para animales como para seres humanos.

En nuestro país existen numerosos estudios orientados a la caracterización de *Enterococcus* de origen nosocomial y en menor medida relacionados con la presencia de este género en efluentes cloacales. No existen estudios epidemiológicos vinculados a la caracterización y evaluación de *Enterococcus* aislados de aves silvestres.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de las aves de la comarca Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) – Península Valdés como posible reservorio de cepas de *Enterococcus* portadoras de factores de virulencia.

Materiales y métodos

Área de muestreo

Se tomaron muestras en la región geográfica denominada Comarca VIRCh -Valdés - provincia del Chubut, desde marzo a noviembre de 2012. En la ciudad de Trelew se recolectaron muestras en el área recreativa Laguna Cacique Chiquichano, así como en áreas residenciales y rurales de la ciudad, y en tres establecimientos avícolas. En cuanto a las muestras recolectadas en la ciudad de Rawson, estas provinieron de la zona costera de la misma, denominada Playa Unión. Solamente 6 muestras provinieron del Área Natural Protegida Península de Valdés. Igual cantidad de muestras se recolectaron en el área rural de la ciudad de Gaiman (Tabla 1).

Toma de muestras

Las muestras consistieron en hisopados fecales de aves, tanto de corral como silvestres. Fueron conservadas en medio de transporte Stuart (Merck, Alemania) a 4 °C hasta el momento de su procesamiento.

Aislamiento de enterococos

Las muestras se sembraron en caldo púrpura de bromocresol-azida (Merck, Alemania). Luego de 24 h de incubación a 37 °C los cultivos se repicaron a agar

Tabla 1. Especies de aves, localidades y cantidad de muestras recolectadas y cepas aisladas.

Nombre científico	Nombre vulgar	Cantidad de muestras recolectadas	Cantidad de cepas aisladas	Localidad
<i>Chloephaga picta</i>	Cauquén	4	3	Área rural (Trelew)
<i>Columba livia</i>	Paloma	13	7	Área residencial (Trelew)
<i>Columba livia</i>	Paloma doméstica	22	16	Laguna Caci que Chiquichano (Trelew)
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	10	1	Establecimiento 1 (Trelew)
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	27	18	Establecimiento 2 (Treorcky)
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	8	4	Establecimiento 3 (Trelew)
<i>Mimus saturninus</i>	Calandria	8	1	Área rural (Trelew)
<i>Mimus saturninus</i>	Calandria	20	13	Playa Unión (Rawson)
<i>Anas versicolor</i>	Pato capuchino	38	21	Laguna Caci que Chiquichano (Trelew)
<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	Pato común	6	2	Área rural (Gaiman)
<i>Rhea pennata</i>	Choique	6	2	Península de Valdés
<i>Zenaida auriculata</i>	Torcaza común	2	1	Área rural (Trelew)
<i>Phalacrocorax atriceps</i>	Cormorán imperial	5	2	Isla Escondida
<i>Passer domesticus</i>	Gorrion	27	14	Playa Unión (Rawson)
<i>Turdus falcklandii</i>	Zorzal patagónico	2	1	Área rural (Trelew)
<i>Vanellus chilensis</i>	Tero	6	4	Área rural (Trelew)
<i>Vanellus chilensis</i>	Tero	3	1	Laguna Caci que Chiquichano (Trelew)
<i>Larus dominicanus</i>	Gaviota cocinera	43	17	Playa Unión (Rawson)
Total de muestras		250	128	

bilis esculina (Merck, Alemania), suplementado con ácido nalidixico (40 µg/ml) y nistatina (20 µg/ml). Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 24-48 h.

Identificación preliminar

Las colonias obtenidas en los aislamientos se seleccionaron en función de la coloración de Gram, la morfología celular, las pruebas de la catalasa y la oxidasa, el crecimiento a 45 °C, a pH 9,6, la hidrólisis de la esculina en presencia de sales biliares (40 %) y la actividad de pirrolidonil aminopeptidasa (PYR) y leucina-aminopeptidasa (LAP).

Las distintas especies del género *Enterococcus* se identificaron mediante la fermentación de azúcares según el esquema de Manero y Blanch (1999).

Actividad de la gelatinasa

Para la prueba de la gelatinasa se utilizó una prueba propuesta por Kanemitsu *et al* (2001). Para tal fin se suplementó el agar tripticasa soja (DIFCO, EE.UU.) con 0,8 % de gelatina. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y se revelaron con una solución de ácido tricloroacético al 20 %. Las zonas claras alrededor de las cepas se consideraron como positivas.

