



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Médicas

Tesis de doctorado

“Caracterización y relación clonal de cepas de enterococos aisladas de alimentos de origen animal de un área rural del centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina”

Tesista: Licenciada en Genética Gisela Pourcel

Director: Prof. Dra. Mónica D. Sparo

Co-director: Prof. Dra. María Marta De Luca

**Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos
(CUDEMYP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP**

2017

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Autoridades

Decana

Prof. Dra. Ana Lía ERRECALDE

Vicedecano

Prof. Dr. Eduardo ESCUDERO

Secretaria de Asuntos Académicos

Prof. Dr. Julio César HIJANO

Secretaria de Asuntos

Estudiantiles

Prof. Dra. María Marta DE LUCA

Secretaria de Extensión

Universitaria

Prof. Dra. Graciela Susana

ETCHEGOYEN

Secretario Docente Asistencial

Prof. Dr. Guillermo Daniel PRAT

Secretario de Ciencia y Técnica

Prof. Dr. Gustavo Juan RINALDI

Secretario Económico Financiero

Cdor. Rubén GALLE

**Director del Hospital Universitario
Integrado (HUI) y Director Ejecutivo
del Hospital Universitario de Alta
Complejidad (HUDAC)**

Prof. Dr. Jorge Guillermo MARTINEZ

**Director del Departamento de
Postgrado**

Prof. David COSTI

Asesor de Gestión

Dr. Felipe CAMPOAMOR

Secretaria de Supervisión

Administrativa

Sra. Norma FORTUNATO de
CARRADORI

Secretaria Administrativa

Sra. Elsa Lidia ANTONINI

A mi adorada hija Camila

A mi padre Luis

A Betty, mi madre, por siempre en mi memoria y mi corazón

***“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la
energía atómica: la voluntad”
A. Einstein***

AGRADECIMIENTOS

A mi hija Camila, por ser el motor de mi vida.

A mis padres, por enseñarme al valor que tiene el esfuerzo para alcanzar un objetivo.

A Marcelo, por el apoyo.

A la Prof. Dra. Mónica Sparo, por su dirección y motivación a lo largo de estos años. Por ser un ejemplo de dedicación y consagración a la investigación. Por esa pasión contagiosa que pone en cada nuevo proyecto. Finalmente concluimos esta tesis, con mucho sacrificio desde el primero al último día. PUDIMOS!!!!!!

A la Dra. María Marta De Luca, por su co-dirección.

A la Lic. Mónica Ceci, por robarle horas a su tiempo y brindarme su ayuda invaluable. A Gastón. Al Centro de Estudios Bioquímicos, ¡gracias chicas!!

A mis amigas Cintia, Vane, Sandra, Laura, Elina.

A Sabina y Pamela, por poner el hombro y el oído.

A la Dra. Silvia Grenóvero.

Al Dr. Hugo Solana, por brindarme generosamente un espacio físico en el cual poder desarrollar gran parte de este trabajo.

A la Escuela Superior de Ciencias de la Salud (UNCPBA), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

Y a Dios, que me ha dado la fuerza suficiente para no bajar los brazos a pesar de los momentos difíciles.

ÍNDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 Taxonomía	2
1.1.2 Hábitat	4
1.1.3 Caracterización fenotípica y genotípica	5
1.1.4 Epidemiología molecular	6
1.1.5 Resistencia antimicrobiana	9
1.5.1 Resistencia adquirida	9
1.1.5.2 Resistencia a Vancomicina	11
1.1.5.3 Alto nivel de resistencia a Gentamicina	16
1.1.6 Determinantes de virulencia	18
1.1.6.1 Citolisina	19
1.1.6.2 Gelatinasa	21
1.1.6.3 Proteína de Superficie de Enterococo	22
1.1.7 Relevancia del género en Salud humana	23
1.1.8 Industria artesanal de producción de alimentos de origen animal en la región del centro de la provincia de Buenos Aires	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo general	26
2.1.1 Objetivos específicos	26
2.1.1.1 OBJETIVO 1	26
2.1.1.2 OBJETIVO 2	26
2.1.1.3 OBJETIVO 3	26
2.1.1.4 OBJETIVO 4	26
2.1.1.5 OBJETIVO 5	27
2.1.1.6 OBJETIVO 6	27
2.1.1.7 OBJETIVO 7	27
2.1.1.8 OBJETIVO 8	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1.1 Periodo y área de estudio	29
3.1.2 Recolección de muestras de alimentos de diferente origen	29

3.1.2.1. Salamín artesanal	29
3.1.2.2. Carne picada	30
3.1.2.3. Leche de cabra	31
3.1.2.4. Queso de cabra artesanal	31
3.1.2.5. Queso de vaca artesanal	31
3.1.2.6 Queso de oveja artesanal	32
3.1.3 Procesamiento de muestras	33
3.1.3.1. Obtención de homogenatos	33
3.1.3.1.1 Salamín artesanal	33
3.1.3.1.2 Carne picada	33
3.1.3.1.3 Leche de cabra	33
3.1.3.1.4 Quesos de cabra, vaca y de oveja artesanales	33
3.1.4 Aislamiento e identificación de <i>Enterococcus</i> spp	34
3.1.5 Caracterización molecular por amplificación génica	35
3.1.5.1 Preparación de aislamientos de enterococos	35
3.1.5.1.1. Obtención de cultivos puros	35
3.1.5.1.2. Obtención de ADN	35
3.1.5.1.2.1 Método de lisis por calor	35
3.1.5.2 Identificación molecular a nivel de género mediante PCR	35
3.1.5.3 Identificación molecular a nivel de especie	36
3.2 Investigación de los determinantes de virulencia en los aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp.	38
3.3 Prevalencia de especies de enterococos y sus determinantes de virulencia	39
3.4 Investigación de <i>Enterococcus</i> spp. con resistencia a glucopéptidos	40
3.4.1 Tamizaje genotípico de resistencia	40
3.4.2 Detección genotípica de determinantes de resistencia a glucopéptidos	40
3.5 Investigación de <i>Enterococcus</i> spp. con alto nivel de resistencia a gentamicina	41
3.5.1 Tamizaje genotípico de resistencia	41
3.5.2 Investigación de genes de resistencia a gentamicina	42
3.6 Investigación de transferencia génica horizontal entre <i>E. faecalis</i> de origen animal y humano	43
3.7 Relación clonal entre cepas de <i>E. faecalis</i> con resistencia de alto nivel a	44

gentamicina de origen animal y humano	
3.7.1 Electroforesis en Campo Pulsado	44
3.7.2 Origen de los aislamientos	45
3.7.3 Preparación de bloques de agarosa	46
3.7.4 Lisis celular de bloques de agarosa	47
3.7.5 Equilibrio y digestión de bloques de agarosa con <i>Sma</i> I	47
3.7.6 Condiciones de corrida electroforética	47
3.7.7 Coloración y registro del gel de PFGE	48
3.8 Relación clonal entre cepas de <i>E. faecium</i> con resistencia de alto nivel a vancomicina de origen animal y humano	48
3.8.1 Origen de los aislamientos	48
4. RESULTADOS	49
4.1.1 Aislamiento e identificación fenotípica y genotípica del género <i>Enterococcus</i>	50
4.1.2 Identificación fenotípica y genotípica de especies de <i>Enterococcus</i>	50
4.1.2.1 Caracterización fenotípica a nivel de especie	50
4.1.2.2. Caracterización genotípica a nivel de especie	52
4.1.2.3 Distribución de especies en productos cárnicos	57
4.1.2.4 Distribución de especies en productos lácteos	58
4.2 Identificación de determinantes de virulencia por amplificación génica	58
4.3 Distribución de enterococos de acuerdo a su especie y determinantes de virulencia	63
4.4 Resistencia Antimicrobiana	63
4.4.1 Genes de resistencia a vancomicina en <i>Enterococcus</i> spp. recuperados de alimentos	63
4.5 Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en <i>Enterococcus</i> spp. recuperados de alimentos	65
4.6 Transferencia génica <i>in vitro</i> de alto nivel de resistencia entre cepas de alimentos de origen animal y humano	66
4.7 Relación clonal entre cepas de <i>E. faecalis</i> con resistencia de alto nivel a gentamicina de origen humano y de alimentos de origen animal	67
4.8 Relación clonal entre cepas de <i>E. faecium</i> con resistencia a vancomicina (<i>vanA</i>) de origen humano, ambiente y de alimentos de origen animal	69
5. DISCUSIÓN	72

6. CONCLUSIONES	84
7. BIBLIOGRAFIA	88
8. GLOSARIO	111
9. ANEXOS	116
10. INDICE DE TABLAS	121
11. INDICE DE FIGURAS	123

RESUMEN

Los enterococos son microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Conforman la microbiota habitual del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales, plantas y ambiente. Actualmente, se considera que el género *Enterococcus* presenta un comportamiento ambiguo como saprófitos/patógenos. Diversos trabajos científicos demuestran las propiedades biotecnológicas de las bacterias que integran este género como biopreservantes y/o probióticos. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas estas bacterias han sido reconocidas con creciente frecuencia como patógenos oportunistas vinculados con la producción de cuadros infecciosos severos en el hombre. Se ha comprobado que los enterococos presentan resistencia a un amplio número de antimicrobianos. Una característica remarcable es la resistencia adquirida que posibilita su diseminación y generación de reservorios de enterococos resistentes a los antimicrobianos. Otra característica observada en enterococos es la presencia de factores de virulencia que contribuyen con la patogenicidad de este género bacteriano en las infecciones invasivas. Dentro de este género las especies más frecuentes son *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* tanto en muestras de origen humano como de origen animal. Otras especies han sido aisladas con menor frecuencia tales como *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. raffinosus*.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue realizar una identificación a nivel genotípico de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de alimentos de origen animal provenientes de un área rural del centro de la Provincia de Buenos Aires y establecer su relación clonal con cepas aisladas a partir de infecciones invasivas humanas correspondientes al mismo periodo de tiempo y espacio geográfico.

Se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de 125 aislamientos pertenecientes al género *Enterococcus* recuperados de alimentos de origen cárnico y lácteo en el periodo comprendido entre enero y diciembre de 2013. La

especie más frecuentemente identificada por método molecular fue *E. faecalis* (75,2%), seguida por *E. faecium* (19,2%), *E. raffinosus* (2,4%), *E. durans* (1,6%), *E. gallinarum* (0,8%) y *E. avium* (0,8%).

De acuerdo a los resultados obtenidos para la identificación de especies por ambos métodos (fenotípico y genotípico) se observa una concordancia del 56,38% para *E. faecalis*, y del 54,17% para *E. faecium*. Sin embargo, para el resto de las especies identificadas, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. durans* y *E. avium* la discrepancia en la identificación entre ambos métodos fue del 100%.

Se observó una mayor frecuencia de recuperación de enterococos en alimentos lácteos (54,4%) que en productos cárnicos (45,6%). Entre los productos lácteos las especies recuperadas fueron las siguientes: *E. faecalis* (76,5%) y *E. faecium* (23,5%). En los aislamientos provenientes de leche de cabra se aisló el 10,3 % del total de los enterococos, en los de queso de oveja el 23,5%, en los de queso de cabra el 7,4% y en los de queso de vaca el 58,8%. La mayor cantidad de aislamientos lácteos fue recuperada de queso de vaca, entre estos solo un aislamiento fue identificado como *E. faecium*, el resto como *E. faecalis*. Los aislamientos de queso de cabra fueron en su totalidad pertenecientes a la especie *E. faecalis*. Entre los productos cárnicos Se recuperaron las siguientes especies: *E. faecalis* (73,6%); *E. faecium* (14%), *E. raffinosus* (5,3%), *E. durans* (3,5%), *E. gallinarum* (1,8%), *E. avium* (1,8%).

Fueron investigados los determinantes de virulencia *cylA*, *gelE* y *esp* mediante amplificación génica en los 125 aislamientos de *Enterococcus*. En aislamientos de origen cárnico, once presentaron la combinación de los tres determinantes, en alimentos de origen lácteo solo dos aislamientos presentaron las tres combinaciones simultáneamente. La combinación *gelE* y *cylA* fue más frecuente en aislamientos cárnicos (4), mientras en aislamientos lácteos fue *gelE* y *esp* (5). La mayoría de los determinantes de virulencia fueron detectados en aislamientos correspondientes a la especie *E. faecalis*. En un único aislamiento identificado como *E. faecium* proveniente de alimento cárnico (salamín) se detectó el gen *esp*.

No se detectó determinante de virulencia en las demás especies (*E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. durans*, *E. avium*).

Mediante amplificación molecular se investigaron los siguientes genes de resistencia a vancomicina (VAN): *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*. El gen *vanA* fue detectado en tres aislamientos correspondientes a *E. faecium*: salami artesanal (CEB25T), queso de vaca (CEB626) y queso de oveja (CEB28). No se detectó el gen *vanA* en las otras especies de *Enterococcus*. En *E. gallinarum*, aislado de salami artesanal se observó la presencia de *vanC*. En los aislamientos recuperados de alimentos no se detectaron los genes, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*.

La resistencia a glucopéptidos (VAN, TEI) utilizando pruebas de resistencia antimicrobiana fenotípicas (determinación de la CIM, mediante método de dilución en agar) y de amplificación molecular fue concordante en todos los aislamientos analizados. El 2,4% de los aislamientos presentó alto nivel de resistencia a gentamicina (ANRG). La totalidad de los aislamientos fueron *E. faecalis* obtenidos a partir de alimentos cárnicos.

En todos los aislamientos con ANRG se detectó el gen *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia*. Se observó la expresión de ANRG en 3 *E. faecalis* (CIM_{gen}: 1024 mg/L), así como alto nivel de resistencia a STR en 2 aislamientos (CIM_{str}: 512-1024mg/L). No se detectó la expresión simultánea de alto nivel de resistencia a los dos aminoglucósidos.

Para demostrar el origen plasmídico del ANRG, se realizaron experimentos de conjugación bacteriana in vitro entre *E. faecalis* con ANRG (donantes) y la cepa *E. faecalis* JH2-SS (Colección del Dr. M. Gilmore; EE.UU.) de origen humano con resistencia cromosómica a estreptomicina (receptora) y sin ANRG. Luego del experimento de conjugación, la cepa receptora *E. faecalis* JH2-SS migró con un valor de movilidad relativo similar al de la célula donante, indicando que la incorporación del plásmido ocurrió en una posición similar y el plásmido adquirido por esta cepa fue responsable del ANRG (CIM > 800 mg/L).

En el presente trabajo de tesis se demostró la presencia de resistencia transferible en cepas de *E. faecalis* con ANRG y de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a VAN. También se comprobó otro posible camino de diseminación de resistencia antimicrobiana a través de la movilización y adaptación de determinados clones de enterococos presentes en los alimentos a los pacientes y al ambiente hospitalario. A través de estudios de PFGE se demostró relación clonal entre cepas de *E. faecalis* con ANRG de origen humano y de alimentos. En Argentina, ésta es la primera evidencia de diseminación clonal de cepas en alimentos de origen animal y humano.

INTRODUCCIÓN

El género *Enterococcus* integra la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de animales y humanos; pudiendo también colonizar otros hábitats como agua, plantas y alimentos de origen vegetal y animal (Delpech *et al.*, 2012; Sparo & Mallo 2001; Marguet *et al.*, 2008; Sánchez Valenzuela *et al.*, 2009). Algunas cepas de este género participan en la biopreservación de los alimentos mediante producción de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) que eliminan la microbiota deteriorante; participan también en procesos de fermentación de productos cárnicos (Sparo *et al.*, 2008; Sparo *et al.*, 2009 a, b). Estudios realizados en quesos demostraron que los enterococos juegan un papel importante en su maduración y contribuyen, en su aroma y sabor, como resultado del metabolismo del citrato y en relación con su actividad proteolítica y lipolítica (Suzzi *et al.*, 2000; Jurkovic *et al.*, 2006; Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2001). Sin embargo, han emergido en las últimas décadas cepas que se han descrito como agentes etiológicos de infecciones severas que originan bacteriemias, meningitis, endocarditis e infecciones complicadas del tracto urinario y quirúrgicas (Casellas *et al.*, 2003; Gentile *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2006; Padilla *et al.*, 2012).

1.1 Taxonomía

El género *Enterococcus* está integrado por bacterias que se presentan como cocos gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos. La mayoría aglutinan con anticuerpos específicos para el antígeno de pared de *Streptococcus* perteneciente al grupo D de Rebecca Lancefield (Lebreton 2014). Por este motivo durante un largo período fueron considerados dentro del género *Streptococcus*. Sin embargo, estudios genéticos posteriores evidenciaron diferencias con este género. Es así que, en el año 1984, constituyeron un nuevo género denominado *Enterococcus*, integrado por múltiples especies (Murray 1990; Devriese *et al.*, 2006).

A través de análisis filogenéticos realizado en cocos Gram (+) catalasa (-), basados en la comparación de aproximadamente 1400 pares de bases (pb) del gen 16S ARNr, se demostró que el género *Enterococcus* tiene relación más

estrecha con *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* que con *Streptococcus* y *Lactococcus* (Lebreton *et al.*, 2014).

Las bacterias del género *Enterococcus* son anaerobias facultativas, con crecimiento óptimo a 35°C, pueden desarrollar en medios con altas concentraciones de sal (NaCl 6,5%), hasta pH = 9,6 y sobreviven a 60°C por 30 min (Foulquié Moreno *et al.*, 2006, Oprea & Zervos 2007).

En el género *Enterococcus*, sobre la base de la evidencia filogenética, apoyada en estudios de secuenciación ARNr 16S y/o de hibridación ADN-ADN, se han descrito hasta el año 2016 56 especies diferentes (<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>; Euzéby, 2017).

Las especies descritas de forma definitiva son: *E. alcedinis* (2013), *E. aquimarinus* (2005), *E. asini* (1998), *E. avium* (1984), *E. caccae* (2006), *E. bulliens* (2016), *E. camelliae* (2007), *E. canintestini* (2005), *E. canis* (2003), *E. casseliflavus* (1984), *E. cecorum* (1989), *E. columbae* (1993), *E. devriesei* (2005), *E. diestrammenae* (2013), *E. dispar* (1991), *E. durans* (1984), *E. eurekensis* (2013), *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. lemanii* (2013), *E. malodoratus* (1984), *E. moraviensis* (2001), *E. mundtii* (1986), *E. olivae* (2014), *E. pallens* (2002), *E. phoeniculicola* (2003), *E. plantarum* (2012), *E. porcinus* (2001), *E. pseudoavium* (1989), *E. quebecensis* (2012), *E. raffinosus* (1989), *E. ratti* (2001), *E. rivorum* (2012), *E. rotai* (2013), *E. saccharolyticus* (1991), *E. saccharominimus* (2004), *E. saigonensis* (2016), *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), *E. xiangfangensis* (2014).

La identificación de especies del género *Enterococcus* es dinámica, ha cambiado de forma significativa en los últimos diez años y continúa siendo revisada (Lebreton *et al.*, 2014). La lista de especies de *Enterococcus* seguirá aumentando y/o modificándose constantemente, con una evaluación continua en la era

genómica en rápida expansión, que ofrece nuevos conocimientos sobre las diferencias entre especies bacterianas.

1.2 Hábitat

Los enterococos son bacterias que integran la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de humanos y animales y son capaces de sobrevivir en medios poco enriquecidos como el agua y el suelo. (Sparo & Mallo 2001, Foulquié Moreno *et al.*, 2006). También habitan productos cárnicos y lácteos. Su capacidad para sobrevivir a procesos como la pasteurización y para adaptarse a diversas condiciones físico-químicas, les permite colonizar materias primas (carne, leche) como alimentos tratados térmicamente (Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

En el género *Enterococcus* se encuentran cepas que pueden tener efectos beneficiosos en los alimentos ya que presentan actividad antimicrobiana (probióticos) o colaboran en los procesos de fermentación de alimentos (Sparo *et al.*, 2008).

Los alimentos de origen lácteo conforman uno de los principales reservorios naturales de *Enterococcus* spp. 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; Faría-Reyes *et al.* (2002) y Ogier & Serror (2008) han recuperado especies de este género en leche y en 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.

En alimentos de origen cárnico se han recuperado 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 y genotípica

La caracterización fenotípica incluye numerosas y diversas pruebas bioquímicas, coloración de Gram, hidrólisis de L-pirronidonil- β -naftilamida, y crecimiento en caldo cerebro corazón (BHI) suplementado con 6,5% de NaCl₂.

Además del test de hidrólisis (arginina, piruvato y metil- α -D-glucopiranosido), tolerancia a telurito al 0,04%, fermentación de carbohidratos (manitol, arabinosa, sorbitol, sucrosa, rafinosa y sorbosa), motilidad y producción de pigmento, existen sistemas automatizados y semiautomatizados comerciales los cuales son mucho más rápidos que las pruebas bioquímicas convencionales utilizados en la identificación de diversos grupos bacterianos.

En el caso de bacterias Gram Positivas, es conocido el sistema API 20 STREPT.

Las técnicas de identificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en un mismo principio general común: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación.

Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos.

Las técnicas de identificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación y permite trabajar con un número grande de muestras (Figura 1).

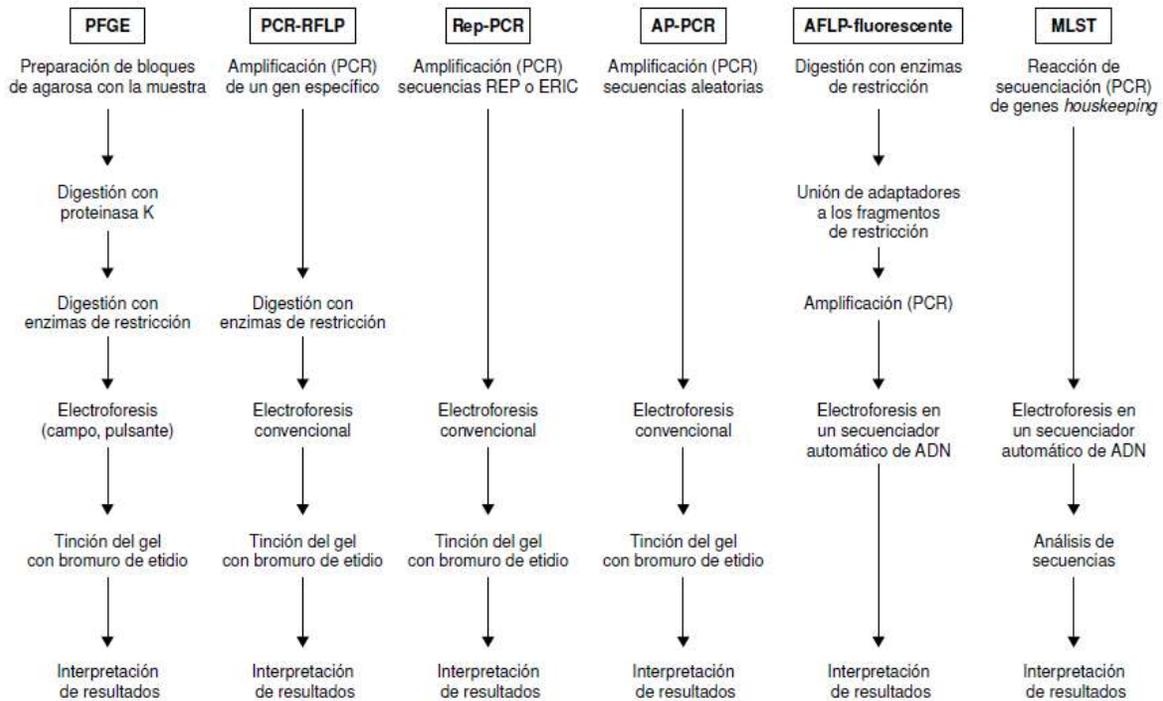


Figura 1: Técnicas de tipificación basada en amplificación molecular

Fuente: Fernández Cuenca. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22(6):355-60.

Existen numerosos estudios internacionales (Harwood *et al.*, 2004; Kirschner *et al.*, 2001) y nacionales (Togneri *et al.*, 2005) sobre caracterización molecular de aislamientos de enterococos de origen humano. Se han documentado reportes de aislamientos provenientes de alimentos tanto internacionales (Ammor *et al.*, 2005; Martín *et al.* 2009; Gomes *et al.*, 2008; Kirschner *et al.*, 2001) como nacionales (Ronconi *et al.*, 2002); sin embargo, no existe documentación hasta la fecha de estudios de genotipificación en aislamientos de enterococos provenientes de alimentos de origen animal y su relación clonal con aislamientos de origen humano.

1.4 Epidemiología molecular

Los métodos de tipificación molecular son esenciales para determinar la epidemiología de los microorganismos y caracterizar brotes a nivel hospitalario. Los primeros métodos moleculares de tipificación en *Enterococcus* se basaron en

el análisis del perfil de plásmidos, los cuales incluían análisis de los mismos utilizando enzimas de restricción.

Posteriormente, a fines del siglo XX, se desarrolló la técnica de amplificación al azar denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que consiste en la amplificación al azar de secuencias cortas de nucleótidos, mediante la utilización de un corto oligonucleótido cebador de 8 a 10 pb que reconocen sitios anónimos en el genoma total, que son amplificados por PCR. Mediante este método es posible obtener una alta cantidad de fragmentos que son visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. El análisis en la variación genética de los RAPDs permite obtener una adecuada diversidad genética debido a su capacidad de generar marcadores aleatorios en el genoma. El principal problema de esta técnica es la falta de reproducibilidad de patrones (variación en número, tamaño e intensidad de bandas) y la reproducibilidad interlaboratorio, por lo tanto, deben mantenerse las condiciones de amplificación para evitar cambios en los patrones (Lin *et al.*, 2015).

En el año 1984 Schwartz y Cantor describieron una nueva técnica de electroforesis de campo pulsado, PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Se fundamenta en un sistema electroforético capaz de separar moléculas de ADN de entre 10 kb y 10 Mb, permitiendo así el estudio genómico de los microorganismos. El principio básico de esta técnica es provocar una reorientación continua de las moléculas de ADN, causada por un cambio constante en la dirección del campo eléctrico. El resultado es una velocidad de migración en la dirección del campo eléctrico neto, que depende mayoritariamente del tamaño de las moléculas de ADN. Posteriormente se han realizado modificaciones de la técnica original, dando lugar a diferentes sistemas de PFGE que varían en la forma en que los campos eléctricos son aplicados al gel. Entre ellos las más utilizados son la Electroforesis de Campo Eléctrico Alterno Ortogonal (*Orthogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis*, OFAGE) y la Electroforesis de Campo Eléctrico Homogéneo Restringido al Contorno (*Contour-Clamped Homogeneous Electric-Field Electrophoresis*, CHEF) (Chu *et al.*, 1984)). El sistema OFAGE fue la primera

modificación hecha sobre el sistema original y consiste en que dos largos cátodos y dos ánodos puntuales que se colocan con ángulos de 90° entre sí. La separación de las moléculas se consigue variando la orientación del campo norte/sur a este/oeste, es decir, los campos alternantes son perpendiculares entre sí. En cuanto al CHEF se trata de un sistema en el que el campo eléctrico se distribuye a lo largo de una estructura hexagonal de electrodos. Los distintos lados del hexágono son activados alternativamente con un ángulo de 120°, resultando una dirección neta de migración perpendicular a los pocillos donde se coloca la muestra. El uso combinado de PFGE con endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte, ha permitido la obtención de patrones de restricción cromosómico (ó extracromosómico) característicos de cada bacteria estudiada. Esto supone una aproximación a la organización física del cromosoma, puesto que es un reflejo de la pauta de distribución de secuencias a lo largo del mismo. La comparación de los patrones de restricción así obtenidos ha sido aplicada a diversos estudios epidemiológicos.

La PFGE ha sido adaptada para su uso en enterococos y es considerada por muchos laboratorios como la técnica estándar de oro para la tipificación molecular. Permite la evaluación de cepas que se encuentran asociadas en tiempo y ubicación, pero no es muy útil para hacer seguimiento de las mismas en estudios ancestrales evolutivos. Diversos estudios han analizado los patrones resultantes de la electroforesis de manera visual basándose en el criterio de tipificación de cepas bacterianas propuesto por Tenover *et al.* (1995). Hace varios años desarrolló un protocolo para el análisis computarizado de perfiles de PFGE, utilizando el software *BioNumerics* para desplazar la lectura visual y pese a que el protocolo ha evolucionado hacia la interpretación automatizada, algunas de sus medidas obligan al usuario a tomar decisiones críticas durante el análisis, en particular para la asignación de bandas anormales y para la interpretación de perfiles estrechamente relacionados; siendo lo anterior una desventaja importante de la PFGE a la hora de la normalización del protocolo (Gerner-Smidt *et al.*, 2006). Por lo tanto, actualmente se considera que la PFGE es el estándar de oro ("*gold standard*") para subtipificar enterococos y es una herramienta útil para la

caracterización epidemiológica molecular de brotes de enterococos con alto nivel de resistencia a VAN.

1.5 Resistencia antimicrobiana

Las bacterias integrantes de este género se caracterizan por presentar resistencia natural a cefalosporinas, trimetoprima/sulfametoxazol y polimixinas; como también resistencia de bajo nivel a lincosamidas y aminoglucósidos.

Además, presentan resistencia adquirida a los antimicrobianos a través de mutación génica y del mecanismo de transferencia génica horizontal (Sparo *et al.*, 2012)

1.5.1 Resistencia adquirida

La emergencia de resistencia a glucopéptidos vancomicina y teicoplanina (VAN y TEI) en enterococos presenta relevancia en Salud Pública ya que cuando se comportan como patógenos humanos se bloquea una de las pocas alternativas terapéuticas existentes para la terapéutica de infecciones severas.

Los enterococos también pueden adquirir resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos. Su ocurrencia produce el bloqueo de la sinergia con beta-lactámicos y glucopéptidos utilizada para la terapéutica de infecciones severas, como osteomielitis, endocarditis y meningitis.

Las bacterias de este género portan una gran variedad de elementos genéticos móviles y se consideran que son reservorios de genes de resistencia antimicrobiana adquirida (Courvalin 2006; Hegstad *et al.*, 2010). Diversos estudios han documentado la transferencia de cepas presumiblemente patógenas y con resistencia asociada a los ATM a través de los alimentos de origen animal al hombre (Jurkovic *et al.*, 2006; Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2001; Thal *et al.*, 1995; Van den Bogaart & Stobberingh 2000; Giraffa 2002; Hayes *et al.*, 2004; Sparo *et al.*, 2012).

En Europa los enterococos con alto nivel de resistencia a VAN (EVR) se originaron por el uso de ATM como promotores del crecimiento animal (Giraffa 2002). La avoparcina fue utilizada en la cría de animales en la Unión Europea (UE), Australia, y otros lugares, no permitiéndose su utilización en Estados Unidos de

Norte América (EE.UU.) y Canadá. Alimentar a los animales con dosis bajas de ATM, en ciertas condiciones, aumenta la productividad al mejorar la conversión alimenticia y la disminución de la morbilidad y la mortalidad causada por las infecciones (Butaye *et al.*, 2002). El glucopéptido avoparcina se introdujo en el año 1975 por primera vez para la promoción del crecimiento (Hammerum *et al.*, 2010), para los pollos y los cerdos; aunque también se utilizó en otros animales como pavos y terneros (Hammerum *et al.*, 2010; Hammerum 2012).

La resistencia a la avoparcina confiere resistencia cruzada a VAN, y como consecuencia, EVR fue reconocido frecuentemente como integrante de la microbiota intestinal de los animales de granja en Europa durante la década de 1990 (Johnsen *et al.*, 2011). El uso de avoparcina como promotor del crecimiento fue prohibido y la prevalencia de EVR en los animales de granja en Europa disminuyó rápidamente, aunque no desapareció (Aarestrup 2000). Esta persistencia entre los animales de granja, puede justificarse por el uso de tilosina (macrólido) en cerdos que co-selecciona para la resistencia a VAN, ya que los determinantes de resistencia se encuentran a menudo en el mismo plásmido (Aarestrup 2000).

Johnsen *et al.* (2005) plantearon la hipótesis de que los sistemas de adición de plásmidos pueden contribuir a la retención de la resistencia. Diversos estudios publicados describen la aparición de EVR en diferentes reservorios no humanos, incluyendo perros y gatos, caballos, cerdos, pollos, aves, muestras ambientales y aguas residuales, así como en muestras de heces de los agricultores y de seres humanos de la comunidad no hospitalizados, principalmente en Europa (Hammerum 2012). La vinculación entre EVR en reservorios no humanos y el uso de avoparcina como promotor del crecimiento es aún tema de debate.

En EE.UU. el origen de la resistencia es el resultado de la presión de selección de microorganismos del medio hospitalario que motivó a que fueran categorizados como emergentes (Chavers *et al.*, 2003). Los fenotipos VanA y VanB son los más comunes hallados en el hombre y representan el 60% y el 40% respectivamente de los EVR aislados en EE.UU. Ambos fenotipos se han encontrado en las cepas

aisladas de muestras clínicas, veterinarias y productos alimenticios para consumo humano (Centikaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2003).

En la Argentina, en la ciudad de Mendoza, en el año 1998, Marín *et al.*, comunicaron el primer aislamiento clínico de *E. faecium* resistente a VAN. Posteriormente, Corso *et al.* (2001) estudiaron 189 aislamientos de EVR con resistencia a VAN provenientes de 30 hospitales de Argentina, confirmando la presencia de los genes *vanA* en 186 cepas y *vanB* en 3 cepas.

En el año 2012, Delpech *et al.* comunicaron la presencia de enterococos con alto nivel de resistencia a VAN en alimentos de origen animal provenientes de establecimientos de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

La resistencia a glucopéptidos en enterococos ocasiona la pérdida de una importante alternativa terapéutica ya que este género presenta resistencia intrínseca a grupos de ATM de frecuente utilización clínica como aminoglucósidos y cefalosporinas.

1.5.2 Resistencia a Vancomicina

El mecanismo de acción de los glucopéptidos como la VAN y la TEI se basa fundamentalmente en su unión al dipéptido terminal D-alanina-D-alanina del precursor del peptidoglucano, inhibiendo la síntesis de la pared celular. Dicho mecanismo 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 peptidoglucano en crecimiento (figura 2) (Wright 2003). La resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus* está mediada por *clusters* génicos, ocho operones (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL* y *vanM*). *vanA*, *vanB*, y *vanM* son resistentes a altos niveles de VAN (> 128 mg/L). Además, *vanA* y *vanM* son típicamente resistentes a altos niveles de TEI, aunque se han detectado excepciones. *vanB* produce poca o ninguna resistencia a TEI (CMI, <1 mg/L). *vanD* son resistentes a niveles moderados de VAN (CMI, 16-128 mg/L) y susceptibles a TEI, mientras *vanC*, *vanE*, *vanL* y *vanG* presentan bajo nivel de resistencia a VAN (Teo *et al.*, 2011).

Todos los fenotipos comparten un mecanismo de resistencia muy similar basado en la modificación del dipéptido D-alanina-D-alanina, que será sustituido por D-alanina-D-lactato o por D-alanina-D-serina, los cuales, a su vez, presentan baja afinidad por estos ATM (Centikaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2003).

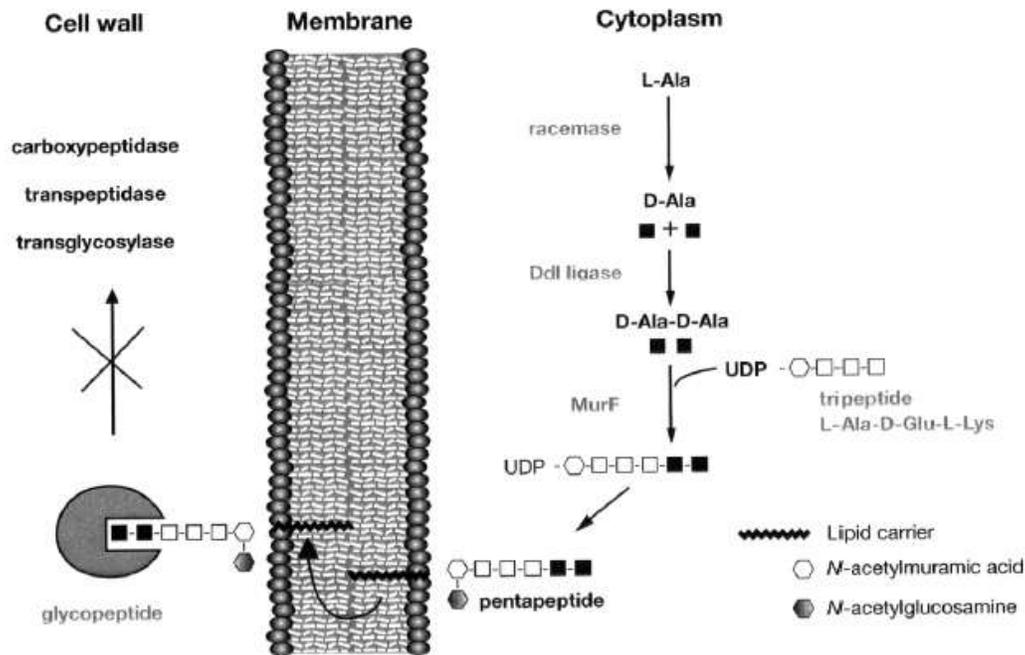


Figura 2: Bio síntesis de peptidoglicano y mecanismo de acción de VAN.

Fuente: Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-Positive cocci. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: S25-S34.

El fenotipo VanA de resistencia a glucopéptidos se caracteriza por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a VAN como a TEI. El gen de resistencia *vanA* se encuentra localizado en el transposón Tn1546, de 10,8 Kb; generalmente en un plásmido, aunque, en algunos casos, se ha transferido al cromosoma (Woodford, 2001).

En este transposón están codificadas las siete proteínas que intervienen en la resistencia a los glucopéptidos, a saber: a) VanR y VanS, implicadas en la regulación del gen de resistencia; b) VanA, VanH y VanX, que serían las responsables directas de la resistencia a glucopéptidos; c) VanY y VanZ, proteínas

accesorias (figura 3). Puede existir heterogeneidad entre los elementos Tn1546, resultado de la presencia de secuencias de inserción o por deleciones de genes no esenciales y regiones intergénicas (Biavasco *et al.*, 2007).

El operón *vanA* codifica resistencia inducible de alto nivel a VAN (CIM \geq 64 mg/L) y a TEI (CIM \geq 16 mg/L) y se adquiere generalmente a través del transposón Tn1546 o de transposones relacionados de la familia Tn3. Este operón contiene 7 genes: 3 (*vanH*, *vanA*, *vanX*) que son responsables directamente de la resistencia a los glucopéptidos, 2 (*vanR* y *vanS*) son los responsables de la regulación de la resistencia, y 1 (*vanY*) es el responsable de eliminar los precursores normales de la pared celular. Se desconoce la función de un séptimo gen (*vanZ*) (Cercenado 2011).

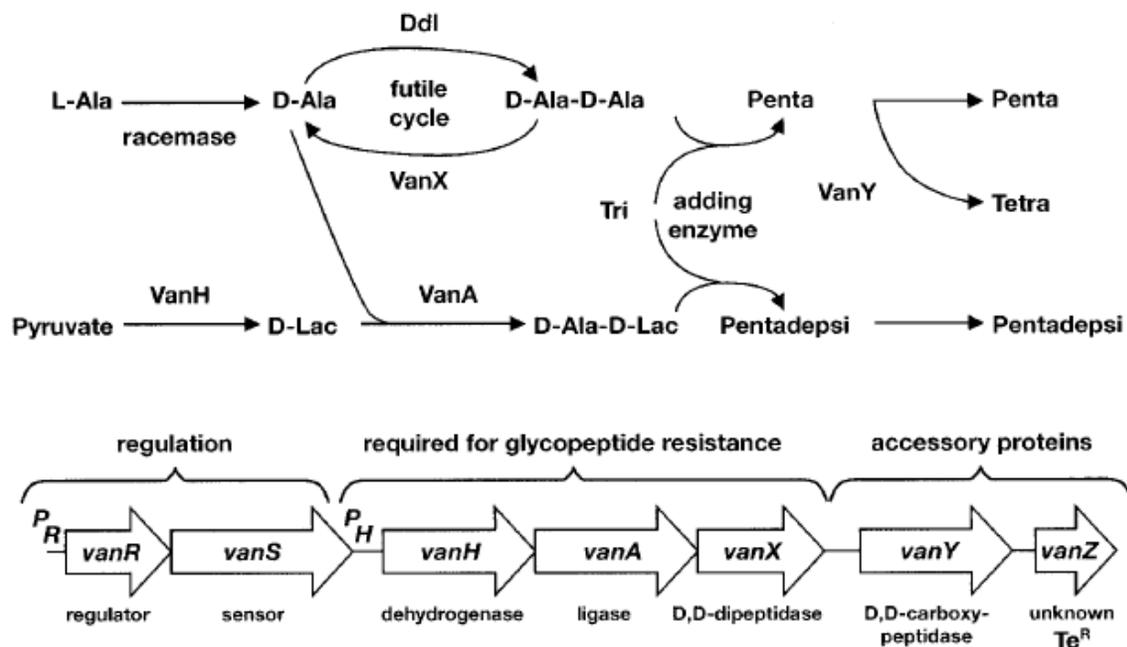


Figura 3: Resistencia a glucopéptidos tipo VanA.

Fuente: Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-Positive cocci. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: S25-S34.

El fenotipo VanB se caracteriza por presentar una resistencia inducible, de moderado ó alto nivel a VAN, pero no a TEI. Los elementos genéticos

responsables de este fenotipo de resistencia se sitúan en elementos transponibles similares al transposón Tn1546, aunque, al contrario de lo que ocurre con el fenotipo VanA, su localización es generalmente cromosómica, siendo menos frecuente la plasmídica. Específicamente se han descrito dos transposones responsables de la diseminación del fenotipo VanB, el Tn1547 y el Tn5382. El Tn5382 se ha encontrado, además, formando parte de un elemento transponible de mayor tamaño, que contiene también el gen de la PBP5, responsable de la resistencia de alto nivel a la penicilina en *E. faecium* (Carias *et al.*, 1998; Woodford 2001). La resistencia VanB se transfiere en algunas cepas por conjugación y se asocia a la movilización de material genético de elevado peso molecular de cromosoma a cromosoma. El análisis de la secuencia de aminoácidos de VanB ha permitido demostrar la elevada homología (65-75%) existente con la ligasa VanA, la deshidrogenasa VanH y la dipeptidasa VanX. Probablemente, las diferencias observadas en la expresión fenotípica y en las sustancias inductoras de la resistencia entre las cepas con fenotipo VanA y VanB sean debidas a variaciones en el sistema regulador, cuya homología es menor (<40%).

El fenotipo VanC se caracteriza por tener una resistencia de bajo nivel a VAN, pero no a TEI. Este fenotipo, de localización siempre cromosómica, es característico de algunas especies de *Enterococcus* raramente encontradas en muestras clínicas: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, y *E. flavescens*. En este caso, a diferencia de lo que ocurría en los fenotipos VanA y VanB, la proteína principal para la resistencia tipo VanC es la síntesis del dipéptido D-alanina-D-serina en vez de D-alanina-D-lactato (Dutka-Malen *et al.*, 1992). Se han descrito en los últimos años tres fenotipos más de resistencia a los glucopéptidos; VanD, VanE y VanG (Depardieu *et al.*, 2003; Fines *et al.*, 1999; Woodford, 2001). Los tres se deben a determinantes genéticos distintos de los clásicos VanA, B, o C, están localizados en el cromosoma y, aparentemente, son de naturaleza no transferible. Hasta la fecha, ninguno de ellos parece estar tan ampliamente diseminado como los fenotipos VanA o VanB, ya que únicamente se han encontrado en unas pocas cepas, de forma muy localizada. El fenotipo VanD se caracteriza por resistencia

moderada a VAN y baja a TEI, mientras que los fenotipos VanE y VanG se caracterizan por resistencia de bajo nivel a VAN y sensibilidad a TEI (Fines *et al.*, 1999; Woodford 2001).

En hospitales de EE. UU. los enterococos son considerados en segundo lugar como los gérmenes más comúnmente aislados de infecciones asociadas a catéter de sistema circulatorio y tracto urinario, también de infecciones de piel y tejidos blandos (Arias & Murray 2012). La implementación de distintos protocolos de vigilancia, permitió detectar la presencia de pacientes portadores en servicios cerrados de los hospitales, como son las unidades de cuidados intensivos.

Dentro del género *Enterococcus* existen dos especies móviles e intrínsecamente resistentes a VAN: *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Ambas especies bacterianas son naturalmente resistentes a bajos niveles de VAN (CIM de 2-32 µg/mL) pero sensibles a TEI, por la presencia de los genes *vanC1* y *vanC2/C3*, respectivamente. Si bien estas especies son de aislamiento clínico poco frecuente, diversos estudios de portación de EVR permitieron detectar elevadas tasas de colonización por *E. gallinarum* en algunas áreas geográficas, confirmando también su transmisión clonal en servicios cerrados hospitalarios (Bourafa *et al.*, 2016). En el año 1995, Dutka-Malen *et al.* documentaron los primeros aislamientos de enterococos móviles con alto nivel de resistencia a glucopéptidos. Años más tarde Lu *et al.* (2000) estudiaron una cepa de *E. gallinarum* con alto nivel de resistencia a VAN y TEI (CIM a VAN y TEI >256 mg/L y 128 mg/L, respectivamente), portado en la mucosa rectal de un paciente con carcinoma nasofaríngeo. Este aislamiento constituyó el primer caso documentado en la Isla de Taiwán. Por estudios de genotipificación se demostró la presencia del gen *vanA* de localización plasmídica, además del gen *vanC1* y la transferencia, por conjugación *in vitro*, del primero a una cepa receptora de *E. faecalis*. En el año 2001, Biavasco *et al.* notificaron en Italia, el aislamiento de dos cepas de *E. gallinarum* de una paciente con leucemia mieloide aguda, demostrando que sólo una de ellas portaba el gen *vanA*.

Tabla 1: Niveles y tipos de resistencia a VAN en enterococos

Fenotipo	Resistencia adquirida								Rcia intrínseca
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanM	VanN	VanC
Gen ligasa	vanA	vanB	vanD	vanE	vanG	vanL	vanM	vanN	vanC1-C2-C3
Subtipos/variantes		B1-3	D1-5		G1-2				C1-C2-C3
MIC _{vancomicina} en mg/L	16 - 1000	4 -32 (-1000)	64 - 128	8 - 32	16	8	>256	16	2 - 32
MIC _{teicoplanina} en mg/L	(4-) 16 - 512	0,5 - 1	4 - 64	0,5	0,5	0,5	96	0,5	0,5 - 1
Expresión	inducible	inducible	constitutiva	inducible	inducible	inducible	Nd	const	Constitutiva/ inducible
Localización	plásmido/ cromosoma	plásmido/ cromosoma	cromosoma	cromosoma	cromosoma	cromosoma?			cromosoma
Transferible por conjugación	+/-	+/-	-	-	¿	¿	+	+	-
Elemento móvil	Tn1546	Tn1547 Tn1549	o----	----	----	----	----	----	----
Target de modificación	D-Ala D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ala	D-Ala-D-Ser	D-Ala-d-Ser	D-Ala-d-Ser	D-Ala-D-Ala	D-Ala-d-Ser	D-Ala-D-Ser
Distribución entre especies	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> ¹ <i>E. casseliflavus</i> ¹ <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> ¹	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>			<i>E. gallinarum</i> : vanC1 <i>E. casseliflavus</i> : vanC2/3

1 adquisición del cluster vanA or vanB en adición con vanC1 o vanC2/3

2 d-Ala-d-Lac, d-alanina-d-lactato; d-Ala-d-Ser, d-alanina-d-serina.