Actividad hemolítica

La producción de hemolisinas de las cepas

aisladas se evaluaron en agar cerebro-corazón (BHI) (Biokar, Francia) suplementado con sangre desfibrinada de conejo al 5 % luego de una incubación a 37 °C durante 48 h. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completo alrededor de las colonias (β -hemólisis).

Selección de cepas potencialmente resistentes a vancomicina

Para la búsqueda de microorganismos con potencial resistencia se utilizó el agar tripticasa soja suplementado con vancomicina (6 µg/ml) según las recomendaciones de Domig *et al* (2003). Todas las cepas que exhibieron desarrollo durante este ensayo se enriquecieron en caldo BHI sin vancomicina y se repicaron a placas chromID VRE (Biomérieux, Francia).

En todas las cepas que exhibieron desarrollo durante este ensayo se determinó su concentración inhibitoria mínima para la vancomicina mediante el método de las diluciones seriadas, según las recomendaciones del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, EE.UU. (2007).

Purificación de ADN

Luego de una incubación a 37 °C durante 12 h en caldo de Man, Rogosa & Sharp (MRS) (Biokar, Francia), las cepas de enterococos se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando

un equipo comercial de purificación Wizard Genomics, Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Determinación de la presencia de los genes *vanA*, *vanB* y *vanC*

Los cebadores y protocolos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes *vanA* y *vanC-1* fueron los descritos por Kariyama *et al* (2000), mientras que en el caso de *vanB* se utilizó el cebador descrito por Elsayed *et al* (2001) (Tabla 2). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La electroforesis de los productos de la amplificación genética se realizó en gel de agarosa al 1,5 %, a 70 V durante 1 h en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA, pH 8). Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio de 0,5 µg/ml; posteriormente se lo visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó.

Resultados

Se procesaron 250 muestras de materia fecal proveniente de aves silvestres y de corral del VIRCH y de la zona costera de la Provincia del Chubut. Se aislaron un total de 128 cepas, de las cuales 57 exhibieron algunos de los factores de virulencia en estudio. La mayor prevalencia de los factores de virulencia estudiados corresponde a la actividad gelatinasa, detectada en 47 cepas (82 %), mientras que 16 (28 %) exhibieron actividad β-hemolítica.

Mediante la técnica de Domig *et al* (2003) se seleccionaron 17 cepas potencialmente resistentes a la vancomicina sin embargo, cuando se realizó la confirmación mediante la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM), 15 resultaron sensibles a la vancomicina (≤ 4 µg/ml) y sólo 2 presentaron una resistencia intermedia (8-16 µg/ml), de acuerdo con los parámetros establecidos por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, EE.UU. (2007) (Tabla 3).

Tabla 2. Cebadores empleados para la reacción de PCR.

Cebador	Tamaño del producto de amplificación (pb)	Secuencia	Referencia
vanA	1030	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	Kariyama <i>et al</i> 2000
vanB	536	AAGCTATGCAAGAAGCCATG CCGACAATCAAATCATCCTC	Elsayed <i>et al</i> 2001
vanC1	822	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCGCCATCATAGCT	Kariyama <i>et al</i> 2000

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima para vancomicina.

Nº de orden	Origen	Identificación	CIM (µg/ml)
117	Calandria	<i>E. faecalis</i>	4
143	Pato capuchino	<i>E. faecium</i>	2
326	Gallina	<i>E. durans/hirae</i>	0,5
327	Gallina	<i>E. faecium</i>	1
328	Gallina	<i>E. faecium</i>	1
414	Calandria	<i>E. faecalis</i>	2
423	Gaviota cocinera	<i>E. faecium</i>	0,5
430	Gaviota cocinera	<i>E. faecium</i>	2
442	Torcaza común	<i>E. faecium</i>	1
443	Cormorán imperial	<i>E. durans/hirae</i>	2
445	Tero	<i>E. faecalis</i>	8
447	Tero	<i>E. faecalis</i>	8
448	Tero	<i>E. faecalis</i>	2
449	Cormorán imperial	<i>E. faecium</i>	1
490	Gaviota cocinera	<i>E. faecium</i>	1
598	Paloma doméstica	<i>E. durans/hirae</i>	1
608	Pato capuchino	<i>E. faecium</i>	2

Posteriormente, mediante las claves dicotómicas desarrolladas por Manero y Blanch (1999) se clasificaron 30 cepas como *E. faecalis*, 23 como *E. faecium* y 1 como *E. avium*, mientras que 3 cepas se asignaron al grupo *E. durans/hirae*.

No se detectó la presencia de los tres genes estudiados que codifican la resistencia a vancomicina en ninguno de los 17 aislamientos seleccionados previamente en las pruebas en placas de agar tripticosa soja suplementadas con vancomicina. Domig *et al* (2003), a través de una amplia revisión de métodos empleados en distintos trabajos para la detección de enterococos resistentes a la vancomicina en distintos ambientes, sugieren utilizar una concentración \geq a 6 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Sin embargo, esta concentración de antibiótico podría inhibir algunas cepas que expresan los genes *VanC* y *vanB*, cuyas concentraciones inhibitorias mínimas se encuentran por debajo del rango sugerido por Domig *et al* (2003). El mencionado trabajo no enfatiza la necesidad de utilizar un inóculo determinado de los microorganismos a estudiar, lo que podría conducir a la detección de falsas resistencias.

De las 57 cepas que exhibieron factores de virulencia sólo una exhibió los tres factores ensayados, mientras que 8 presentaban actividad gelatinasa y resistencia a vancomicina y 15 aislamientos exhibieron actividad gelatinasa y β -hemólisis (Tabla 4).

Discusión

Los 128 aislamientos de *Enterococcus* obtenidos a partir de 250 muestras de materia fecal ponen de manifiesto la alta frecuencia (51 %) con que se encuentra este género en muestras provenientes de aves, tanto de corral como silvestres.

Probablemente la temperatura corporal de las mismas (42 °C) actuaría como factor selectivo en favor de estos microorganismos, ya que pueden multiplicarse en forma efectiva en un rango de 10 a 45 °C. Muchas bacterias entéricas, en especial algunas especies de enterobacterias, se desarrollan en forma escasa o nula a la temperatura corporal normal de las aves. El amplio rango de temperaturas que permite la duplicación de los enterococos también facilita su persistencia en ambientes extraentéricos donde las

variaciones de temperatura, como en el caso del intestino de las aves, actúa como un factor de selección de la microbiota.

Entre los aislamientos que expresaron alguno de los factores de virulencia en estudio, *E. faecalis* (53 %) y *E. faecium* (40 %) fueron las especies predominantes. Esto coincide con estudios previos de otros autores en aislamientos recuperados a partir de muestras de materia fecal de animales silvestres (Foulquié Moreno *et al* 2006; Lanthier *et al* 2010; Oravcova *et al* 2013; Poeta *et al* 2005). Al igual que en nuestro trabajo, en estos estudios se encontró una baja prevalencia de otras especies de enterococos: es el caso de *E. durans/hirae* y *E. avium*.

El factor de virulencia de mayor prevalencia correspondió a la actividad gelatinasa (47/57), poniendo en evidencia que la presencia de la enzima, y en consecuencia la de los genes involucrados, es alta dentro del género *Enterococcus*, tal como se ha comunicado en trabajos previos (Marguet *et al* 2008; Waters *et al* 2003).

La gelatinasa (*gelE*) es una metaloendopeptidasa extracelular, capaz de degradar sustratos como la gelatina, fragmentos insolubles de colágeno, la cadena b de la insulina y otros péptidos bioactivos de los tejidos del hospedador, mejorando la migración y difusión de los enterococos por los tejidos dañados (Qin *et al* 2000). Además, también está implicada en la degradación de feromonas sexuales y de péptidos involucrados en la transferencia de plásmidos por conjugación entre diferentes cepas de enterococos (Qin *et al* 2000). Esta enzima contribuye a la patogénesis en diferentes modelos de infección en animales, entre los que se incluyen los de peritonitis en ratones y endoftalmítis en conejos (Mylonakis *et al* 2002; Semedo *et al* 2003). Sin embargo, de acuerdo a estudios previos, la presencia de los genes involucrados no implica la capacidad de expresión del correspondiente fenotipo, debido a diferentes niveles de regulación o por la inactivación del producto genético (Fisher y Phillips 2009).

En menor medida observamos aislamientos con actividad β -hemolítica (16/57). Al analizar la prevalencia encontrada incluyendo la totalidad de los aislamientos de enterococos, el 12 % encontrado

Tabla 4. Factores de virulencia presentes en cepas aisladas de aves.