3 subtipos (vanB1-3, vanD1-5, vanG1-2); S, susceptible a TEI. Fuente: Werner et al., 2008; Courvalin 2006, Cercenado 2011.

1.5.3 Alto Nivel de Resistencia a Gentamicina

Los enterococos presentan resistencia intrínseca de bajo nivel a los aminoglucósidos a través de un mecanismo que implica un transporte deficiente de estas drogas al interior de la bacteria, que se caracteriza por presentar valores de CIM que oscilan entre 4 mg/L y 64 mg/L para gentamicina (GEN) y entre 16 mg/L y 256 mg/L para estreptomycinina (STR). Como consecuencia de este hecho los aminoglucósidos no son eficaces en monoterapia en infecciones provocadas por enterococos. Sin embargo, cuando se asocia un aminoglucósido con otro antimicrobiano que actúe en la pared celular (beta-lactámicos y glucopéptidos), se produce un gran aumento de la captación del aminoglucósido, resultando en un efecto sinérgico bactericida necesario para el tratamiento de infecciones graves. Ciertas bacterias de este género pueden evadir este efecto sinérgico bactericida

mediante la adquisición de genes que codifican la producción de enzimas inactivantes de aminoglucósidos que otorgan resistencia de alto nivel a estas drogas. Las reacciones catalizadas por estas enzimas se dividen en tres categorías:

- 1- Fosforilación
- 2- Adenilación
- 3- Acetilación

Las cepas con alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos (ANRG) presentan valores elevados de CIM para GEN (CIM \geq 500 mg/L) y/o para STR (CIM \geq 2000 mg/L) dependiendo del mecanismo de inactivación de las drogas (Cercenado 2011). El ANRG no se limita a aislamientos clínicos, puede encontrarse en ambientes acuáticos y animales (Silva Lopes *et al.*, 2003; Sparo *et al.*, 2013).

El ANRG cuando es mediada por la enzima bifuncional AAC (6')-APH (2'') puede transferirse a otras bacterias a través de plásmidos y transposones y así diseminarse en el ecosistema (Sparo *et al.*, 2012).

El gen *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia* es el determinante que más frecuentemente está presente entre las distintas especies de enterococos con alto nivel de resistencia a GEN (ANRG); codifica la enzima AAC (6')-APH (2'') con actividad acetiltransferasa y fosfotransferasa (Chow 2000). Este gen bifuncional confiere resistencia a los aminoglucósidos disponibles clínicamente excepto STR, eliminando así el sinergismo bactericida entre aminoglucósidos y un agente activo sobre de la pared celular, como ampicilina o VAN (Chow *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2001, Sparo *et al.*, 2013). También se han caracterizado otros genes monofuncionales que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Dentro de la clase APH (2'')-subclase I de las fosfotransferasas se han descrito genes cromosómicos como *aph(2'')-Ib* y *aph(2'')-Id* y genes de origen plasmídico como *aph(2'')-Ic*, que codifican enzimas que generan resistencia a GEN y amikacina; detectados originalmente en especies de *Enterococcus* distintas a *E. faecalis* (Ramírez & Tolmasky, 2010), y se ha aislado con más frecuencia de enterococos procedentes

de animales de granja que de humanos (Cercenado 2011). Otros genes *aph(3')-IIIa* y *ant(4')-Ia* codifican resistencia a varios aminoglucósidos, excepto a GEN (Chow *et al.*, 1997).

Tabla 2: Genes de resistencia enzimática a los aminoglucósidos en *Enterococcus*.

Aminoglucósidos					
Gen de Resistencia	gentamicina	tobramicina	amikacina	kanamicina	estreptomicina
<i>aac(60)-Ie-aph(200)-Ia</i>	ANR	R	R	R	S
<i>aph(200)-Ib</i>	R	R	BNR	R	S
<i>aph(200)-Ic</i>	R	R	S	R	S
<i>aph(200)-Id</i>	R	R	S	R	S
<i>aph(30)-IIIa</i>	S	S	R	R	S
<i>aac(60)-Ii</i>	S	R	S	R	S
<i>ant(300)-Ia</i>	S	S	S	S	R
<i>ant(40)-Ia</i>	S	R	R	R	S
<i>ant(60)-Ia</i>	S	S	S	S	R

ANR: resistencia de alto nivel BNR: resistencia de bajo nivel

Fuente: Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis.* 2000; 31(2):586–9.

1.6 Determinantes de virulencia

La virulencia en los enterococos ha evolucionado probablemente de forma similar a otros linajes patogénicos de otras especies bacterianas como *Escherichia coli* O157 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR). *S. aureus* ha adquirido determinantes de virulencia por medio de intercambio genético, característica que le permite obtener plásmidos, transposones o elementos cromosomales como es el *cassette* SCC*mec*. De la misma manera, *E. coli* posee islas de patogenicidad que codifican para numerosas toxinas, adhesinas y diversos genes de virulencia. Una vez que estos elementos se integran en los huéspedes bacterianos, se generan nuevos linajes patogénicos que pueden adaptarse, sobrevivir y diseminarse en su nuevo nicho biológico.

En enterococos, los determinantes genéticos que han adquirido algunas especies, han incrementado en este género la posibilidad de generar infección por medio de

la producción de toxinas citolíticas, gelatinasa, sustancia de agregación, producción extracelular de peróxido y proteínas de superficie, entre otros. Así, estas proteínas de tipo adhesina; le permiten al enterococo adherirse a un amplio rango de proteínas de la matriz extracelular como colágeno, fibrinógeno, trombospondina, lactoferrina; como al epitelio renal y oral de humanos y animales. Una vez iniciado el proceso de adherencia, la bacteria puede invadir otros órganos cercanos e ingresar al sistema linfático o a la circulación sanguínea, lo cual genera diversas alteraciones patológicas y respuestas inflamatorias (Garza Velazco *et al.*, 2002).

La codificación y expresión de factores de virulencia como hemolisina (*cyl*), proteína de adhesión (*esp*) y proteasa enterocócica (*gel*) se consideran como los principales determinantes en la virulencia de *E. faecalis* (Coburn & Gilmore 2003; Toledo-Arana *et al.*, 2001). Según Shankar *et al.* (2004), algunos de estos factores como *hly*, *esp* y *gel* son codificados sobre una isla de patogenicidad.

1.6.1 Citolisina

La citolisina es una toxina hemolítica proteica modificada post translacionalmente que ocurre hasta en el 60% de las cepas de *E. faecalis*.

El operón se encuentra localizado en un plásmido o integrado en el cromosoma bacteriano, el más comúnmente estudiado es pAD1 (Ike *et al.*, 1992). Esta citolisina esta codificada por el operón *cy/LLLSMBA/* que provoca lisis de los eritrocitos (actividad β -hemolítica). Las cepas de *E. faecalis* que expresan *cyl* son más virulentas que aquellas cepas isogénicas que no lo expresan (Mundy *et al.*, 2000; Arias & Murray 2012; Van Tyne *et al.*, 2013).

El operón de la citolisina está constituido por seis genes relacionados con la biosíntesis de la toxina. El modelo para la expresión, maduración, secreción y activación, incluye dos subunidades estructurales de citolisina: una grande (*large*) y otra pequeña (*small*), codificada por los genes *cy/LI* y *cy/Ls*. Estas son modificadas post translacionalmente en el interior de la célula por el producto de *cy/M* y transportado fuera de la célula por un *cassette* transportador de unión a ATP codificado por *cy/B*; luego de externalizarlo y los componentes precursores de

la citolisina son activados por el producto del gen *cyIA* (una serina proteasa). Un sexto gen (*cyII*), codifica para una proteína responsable de la inmunidad de las bacterias productoras de citolisina. Los seis marcos de lectura abiertos están agrupados y en la misma orientación. La regulación de la expresión de la citolisina está determinada por dos genes *cyIR1* y *cyIR2* implicados en la represión de la transcripción por un mecanismo de “*quorum sensing*” o mecanismos de comunicación bacterianos (Semedo *et al.*, 2003; Van Tyne *et al.*, 2013).

Se ha estudiado la asociación de la expresión de citolisina y el incremento de la toxicidad de las infecciones por enterococos en múltiples modelos animales y en evolución clínica de infecciones humanas (tabla 3).

Tabla 3: Efecto de la citolisina en infecciones producidas por *E. faecalis*.

Infección por <i>E. faecalis</i>	Efecto de citolisina
Bacteriemia humana	Provoca infección 5 veces más agudamente letal
Endoftalmitis en conejo	Provoca infección aguda en retina y otras estructuras oculares, refractaria a tratamiento ATM
Infección intraperitoneal en raton	Provoca infección aproximadamente 100 veces más agudamente letal
Endocarditis en conejo	Provoca infección aguda letal en sinergia con sustancia de agregación
Ingestión en <i>Caenorhabditis elegans</i>	Provoca infección aguda letal posterior a la ingestión

Fuente: Van Tyne *et al.* *Structure, Function, and Biology of the Enterococcus faecalis Cytolysin. Toxins.* 2013; 5: 895-911

En el modelo de endoftalmitis se ha demostrado que la citolisina produce una disminución de la función retinal en los conejos (Jett 1992). Así mismo, en el modelo de endocarditis observaciones similares han detectado la producción de vegetaciones debido a la presencia de la citolisina, las cuales incrementan significativamente la mortalidad de los animales estudiados.

La citolisina también ha sido asociada con incremento de la toxicidad en infecciones en el hombre. Un estudio retrospectivo que analizó 190 aislamientos clínicos de *E faecalis* encontró que el 45% de los aislamientos fueron citolisina

positivos. Es de destacar que, incluso después de controlar el tratamiento y la resistencia a los medicamentos, los pacientes infectados con *E. faecalis* citolíticas tuvieron aumentado cinco veces el riesgo a una forma aguda terminal (muerte dentro de las tres semanas post diagnóstico) en comparación con pacientes infectados con cepas no citolíticas (Van Tyne *et al.*, 2013).

1.6.2 Gelatinasa

La gelatinasa es una metaloproteasa extracelular secretada por *E. faecalis*, que hidroliza gelatina, colágeno y caseína, y en modelos animales se considera como un factor de virulencia. La capacidad de esta enzima para hidrolizar colágenos y ciertos péptidos bioactivos sugiere su participación en la iniciación y propagación de procesos inflamatorios que implican *E. faecalis* (Furumura *et al.*, 2006).

El gen *gelE* está localizado en el cromosoma, es regulado por medio del “*quorum sensing*” y “corriente abajo” (*downstream*), se encuentra un gen adicional denominado *sprE*, que codifica para una serina-proteasa y es co-transcrito con *gelE*, que codifica la expresión de gelatinasa. La transcripción de estos genes es regulada de una forma dependiente por medio del sistema *fsr* (*f*ecal *s*treptococci *r*egulator), el cual está formado por los genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* (homólogos a los genes *agr* de *S. aureus*); que se encuentran “corriente arriba” (*upstream*) de los genes *gelE* y *sprE* (Qin *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2003; Arias & Murray 2012). Este sistema inicialmente se postulaba como regulador solamente de los genes *gelE* y *sprE*, sin embargo, estudios recientes han demostrado su actividad como regulador general en *E. faecalis*. El gen *fsrA*, se transcribe de forma monocistrónica como un regulador de respuesta, el gen *fsrB* produce un oligopéptido señal, feromona, conformada por 11 residuos peptídicos denominada feromona activada por biosíntesis de gelatinasa (*G*elatinase *B*io *s*ynthesis *A*ctivating *P*heromone, GBAP) y el gen *fsrC* codifica para una proteína quinasa, capaz de sensar la presencia del GBAP. Por lo tanto, cuando el GBAP se acumula en la transición de fase exponencial a fase estacionaria se inducen los genes *gelE* y *sprE*. Diferentes estudios del sistema *fsrABC* y de la gelatinasa en *E. faecalis*

OG1RF han señalado que estos genes son importantes en la virulencia en diferentes modelos animales. Por ejemplo, mutantes de *fsrA*, *fsrB* y/o *fsrC* y del gen *ge/E* han mostrado atenuación en el modelo de peritonitis de ratón, comparado con cepas paternas y en el modelo de virulencia bacteriana en *Caenorhabditis elegans* (Waters *et al.*, 2003).

1.6.3 Proteína de superficie de enterococo

La proteína de superficie de enterococo (ESP) es una proteína de superficie de alto peso molecular, cuya función se desconoce, pero se encuentra significativamente aumentada en infecciones provocadas por *E. faecalis* (Toledo-Arana *et al.*, 2001). Posee una arquitectura con múltiples motivos repetidos, característico de un número significativo de proteínas de superficie bacteriana que actúan como adhesinas uniéndose a ligandos del hospedador (Shankar *et al.*, 2001).

El gen *esp* (*Enterococcal Surface Protein, esp*), contribuye a la persistencia de las infecciones del tracto urinario (aproximadamente un tercio expresan ESP) y tiene un compromiso en la formación de *biofilm* por *E. faecalis*. El gen *esp* forma parte de una gran isla de patogenicidad (*Pathogenicity Island, PAI*) (Shankar *et al.*, 2006, 2001). ESP posee múltiples motivos repetidos, característica frecuente en las proteínas de superficie bacteriana, que cumplen la función de adhesinas involucradas en la unión a ligandos del huésped (Shankar *et al.*, 2001).

El estudio de la presencia de hemolisina, gelatinasa y proteína de adhesión ESP en enterococos que integran la microbiota de los alimentos presenta una relevancia significativa por la posibilidad de colonización de estas cepas en el tracto gastrointestinal humano y el riesgo de intercambio génico con la microbiota habitual del hombre.

Tabla 4: Genes que codifican factores de virulencia en *Enterococcus* y sus productos.

Genes	Relación con la virulencia
<i>gelE</i>	Toxina, metaloendopeptidasa extracelular, hidroliza gelatina, colágeno y otros productos bioactivos
<i>cy/LI cy/Ls</i>	Precusores de la citolisina, expresión de <i>cy/LI</i> , <i>cy/Ls</i> , <i>cy/M</i> , <i>cy/B</i> , <i>cy/A</i> , es requerida para la producción de una citolisina activa la cual lisa un espectro amplio de células gram positivas y eucariotas.
<i>cy/M</i>	Modificación post transcripcional de la citolisina
<i>cy/B</i>	Transporte de la citolisina
<i>cy/A</i>	Activación de la citolisina
<i>esp</i>	Proteína asociada a la pared celular involucrada en la evasión de la respuesta inmune y puede estar asociada a genes <i>cyI</i>

Fuente: Eaton TJ, Gasson MJ. *Appl Environ Microbiol.* 2001

1.7 Relevancia del género en salud humana

Durante los años 1960 y 1970 (Mundt *et al.*, 1963, Martin & Mundt, 1972) se realizaron estudios analizando una variedad de ambientes y se encontraron enterococos en el tracto gastrointestinal y heces de mamíferos (71,3%), reptiles (85,7%) y aves (31,8%), como también en insectos (53%). Este patrón de colonización sugiere que al menos desde el periodo Devónico temprano (aproximadamente 412 millones de años atrás, el tiempo del último ancestro común de mamíferos, reptiles, aves e insectos), los enterococos formaban parte de la microbiota intestinal, lo que probablemente los convierte en los primeros miembros del tracto gastrointestinal (Lebreton *et al.*, 2014).

Los alimentos de origen animal están colonizados por diversas especies de enterococos y pueden por lo tanto constituir un reservorio de cepas con factores de virulencia y resistencia múltiple a los antimicrobianos de utilización clínica de potencial diseminación al hombre a través de la cadena alimentaria (Delpech *et al.*, 2012; Delpech *et al.*, 2013).

1.8 Industria artesanal de producción de alimentos de origen animal en la región del centro de la Provincia de Buenos Aires

Los partidos de Tandil, Azul y Olavarría constituyen un núcleo tripolar de centros urbanos organizadores de un amplio espacio de la zona central de la Provincia de Buenos Aires. Forman un triángulo de ciudades conectadas entre sí por la actividad agrícola y ganadera y por actividades industriales relacionadas.

Se desarrollan en su zona agrícola, cultivos de trigo, avena, cebada, legumbres, alfalfa y frutales; así como actividad pecuaria criándose especialmente ganado vacuno para producción de carne, leche y practicándose la avicultura y la apicultura. Es la zona maicera por excelencia y una de las regiones del país que aporta la materia prima para una industria alimenticia con relevancia creciente.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GENERAL

Genotipificar cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de alimentos de origen animal provenientes de un área rural del centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina y establecer su relación clonal con cepas aisladas de infecciones invasivas humanas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 OBJETIVO 1

Aislar y caracterizar, mediante técnicas fenotípicas y moleculares, las especies de enterococos recuperadas de alimentos de origen cárnico y lácteo elaborados en un área rural del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

2.1.2 OBJETIVO 2

Investigar los determinantes de virulencia en los aislamientos de *Enterococcus* spp.

2.1.3 OBJETIVO 3

Establecer la prevalencia de las distintas especies de enterococos y sus determinantes de virulencia en los aislamientos de enterococos presentes en alimentos de origen cárnico y lácteo.

2.1.4 OBJETIVO 4

Determinar la presencia *Enterococcus* spp. resistentes a glucopéptidos mediante la investigación de los genes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*.

2.1.5 OBJETIVO 5

Investigar la presencia de *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a gentamicina mediante la investigación de los genes *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia*, *aph (2'')-Ib*, *aph (2'')-Ic*, y *aph (2'')-Id*.

2.1.6 OBJETIVO 6

Investigar la transferencia horizontal *in vitro* de resistencia de alto nivel a gentamicina entre *E. faecalis* recuperados de alimentos de origen animal y de origen humano.

2.1.7 OBJETIVO 7

Establecer la relación clonal entre cepas de *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a gentamicina provenientes de alimentos de origen animal y de origen humano.

2.1.8 OBJETIVO 8

Establecer la relación clonal entre cepas de *E. faecium* con resistencia a vancomicina (*vanA*) provenientes de alimentos de origen animal y de origen humano.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

3.1.1 Periodo y área de estudio

La presente tesis doctoral se basa en una investigación de tipo observacional, prospectiva y transversal y que ha sido realizada durante el período enero-diciembre de 2013 en el Partido de Tandil de la región del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

3.1.2 Recolección de muestras de alimentos de diferente origen

La recolección de muestras fue efectuada de distintos establecimientos comerciales dedicados a la elaboración artesanal de alimentos de origen animal, de la zona céntrica y periférica de la ciudad de Tandil. Se incluyeron los cuatro períodos estacionales. Las muestras de alimentos cárnicos y lácteos artesanales fueron tomadas en forma representativa a través de un muestreo probabilístico aleatorio simple siguiendo las recomendaciones del *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food* (2015). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: alimentos de origen bovino, ovino, porcino y caprino, elaborados artesanalmente, provenientes del Partido de Tandil de la Provincia de Buenos Aires.

Se excluyeron los alimentos artesanales del mismo origen que no fueron elaborados en la zona bajo estudio (Partido de Tandil).

3.1.2.1 Salamín artesanal

Se estudió un total de n=**642** salamines artesanales.

Primera serie de muestreo: se seleccionaron tres salamines/lote de dos lotes/establecimiento, elaborados en tres establecimientos industriales del área periférica de la ciudad de Tandil dedicados a la elaboración artesanal (A1-A2-A3).

Segunda serie de muestreo: cinco salamines/lote de dos lotes/establecimiento, obtenidos en los establecimientos (A1-A2-A3).

Tercera serie de muestreo: se efectuó en cinco establecimientos de la zona céntrica de la ciudad de Tandil (B1-B2-B3-B4-B5), se recolectaron tres salamines/lote de cinco lotes/establecimiento y también en cuatro establecimientos

de la zona periférica de Tandil (E1-E2-E3-E4) en los que se recolectaron tres salamines/lote originados de cuatro lotes/establecimiento seleccionados.

Cuarta serie de muestreo: se recolectaron tres salamines/lote de siete lotes/establecimiento, procedentes de cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (A1-A2-A3-A4-A5) y tres salamines/lote, de seis lotes/establecimiento adquiridos en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4).

Quinta serie de muestreo: se recolectaron tres salamines/lote, cuatro lotes/establecimiento, de cinco establecimientos de la zona céntrica (A1-A2-A3-A4-A5) y tres salamines/lote, cinco lotes/establecimiento, de cuatro establecimientos de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4).

Sexta serie de muestreo: tres salamines/lote, de seis lotes/establecimiento, a partir de cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (A1-A2-A3-A4-A5) y tres salamines/lote, de siete lotes/establecimiento, recolectados en cuatro establecimientos de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4).

3.1.2.2 Carne picada

Se estudió 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 (A1-A2-A3) y en tres establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3).

Segunda serie de muestreo: tres muestras/establecimiento recolectadas en cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (A1-A2-A3-A4-A5) y en cinco establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4-B5).

Tercera serie de muestreo: tres muestras/lote, de diez lotes/establecimiento en cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (A1-A2-A3-A4-A5) y en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4) 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 (A1-

A2-A3-A4-A5) junto con tres muestras/lote de 11 lotes/establecimiento en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4).

Quinta serie de muestreo: tres muestras/lote a partir de siete lotes/establecimiento, seleccionados en cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (A1-A2-A3-A4-A5) y tres muestras/lote, adquiridas de ocho lotes/establecimiento en cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4).

Sexta serie de muestreo: tres muestras/lote, ocho lotes/establecimiento, de cinco establecimientos comerciales de la zona céntrica (A1-A2-A3-A4-A5) y tres muestras/lote, de nueve lotes/establecimiento, provenientes de cuatro establecimientos comerciales de la zona periférica de Tandil (B1-B2-B3-B4).

3.1.2.3 Leche de cabra

Se obtuvo $n=30$ muestras de leche de cabra de tres establecimientos agropecuarios elaboradores de quesos de cabra artesanales (C1-C2-C3) de la zona rural del Partido de Tandil, Prov. Bs. As. Se seleccionaron diez muestras por establecimiento.

3.1.2.4 Queso de cabra artesanal

Se recolectó $n=42$ quesos de cabra en siete establecimientos agropecuarios elaboradores de quesos de cabra artesanales (D1-D2-D3-D4-D5-D6-D7) de la zona rural del Partido de Tandil. Se obtuvieron seis quesos/establecimiento.

3.1.2.5 Queso de vaca artesanal

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

Primera serie de muestreo: se seleccionaron cinco quesos/establecimiento en tres establecimientos elaboradores de quesos de vaca artesanales (E1-E2-E3).

Segunda serie de muestreo: se adquirieron ocho quesos/establecimiento en cinco establecimientos elaboradores de quesos de vaca artesanales (E1-E2-E3-E4-E5-E6-E7-E8).

Tercera serie de muestreo: dos quesos/lote, de un lote/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (E1-E2) y dos quesos/lote, un

lote/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (E1-E2).

Cuarta serie de muestreo: dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (E1-E2) y dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (E1-E2)

Quinta serie de muestreo: dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (E1-E2) y dos quesos/establecimiento, dos lotes/establecimiento, en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (E1-E2).

Sexta serie de muestreo: dos quesos/lote, obtenidos de tres lotes/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (E1-E2) y dos quesos/lote, obtenidos de tres lotes/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (E1-E2).

3.1.2.6 Queso de oveja artesanal

Se estudió n=**24** quesos de oveja artesanales.

En la primera, segunda y tercera series de muestreo no se obtuvieron muestras de queso de oveja.

Tercera serie de muestreo: dos muestras de un lote en un establecimiento comercial de la zona céntrica (F1) y de un lote en un establecimiento comercial de la zona periférica (F1).

Cuarta serie de muestreo: dos muestras de un lote en un establecimiento comercial de la zona céntrica (F1) y de un lote en un establecimiento comercial de la zona periférica (F1).

Quinta serie de muestreo: dos muestras/lote, de dos lotes/establecimiento en dos establecimientos comerciales de la zona céntrica (F1-F2) y en dos establecimientos comerciales de la zona periférica (F1-F2).

3.1.3 Procesamiento de muestras

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

3.1.3.1.1 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 ajustó 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 (Vicking M23, Argentina) durante 25 min a 245 rpm.

3.1.3.1.2 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.

3.1.3.1.3 Leche de cabra

Debido a su consistencia líquida fueron procesados como homogenatos. No se les agregó diluyente o Tween 80. No fueron sometidas a agitación mecánica.

3.1.3.1.4 Quesos de cabra, de vaca y de oveja artesanales

Se pesaron 10 g del alimento en forma estéril para su posterior almacenamiento en bolsa plástica con cierre hermético estéril. Se ajustó a un volumen final de 100 mL con Agua Peptonada estéril 1,5% p/v como diluyente. Como la variedad de quesos en estudio contenía un alto porcentaje de materia grasa se agregó al diluyente Tween 80 (1,0%). Por medio de un instrumento mecánico (Stomacher 400, Lab System, USA) se procedió a la homogeneización (3 ciclos de 60 s).

3.1.4 Aislamiento e identificación fenotípica de *Enterococcus* spp.

Las muestras recolectadas fueron enriquecidas en agua de peptona tamponada durante 16 h (35°C) y una alícuota de 0,1 mL se extendió sobre placas de agar Slanetz–Bartley (comercial) y de agar-bilis-esculina-kanamicina-azida (comercial) suplementados con 125 mg/L de GEN, y 6 mg/L de VAN y sin estas drogas. Después de 48 h de incubación a 35°C en atmósfera ordinaria, en las colonias compatibles con enterococos se investigó la morfología por coloración de Gram y la presencia de catalasa con peróxido de hidrógeno al 10%. Posteriormente las cepas fueron almacenadas por duplicado a -70°C en caldo BHI glicerol 20% (v/v) hasta su identificación. Los aislamientos obtenidos a partir del medio selectivo para enterococos (Agar azida -bilis-esculina; Lab. Britania, Argentina) que presentaron colonias con características macroscópicas compatibles con *Enterococcus* spp. (colonias con pigmento negro) se transfirieron a agar nutritivo. Luego de 48 h de incubación en atmósfera ordinaria a 35°C; se efectuó coloración de Gram y catalasa.

Posteriormente se realizó el almacenamiento por quintuplicado de cada aislamiento a -20°C y -70°C en caldo BHI con glicerol 30%.

La diferenciación fenotípica de los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* se basó en el protocolo descrito por Sparo & Mallo (2001). Se investigó la morfología bacteriana; la presencia de catalasa con peróxido de hidrógeno al 10%. Posteriormente para la caracterización fenotípica de especies se utilizó la galería API 20 STREP (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). El sistema API 20 STREP es un método estándar que asocia veinte tests bioquímicos o microtubos que contienen los sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares. Las pruebas enzimáticas son inoculadas con una suspensión densa realizada a partir de un cultivo puro que rehidrata los sustratos. Las reacciones que se producen durante el período de incubación se traducen en variaciones de la coloración, espontáneas o reveladas mediante la adición de reactivos.

La lectura de estas reacciones se efectuó mediante la Tabla de Lectura y la identificación se obtuvo con el Catálogo Analítico provisto por el fabricante.

3.1.5 Caracterización molecular por amplificación génica

3.1.5.1 Preparación de aislamientos de enterococos

3.1.5.1.1 Obtención de cultivos puros

De una copia de los aislamientos almacenados a -20°C se realizó un enriquecimiento en caldo BHI.

Se realizaron tres pasajes sucesivos en caldo BHI, con intervalos de 7-8 h, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento bacteriano; posteriormente se efectuó un aislamiento a agar nutritivo y a caldo BHI.

3.1.5.1.2 Obtención de ADN

3.1.5.1.2.1 Método de lisis por calor

Los aislados se sembraron en placas de agar sangre a 35°C durante 12 h. A partir de este cultivo se tomaron de tres a cinco colonias y se suspendieron en 1 mL de agua destilada estéril. Después de homogeneizar la suspensión por agitación en un agitador "vortex", se calentó durante 15 min a 100°C y luego se centrifugó a 15.000 *g* por 10 min. El sobrenadante, que contenía el ADN, se separó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.1.5.2 Identificación molecular a nivel de género mediante PCR

Se utilizó el protocolo descrito por Ke *et al.* (1999) en el que se amplifica un fragmento del gen *tuf* de 112 pb (tabla 5), que codifica para un factor de elongación específico del género *Enterococcus* (EF-Tu) que está involucrado en la formación de la cadena peptídica y es un constituyente esencial para el genoma bacteriano.

Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en termociclador Modelo *Gradient T Professional Basic* (Biometra, Germany) en tubos de reacción de 0,2 mL conteniendo 25 µL de mezcla de reacción compuesta por 1 X de Buffer (Invitrogen, Life Technologies, Argentina), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP's, Invitrogen), 0,4 µM de cada oligonucleótido cebador (IDT, Biodynamics, Argentina), 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 100 ng/µL de ADN. El volumen final fue de 50 µL.

Como control positivo se utilizó la cepa de colección: *E. faecalis* ATCC 19433. Como controles negativos se utilizaron las cepas de colección: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

En cada reacción se realizó un control conteniendo todos los reactivos excepto el ADN. Cada reacción de PCR se realizó dos veces para asegurar la reproductibilidad del método y de los resultados.

Se utilizó el siguiente esquema de ciclos: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min seguidos de 25 ciclos de amplificación, cada uno de los cuáles consistieron de 94°C por 60 s, 60 s a 55°C y 60 s a 72°C, terminando con un paso final de extensión a 72°C por 5 min.

Luego de la amplificación, se tomaron 10 µL de cada reacción de PCR y se revelaron a través de electroforesis (Bio Rad System, TecnoLab, Argentina) en gel de agarosa (1,5% agarosa, 1X TBE, 100 V) para calcular los tamaños moleculares de los productos de amplificación, comparándolos con marcador de 100 pb (Inbio Highway, Argentina). Se utilizó SYBR Safe (Invitrogen) para tinción de ADN y las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador de luz azul (UltraBright UV Transilluminator, Maestrogen, US)

3.1.5.3 Identificación molecular a nivel de especie

Para la identificación de *E. faecalis* y *E. faecium* se utilizó el protocolo descrito por Dutka- Malen *et al.* (1995) que amplifica un fragmento del gen *ddl* que codifica para la ligasa D-alaninaD-alanina. Para la identificación de *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hiraе*, *E. raffinosus* y *E. saccharoliticus* se utilizó el protocolo descrito por Jackson *et al.* (2004) basado en la amplificación del gen *sodA* que codifica para la superóxido dismutasa. La secuencia de oligonucleótidos utilizado para la identificación de cada especie y los tamaños de los fragmentos amplificados por PCR se detallan en la tabla 5. La mezcla de reacción para PCR utilizada es la misma descrita en el apartado anterior para identificación molecular a nivel de género.

Tabla 5: Secuencia de oligonucleótidos y tamaño del fragmento amplificado para género y cada una de las especies tipificadas.

Género/especie	Oligonucleótido y Secuencia 5' 3'	Tamaño del producto amplificado	Temperatura de Alineamiento (°C)
<i>Enterococcus</i>	Ent1 TACTGACAAACCATTCATGATG Ent2 AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112pb	55
<i>E. faecalis</i>	E1 ATCAAGTACAGTTAGTCT E2 ACGATTCAAAGCTAACTG	941pb	45
<i>E. faecium</i>	Efdd1 GCAAGGCTTCTTAGAGA Efdd2 CATCGTGTAAGCTAACTTC	535pb	55
<i>E. durans</i>	Du1 CCTACTGATATTAAGACAGCG Du2 TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295pb	55
<i>E. avium</i>	Av1 GCTGCGATTGAAAAATATCCG Av2 AAGCCAATGATCGGTGTTTTT	368pb	55
<i>E. raffinosus</i>	Rf1 GTCACGAACTTGAATGAAGTT Rf2 AATGGGCTATCTTGATTGCGG	287pb	55
<i>E. gallinarum</i>	Ga1 TTAATTGCTGATTTTGATTTCG Ga2 TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	173pb	55
<i>E. hirae</i>	Hi1 CTTTCTGATATGGATGCTGTC Hi2 TAAATTCTTCTTAAATGTTG	187pb	55
<i>E. casseliflavus</i>	Ca1 TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC Ca2 GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	288pb	55
<i>E. saccharolyticus</i>	Sa1 AAACACCATAACACTTATGTG Sa2 GTAGAAGTCACTTCTAATAAC	371pb	60

Como controles se utilizaron cepas de colección: *E. avium* ATCC 14025, *E. casseliflavus* ATCC 25788, *E. durans* ATCC 19432, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC19434, *E. gallinarum* ATCC 49673, *E. hirae* ATCC 8043, *E. raffinosus* ATCC 49427, *E. saccharolyticus* ATCC 43076.

En cada reacción se realizó un control conteniendo todos los reactivos excepto el ADN. Cada reacción de PCR se realizó dos veces para asegurar la reproductibilidad del método y de los resultados.

Se utilizó el siguiente esquema de ciclos: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min seguidos de 25 ciclos de amplificación, cada uno de los cuáles consistieron de 94°C por 60 s, 60 s a la temperatura de alineamiento

correspondiente (tabla 5) y 60 s a 72°C, terminando con un paso final de extensión a 72°C por 5 min.

Luego de la amplificación, se tomaron 10 µL de cada reacción de PCR y se revelaron a través de electroforesis (Bio Rad) en gel de agarosa (1,5% agarosa, 1X TBE, 100V) para calcular los tamaños moleculares de los productos de amplificación, comparándolos con marcador de 100 pb (Inbio Highway). Se utilizó *SYBR Safe* (Invitrogen) para tinción de ADN y las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador de luz azul (UltraBright UV Transilluminator).

3.2 Investigación de los determinantes de virulencia en los aislamientos de *Enterococcus* spp.

Para la amplificación génica del ADN se realizó la PCR de acuerdo al protocolo de Eaton & Gasson (2001) y Vanckerckhoven *et al.* (2004).

A partir de un cultivo puro y obtención de ADN mediante el método de lisis por calor, se realizaron las reacciones de PCR. Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en termociclador Modelo *Gradient T Professional Basic* (Biometra) en tubos de reacción de 0,2 mL conteniendo 25 µL de mezcla de reacción compuesta por 1 X de Buffer (Invitrogen Life Technologies), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP's (Invitrogen), 0,4 µM de cada oligonucleótido cebador (IDT, Biodynamics) descritos en la tabla 6, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 100 ng/µL de ADN.

Se utilizó el siguiente esquema de ciclos: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min seguidos de 25 ciclos de amplificación, cada uno de los cuáles consistieron de 94°C por 60 s, 60 s a la temperatura de alineamiento correspondiente (tabla 6) y 60 s a 72°C, terminando con un paso final de extensión a 72°C por 5 min. El volumen final fue de 50 µL.

Como controles se utilizaron cepas de referencia con distintos determinantes de virulencia reconocidos: *E. faecalis* DS16 portadora del gen *cylA*, *E. faecalis* NMH594 portadora del gen *esp* y *E. faecalis* OG1RF portadora del gen *gelE* y

cepas saprófitas de colección como *E. faecalis* CECT7121 y *E. faecalis* MR1024, sin determinantes de virulencia.

En cada experimento se realizó un control conteniendo todos los reactivos excepto el ADN. Cada reacción de PCR se realizó dos veces para asegurar la reproductibilidad del método y de los resultados.

Luego de la amplificación, se tomaron 10 µL de cada reacción de PCR y se revelaron a través de electroforesis (BioRad) en gel de agarosa (1,5% agarosa, 1X TBE, 100 V) para calcular los tamaños moleculares de los productos de amplificación, comparándolos con marcador de 100 pb (Inbio Highway). Se utilizó *SYBR Safe* (Invitrogen) para tinción de ADN y las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador de luz azul (UltraBright UV Transilluminator).

Tabla 6: Secuencia de oligonucleótidos y fragmentos amplificados para determinantes de virulencia.

Gen	Oligonucleótido y secuencia 5' 3'	Tamaño del producto amplificado	Temperatura de Alineamiento °C
<i>cyIA</i>	TE17 TGGATGATAGTGATAGGAAGT TE18 TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517pb	52
<i>gelE</i>	Gel11TATGACAATGCTTTTTGGGAT Gel12 AGATGCACCCGAAATAATATA	213pb	56
<i>esp</i>	ESP11 TTGCTAATGCTAGTCCACGACC ESP12 GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933pb	62

3.3 Prevalencia de especies de enterococos y sus determinantes de virulencia

Para establecer la prevalencia de las distintas especies de enterococos y de los determinantes de virulencia de los enterococos presentes en alimentos de origen cárnico y lácteo se realizó análisis estadístico descriptivo, aplicando la prueba estadística Chi cuadrado (X²). Se consideró estadísticamente significativo el hallazgo de valores de $p < 0.05$. Los datos de susceptibilidad antimicrobiana se analizaron con el programa WHONET, versión 5.6.

3.4 Investigación de *Enterococcus* spp. con resistencia a gluco péptidos

3.4.1 Tamizaje fenotípico de resistencia

Se determinó la CIM mediante el método de dilución en agar, de acuerdo a las recomendaciones establecidas por el CLSI (2015). Se ensayaron VAN y TEI. Para el control de calidad de estos procedimientos se utilizó la cepa de referencia *E. faecalis* ATCC 29212.

3.4.2 Detección genotípica de determinantes de resistencia a gluco péptidos

Para la amplificación génica del ADN se realizó la PCR de acuerdo al protocolo de Depardieu *et al.*, 2004.

A partir de cultivo puro y obtención de ADN por el método de lisis por calor se procedió a amplificación de ADN, la misma se llevó a cabo en un sistema termociclador de PCR Modelo *Gradient T Professional Basic* (Biometra), en tubos de reacción de 0,2 mL conteniendo 25 µL de mezcla de reacción compuesta por 1 X de Buffer (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP's, (Invitrogen), 0,4 µM de cada oligonucleótido cebador (IDT), 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 100 ng/µL de ADN. El volumen final fue de 50 µL.

Se realizó el siguiente esquema de ciclos: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min seguidos de 25 ciclos de amplificación, cada uno de los cuáles consistieron de 94°C por 60 s, 60 s a la temperatura de alineamiento correspondiente (tabla 7) y 60 s a 72°C, terminando con un paso final de extensión a 72°C por 5 min.

Como controles se utilizaron cepas de referencia: *E. faecium* BM 4147 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* BM 4174 (*vanC1*), *E. faecalis* ATCC 29212 (sensible a VAN y TEI) y *S. aureus* ATCC 29213. En cada reacción se realizó un control negativo conteniendo todos los reactivos excepto el ADN. Cada reacción de PCR se realizó dos veces para asegurar la reproductibilidad del método y de los resultados.

Luego de la amplificación, se tomaron 10 mL de cada reacción de PCR y se revelaron a través de electroforesis (BioRad) en gel de agarosa (1,5% agarosa, 1X TBE, 100V) para calcular los tamaños moleculares de los productos de

amplificación, comparándolos con marcador de 100 pb (Inbio Highway). Se utilizó *SYBR Safe* (Invitrogen) para tinción de ADN y las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador de luz azul (UltraBright UV Transilluminator).

Tabla 7: Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de productos amplificados para genes de resistencia a VAN.

Gen de resistencia a VAN	Oligonucleótido y Secuencia 5' 3'	Tamaño del producto amplificado	Temperatura de Alineamiento °C
<i>vanA</i>	A1 GGGAAAACGACAATTGC A2 GTACAATGCGGCCGTTA	732pb	54
<i>vanB</i>	B1 ATGGGAAGCCGATAGTC B2 GATTCGTTCTCGACC	635pb	54
<i>vanC1</i>	C1 GGTATCAAGGAAAACCTC C2 CTTCCGCCATCATATAGCT	822pb	54
<i>vanC2/C3</i>	D1 CTCCTACGATTCTCTTG D2 CGAGCAAGACCTTTAAG	438pb	54
<i>vanD</i>	ED1 TGTGGGATGCGATATTCAA ED2 TGCAGCCAAGTATCCGGTAA	500pb	54
<i>vanE</i>	EE1 TGTGGTATCGGAGCTGCAG EE2 ATAGTTTAGCTGGTAAC	430pb	54
<i>vanG</i>	EG1 CGGCATCCGCTGTTTTTGA EG2 GAACGATAGACCAATGCCTT	941pb	54

3.5 Investigación de *Enterococcus* spp. con alto nivel de resistencia a gentamicina

3.5.1 Tamizaje fenotípico de resistencia

Se determinó la CIM para GEN y STR mediante el método de dilución en agar de acuerdo a las recomendaciones establecidas por el CLSI (2015). Se ensayaron los siguientes ATM: GEN y STR. Para el control de calidad de estos procedimientos se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299.

3.5.2 Investigación de genes de resistencia a gentamicina

Para la amplificación génica del ADN se realizó la PCR de acuerdo a Donabedian *et al.* (2003) y Sparo *et al.* (2013). Se investigaron los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* y *aph(2'')-Id*.

A partir de cultivo puro y obtención de ADN por el método de lisis por calor se procedió a amplificación de ADN, la misma se llevó a cabo en un sistema termociclador de PCR Modelo Gradient T Professional Basic (Biometra), en tubos de reacción de 0,2 mL conteniendo 25 µL de mezcla de reacción compuesta por 1 X de Buffer (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP's, (Invitrogen), 0,4 µM de cada oligonucleótido cebador (IDT), 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 100 ng/µL de ADN. El volumen final fue de 50 µL.

La secuencia de oligonucleótidos utilizada para la identificación de cada especie y los tamaños de los fragmentos amplificados por PCR se detallan en la tabla 8. Como controles se usaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299. En cada reacción se realizó un control conteniendo todos los reactivos excepto el ADN. Cada reacción de PCR se realizó dos veces para asegurar la reproducibilidad del método y de los resultados.

Se realizó el siguiente esquema de ciclos según el gen a detectar:

Para la amplificación del gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*: desnaturalización durante 5 min a 95°C, luego 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 47°C y 30 s a 72°C; terminando con una extensión final de 10 min a 72°C.

Para la amplificación de los genes *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* y *aph(2'')-Id*, desnaturalización durante 3 min a 95°C; luego 30 ciclos de 1 min a 95°C, 50 s a 57°C y 40 s a 72°C; terminando con una extensión final de 5 min a 72°C.

Luego de la amplificación, se tomaron 10 µL de cada reacción de PCR y se revelaron a través de electroforesis (BioRad) en gel de agarosa (1,5% agarosa, 1X TBE, 100V) para calcular los tamaños moleculares de los productos de amplificación, comparándolos con marcador de 100 pb (Inbio Highway). Se utilizó

SYBR Safe (Invitrogen) para tinción de ADN y las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador de luz azul (UltraBright UV Transilluminator).

Tabla 8: Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de productos amplificados para genes de resistencia a GEN.

Gen de resistencia a GEN	Oligonucleótido y Secuencia 5' 3'	Tamaño del fragmento amplificado	Temperatura de Alineamiento °C
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	IaF:CAGGAATTTATCGAAATGGTAGAAAAG IaR:CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369pb	54
<i>aph(2'')-Ib</i>	IbF:CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC IbR:GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867pb	54
<i>aph(2'')-Ic</i>	IcF:CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC IcR:GCCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444pb	54
<i>aph(2'')-Id</i>	IdF:GGTGGTTTTTACAGGAATGCCATC IdR:CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641pb	54

3.6 Investigación de transferencia génica horizontal entre *E. faecalis* de origen animal y humano

Se realizaron experimentos de conjugación *in vitro* entre *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a GEN (ANRG; donantes) y la cepa *E. faecalis* JH2-SS (Colección del Dr. M. Gilmore; EE.UU.) de origen humano con resistencia cromosómica a STR (receptora) y sin ANRG, de acuerdo al protocolo de Sparo *et al.* (2006)

Para la transferencia plasmídica *in vitro* los aislamientos con ANRG provenientes de queso donantes y la cepa receptora se incubaron en caldo BHI, en una relación 1/10, a 35°C durante 5 h. Luego se agregó STR (300 mg/L) y se incubó durante 9 h a 35°C. El sedimento se resuspendió en caldo BHI. A partir de diluciones seriadas en solución salina estéril se inoculó en agar BHI con STR (300 mg/L) y GEN (500 mg/L), incubando a 35°C durante 48 h.

Se realizaron recuentos de bacterias viables en agar BHI con GEN (500 mg/L) y agar BHI con STR (300 mg/L). Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizó el equipo QIAGEN (Plasmid Midi kit; Qiagen, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.7 Relación clonal entre cepas de *E. faecalis* con resistencia de alto nivel a gentamicina de origen animal y humano

3.7.1 Electroforesis en Campo Pulsado

Esta metodología se utilizó para evaluar la relación genética entre aislamientos de *Enterococcus* de la misma especie y que presentaron resistencia a glucopéptidos u otros antibióticos de interés. El ADN de cada aislamiento fue sometido a una restricción enzimática con la enzima *Sma*I y los fragmentos de restricción fueron separados por tamaño mediante la aplicación de campos eléctricos en pulsos de tiempos en aumento, como fue descrito previamente (Corso *et al.*, 2007). Los patrones de bandas obtenidos se analizaron aplicando el criterio definido por Tenover *et al.* (1995), que permite obtener un perfil genético para cada cepa evaluada.

En función del número de diferencias entre dos patrones o pulsotipos, los aislamientos se pueden clasificar en:

-Idénticos: dos aislamientos tienen el mismo patrón de bandas. Corresponde a dos aislamientos de un mismo clon genéticamente igual.

-Genéticamente relacionados: la diferencia en el patrón de bandas de dos aislamientos es igual o inferior a tres. Esto es debido a pequeñas evoluciones dentro de un mismo clon y un único cambio genético (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), que se traduce a un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

-Posiblemente relacionados: cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de bandas diferentes puede llegar a ser hasta de seis (inserciones o deleciones del ADN, o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan

cercana y por eso es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos de tiempo (mayor de seis meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas. En estos casos, antes de llegar a una conclusión deben analizarse las características fenotípicas de los aislamientos, su sensibilidad antimicrobiana y aplicar otros marcadores genotípicos si fuera necesario.

-No relacionados: Cuando los patrones presentan más de siete bandas de diferencia y son el producto de tres o más cambios genéticos independientes. En este caso los dos aislamientos pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

3.7.2 Origen de los aislamientos

Fueron incluidos aquellos aislamientos provenientes de alimentos de origen animal caracterizados genotípicamente como *E. faecalis*. Los aislamientos fueron recolectados entre enero y diciembre de 2013. Se realizó tamizaje fenotípico a aminoglucósidos, se determinó la CIM para GEN y STR mediante el método de dilución en agar de acuerdo a las recomendaciones establecidas por el CLSI (2015). Se ensayaron los siguientes ATM: GEN y STR. Para el control de calidad de estos procedimientos se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299.

Los aislamientos clínicos fueron provenientes de hemocultivo (n=3), líquido abdominal (n=1). Las muestras de origen clínico fueron cedidas por el laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Municipal Ramón Santamarina de Tandil. Los aislamientos fueron almacenados en caldo BHI con 30% de glicerol a -70 hasta el momento de su utilización.

3.7.3 Preparación de bloques de agarosa

Para realizar esta metodología, se inocularon 3 a 4 colonias de enterococos de un cultivo de 15 h de incubación en 200 mL de buffer PIV (tris-HCl pH 7.6 10 mM y NaCl 1 M).

Se colocaron 5 μ L de la suspensión bacteriana en una cubeta descartable conteniendo 1 mL de PIV (dilución 1:200).

Se cubrió la cubeta con PARAFILM y se homogeneizó. Se procedió a medir la densidad óptica DO_{620nm} .