Especie	N°	RV*	β -hemólisis	gelatinasa	RV + H + G	H + G	RV + G	H + RV
<i>E. faecalis</i>	30	5/30	10/30	29/30	1/30	9/30	4/30	0/30
<i>E. faecium</i>	23	9/23	5/23	17/23	0/23	5/23	4/23	0/23
<i>E. durans/hirae</i>	3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>E. avium</i>	1	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1

RV: resistencia a vancomicina; H: hemólisis; G: gelatinasa. *Resultados según la técnica de Domig *et al* (2003).

es similar a lo informado por otros autores (Eaton y Gasson 2001). La ausencia de actividad en las cepas restantes podría deberse a la ausencia o inactivación de algunos de los genes que conforman el operón *cyl* y se requieren para la expresión de la actividad β -hemolítica (Gilmore et al 1994).

El ensayo de expresión de hemolisinas, según la técnica descrita, permitió detectar actividad β -hemolítica en 10 cepas de *E. faecalis*, en 5 de *E. faecium* y sólo en una cepa de *E. avium*. Los resultados obtenidos coinciden con trabajos previos donde se informa sobre la prevalencia de las especies *E. faecalis* y *E. faecium* en la expresión de este factor de virulencia y en consecuencia vinculadas a infecciones enterocócicas (Eaton y Gasson 2001).

La citolisina o hemolisina b es una toxina extracelular, también reconocida como una bacteriocina (Kayser 2003), perteneciente a la clase I o lantibióticos (Kak y Chow 2012), siendo la única bacteriocina de este grupo capaz de lisar células eucarióticas. Esta toxina/bacteriocina presenta un interés especial porque su actividad incrementa la virulencia de los enterococos en diferentes modelos de infección (Gilmore et al 1994, Kak y Chow 2012).

Estudios recientes sobre la síntesis de la citolisina (*cyl*) han revelado que para su producción es necesaria la expresión de ocho genes situados en un único operón, que bien puede estar localizado en una isla de patogenicidad o en otros sitios del cromosoma bacteriano o de plásmidos regulados por feromonas y asociados a otros factores de virulencia como la *Agg* y la *Esp* (Kak y Chow 2012). En algunos casos puede detectarse la presencia de uno o más genes relacionados con el operón *cyl*, condición necesaria pero no suficiente para que se exprese la capacidad hemolítica de la enzima (Kak y Chow 2012). En consecuencia, la hemólisis en placa sigue siendo la "regla de oro" para evaluar la posible virulencia de cepas de *Enterococcus* (Eaton y Gasson 2001).

Las técnicas utilizadas para detectar resistencia a vancomicina son las de uso rutinario en microbiología clínica, complementada con el sistema chromID VRE agar, diseñado tanto para detectar cepas resistentes como para diferenciar entre *E. faecalis* y *E. faecium*, las 2 especies prevalentes dentro de las enfermedades humanas, sin embargo éstas no brindan resultados confiables al evaluar aislamientos de origen ambiental. Ambas técnicas en placa podrían emplearse como una primera aproximación al estudio de la resistencia a vancomicina. No obstante, sus resultados deberían confirmarse estableciendo la CIM de cada aislamiento y, posteriormente, revelando la presencia de los determinantes genéticos responsables de tal resistencia.

En este sentido los aislamientos seleccionados

con las técnicas previamente mencionadas exhibieron una resistencia intermedia al antibiótico con valores máximos de 8 $\mu\text{g/ml}$ para los aislamientos 445 y 447, ambos identificados como *E. faecalis*, mientras que las cepas 326 y 423 vieron inhibido su crecimiento a concentración $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$.

Al evaluar la presencia de los genes *vanA*, *vanB* y *vanC-1* en los 17 aislamientos resistentes a vancomicina seleccionados a partir de las técnicas en placa, no se detectaron productos de amplificación en ninguna de las cepas. Estos resultados sugerirían que la resistencia observada estaría codificada en el cromosoma bacteriano, por cuanto tanto el gen *vanA*, como el gen *vanB* residen en plásmidos, transferibles entre cepas de *Enterococcus* (Nilsson 2012; Werner et al 2013). En cuanto a la ausencia de *vanC-1*, si bien se ha descrito que es el genotipo presente en cepas de *Enterococcus* que exhiben una tolerancia a vancomicina de 2 a 32 $\mu\text{g/ml}$, la resistencia observada en las cepas 117, 445 y 447 podría deberse a un genotipo diferente a los estudiados. La aparición de nuevos genotipos asociados a la resistencia a vancomicina es un hallazgo habitual en los últimos años, corroborado por distintos autores. En este sentido deberían llevarse a cabo estudios posteriores para verificar o descartar esta hipótesis (Chadfield et al 2004; Werner et al 2013).