Se calculó el volumen de PIV necesario a agregar a la suspensión bacteriana, para alcanzar una DO_{620} de 5 unidades, según la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. PIV a agregar } (\mu\text{L}) = (210 \times 40 \times DO_{\text{medida}}) - 210$$

La fórmula proviene de:

$$DO_{\text{final}} \times \text{Vol. Final} = DO_{\text{inicial}} \times \text{Vol. inicial}$$

$$5 \times (\text{Vol. inicial} + \text{Vol. Agregado}) = (DO_{\text{medida}} \times 200) \times 210$$

$$\text{Vol. Agregado} = \frac{DO_{\text{medida}} \times 200 \times 210}{5} - 210$$

5

Se transfirieron 150 μ L de la suspensión bacteriana ($DO_{620}=5$ unidades) a un tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL y se llevó a incubar por 10 min a 42°C. Se agregó a la suspensión bacteriana 150 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (*Low Melt Preparative Grade Agarose*, BioRad) 1,5%, precalentada a 42°C y se mezcló rápidamente con vortex.

Se depositaron gotas de 20 μ L de la mezcla suspensión bacteriana/agarosa sobre el vidrio usado como soporte, cubriendo con vidrios portaobjetos y dejando solidificar. Se colocó el soporte con los bloques de agarosa a -20°C por 5 min, luego se dejó reposar a temperatura ambiente.

3.7.4 Lisis Celular de bloques de agarosa

Se descartó el buffer ES-P y se lavaron los bloques de agarosa en agitación horizontal por 30 min con 10-15 mL de buffer TE (10:1) estéril. Se repitió este paso 5 veces más. El objetivo fue eliminar la proteinasa K.

Se retiró el buffer TE de lavado y se trasvasaron los bloques de agarosa a un tubo tipo Eppendorf conteniendo 1 mL de buffer TE fresco (10:1).

3.7.5 Equilibrio y digestión de bloques de agarosa con *Sma*I

Se transfirieron 200 μ L de buffer pre-*Sma*I 1 X a tubos tipo *Eppendorf* estériles de 1,5 mL y se agregó un bloque de agarosa a cada tubo.

Se incubaron los tubos en baño de agua a 25°C durante 30 min.

Mediante pipeta automática se eliminó el buffer Pre-*Sma*I 1X.

Se agregó la mezcla de restricción: *Buffer* Pre-*Sma*I 1X + *Sma*I. La concentración final de *Sma*I (Invitrogen) es aproximadamente 10U/bloque de agarosa.

Se transfirieron 45 μ L de la mezcla de restricción a cada tubo.

Se incubó la mezcla de restricción en baño de agua a 25°C.

Se retiró la mezcla de restricción del baño, se agregaron 3 μ L de *buffer* de carga para frenar la restricción por 10 min a temperatura ambiente. Se cargaron los bloques de agarosa dentro del gel.

3.7.6 Condiciones de la corrida electroforética

Las condiciones de corrida fueron las específicas para CHEF DR-III (BioRad, Richmond, CA, US).

- Gel agarosa 1%
- *Buffer* corrida TBE 0.5X
- Tiempo inicial 5 s
- Tiempo final 35 s
- Voltaje 6 V/cm o 200V
- Tiempo de corrida 26 h
- Temperatura 7°C
- Velocidad de bomba 70

3.7.7 Coloración y registro del gel de PFGE

El gel fue coloreado con una solución de Bromuro de Etidio (BrEt) de 1 µg/mL durante 30 min en agitación suave. Posteriormente el gel fue visualizado en luz UV y registrado fotográficamente.

3.8 Relación clonal entre cepas de *E. faecium* con resistencia de alto nivel a vancomicina de origen animal y humano

3.8.1 Origen de los aislamientos

Fueron incluidos aquellos aislamientos provenientes de alimentos de origen animal caracterizados genótipicamente como *E. faecium*. Los aislamientos fueron recolectados entre enero y diciembre de 2013. Se realizó el tamizaje fenotípico de resistencia a glucopéptidos, se determinó la CIM mediante el método de dilución en agar, de acuerdo a las recomendaciones establecidas por el CLSI (2015). Se ensayaron VAN y TEI. Para el control de calidad de estos procedimientos se utilizó la cepa de referencia *E. faecalis* ATCC 29212.

Se realizó la detección genotípica de resistencia a VAN como se detalla en el objetivo 4.

Los aislamientos clínicos fueron provenientes de hemocultivo (n=5), líquido abdominal (n=1), hisopado rectal (n=3) y a partir del colchón de un paciente fallecido internado en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del Hospital Municipal Ramón Santamarina (n=1). Las muestras de origen clínico fueron cedidas por el laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Municipal Ramón Santamarina de Tandil. Los aislamientos fueron almacenados en caldo BHI con 30% de glicerol a -70°C hasta el momento de su utilización. Los aislamientos fueron almacenados en caldo BHI con 30% de glicerol a -70°C hasta el momento de su utilización.

El procedimiento de preparación de bloques de agarosa, lisis celular, equilibrio y digestión con la enzima de restricción, condiciones de corrida electroforética, coloración y registro del gel de PFGE es igual al que se describe en el objetivo 7.

RESULTADOS

4.1.1 Aislamiento e identificación fenotípica y genotípica del género

Enterococcus

Durante el período analizado (enero a diciembre de 2013) se recuperaron n=125 aislamientos que fueron fenotípicamente identificados como *Enterococcus*. La totalidad de los aislados fueron caracterizados fenotípica y genotípicamente como pertenecientes a este género.

La genotipificación mediante amplificación del gen *tuf*, que codifica para un factor de elongación específico del género *Enterococcus* (EF-Tu) se muestra en la figura 4. Se observó una mayor frecuencia de recuperación de enterococos en alimentos lácteos (68/125; 54,4%) que en productos cárnicos (57/12; 45,6%).

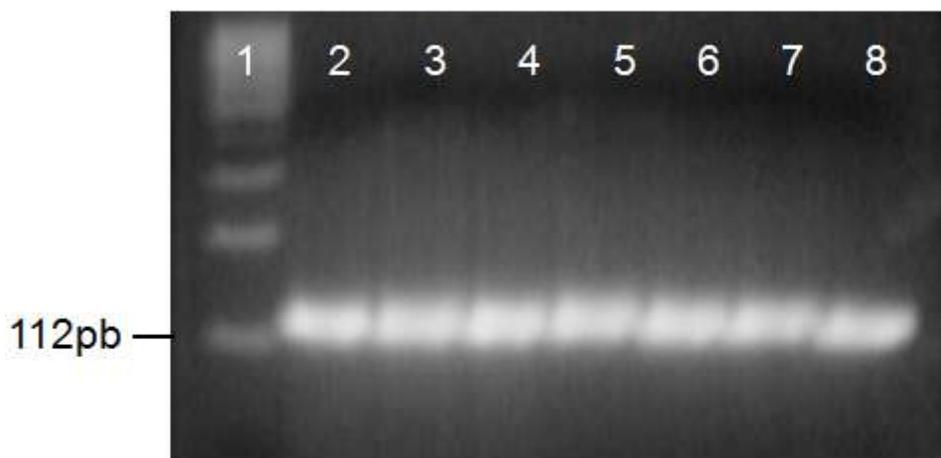


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del producto de amplificación del gen *tuf* (112 pb), Línea 1: MPM 100-1000 pb, (Inbio Highway), Líneas 2 a 7: aislamientos *Enterococcus* positivo, calle 8: control positivo *E. faecalis* CECT7121. Coloración: *Sybr Safe* (Invitrogen).

4.1.2 Identificación fenotípica y genotípica de especies de *Enterococcus*

4.1.2.1 Caracterización fenotípica a nivel de especie

Para la identificación fenotípica a nivel de especie de los aislamientos de *Enterococcus* con el sistema API 20 STREPT (Biomérieux, Argentina), como se

observa en la figura 5. Se registró las siguientes dificultades en la interpretación de sus resultados:

a) se requirió una prolongación del tiempo de incubación de 24 h (especificación del fabricante) hasta 48-72 h para su lectura final; evento que fue validado mediante la utilización de las cepas de control (ATCC) en las que se detectaron falsos negativos en la acidificación de carbohidratos cuando se incubó durante 24 h.

b) la opacidad requerida para la preparación del inóculo fue mayor que la especificada por el fabricante. Se necesitó una densidad de inóculo equivalente al tubo 4 de la escala de McFarland ($1,2 \times 10^9$ cel/mL).

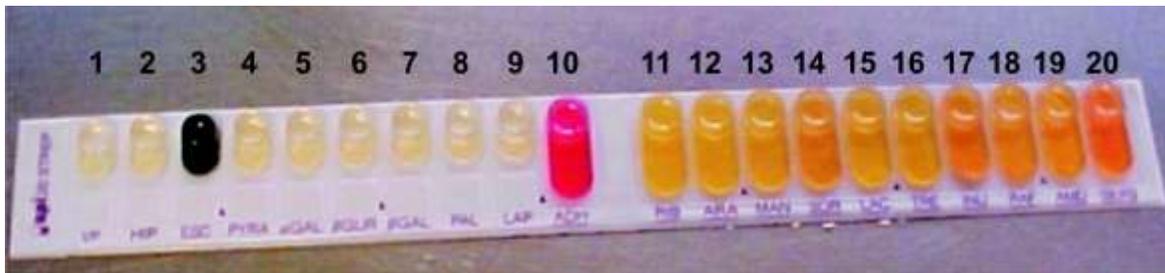


Figura 5: Identificación de *Enterococcus* por Sistema semiautomático API20 STREPT.

1- VP: Voges Proskauer; **2- Hip:** Hipurato; **3- Esc:** Esculina; **4- PyRA:** Pyrrolidonilarilamidasa; **5- αGAL:** α Galactosidasa; **6- βGUR:** β Glucuronidasa; **7- βGAL:** β Galactosidasa; **8- PAL:** Fosfatasa alcalina; **9- LAP:** Leucin arilamidasa; **10- ADH:** Arginina; **11- RIB:** Ribosa; **12- ARA:** L- Arabinosa; **13- MAN:** Manitol; **14- SOR:** Sorbitol; **15- LAC:** Lactosa; **16- TRE:** Trehalosa; **17- INU:** Inulina; **18- RAF:** Rafinosa; **19- AMD:** Almidón; **20- GLYG:** Glicógeno.

La especie recuperada con mayor frecuencia en alimentos cárnicos fue *E. faecalis* y en lácteos fue *E. faecium*. El resto de las especies fueron recuperadas en menor proporción (tabla 9).

Tabla 9: Distribución de especies de enterococos caracterizadas fenotípicamente, recuperadas de alimentos cárnicos y lácteos.

ESPECIE	cantidad	cárnico	lácteo
<i>E. faecalis</i>	74	55	19
<i>E. faecium</i>	29	2	27
<i>E. raffinosus</i>	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	10	0	10
<i>E. durans</i>	10	0	10
<i>E. avium</i>	2	0	2
TOTAL	125	57	68

4.1.2.2 Caracterización genotípica a nivel de especie

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante amplificación génica (PCR), la especie prevalente fue *E. faecalis* (94/125; 75,2%) seguida por *E. faecium* (24/125; 19,2%). Con menor frecuencia se recuperaron *E. raffinosus* (3/125; 2,4%), *E. durans* (2/125; 1,6%), *E. gallinarum* (1/125; 0,8%) y *E. hirae* (1/125; 0,8%). En la tabla 10 se observa la distribución de especies de enterococos recuperados de productos cárnicos y lácteos.

Tabla 10: Distribución de especies de enterococos caracterizadas genotípicamente, recuperadas de alimentos cárnicos y lácteos.

Especie	cantidad	cárnico	lácteo
<i>E. faecalis</i>	94	42	52
<i>E. faecium</i>	24	8	16
<i>E. raffinosus</i>	3	3	0
<i>E. gallinarum</i>	1	1	0
<i>E. durans</i>	2	2	0
<i>E. avium</i>	1	1	0
TOTAL	125	57	68

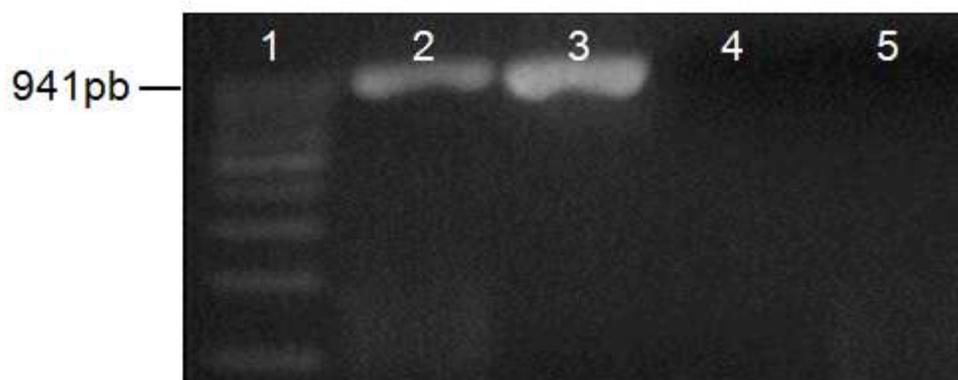


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del producto de amplificación del gen *ddl_{Efaecalis}* (941 pb), Línea 1: MPM 100-1000 pb, (Inbio Highway), Líneas 2: aislamiento *E. faecalis* positivo, calle 3: control positivo *E. faecalis* CECT7121, calle 4: control negativo *E. faecium* ATCC 19434, línea 5: control de reacción negativo mezcla de reacción sin ADN. Coloración: *Sybr Safe* (Invitrogen).

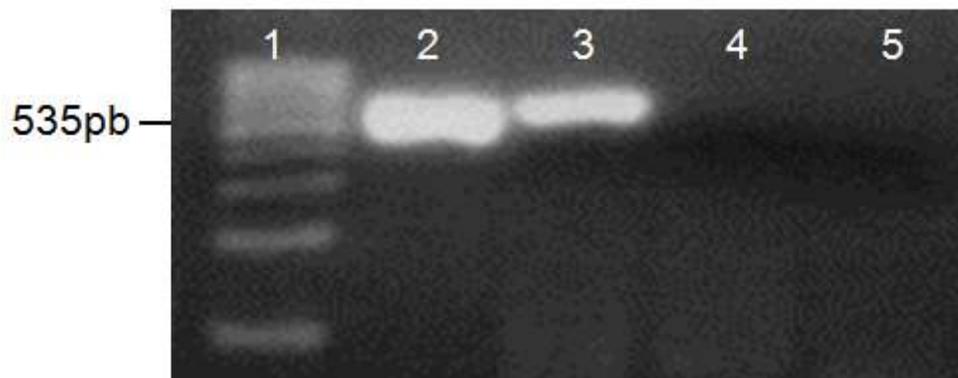


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del producto de amplificación del gen *ddl_{Efaecium}* (535 pb), Línea 1: MPM 100-1000 pb, (Inbio Highway), Línea 2: aislamiento *E. faecium* positivo, línea 3: control positivo *E. faecium* ATCC 19434, calle 4: control negativo *E. faecalis* CECT7121, línea 5: control de reacción negativo mezcla de reacción sin ADN. Coloración: *Sybr Safe* (Invitrogen).

De acuerdo a los resultados obtenidos para la identificación de especies por ambos métodos (fenotípico y genotípico) se observa una concordancia del 56,38% para *E. faecalis*, y del 54,17% para *E. faecium*. Sin embargo, para el resto de las

especies identificadas, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. durans* y *E. avium* la discrepancia en la identificación entre ambos métodos fue del 100% (tabla 11 y tabla 12).

Tabla 11: Origen de los aislamientos, resultado de la identificación fenotípica y genotípica.

AISLAMIENTO	ORIGEN	MUESTRA	FENOTIPO	GENOTIPO
CEB1	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB2	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB3	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB4	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB5	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB6	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB7	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB8	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB9	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB10	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB11	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB12	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB13	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB14	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB15	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB16*	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB17*	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB18*	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB19*	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB20*	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB21	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB22	lácteo	queso de cabra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB23	lácteo	queso de cabra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB24	lácteo	queso de cabra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB25	lácteo	queso de cabra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB26	lácteo	queso de cabra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB27	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB28*	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB29*	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB30*	lácteo	queso de oveja	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB25T*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB52	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB53	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB55*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB57	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB60	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB62	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB63	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>

[Continúa de: **Tabla 11:** Origen de los aislamientos...]

			<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB64*	cárnico	salamín		
CEB65	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB67	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB68	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB69	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB70	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB71	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB72	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB73	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB74	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB75	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB76	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB77	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB78	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB79	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB80	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB81	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB82	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB83	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB84	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB85	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB88	cárnico	carne picada	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB90	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB95	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB117	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB54*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>
CEB59	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB86	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB101	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB132	lácteo	leche de cabra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB140*	lácteo	leche de cabra	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB145	lácteo	leche de cabra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB150	lácteo	leche de cabra	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB160*	lácteo	leche de cabra	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB180	lácteo	leche de cabra	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
CEB300*	lácteo	leche de cabra	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB410*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB420	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB510	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB960*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB600*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB601*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB602*	lácteo	queso de vaca	<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB603*	lácteo	queso de vaca	<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB604*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>

[Continúa de: Tabla 11: Origen de los aislamientos...]

CEB605*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB606*				
CEB607*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB608*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB609*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB610*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB611*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB612*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB613*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB614*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB615*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB616*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB617*	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB618*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB619*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB620	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB621	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB622	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB623	lácteo	queso de vaca	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB624*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB625*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB626*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>
CEB627*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB628*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB629*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB630*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB631*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB632*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB633*	lácteo	queso de vaca	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB634*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB635*	lácteo	queso de vaca	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB501	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB502*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB505	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB508	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CEB513*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
CEB515*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>
CEB516*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. raffinosus</i>
CEB517*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>
CEB518*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. avium</i>
CEB519*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. raffinosus</i>
CEB520*	cárnico	salamín	<i>E. faecalis</i>	<i>E. raffinosus</i>

* muestras con especies discordantes genotipo/fenotipo

Tabla 12: Concordancia entre la identificación genotípica y fenotípica en el total de los aislamientos analizados provenientes de alimentos de origen animal.

ESPECIE	CONCORDANCIA
	n/N (%)
<i>E. faecalis</i>	53/94* (56,38)
<i>E. faecium</i>	13/24 *(54,17)
<i>E. raffinosus</i>	0/3* (0)
<i>E. gallinarum</i>	0/1* (0)
<i>E. durans</i>	0/2* (0)
<i>E. avium</i>	0/1 *(0)

* igual genotipo y fenotipo/genotipo

4.1.2.3 Distribución de especies en productos cárnicos

De acuerdo a la caracterización genotípica de especie, se recuperaron n=57 aislamientos de *Enterococcus* spp. Se recuperaron las siguientes especies: *E. faecalis* (42/57= 73,6%); *E. faecium* (8/57=14%), *E. raffinosus* (3/57 =5,3%), *E. durans* (2/57=3,5%), *E. gallinarum* (1/57=1,8%), *E. avium* (1/57=1,8%). En la tabla 13 se detalla la distribución de *Enterococcus* spp. en alimentos cárnicos.

En muestras de salami se aisló el 84,2% de los enterococos de origen cárnico y presentaron variabilidad de especies, mientras que el 15,8% de los aislamientos se recuperó de muestras de carne picada y solo fueron identificadas las especies *E. faecalis* y *E. faecium*.

Tabla 13: Distribución de *Enterococcus* spp. en alimentos cárnicos.

ESPECIE	Salami n (%)	Carne picada n (%)	TOTAL n (%)
<i>E. faecalis</i>	35 (76)	7 (63,6)	42 (73,6)
<i>E. faecium</i>	4 (8,3)	4 (36,4)	8 (14)
<i>E. raffinosus</i>	3 (6,3)	0	3 (5,3)
<i>E. durans</i>	2 (4,2)	0	2 (3,5)
<i>E. gallinarum</i>	1 (2,1)	0	1 (1,8)
<i>E. avium</i>	1 (2,1)	0	1 (1,8)
TOTAL n	46	11	57

4.1.2.4 Distribución de especies en productos lácteos

De acuerdo a la caracterización genotípica de especie se recuperaron N=68 aislamientos de *Enterococcus* spp. Las especies recuperadas fueron las siguientes: *E. faecalis* (52/68= 76,5%) y *E. faecium* (16/68=23,5%). En los aislamientos provenientes de leche de cabra se aisló el 10,3 % del total de los enterococos, en los de queso de oveja el 23,5%, en los de queso de cabra el 7,4% y en los de queso de vaca el 58,8%. La mayor cantidad de aislamientos lácteos fue recuperada de queso de vaca, entre estos solo un aislamiento fue identificado como *E. faecium*, el resto como *E. faecalis*. Los aislamientos de queso de cabra fueron en su totalidad pertenecientes a la especie *E. faecalis*. En la tabla 14 se detalla la distribución de *Enterococcus* spp en alimentos lácteos.

Tabla 14: Distribución de *Enterococcus* spp. en alimentos lácteos

ESPECIE	Leche de cabra n (%)	Queso de oveja n (%)	Queso de cabra n (%)	Queso de vaca n (%)	TOTAL n(%)
<i>E. faecalis</i>	5 (71,4)	1 (6,3)	5 (100)	39 (97,5)	52 (76,5)
<i>E. faecium</i>	2 (28,6)	15 (93,7)	0	1 (2,5)	16 (23,5)
TOTAL n	7	16	5	40	68

4.2 Identificación de determinantes de virulencia por amplificación génica

Los N=125 aislamientos de *Enterococcus* fueron investigados para los determinantes de virulencia *cyIA*, *geIE* y *esp* mediante amplificación génica (PCR). La caracterización de especies y la identificación de los determinantes de virulencia de *Enterococcus* spp, se detalla en la tabla 15.

Tabla 15: Origen de los aislamientos, identificación molecular y determinantes de virulencia

aislamiento	ORIGEN	MUESTRA	GENOTIPO	<i>geIE</i>	<i>cyIA</i>	<i>esp</i>
CEB1	cárnico	carne picada	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB2	cárnico	carne picada	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB3	cárnico	carne picada	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB4	cárnico	carne picada	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB5	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB6	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-

[Continúa de Tabla 15: Origen de los aislamientos...]

CEB7	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB8	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB9	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB10	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB11	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB12	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB13	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB14	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB15	lácteo	queso de oveja	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB16	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB17	cárnico	carne picada	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB18	cárnico	carne picada	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB19	cárnico	carne picada	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB20	cárnico	carne picada	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB21	cárnico	carne picada	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB22	lácteo	queso de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB23	lácteo	queso de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB24	lácteo	queso de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB25	lácteo	queso de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB26	lácteo	queso de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB27	lácteo	queso de oveja	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB28	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB29	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB30	lácteo	queso de oveja	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB25T	cárnico	salamín	<i>E faecium</i>	-	-	+
CEB52	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB53	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	+
CEB55	cárnico	salamín	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB57	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB60	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB62	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB63	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB64	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB65	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB67	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB68	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB69*	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB70**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB71*	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB72	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	+	-
CEB73**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB74*	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB75**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB76	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB77	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	-

[Continúa de Tabla 15: Origen de los aislamientos...]

CEB78	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	+
CEB79**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB80	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB81*	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB82*	cárnico	carne picada	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB83**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB84**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB85	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB88	cárnico	carne picada	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB90**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB95*	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB117*	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB54	cárnico	salamín	<i>E. durans</i>	-	-	-
CEB59	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB86	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB101**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB132	lácteo	leche de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB140*	lácteo	leche de cabra	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB145	lácteo	leche de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB150	lácteo	leche de cabra	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB160*	lácteo	leche de cabra	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB180	lácteo	leche de cabra	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB300	lácteo	leche de cabra	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB410	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB420	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB510	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB960*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB600	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB601	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB602**	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB603*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB604*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB605	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	+
CEB606	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB607*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB608*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB609*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB610**	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB611	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB612	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB613	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB614	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB615	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB616	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB617	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-

[Continúa de Tabla 15: Origen de los aislamientos...]

CEB618	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB619	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB620*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB621*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	+	-
CEB622	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB623	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB624	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	+
CEB625	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB626	lácteo	queso de vaca	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB627	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB628	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB629	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB630	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	+
CEB631	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	+
CEB632	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	-
CEB633*	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	+	-	+
CEB634	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB635	lácteo	queso de vaca	<i>E faecalis</i>	-	-	-
CEB501**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB502	cárnico	salamín	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB505**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB508**	cárnico	salamín	<i>E faecalis</i>	+	+	+
CEB513	cárnico	salamín	<i>E faecium</i>	-	-	-
CEB515	cárnico	salamín	<i>E gallinarum</i>	-	-	-
CEB516	cárnico	salamín	<i>E raffinossus</i>	-	-	-
CEB517	cárnico	salamín	<i>E durans</i>	-	-	-
CEB518	cárnico	salamín	<i>E avium</i>	-	-	-
CEB519	cárnico	salamín	<i>E raffinossus</i>	-	-	-
CEB520	cárnico	salamín	<i>E raffinossus</i>	-	-	-

* presencia de 2 determinantes de virulencia

** presencia de 3 determinantes de virulencia



Figura 8: Amplificación del gen *cyIA* (517 pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Coloración: Sybr Safe (Invitrogen). MPM 100-1000 pb. Líneas 1y 19 MPM 100-1000 pb, (Inbio Highway), Líneas 2-11 aislamientos *cyIA* No Detectables. Líneas 12-16 aislamientos *cyIA* (+). Línea 17 control de reacción positivo *E. faecalis* DS16. Línea 18 control de reacción negativo *E. faecalis* CECT7121.



Figura 9: Amplificación del gen *esp* (933 pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Coloración: *Sybr Safe* (Invitrogen). MPM 100-1000 pb. Líneas 1 y 19: MPM 100-1000 pb, (Inbio Highway). Líneas 4, 9, 10, 13, 14, 16 aislamientos *esp*. No Detectables. Líneas 2, 3, 5-8, 11, 12, 15 aislamientos *esp* (+). Línea 17 control de reacción positivo *E. faecalis* NMH594. Línea 18 control de reacción negativo *E. faecalis* CECT7121.



Figura 10: Amplificación del gen *ge/E* (213pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Coloración: *Sybr Safe* (Invitrogen). Líneas 1 y 19: MPM 100-1000 pb (Inbio Highway). Líneas 2, 13 y 16 aislamientos *ge/E* No Detectables. Líneas 1, 3-12,14-15 aislamientos *ge/E* (+). Línea 17 control de reacción positivo *E. faecalis* OG1RF. Línea 18 control de reacción negativo *E. faecalis* CECT7121.

Según el análisis realizado, en aislamientos de origen cárnico, once presentaron la combinación de los tres determinantes, mientras en alimentos de origen lácteo solo dos aislamientos presentaron las tres combinaciones simultáneamente.

La combinación *ge/E* y *cylA* fue más frecuente en aislamientos cárnicos (4), mientras en aislamientos lácteos fue *ge/E* y *esp* (5) (tabla 16). La mayoría de los determinantes de virulencia fueron detectados en aislamientos correspondientes a la especie *E. faecalis*. En un único aislamiento identificado como *E. faecium* proveniente de alimento cárnico (salamín) de detectó el gen *esp*. No se detectó determinante de virulencia en las demás especies (*E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. durans*; *E. avium*).

En 26 aislamientos cárnicos y 28 aislamientos lácteos no se detectaron determinantes de virulencia.

Tabla 16: Combinación más frecuente de determinantes de virulencia y origen de alimento

	<i>gelE+cylA+esp</i>	<i>gelE+cylA</i>	<i>gelE+esp</i>	sin determinante
cárnico	11	4	3	26
lácteo	2	5	6	28

4.3 Distribución de enterococos de acuerdo a su especie y determinantes de virulencia

La prevalencia de las distintas especies de *Enterococcus* de acuerdo a su identificación genotípica se muestra en la tabla 17. La especie con mayor prevalencia fue *E. faecalis* con el 75,2% (n/N=94/125) del total de los aislamientos estudiados. La segunda especie fue *E. faecium* con 19,2% (n/N=24/125). En tercer lugar *E. raffinosus* con 2,4% (n/N=3/125). En *E. durans* se observó una prevalencia de 1,6% (n/N=2/125) y en *E. avium* y *E. gallinarum* de 0,8% cada una (n/N=1/125).

Tabla 17: Prevalencia de *Enterococcus* spp en alimentos de origen animal

Especie	Prevalencia (%)
<i>E. faecalis</i>	75,2
<i>E. faecium</i>	19,2
<i>E. raffinosus</i>	2,4
<i>E. durans</i>	1,6
<i>E. avium</i>	0,8
<i>E. gallinarum</i>	0,8

4.4 Resistencia antimicrobiana

4.4.1 Genes de resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp. recuperados de alimentos

Se investigó, mediante amplificación molecular (PCR) los siguientes genes de resistencia a VAN: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*. Como se detalla en la tabla 18, el gen *vanA* fue detectado en tres aislamientos correspondientes a *E.*

faecium: salami artesanal (CEB25T), queso de vaca (CEB626) y queso de oveja (CEB28).

No se detectó el gen *vanA* en las otras especies de *Enterococcus*. En *E. gallinarum*, aislado de salami artesanal se observó la presencia de *vanC*. En los aislamientos recuperados de alimentos no se detectaron los genes, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*.

La búsqueda de resistencia a glucopéptidos (VAN, TEI) utilizando pruebas de resistencia antimicrobiana fenotípicas (determinación de la CIM, mediante método de dilución en agar) y de amplificación molecular fue concordante en todos los aislamientos analizados.

Tabla 18: Distribución de genes *vanA* y *vanC* en especies de enterococos recuperados de alimentos

ESPECIE	<i>vanA</i>	<i>vanC</i>	Total
<i>E. faecalis</i>	0	0	0
<i>E. faecium</i>	3	0	3
<i>E. gallinarum</i>	0	1	1
<i>E. avium</i>	0	0	0
<i>E. durans</i>	0	0	0
<i>E. hirae</i>	0	0	0
<i>E. raffinosus</i>	0	0	0
TOTAL	0	0	4

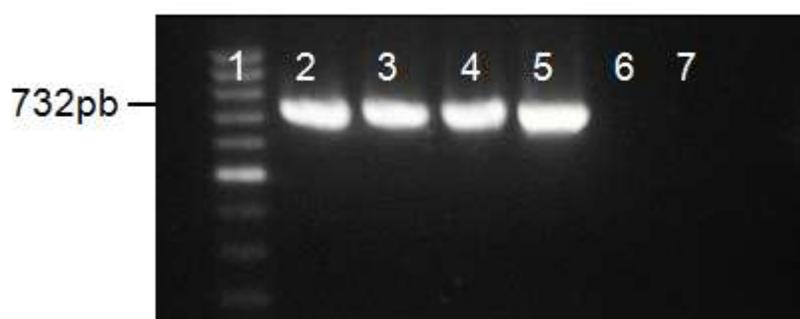


Figura 11: Amplificación del gen *vanA* (732pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Coloración: Sybr Safe (Invitrogen). Líneas 1: MPM 100-1000 pb (Inbio Highway). Líneas 2: CEB25T; línea 3: CEB626; línea 4: CEB28; línea 5: control de reacción positivo *E. faecium* ATCC 51559; línea 6: control de reacción negativo *E. faecalis* ATCC 29212; línea 7: control de reacción negativo mezcla de reacción sin ADN.

4.5 Alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos en *Enterococcus* spp. recuperados de alimentos

El 2,4% (3/125) de los aislamientos presentó ANRG, CIM_{gen} >500 mg/L. La totalidad de los aislamientos fueron *E. faecalis* obtenidos a partir de alimentos cárnicos (tabla 19).

En todos los aislamientos con ANRG se detectó el gen *aac* (6')-*le-aph* (2'')-*la*. Estos resultados están en línea con los valores de sensibilidad cuantitativa para GEN y STR (CIM_{gen} >500 mg/L; CIM_{str} <2000 mg/L).

Se observó la expresión de ANRG en 3 *E. faecalis* (CIM_{gen}: 1024 mg/L), así como alto nivel de resistencia a STR en 2 aislamientos (CIM_{str}: 512-1024mg/L). No se detectó la expresión simultánea de alto nivel de resistencia a los dos aminoglucósidos.

Tabla 19: Aislamientos con resistencia de alto nivel a gentamicina

Aislamiento	Origen	Muestra	Especie	Alto nivel de Resistencia a gentamicina
CEB72	Cárnico	Salamín	<i>E. faecalis</i>	+
CEB82	Cárnico	Carne picada	<i>E. faecalis</i>	+
CEB88	Cárnico	Carne picada	<i>E. faecalis</i>	+

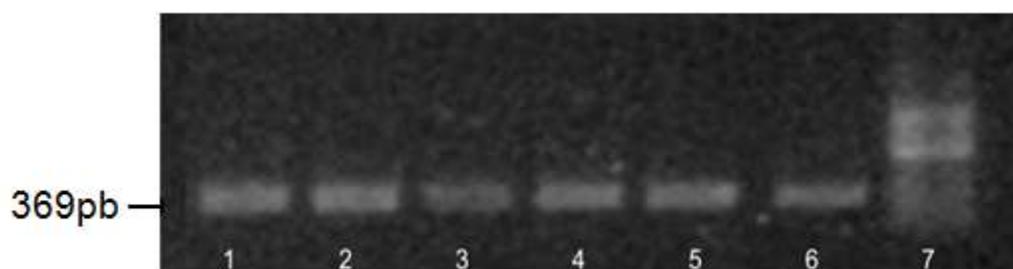


Figura 12: Amplificación del gen *aac*(6')-*le-aph*(2'')-*la* (369pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Coloración: *Sybr Safe* (Invitrogen). Líneas 1: CEB72 (alimento); línea 2: CEB82 (alimento); línea 3: CEB88 (alimento); línea 4: HRSRG16 (hemocultivo); 5: HRSRG215 (hemocultivo); línea 6: control de reacción positivo *E. faecalis* ATCC 51299. Línea 7: MPM 100-1000 pb (Inbio Highway).

4.6 Transferencia génica *in vitro* de alto nivel de resistencia entre cepas de alimentos de origen animal y humano

Se realizaron experimentos de conjugación *in vitro* entre *E. faecalis* con ANRG (donantes) y la cepa *E. faecalis* JH2-SS (Colección del Dr. M. Gilmore; EE.UU.) de origen humano con resistencia cromosómica a estreptomicina (receptora) y sin ANRG, de acuerdo al protocolo de Sparo *et al.* (2006)

Luego del experimento de conjugación, la cepa receptora *E. faecalis* JH2-SS migró con un valor de movilidad relativo similar al de la célula donante, indicando que la incorporación del plásmido ocurrió en una posición similar y el plásmido adquirido por esta cepa fue responsable del ANRG (CIM > 800 mg/L). La frecuencia de transferencia del plásmido por conjugación se encuentra entre $2,9 \times 10^{-5}$ y $2,6 \times 10^{-3}$ por célula donante (figuras 13 y 14).

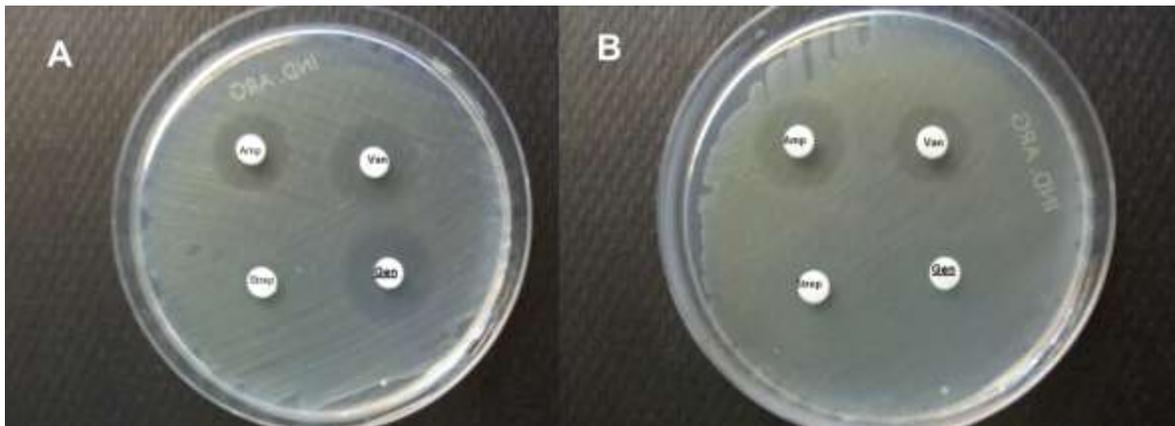


Figura 13: Transferencia *in vitro* de resistencia plasmídica a gentamicina. A: *E. faecalis* JH-SS salvaje. B: *E. faecalis* JH-SS transconjugada. Amp: ampicilina; Van: vancomicina; Gen: gentamicina, Strep: estreptomicina.

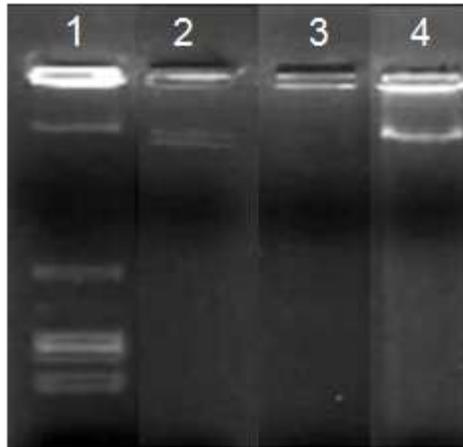


Figura 14: Transferencia plasmídica in vitro por conjugación. Línea 1: plásmidos de *Escherichia coli* V517; línea 2: *E. faecalis* CEB7, línea 3: *E. faecalis* JH2-SS; línea 4: *E. faecalis* JH2-SS transconjugada.

Marcador: *E. coli* V517 Kb 56,4 – 7,5- 4,0-3,1-2,8-2,2.

4.7 Relación clonal entre cepas de *E. faecalis* con resistencia de alto nivel a gentamicina de origen humano y de alimentos de origen animal.

Los aislamientos de *E. faecalis* con ANRG fueron recolectados a partir de diferente origen: humano, y alimentos de origen animal. Los enterococos de origen animal fueron recuperados a partir de muestras colectadas en un único comercio (A3). La fecha correspondiente a los aislamientos está comprendida entre los meses de enero y diciembre del año 2013.

Mediante *Sma*I-PFGE se observó que los siete aislamientos de *E. faecalis* ANRG (EFA) se diferenciaron en cuatro tipos clonales: EFA-A, EFA-B, EFA-C y EFA-D. El clon A fue representado en cuatro aislamientos, dos provenientes de pacientes de UTI con infecciones invasivas, un hemocultivo y una punción abdominal (HRSRG215 y HRSRG304) correspondientes al mismo periodo de tiempo y dos de alimentos en carne picada procedentes del mismo establecimiento de producción (A3) y periodo. Los clones B (hemocultivo), C (hemocultivo) y D (salamín artesanal) fueron representados por uno de cada uno.

El detalle del origen de los aislamientos y los resultados de los perfiles *Sma*I-PFGE están representados en la tabla 20, en la figura 15 se observa la imagen de la corrida electroforética.

Tabla 20: Origen de los aislamientos EFA y patrón de *Sma*I-PFGE

Aislamiento	Origen	Muestra	<i>Sma</i> I-PFGE
HRSRG16	Clínico, UTI (II)	Hemocultivo	EFA-B
HRSRG215	Clínico, UTI (II)	Hemocultivo	EFA-A
HRSRG291	Clínico, UTI (II)	Hemocultivo	EFA-C
HRSRG304	Clínico, UTI (II)	Líquido de punción abdominal	EFA-A
CEB72	Alimento, A3	Salamín	EFA-D
CEB82	Alimento, A3	Carne picada	EFA-A
CEB88	Alimento, A3	Carne picada	EFA-A

EFA: *E. faecalis* con Alto nivel de resistencia a gentamicina, UTI: Unidad de Terapia Intensiva, II: Infección Invasiva, A: Establecimiento.

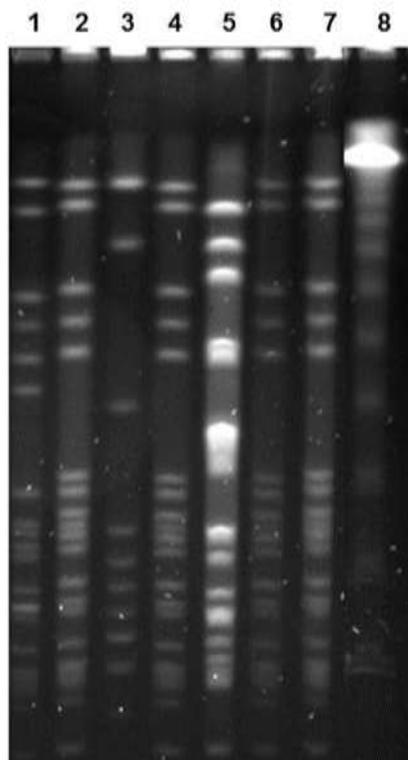


Figura 15: Patrón *Sma*I-PFGE en aislamientos de *E. faecalis* ANRG. Línea 1, HRSRG16 (tipo clonal B); línea 2, HRSRG215 (tipo clonal A); línea 3, HRSRG291 (tipo clonal C), línea 4, HRSRG304 (tipo clonal A); línea 5, CEB72 (tipo clonal D); línea 6, CEB82 (tipo clonal A); línea 7, CEB88 (tipo clonal A), línea 8, MPM lambda (*New England Biolabs*, US).

4.8 Relación clonal entre cepas de *E. faecium* con resistencia a vancomicina (*vanA*) de origen humano, ambiente y de alimentos de origen animal.

Los aislamientos de *E. faecium* resistentes a VAN fueron recolectados a partir de diferente origen: humano, ambiental hospitalario y alimentos de origen animal. Los enterococos de origen animal fueron recuperados a partir de muestras colectadas en tres comercios (E1, E3, E5). La fecha correspondiente a los aislamientos está comprendida entre los meses de enero y diciembre del año 2013.

Los aislamientos clínicos de *E. faecium* resistentes a VAN fueron recuperadas de seis (n=6) pacientes con infecciones invasivas, cinco a partir de hemocultivo y una a partir de líquido de punción abdominal. También fueron recuperadas tres a partir de hisopado rectal (n=3) de pacientes sin enfermedad invasiva por enterococo y una (n=1) a partir del colchón de un paciente (HRSER460) situado contiguo a otro cuyo cultivo rectal fue positivo.

Tres *E. faecium* resistentes a VAN fueron aislados de alimentos: salamín artesanal (CEB25T), queso de vaca (CEB626) y queso de oveja (CEB28). En todos los aislamientos *E. faecium* resistentes a VAN (n=13), fue detectado el gen *vanA* y las CIM fueron las siguientes: VAN, ≥ 256 mg/L TEI, ≥ 256 mg/L.

Los aislamientos de *E. faecium* resistentes a VAN pudieron ser diferenciados en siete tipos clonales: EVR-A, EVR-B, EVR-C, EVR-D, EVR-E, EVR-F, y EVR-G. Tres aislamientos correspondieron al clon A, dos de estos fueron provenientes de hemocultivo de pacientes con infecciones invasivas (HRSER501 y HRSER503) y un paciente con colonización rectal (HRSER509) todos ellos hospitalizados en UTI en el mismo periodo. Tres aislamientos correspondieron al clon B, un hemocultivo positivo de un paciente (HRSER461) y una muestra ambiental correspondiente a un colchón utilizado por un paciente (HRSER459) con infección intrahospitalaria internado en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del Hospital y una colonización rectal de un paciente (HRSER460) de la misma Unidad; ambos sin infección invasiva por enterococo. El clon C estuvo integrado por dos aislamientos clínicos *E. faecium* HRSER456 de hemocultivo y *E. faecium* HRSER457 de punción de

líquido abdominal provenientes de pacientes con infección severa y admitidos en UTI en diferente periodo. El clon D correspondió a dos aislamientos provenientes de alimentos, uno de salmín artesanal y otro de queso de oveja, de diferentes establecimientos de producción (E1 y E3) elaboradas en periodo diferente. Estos aislamientos fueron identificados pertenecientes a dos subtipos (D1 y D2), con relación clonal cercana. Los tipos clonales E (hemocultivo), F (queso de vaca) y G (hisopado rectal) estuvieron representados por un único aislamiento cada uno. El detalle del origen de los aislamientos y los resultados de los perfiles *SmaI*-PFGE están representados en la tabla 21. En la figura 16 se observa la imagen de la corrida electroforética.

Tabla 21: Origen de aislamientos EVR y patrón de *SmaI*-PFGE

Aislamiento	Origen	Muestra	SmaI-PFGE
HRSER456	Clínico, UTI	Líquido de punción abdominal	EVRf-A
HRSER457	Clínico, UTI, II	Hemocultivo	EVRf-A
HRSER458	Clínico, UTI, II	Hemocultivo	EVRf-A
HRSER459	Ambiente, UTI	Colchón	EVRf-C
HRSER460	Clínico, UTI, CR	Hisopado rectal	EVRf-C
HRSER461	Clínico, UTI	Hemocultivo	EVRf-E
HRSER462	Clínico, UTI	Hisopado rectal	EVRf-B
HRSER501	Clínico, UTI	Hemocultivo	EVRf-B
HRSER503	Clínico, UTI	Hemocultivo	EVRf-B
HRSER509	Clínico, CR	Hisopado rectal	EVRf-D1
CEB25T	Alimento, E1	Salmín	EVRf-D2
CEB180	Alimento, E3	Queso oveja	EVRf-F
CEB616	Alimento, E5	Queso vaca	EVRf-G

EVR: *E. faecium* con resistencia a VAN, UTI: Unidad de Terapia Intensiva, II: Infección Invasiva, CR: Colonización Rectal, E: Establecimiento.

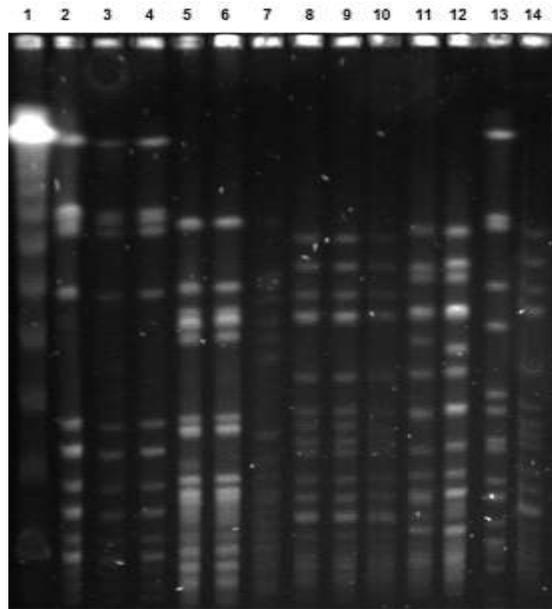


Figura 16: Patrón *SmaI*-PFGE en aislamientos EVR. Línea 1, MPM lambda (*New England Biolabs*, US); línea 2, HRSER456 (tipo clonal A); línea 3, HRSER457 (tipo clonal A); línea 4, HRSER458 (tipo clonal A); línea 5, HRSER459 (tipo clonal C); línea 6, HRSER460 (tipo clonal C); línea 7, HRSER461 (tipo clonal E); línea 8, HRSER462 (tipo clonal B); línea 9, HRSER501 (tipo clonal B); línea 10, HRSER503 (tipo clonal B); línea 11, HSER509 (tipo clonal D1); línea 12, CEBER25T (tipo clonal D2); línea 13, CEBER180 (tipo clonal F); línea 14, CEBER616 (tipo clonal G).

DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral la caracterización fenotípica y genotípica a nivel de género (*Enterococcus*) fue coincidente en la totalidad de los aislamientos. Las discrepancias fueron observadas en la caracterización a nivel de especie. El mayor porcentaje de concordancia, aunque menor al 60%, entre ambos métodos (fenotípico y genotípico) se obtuvo entre las especies más frecuentes, *E. faecalis* y *E. faecium*. Además, los aislamientos identificados fenotípicamente (API 20 STREP, Biomerieux) como *E. durans*, *E. gallinarum* y *E. avium* fueron caracterizadas genotípicamente como *E. faecalis* por amplificación génica (PCR). Estos eventos demuestran que los métodos fenotípicos no están validados para la caracterización a nivel de especie en *Enterococcus* recuperados de alimentos.

La presente investigación está en línea con los resultados obtenidos por Gomes *et al.* (2007) en un estudio comparativo entre dos métodos diferentes de identificación de género y especie de enterococos recuperados de alimentos. Para este fin utilizaron para la caracterización fenotípica, el sistema API 20 STREP (Biomerieux), y para la genotípica, PCR multiplex, en 52 aislamientos provenientes de alimentos. Sobre un total de 52 aislamientos observaron resultados discordantes entre los dos métodos.

Sin embargo, Robredo *et al.* (2000) cuando compararon el sistema API 20 STREP (Biomerieux) con la hibridación de colonias en medios de aislamiento en enterococos recuperados de alimentos de origen animal, no observaron resultados discrepantes para *E. faecalis*, a diferencia de la presente tesis doctoral. Aunque coinciden en la ausencia de concordancia en otras especies analizadas como *E. durans*, *E. casseliflavus* y *E. faecium*.

Contrariamente a lo observado en esta investigación, en cepas de origen clínico la ausencia de confiabilidad de las pruebas bioquímicas ha sido documentada solamente en especies de aislamiento poco frecuente (*E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. sacharolyticus*). Es así que Day *et al.* (2001) en un estudio realizado para evaluar las pruebas fenotípicas propuestas por Facklam y Sahm (1995) para la identificación de especies de *Enterococcus*, demostraron que no son de utilidad para reconocer ciertas especies, especialmente aquellas poco frecuentes. Previamente, también Manero y Blanch

(1999) comunicaron errores mayores en las pruebas utilizadas para la caracterización fenotípica de ciertas especies poco frecuentes de *Enterococcus*. En relación a la utilización de sistemas multi-pruebas de identificación rápida, ID 32 STREP, API 20 STREP, API 50CH, API ZYM (Biomerieux) y Phene Plate PhP Plate System (PhPlate Microplate Techniques, Suecia) en el año 1995, Facklam y Sahm demostraron que solamente caracterizaban la especie *E. faecalis* con más del 90% de confianza. Actualmente y a pesar de los avances tecnológicos con la utilización de sistemas de identificación microbiana completamente automatizados, como Vitek 2® (Biomerieux) y Phoenix® (Becton Dickinson), persiste la controversia en la identificación a nivel de especie. Esta tecnología está validada con más de un 90% de confiabilidad solamente en las especies más frecuentes, *E. faecalis* y *E. faecium*, recuperadas de muestras de origen clínico en medicina humana (Blanco *et al.*, 2010).

Los resultados expuestos en esta tesis ponen en evidencia que en el género *Enterococcus* los métodos fenotípicos de identificación a nivel de especie son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Es importante destacar que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por lo tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Fernández Cuenca, 2004).

En la presente tesis se caracterizaron genotípicamente 125 aislamientos de enterococos provenientes de alimentos de origen animal en el área bajo estudio, de los cuales 45,6% (n=57) fueron de origen cárnico y 54,4% (n=68) de origen lácteo. Las especies predominantes fueron *E. faecalis* (n=74; 59,2%) y *E. faecium* (n=29; 23,2%). Analizando las especies por alimento se observa que las más frecuentes fueron *E. faecalis*, en alimentos cárnicos, y *E. faecium*, en alimentos lácteos. Otras especies como *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. durans* y *E. avium* fueron recuperadas únicamente de alimentos cárnicos. Estos resultados están en línea con Brtkova *et al.* (2010) que al caracterizar fenotípica y genotípicamente 97 aislamientos de enterococos de origen ambiental y animal,

encontraron a *E. faecalis* como la especie más frecuente. Previamente, otros autores también fueron coincidentes con estos hallazgos (Franz *et al.*, 2003; Krocko *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2003). También Martín *et al.* (2009), investigaron en Italia la distribución de especies en chacinados tradicionales fermentados mediante PCR múltiple, *atpA* y secuenciación génica del 16S ADNr, encontrando la siguiente frecuencia: *E. faecalis* (31,4%), *E. faecium* (30,7%), *E. sanguinicola* (14,9%), *E. devriesei* (9,7%), *E. malodoratus* (7,2%), *E. gilvus* (1,0%), *E. gallinarum* (1,3%), *E. casseliflavus* (3,4%), *E. hermannienseis* (0,2%), y *E. durans* (0,2%). Sin embargo, en alimentos de origen animal, otros investigadores han comunicado a *E. faecium* como la especie más frecuente, seguida por *E. faecalis* (Lebreton *et al.*, 2014; Talebi *et al.*, 2015, Barbosa *et al.*, 2009). En Argentina, en un estudio realizado por Fontana *et al.* (2009) en la ciudad de Tucumán aislaron en embutidos secos como especie predominante *E. faecium* (56%) y luego *E. faecalis* (17%).

Es importante destacar que la distribución de especies observada en la presente tesis en alimentos de origen animal es similar a la hallada en alimentos de origen vegetal. Un estudio realizado en Omán (Medio Oriente), cuyo objetivo fue identificar microorganismos en vegetales y frutas, encontró como especies predominantes a *E. faecalis* (lechuga, rábanos, mango, papaya); y *E. faecium* (repollo, lechuga) y *E. casseliflavus* (repollo, zanahoria, papaya, rábanos, sandía, lechuga, tomate). En menor proporción recuperaron *E. ludwigii* (pimientos, pepinos, dátiles); *E. hiraе* (papaya) y *E. raffinosus* (dátiles) (Al-Kharousi *et al.*, 2016). En Argentina, Ronconi *et al.* (2002) en alimentos crudos (lechuga) comunicaron como especies más frecuentes *E. faecium* (32,61%) y *E. faecalis* (21,74%). También se recuperaron *E. gallinarum* (13,04%), *E. casseliflavus* y *E. mundtii* (7,60%), *E. hiraе* (6,52%), *E. durans* (4,35%), *E. raffinosus* y *E. saccharolyticus* (2,17%), *E. avium* y *E. malodoratus* (1,10%).

En relación a los determinantes de virulencia, de los 60 aislamientos de *E. faecalis* en que se detectó el gen *gelE* por PCR (64,5%), 26 fueron de origen cárnico y 34 correspondieron a origen lácteo. En Argentina, Marguet *et al.* (2008) en enterococos aislados de quesos ovinos detectaron el gen *gelE* en *E. faecalis* y, a diferencia de la presente tesis en *E. faecium* también observaron la presencia de este gen. En Brasil, Camargo *et al.* (2014) en alimentos de origen cárnico encontraron una elevada prevalencia de *E. faecalis* portadores del gen *gelE*. Medeiros *et al.* (2014) sugieren que existe una correlación entre la actividad de gelatinasa y la formación de biopelículas (biofilm) que contribuye a la persistencia de estas bacterias.

En esta tesis doctoral no se efectuó la detección fenotípica de los factores de virulencia por la probable presencia de genes silenciosos o cuya expresión depende del ambiente o las condiciones de cultivo, como el complejo operón *fsr*. La discrepancia genotípica/fenotípica y la ausencia de expresión *in vitro* pero no *in vivo* fue ya descrita por otros investigadores (Anderson *et al.*, 2016).

De los 23 aislamientos de *E. faecalis* en que se detectó el gen *cylA* por PCR, 16 fueron cepas de origen cárnico y 7 correspondieron a origen lácteo. Camargo *et al.* (2014) también encontraron una elevada frecuencia (79,8%) de este gen en alimentos cárnicos. En España, Sánchez Valenzuela *et al.* (2009), en alimentos artesanales de origen animal observaron una prevalencia de *cylA* en *E. faecalis* similar a la informada en este trabajo de tesis. Otros autores han comunicado resultados similares en enterococos provenientes de alimentos de origen animal tanto lácteo como cárnico (Gomes *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2010).

La expresión de la hemolisina, como en el caso de la gelatinasa, está condicionada por la regulación de un operón en el que *cylA* es el gen estructural. Según Barbosa *et al.* (2010), en aquellos aislamientos en los cuales demostraron la actividad hemolítica, se observó que se detectaba molecularmente el operón *cy/LLLSMBAI* completo. La falta de congruencia fenotípica/genotípica sugiere la pérdida de genes del operón *cyl*, entre cepas *cylA* positivo/hemolisina negativa o la presencia de genes *cylA* silenciosos.

Semedo *et al.* (2003) observaron una alta frecuencia de *cylA* en aislamientos clínicos (33%) pero muy baja en alimentos (6%). Cosentino *et al.* (2010) encontraron cepas clínicas de enterococos no hemolíticas portando genes *cyl*.

En esta investigación se observó que de los 29 aislamientos de *E. faecalis* en que se detectó el gen *esp* por PCR, 17 fueron de origen cárnico y 12 correspondieron a origen lácteo. Cariolato *et al.* (2008) y Olawale *et al.* (2014) también encontraron una elevada frecuencia de portación (42%-90%) de este gen en alimentos de origen animal. Abriouel *et al.* (2008) describieron el gen *esp* en enterococos provenientes de agua y vegetales.

En Alemania, Anderson *et al.* (2016) encontraron con mayor frecuencia el gen *esp* en aislamientos provenientes de leche cruda en comparación con aislamientos provenientes de muestras clínicas. Contrariamente a estos resultados, Mannu *et al.* (2003) y posteriormente Medeiros *et al.* (2014) hallaron el gen *esp* sólo en aislamientos clínicos, descartando su presencia en enterococos de otro origen.

En la presente tesis la frecuencia de determinantes de virulencia en los aislamientos de *E. faecium* es baja en comparación con *E. faecalis*, probablemente como resultado de la presencia de plásmidos conjugativos inducibles por feromonas en cepas de esta última especie. Este hecho fue también destacado por Franz *et al.* (2003).

La posibilidad de transferencia génica horizontal de determinantes de virulencia hacia enterococos autóctonos del tracto gastrointestinal humano realza la importancia de su detección en alimentos (Eaton & Gasson, 2001).

En relación a la resistencia a vancomicina, en la presente tesis el gen *vanA* fue detectado por PCR en tres aislamientos correspondientes a *E. faecium* (salamín artesanal, queso de vaca y queso de oveja). No se detectó el gen *vanA* en las otras especies de *Enterococcus* recuperadas. Los mismos resultados fueron encontrados en estudios realizados por Talebi *et al.* (2015) que investigaron enterococos con alto nivel de resistencia a vancomicina en aislamientos provenientes de carne, pollo y queso. A diferencia de esta tesis doctoral, Furlaneto Maia *et al.* (2013) en alimentos lácteos, reconocieron el gen *vanA* tanto en

aislamientos de *E. faecalis* como de *E. faecium*. En otro estudio realizado en Portugal, fueron investigadas las especies prevalentes de *Enterococcus* aisladas a partir de embutidos y la presencia de multiresistencia a antimicrobianos. En las especies *E. faecalis* y *E. faecium* no se demostró la presencia de genes *vanA* o *vanB*. Solo en un aislamiento de *E. casseliflavus* fue amplificado el gen *vanC2/C3* (Barbosa *et al.*, 2009). También Sánchez Valenzuela *et al.* (2009), detectaron *E. faecium* con alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina (gen *vanA*). Recientemente, Ribero *et al.* (2011), encontraron aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina en embutidos portugueses tradicionales.

En esta tesis, un aislamiento de *E. gallinarum* fue portador del gen *vanC*. No se detectaron los genes *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG* en los 125 aislamientos analizados. En un estudio realizado en embutidos secos en Argentina (Fontana *et al.*, 2009) no observaron genes de resistencia *vanA*, *vanB*, *vanC* en las especies de enterococos recuperadas. En Brasil, Camargo *et al.* (2014) en alimentos de origen animal, tampoco encontraron enterococos con alto nivel de resistencia a vancomicina. De acuerdo a lo expuesto anteriormente puede observarse que la distribución de la resistencia a vancomicina en enterococos aislados de alimentos de origen animal es diferente según la región geográfica analizada. Este hecho también fue sugerido por otros autores (Franz *et al.*, 2001; Giraffa, 2002; Gomes *et al.*, 2008).

La presencia de enterococos con alto nivel de resistencia a vancomicina, portadores del gen *vanA* presenta relevancia epidemiológica por la posibilidad de su transferencia horizontal hacia otras bacterias a través del mecanismo de conjugación bacteriana. Existen investigaciones consistentes sobre la transferencia *in vitro* e *in vivo* (ratones gnotobióticos) de resistencia a vancomicina y teicoplanina a través de la transferencia del gen *vanA* de *E. faecium* de origen animal a cepas humanas (Moubareck *et al.*, 2003; Dahl *et al.*, 2007). Posteriormente, Lester & Hammerum (2010) describieron un modelo *in vivo* en ratones inmunocompetentes que demostró la transferencia de resistencia de alto nivel a vancomicina (gen *vanA*) desde una cepa de *E. faecium* de origen animal a otra de origen humano. Por lo tanto, la presencia silente en alimentos de

enterococos portadores del gen *vanA* constituye un riesgo para la Salud Pública por la posibilidad de transferencia de información hacia la microbiota habitual humana.

En relación a la resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, en la presente tesis, de los 125 aislamientos, 3 presentaron ANRG (2,4%). Todos pertenecieron a la especie *E. faecalis* y fueron recuperados de alimentos de origen cárnico. Estos resultados están en línea con Delpech *et al.* (2012) que comunicaron la presencia de aislamientos de enterococos con alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos a partir de productos cárnicos fermentados. En esta tesis doctoral en la totalidad de *E. faecalis* con ANRG se detectó el gen *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia*. Otros investigadores reportaron también la importancia del gen *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia* en *E. faecalis* recuperados de alimentos de origen animal y animales de cría para consumo (Watanabe *et al.* 2009; Choi & Woo 2013; Padmasini *et al.*, 2014; Hidano *et al.*, 2017)

La ANRG limita las opciones terapéuticas en las infecciones invasivas por enterococos en el hombre; ya que se invalida la asociación sinérgica entre este fármaco con antimicrobianos beta-lactámicos o glucopéptidos. La posibilidad de diseminación a la microbiota humana de la información de ANRG destaca la relevancia de la detección de los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos en los enterococos colonizantes de los alimentos de origen animal.

La presión de los antimicrobianos utilizados en medicina veterinaria y medicina humana no afecta solamente a la viabilidad de su microbiota autóctona, sino que también promueve la transferencia de elementos que codifican resistencia antimicrobiana. La conjugación bacteriana brinda un camino eficiente de transferencia génica y puede considerarse el mecanismo de mayor relevancia para el incremento de la resistencia antimicrobiana (Kurenbach *et al.*, 2003). Existe la posibilidad que bacterias que habitan los alimentos puedan actuar como reservorios de resistencia. Hayes *et al.* (2004) reportaron la transferencia de genes

que confieren resistencia antimicrobiana a través de elementos genéticos móviles, a partir de aislamientos obtenidos de alimentos.

Estudios previos han demostrado que las cepas de *E. faecalis* de origen animal y humano presentan en general idéntico mecanismo de ANRG; por lo tanto es factible el intercambio de estos genes de resistencia entre enterococos colonizantes de alimentos y de origen humano a través de transferencia horizontal, (Sparo et al., 2012).

Sparo et al. (2013) describieron la diseminación de *E. faecalis* con ANRG (gen *aac* (6')-*le-aph* (6'')-*la*) en alimentos, animales y el hombre, en la región del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Las cepas de *E. faecalis* con ANRG caracterizadas en este estudio mostraron además una alta prevalencia del gen *cylA*.

En pacientes hospitalizados, Ronconi & Merino (2000) comunicaron la presencia de enterococos con ANRG (gen *aac* (6')-*le-aph* (2'')-*la*) en sus heces y Famiglietti et al. (2004) observaron entre 30-50% de aislamientos de *E. faecalis* con ANRG (gen *aac* (6')-*le-aph* (2'')-*la*) recuperados de hemocultivo.

Donabedian et al. (2003) evaluaron enterococos resistentes a gentamicina provenientes de aislamientos humanos, alimentos y animales de granja y demostraron la propagación de enterococos con ANRG desde animales a humanos a través del suministro de alimentos y que los enterococos aislados de animales y humanos portan los mismos genes de resistencia a los aminoglucósidos.

Cuando se utilizan antibióticos de amplio espectro (cefalosporinas de tercera y cuarta generación) se produce un desbalance de la microbiota intestinal humana con niveles mayores de colonización por *E. faecalis* (con resistencia natural a las cefalosporinas) y puede ocurrir el fenómeno de translocación intestinal con ocurrencia de infección invasiva; sumado a otros factores predisponentes como comorbilidades asociadas en el paciente. Como el tracto gastrointestinal es un reservorio masivo de bacterias con potencial de adquirir y transferir resistencia antimicrobiana, las bacterias de los alimentos y la información que contienen tienen relevancia para la Salud Pública.

En la presente tesis para comprobar el origen plasmídico del ANRG en los aislamientos realizados y la posibilidad de transferencia horizontal génica de información entre enterococos recuperados de alimentos y de origen humano se realizaron experimentos de conjugación bacteriana *in vitro*. Es así que se comprobó la posibilidad de diseminación de la información desde los enterococos recuperados de alimentos hacia la microbiota humana.

Los modelos de transferencia génica de ANRG *in vitro* ya han sido validados *in vivo*. Hirayama (1999) en un modelo *in vivo* reprodujo la interacción de las cepas alimentarias con la microbiota del tracto gastrointestinal humano al colonizar ratones gnotobióticos con microbiota de colon humano. Otro modelo realizado en Argentina utilizó ratones inmunocompetentes colonizados con microbiota intestinal humana (Sparo *et al.*, 2012) y se demostró también la transferencia génica de ANRG *in vivo* entre *E. faecalis* de alimentos de origen animal y de origen humano.

E. faecalis y *E. faecium* son patógenos oportunistas frecuentes en pacientes hospitalizados, gerontes, inmunosuprimidos o con terapia antimicrobiana prolongada. En el presente trabajo de tesis se demostró la presencia de resistencia transferible en cepas de *E. faecalis* con ANRG y de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a VAN. Sin embargo, también se comprobó otro posible camino de diseminación de resistencia antimicrobiana a través de la movilización y adaptación de determinados clones de enterococos presentes en los alimentos a los pacientes y al ambiente hospitalario. A través de estudios de PFGE se demostró relación clonal entre cepas de *E. faecalis* con ANRG de origen humano y de alimentos. En Argentina, ésta es la primera evidencia de diseminación clonal de cepas en alimentos de origen animal y humano.

En *E. faecalis*, el único complejo clonal (BVE) descrito previamente por Nallapareddy *et al.* (2005) fue de origen humano y estaba integrado por aislamientos productores de beta-lactamasa, con ANRG y con resistencia a vancomicina. La totalidad fueron recuperados de pacientes de EE.UU. y de Argentina.

Previamente, Murray *et al.* (1990) encontraron que varios aislamientos de *E. faecalis* con ANRG de similar y diferente origen, presentaban diferente patrón de PFGE. Sin embargo, en un estudio realizado en Dinamarca se detectaron aislamientos de *E. faecalis* con ANRG en 2 pacientes con endocarditis infecciosa, que también fueron aislados de cerdos. Todos pertenecieron al mismo grupo clonal y se pudo inferir su transmisión a través de los alimentos (Larsen *et al.*, 2010). Posteriormente, Freitas *et al.* (2011) demostraron la diseminación de un clon *E. faecalis* con multirresistencia antimicrobiana en animales y humanos.

En relación a las cepas de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a vancomicina y portadoras del gen *vanA*, no se observó relación clonal entre las recuperadas de alimentos y de origen humano. Éste es el primer reporte en Argentina, sobre la relación e identidad génica entre cepas de *E. faecium* de origen alimentario y humano.

A diferencia de lo hallado en esta tesis, en un estudio epidemiológico realizado en Francia por Bertrand *et al.* (2000) se observó un patrón de PFGE común entre cepas de *E. faecium* resistentes a los antimicrobianos, aislados en queso y en el hombre. Se sugiere que el queso, podría actuar como reservorio para estas cepas resistentes, permitiéndoles persistir y diseminarse en la comunidad. Sorensen *et al.* (2001) comprobaron que cepas de *Enterococcus* spp. con resistencia múltiple a los antimicrobianos pueden utilizar los alimentos derivados de aves de corral y cerdos como reservorio y al resistir el pasaje gástrico se posibilita su portación sostenida en el intestino.

Es importante destacar que en la presente tesis se demostró la existencia de relación clonal entre cepas clínicas de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a vancomicina recuperadas de pacientes hospitalizados y ambientales (colchón). Kalocheretis *et al.* (2004) demostraron la diseminación de *E. faecium* resistente a vancomicina a través de ambientes contaminados en diferentes áreas hospitalarias. La diseminación de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a vancomicina es un problema global de Salud Pública por su persistencia en ambientes hospitalarios, limitación de las alternativas terapéuticas y la transferencia plasmídica del gen *vanA* (CDC, 2002). *E. faecium* con alto nivel de

resistencia a vancomicina es la segunda causa más frecuente de infecciones nosocomiales en EE.UU. (Sievert et al, 2013). En la década del 90, en algunos países europeos, la aparición de estas cepas en los hospitales coincidió con una alta prevalencia de *E. faecium* resistentes a vancomicina recuperados de animales y relacionado con el uso extendido de avoparcina como promotor del crecimiento en la cría de ganado (Bonten *et al.*, 2001). En Europa la prevalencia de esta bacteria es variable; desde menos de 1% en Francia y Suecia hasta más del 20% en Grecia, Irlanda, Portugal y Reino Unido (EARS, 2015). En Argentina, han sido reportadas infecciones por *E. faecium* resistente a vancomicina desde el año 1998. En diferentes hospitales se observó la predominancia de un clon epidémico portador del gen *vanA* (Corso *et al.*, 2007). En el año 2014, de acuerdo con la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET-Argentina (89 laboratorios de Microbiología Clínica), *E. faecium* de origen clínico mostraron un alto índice (61%) de resistencia a vancomicina (www.antimicrobianos.com.ar).

En esta tesis, solamente las cepas provenientes del hospital portaban el gen *esp*; este hecho también ha sido reportado por Willems & Bonten (2007). De acuerdo a Willems *et al.* (2005) el linaje *E. faecium* ST-17 emergió en el ámbito hospitalario con cambios adaptativos, la adquisición de resistencia a ampicilina y una nueva PAI, relacionada al gen *esp*. En cepas pertenecientes al Complejo Clonal 17 (CC17), el gen *esp* brinda una ventaja en la adaptación al ambiente hospitalario. Aunque no se haya comprobado en el ecosistema en estudio la diseminación de clones de *E. faecium* desde los alimentos hacia el ambiente y pacientes hospitalarios, la transmisión de resistencia puede realizarse a partir de la movilización del gen *vanA* hacia otras bacterias de origen humano de la misma o diferente especie y hasta de diferente género (Muto *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis permitió demostrar que:

- Los enterococos integran la microbiota de los alimentos artesanales de origen animal, sobreviviendo a los procesos de fermentación láctea y cárnica (quesos, salames).
- En enterococos de origen animal, la identificación genotípica y fenotípica de género es coincidente. Sin embargo, a nivel de especie la caracterización genotípica presenta discordancia con la identificación fenotípica. Por lo tanto no es recomendable la utilización de métodos fenotípicos para la caracterización de especie en enterococos recuperados de alimentos de origen animal.
- Las especies predominantes en alimentos de origen animal son *E. faecalis* y *E. faecium*.
- La detección fenotípica de resistencia a vancomicina y teicoplanina mediante concentración inhibitoria mínima es coincidente con la genotípica. La detección del fenotipo VanA concuerda con la presencia de genes codificantes para el genotipo *vanA*. Por lo tanto, los valores de la concentración inhibitoria mínima a vancomicina y teicoplanina son marcadores iniciales útiles para la detección de *E. faecium* VanA
- En alimentos de origen animal habitan enterococos con determinantes de patogenicidad (*cyIA*, *gelE*, *esp*). Estas cepas pueden actuar como reservorios de factores de virulencia, permitiendo la diseminación de sus determinantes génicos a la microbiota intestinal humana.
- Los alimentos de origen animal constituyen un reservorio de enterococos con resistencia a los antimicrobianos de frecuente utilización clínica en medicina humana como aminoglucósidos (gentamicina) y glucopéptidos (vancomicina).
- Existen cepas de *E. faecalis* en alimentos de origen animal que pueden transmitir la resistencia de alto nivel a gentamicina (gen *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia*) mediante

transferencia horizontal génica hacia otras bacterias presentes en los alimentos y la microbiota intestinal humana

- Existen cepas de *E. faecium* en alimentos de origen animal que pueden transmitir la resistencia a glucopéptidos de alto nivel (*vanA*) mediante transferencia horizontal génica hacia otras bacterias presentes en los alimentos y la microbiota intestinal humana.