Las infecciones por enterococos, relativamente raras en aves de corral (Devriese et al 1990) y en otros pájaros como canarios y psitácidos (Silva et al 2012) son, por el contrario, frecuentes en ambientes nosocomiales, en cuyos aislamientos se observa una alta prevalencia de cepas con actividad gelatinasa y β -hemolítica, además de resistencia a antibióticos (Deshpande et al 2007). Los suelos agrícolas y costeros marinos y continentales, la vegetación terrestre y acuática, así como las aguas marinas y dulces suelen actuar como reservorio de enterococos potencialmente patogénicos, como consecuencia de la contaminación de estos habitats a partir de actividades humanas como la recreación acuática, la agricultura intensiva y las plantas de tratamiento de líquidos cloacales y de mataderos (Byappanahalli et al 2012).

No se ha demostrado con claridad el circuito que potencialmente transitarían las cepas virulentas entre seres humanos, medio ambiente y aves. Sin embargo, la hipótesis más aceptada es la que indica que las aves pueden estar expuestas a ambientes contaminados por actividades de origen antrópico o animal y, en consecuencia, los enterococos, gracias a su capacidad para adaptarse a condiciones adversas, podrían formar parte de la flora intestinal por tiempos prolongados o en forma permanente. En este sentido las aves silvestres en contacto con estos ambientes podrían representar un dispersor de microbiota con potencial patogénico (Silva et al 2012).

Referencias bibliográficas

- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76(4):685-705.
- Chadfield MS, Christensen JP, Christensen H, Bisgaard M. Characterization of streptococci and enterococci associated with septicemia in broiler parents with a high prevalence of endocarditis. *Avian Pathol.* 2004; 33(6):610-617.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2011, Stockholm, SE.
- Elsayed S, Hamilton N, Boyd D, Mulvey M. Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(6):2367-2368.
- Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58(2):163-170.
- Devriese LA, Ducatelle R, Uyttendaele E, Haesebrouck, F. *Enterococcus hirae* infection and focal necrosis of the brain of chicks. *Vet Rec.* 1991; 129(14):316-318.
- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88(2-3):165-188.
- 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(4):1628-1635.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009; 155(6):1749-1757.
- 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):1-24.
- Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol.* 1994; 176(23):7335-7344.
- Kak V, Chow JW. Acquired antibiotic resistances in enterococci. En: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, 2002. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.* Washington DC; ASM Press, pp. 355-372.
- Kanemitsu K, Nischino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, Kaku M. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Methods* 2001; 47(1):11-16.
- Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(8):3092-3095.
- Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88(2):255-262.
- Lanther M, Scott A, Lapen DR, Zhang Y, Topp E. Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* spp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Can J Microbiol.* 2010; 56(9):715-729.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Genus *Enterococcus*. Disponible en: www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html. Acceso: 20 de febrero de 2015.
- Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(10):4425-4430.
- Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquim Clín Latinoam.* 2008; 42(4):543-548.
- Mylonakis E, Engelbert M, Qin X, Sifri CD, Murray BE, Ahsanul FM, Gilmore MS, Calderwood SB. The *Enterococcus faecalis* fsrB gene, a key component of the fsr quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect Immun.* 2002;70(8):4678-4681.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M2-A7, 7th ed. NCCLS, Wayne, EEUU.
- Nilsson O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance. *Infect Ecol Epidemiol.* 2012; 2:16959. DOI: 10.3402/iee.v2i0.16959
- Oravcova V, Zurek L, Townsend A, Clark AB, Ellis JC, Cizek A, Literak I. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with vanA gene. *Environ Microbiol.* 2014; 16(4):939-949.
- Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52(9):396-402.
- Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun.* 2000; 68(5):2579-2586.
- Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Barreto Crespo MT. Comparative study using type strains and clinical and food isolated to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyt* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2569-76.
- Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Varshochi M, Hasani A, Aghazadeh M, Milani M. Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of north west of Iran. *Open Microbiol J.* 2012; 6:34-39.
- Silva N, Igrejas G, Felgar A, Gonçalves A, Pacheco R, Poeta P. Molecular characterization of vanA-containing *Enterococcus* from migratory birds: song thrush (*Turdus philomelos*). *Braz J Microbiol.* 2012; 43(3):1026-1029.
- Waters CM, Antipporta 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(12):3613-3623.
- Werner G, Coque TM, Franz CMAP, Grohmann E, Hegstade K, Jenseng L, van Schaik W, Weaver K. Antibiotic resistant enterococci - Tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303(6-7):360-379.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con fondos otorgados por la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco al proyecto "Evaluación de la seguridad alimentaria y sanitaria de *Enterococcus* ambientales" PI R/7 222/2013.

Conflictos de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.