- Existen cepas de *E. gallinarum* en alimentos de origen animal con resistencia a glucopéptidos (*vanC*).

- Existe relación clonal entre *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a gentamicina aislados de alimentos de origen animal y humanos. Por lo tanto, se comprueba que existe una diseminación clonal de esta bacteria en el ecosistema analizado.

- En Argentina es el primer trabajo donde se analiza la relación clonal entre cepas de *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a gentamicina y cepas de *E. faecium* portadoras de gen *vanA* recuperadas de alimentos y de origen humano.

- No existe relación clonal entre *E. faecium* portadores del gen *vanA* aislados de alimentos de origen animal, ambiente hospitalario y humanos. Por lo tanto, no se comprobó la diseminación y adaptación de clones desde los alimentos al hombre y al ambiente hospitalario en el ecosistema analizado.

- Existe relación clonal entre *E. faecium* portadores del gen *vanA* aislados de pacientes y del ambiente hospitalario. Por lo tanto, existen clones adaptados al ambiente hospitalario que circulan entre los pacientes atendidos en la institución analizada.

- Hasta la presente tesis en Argentina no se había realizado estudios sobre la dispersión de clones en el ecosistema. Éste es el primer trabajo en donde se demuestra la existencia de una relación clonal entre aislamientos de *E. faecalis* alto nivel de resistencia a gentamicina recuperadas de alimentos y de origen humano.

Los resultados obtenidos permiten resaltar que las bacterias patógenas no constituyen la única preocupación cuando se considera la resistencia antimicrobiana presente en bacterias que habitan reservorios de alimentos de origen animal. Las bacterias comensales conforman una enorme reserva potencial de genes de resistencia disponibles para las bacterias patógenas. La prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias que integran la microbiota del hombre y de los alimentos puede considerarse un marcador de la presión selectiva ejercida por el uso de estos fármacos y refleja el potencial de resistencia en las infecciones futuras.

La amplia utilización de antimicrobianos en Medicina Veterinaria crea una presión selectiva para la aparición de bacterias resistentes que tienen los alimentos de origen animal como reservorios. Por lo tanto, existe una evidente relación entre la utilización de antimicrobianos y la resistencia bacteriana.

Existe un aumento significativo de la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos con impacto en Salud Pública. Este hecho genera la necesidad de incrementar los esfuerzos para su control no solamente desde la Medicina Humana sino con la participación conjunta de todos los actores involucrados en la producción de alimentos y de la comunidad en general.

BIBLIOGRAFIA

Aarestrup FM. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (7): 2774-2777.

Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, Lopez RL, Grande MJ, Martínez-Viedma P, Ortega E, Cañamero MM, Galvez A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *I J Food Microbiol.* 2008; 123 (1-2): 38-49.

Al-Kharousi ZS, Guizani N, Al-Sadi A, Al-Bulushi IM, Shaharoon B. Hiding in fresh fruits and vegetables: opportunistic pathogens may cross geographical barriers. *Int J Microbiol.* 2016; doi:10.1155/2016/4292.

Ammor S, Rachman C, Chaillou S, Prévost H, Dousset X, Zagorec M, Dufour E, Chevallier I. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiol.* 2005, 22: 373-382.

Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, Arweiler N, Vach K, Wittmer A, Al-Ahmad A. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol.* 2016; 6: 1534.doi: 10.3389/fmicb.2015.01534. www.frontiersin.org

Arias CA & Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2012,10(4):266-278.

Barbosa J, Ferreira V, Teixeira P. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol.* 2009;26: 527-532.

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.

Biavasco F, Paladini C, Vignaroli C, Foglia G, Manso E, Varaldo PE. Recovery from a single blood cultura of two *Enterococcus gallinarum* isolates carrying both *vanC-1* and *vanA* cluster genes and differing in glycopeptide susceptibility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20:309-314.

Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, Guaglianone E, Sundsfjord A, Pruzzo C, Donelli G, Facinelli B. *vanA*-Type Enterococci from humans, animals and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location and virulence determinants. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(10):3307-3319.

Blanco MA, Mónaco, María Belén, Lopardo HA. Evaluación de un sistema automatizado para la identificación de especies de enterococos. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2010; 44(2), 239-242.

Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(5):314-325.

Brtkova A, Filipova M, Drahovska H, Bujdakova H. Characterization of enterococci of animal and environmental origin using phenotypic methods and comparison with PCR based methods. *Vet Med.* 2010; 55 (3): 97-105

Butaye P, Baele M, Devriese LA, Haesebrouck F. Comparison of susceptibility to antimicrobials of the enterococcal species isolated from pigeons (*Columba livia*). *Microb Drug Resist.* 2002; 8 (3): 215-218.

Carias LL, Rudin SD, Donskey CJ, Rice LB. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (*Tn5382*) and a lowaffinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J Bacteriol.* 1998; 180: 4426-4434.

Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Lee SHI, Júnior AF, Kaneno R, Rall VLM. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2014;45(1):111-115.

Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control.* 2008,19(9):886-892.

Casellas JM, Tomé G, Bantar C, Bertolini P, Blázquez N, Borda N, Couto E, Cudmani N, Guerrero J, Juárez MJ, López T, Littvik A, Méndez E, Notario R, Ponce G, Quinteros M, Salamone F, Sparo M, Sutich E, Vaylet S, Wolff L. Argentinean collaborative multicenter study on the in vitro comparative activity of piperacillin-tazobactam against selected bacterial isolates recovered from hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47 (3): 527-537.

Cercenado E. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(Supl 5): 59-65.

Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13: 686-707.

Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, Johnson CN, Funkhouser E, Chavers LP, Stamm AM, Waites KB. Vancomycin resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect*. 2003; 53: 159-171.

Choi JM & Woo GJ. Molecular Characterization of High-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *Int J Food Micro*. 2013; 165:1-6.

Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis*. 2000; 31(2): 586-589.

Chow JW, Donabedian SM, Clewell SM, Sahm DF, Zervos MJ. In vitro susceptibility and molecular analysis of gentamicin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 32 (3):141-146.

Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(3): 511-514.

Chu G, Vollrath D, Davies RW. Separation of large DNA molecules by countour-clamped homogeneous electric fields. *Science*. 1984; 234: 1582-1585.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 25th Informational Supplement. CLSI document M100-S25. CLSI: Wayne, PA

Coburn PS & Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol.* 2003; 5(10): 661-669.

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food, 5th ed., American Public Health Association. Washington D.C., Estados Unidos. 2015.

Corso A, Gagetti P, Rodríguez M, Melano R, Ceriana P, Faccone D, VRE Argentinian Group. Molecular characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* from 30 Hospitals in Argentina. 41th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Resumen C2-509. 2001. Chicago, EEUU.

Corso AC, Gagetti PS, Rodríguez MM, Melano RG, Ceriana PG, Faccone DG, Galas MF. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int J Infect Dis.* 2007; 11: 69-75.

Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(1):25-34.

Dahl KH, Mater D, Flores M, Johnsen P, Midtvedt T, Corthier G, Sundsfjord A. Transfer of plasmid and chromosomal glycopeptide resistance determinants occurs more readily in the digestive tract of mice than in vitro and exconjugants can persist stably in vivo in the absence of glycopeptide selection. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59: 478-486.

Day AM, Sandoe JET, Cove JH, Phillips-Jones MK. Evaluation of biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Lett Appl Microbiol*. 2001; 33: 392–396.

Delpech G, Pourcel G, Schell C, *et al*. Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from artisanal food of animal origin in Argentina. *Foodborne Pathog Dis*. 2012; 9(10): 939-44.

Delpech G, Sparo M, Pourcel G, Schell C, De Luca MM, Basualdo JA. *Enterococcus* spp. isolated from sheep cheese: resistance to antimicrobials used in clinics. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2013; 33: 129-133.

Depardieu F, Bonora MG, Reynolds PE, Courvalin P. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol Microbiol*. 2003; 50: 931-948.

Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of *Enterococci* and *Staphylococci* at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(12): 5857-5860.

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.

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 (3): 1109-1113.

Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine: D-alanine ligase related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene*. 1992; 112: 53-58.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 24-27.

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.

Euzéby P. Genus *Enterococcus*. En: List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2017. Disponible en: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html> Acceso: 23 de mayo de 2017.

Facklam RR, Sahm DF. Enterococcus. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology Press, Washington D.C. 1995, 308–314.

Famiglietti A, Rodríguez H, Rodríguez C, Weyland B, Foccoli M, Tiraboschi N *et al*. Análisis de la resistencia en microorganismos de origen intrahospitalarios aislados en Clínica Médica. *Medicina* (Buenos Aires) 2004; 64: 23.

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.

Fernández Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22(6):355-60.

Fines M, B Perichon, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. *vanE*, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 2161–2164.

Fontana C, Gazzola S, Cocconcelli PS, Vignolo G. Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. *Lett Appl Microbiol*. 2009 ;49(3):411-4.

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.

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.

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

Freitas AR, Coque TM, Novais C, Hammerum AM, Lester CH, Zervos MJ, Donabedian S, Jensen LB, Francia LB, Baquero F, Peixe L. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and

CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(3):925-931.

Furlaneto-Maia L, Rocha K, Henrique F, Giazzi A, Furlaneto MC. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp isolated from soft cheese in Southern Brazil. *Adv Microbiol.* 2014; 4:175-181

Furumura MT, Figueredo PMS, Carbonell GV, da Costa Darini AL, Yano T. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains Isolated from clinical sources. *Braz J Microbiol.* 2006; 37: 230-236.

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.

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.

Gentile JH, Sparo MD, Pipo VB, Gallo AJ. Meningitis due to *Enterococcus faecalis*. *Medicina* (Buenos Aires). 1995; 55: 435-437.

Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, Hunter S, Rolando S, Hyytiä-Trees E, Ribot EM, Swaminathan B and Pulsenet Taskforce. PulseNet USA: A Five-Year Update. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3(1): 9-19.

Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26: 163-171.

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.

Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Franco BDGM, de Martinis ECP. Correlation between API 20 STREP and multiplex PCR for identification of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Braz J Microbiol.* 2007;38 (4): 617-619.

Hammerum AM. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 (7):619-625.

Hammerum AM, Lester CH, Heuer OE. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(10): 1137-1146.

Harwood VJ, Delahoya NC, Ulrich RM, *et al.* Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Lett Appl Microbiol.* 2004; 38: 476-482.

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.

Hayes J, English L, Carr L, Wagner D, Joseph S. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 6005-601.

Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Wernwr G, Sundsfjord A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(6): 541-54.

Hidano A, Yamamoto T, Hayama Y, Norihiko Muroga, Kobayashi S, Nishida T, Tsutsui T. Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken products in Japan. *PloS one.* 2015;10(3): e0121189. doi:10.1371/journal.pone.0121189.

Hirayama K. Ex-germ free mice harboring intestinal microbiota derived from other animal species as an experimental model for ecology and metabolism of intestinal bacteria. *Exp Anim.* 1999; 48: 219-227.

Ike Y, Flannagan SE, Clewell DB. Hyperhemolytic phenomena associated with insertions of *Tn916* into the hemolysin determinant of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1. *J. Bacteriol.* 1992; 174:1801-1809.

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (8): 3558-3565.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1992; 7(4): 462-478.

Johnsen PJ, Østerhus JI, Sletvold H, Sørnum M, Kruse H, Nielsen K, Simonsen GS, Sundsfjord A. Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated

vanA element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(1): 159-168.

Johnsen PJ, Townsend JP, Bohn T, Simonsen GS, Sundsfjord A, Nielsen KM. Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):608–10

Jurkovič D, Križková L, Dušinský R, Belicová A, Sojka M, Krajčovič J, Ebringer L. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letť Appl Microbiol.* 2006; 42: 553-559.

Kalocheretis P, Baimakou E, Zerbala S, Papaparaskevas J, Makriniotou I, Tassios PT, Iatrou C, Kouskouni E, Zerva L. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemoter.* 2004;54(6):1031-1034.

Ke D, Picard F, Martineau F, Ménard C, Roy P, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clinical Microbiol.* 1999; 37(11): 3497-3503.

Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88: 269-290.

Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiol Infect.* 2001; 126(2): 197-204.

Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 2004 ;186(1):154-63.

Krocko M, Canigova M, Duckova V. Occurrence, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw pork, beef and poultry. *J Food Nutr Res.* 2007; 46: 91-95.

Kurenbach B, Bohn C, Prabhu J, Abudukerim M, Szewzyk U, Grohmann E. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its *tra* region. *Plasmid.* 2003;50(1):86-93.

Larsen J, Schønheyder HC, Lester CH, Olsen SS, Porsbo LJ, Garcia-Migura L, Jensen LB, Bisgaard M, Hammerum AM. Porcine-Origin Gentamicin- Resistant *Enterococcus faecalis* in Humans, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(4): 682-684.

Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(5): 454-460.

Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. 2014 Feb 2. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al.*, editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>

Lester C & Hammerum A. Transfer of *vanA* from an *Enterococcus faecium* isolate of chicken origin to a CC17 *E. faecium* isolate in the intestine of cephalosporin-treated mice. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1534-154.

Lopes MF, Simões AP, Tenreiro R, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol.* 2006; 112: 208-214.

Lu JJ, Wu JC, Chiueh TS, Perng CL, Chi WM, Lee WH. Characterization of a highly glycopeptides resistant *Enterococcus gallinarum* isolate. *J Formos Med Assoc.* 2000; 99: 305-310.

Manero A & Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(10):4425-30.

Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Duprè I, Zanetti S, Sechi LA. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88: 291-304.

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.

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.

Martin JD, Mundt JO. Enterococci in insects. *J Appl Microbiol.* 1972;24(4):575-580.

Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon APG. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(1): 327-332.

Moubareck C, Bourgeois N, Courvalin P, Doucet-Populaire F. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2993-2996.

Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 513-522.

Mundt J. O. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *J Appl Microbiol.* 1963;11(2):136-140.

Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3: 46-65.

Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003; 24: 362-86.

Nallapareddy SR, Wenxiang H, Weinstock GM, Murray BE: Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-

receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J Bacteriol.* 2005, 187:5709-5718.

Ogier JC & Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008; 126: 291-301.

Olawale A, Onasanya A, Oyelakin O, David O, Famurewa O. *Microbiol Res.* 2014; 2(2):18-27

Oprea SF y Zervos MJ. *Enterococcus* and its association with foodborne illness. In: Simjee S, ed. Foodborne Disease. Totowa, NJ: Humana Press, 2007; 157-174.

Padilla EC, Núñez AM, Padilla GA, Lobos GO. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. *Rev Chil Infect.* 2012; 29 (1): 55-61.

Padmasini E, Padmaraj R, Rames S. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. *Sci World J.* 2014, doi:10.1155/2014/329157.

Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H, Klein G, Ellerbroek L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88 (2-3):311-4.

Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol.* 2001; 183(11): 3372-3383.

Ramírez MS & Tomalsky M. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010; 13: 151-171.

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 Prot.* 2011; 74: 465-469.

Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int J Microbiol.* 2000; 54: 197-204.

Ronconi MC & Merino LA. Prevalencia de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en las ciudades de Resistencia y Corrientes, Republic of Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2000;18: 71-73.

Ronconi MC, Merino LA, Fernández G. Detección de *Enterococcus* resistentes a altos niveles de aminoglucósidos y resistentes a glucopéptidos en *Lactuca sativa* (lechuga). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; 20(8): 380-383.

Sánchez Valenzuela A, ben Omar N, Abriouel H, Lucas López R, Veljovic K, Martínez 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.

Schwartz DC & Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 1984;37(1):67-75.

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.

Shankar N, Coburn P, Pillar C, Haas W, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol.* 2004; 293 (7-8): 609-618.

Shankar N, Baghdayan AS, Willems R, Hammerum AM, Jensen LB. Presence of pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* Isolates from Pigs in Denmark. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(11): 4200-4203.

Shankar N, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Inf Immunity.* 2001; 69(7): 4366-4372.

Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Limbago A, Fridkin S. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013; 34: 1-14.

Silva Lopes MF, Ribeiro T, Martins MP, Tenreiro R, Barreto Crespo MT. Gentamicin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. *J Ant Chemoth.* 2003; 52, 214-219.

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.

Sparo M, Delpech G, Pourcel G, Schell C, de Luca MM, Bernstein J, Grenóvero S, Basualdo JA. Cytolysin and high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* from different origin. *RAZ y EIE*. 2013; 8(2): 5-10

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

Sparo M, Castro M, Andino P, Lavigne M, Ceriani C, Gutiérrez G, *et al*. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol*. 2006; 100: 123-124.

Sparo M, Nuñez G, Castro M, Calcagno M, 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 Microbiol*. 2008; 25 (4): 607-615.

Sparo M, Jones D, Sánchez Bruni S. *In vitro* efficacy of the novel peptide CECT7121 against bacteria isolated from mastitic dairy cattle. *Lett Appl Microbiol*. 2009a.; 48 (2): 187-192.

Sparo M, Jones D, Sanchez Bruni S. Assesment of the *in vitro* efficacy of the novel antimicrobial peptide CECT7121 against human gram-positive bacteria from serious infections refractory to treatment. *Chemotherapy*. 2009b.; 55(4): 270-277.

Sparo M, Urbizu L, Solana MV, Pourcel G, Delpech G, Confalonieri A, Ceci M, Sanchez Bruni SF. High level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Lett Appl Microbiol*. 2012; 54: 119-125.

Suzzi G, Caruso M, Gardini F, *et al*. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J Appl Microbiol*. 2000; 89: 267-274.

Tacconelli E & Cataldo MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31:99–106.

Talebi M, Sadeghi J, Rahimi F, Pourshafie M. Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. *Jundishapur J Microbiol*. 2015; 8(4): 1-5.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(9): 2233-2239.

Teo JW, Krishnan P, Jureen R, Lin RT. Detection of an Unusual *van* Genotype in a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Hospital Isolate. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(12): 4297-4298.

Thal LA, Chow JW, Mahayni R, Bonilla H, Perri MB, Donabedian SA, Silverman J, Taber S, Zervos MJ. Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 2112-2115.

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(10): 4538-4545.

Van der Bogaard AE & Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 14: 315-319.

Vankerckoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, *et al*. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among

european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42 (10): 4473-4479.

Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*. 2013; 5: 895-911.

Watanabe S, Kobayashi N, Quiñones D, Nagashima S, Uehara N, Watanabe N. Genetic diversity of enterococci harboring the high-level gentamicin resistance gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* or *aph(2'')-Ie* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist*. 2009 ;15(3):185-94.

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.

Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, *et al*. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 2008; 13 (47): 1-11.

Willems RJ and Bonten MJ. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*. 2007; 20(4):384-390.

Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bonten MJ. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):821-8.

Willems RJ and van Schaik W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol.* 2009;4(9):1125-35.

Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. [Microb Drug Resist.](#) 2001; 7(3): 229-236.

Wright GD. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003, 7: 563-569.

GLOSARIO

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP (siglas en inglés): amplificación de fragmentos largos polimórficos, *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ANRG: alto nivel de resistencia a gentamicina

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

ATCC (siglas en inglés): Colección de Cultivos Americano, *American Type Culture Collection*

ATM: antimicrobiano

ATS: agar tripteina soya

BHI: infusión cerebro-corazón

C: átomos de carbono

°C: grados Celsius

cm: centímetro

CIM: concentración inhibitoria mínima

CLSI (siglas en inglés): Instituto de estándar Clínico y de laboratorio, *Clinical and Laboratory Standards Institute*

csp: cantidad suficiente para

cyl: citolisina

DO: densidad óptica

ECM:

ERV: enterococos resistente a vancomicina

esp: proteína de superficie de enterococo

g: gramo

Gel: gelatinasa

GEN: gentamicina

h: horas

Hem: hemolisina

I: intermedio

L: litro

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

MLST (siglas en inglés): tipificación de secuencias de múltiples locus, *multilocus sequence typing*

mm: milímetro

MO: microorganismos

MRS:

n: número

N/D: no detectado

nm: nanómetro

PAGE: electroforesis vertical con gel de poliacrilamida, *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, *Polimerase Chain Reaction*

PBP (siglas en inglés): Proteína Ligadora de Penicilina, *Penicillin Binding Protein*

PBS: buffer fosfato salino

p/V: relación peso-volumen

R: resistente

RAPD (siglas en inglés): amplificación de fragmentos de ADN al azar, *Random Amplification Polymorphic DNA*

REP PCR: PCR palindrómicos extragénicos repetitivos

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

S: sensible

SA: sustancia agregativa

SDS: dodecilsulfato de sodio

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

TBE: tris bario EDTA

TE: tris EDTA

TEI: teicoplanina

TGI: Tracto Gastro Intestinal

Tn: transposón

TS: tripteina soja

U: unidades

UFC: unidades formadoras de colonias

UE: Unión Europea

van: genotipo de resistencia a glucopéptidos

Van: fenotipo de resistencia a glucopéptidos

VAN: vancomicina

Vol: volumen

Anexos

Soluciones para PFGE de Enterococos

Agarosa 1,5% para preparación de bloques de agarosa.

Pesar 0,15 g agarosa bajo punto de fusión en tubo de vidrio, agregar 10 mL de buffer PIV y disolver en microondas con exposiciones de 30 s. Colocar en baño de agua a 42°C hasta su uso.

Buffer PIV (500 mL)

[10mM Tris pH 8.0, 1M NaCl]

Solución Stock	agregar
1M Tris pH 8.0	5 mL
Cloruro de sodio	29,2 g

Agregar agua destilada hasta 500 mL. Autoclavar.

Buffer EC (500 mL)

[6 mM Tris, 1 m ClNa, 100 mM EDTA pH 8.0, 0,2% deoxicolato-Na, 05% Laurisarcosina-Na, 0,5% Brij-58]

Solución stock	Agregar	Concentración final
1M Tris pH 8.0	3 mL	6mM Tris pH 8.0
NaCl	29,2 g	1 M NaCl
0,5 M EDTA pH 8.0	100 mL	100 mM EDTA pH 8.0
Deoxicolato-Na	1 g	0,2% Deoxicolato-Na
Laurilsarcosina-Na	2,5 g	0,5% Laurilsarcosina-Na
Brij-58	2,5 g	0,5% Brij-58

Agregar agua destilada hasta 500 mL. Autoclavar.

Buffer EC-Lisis (Buffer Ec + RNasa + Lisozima) *

Solución stock	1 bloque	10 bloques	15 bloques	20 bloques	Concentración final
1X Buffer EC	1mL	10mL	15mL	20mL	1X Buffer Ec
10 mg/mL RNasa A	5µL	50µL	75µL	100µL	50µg/bloque RNAsa A
20 mg/mL Lisozima	5µL	50µL	75uL	100µL	100µg/bloque Lisozima

*Preparar en el momento.

RNAsa A (10mg/mL)

Disolver 30 mg de RNAsa A pancreática en 3 mL de H₂O destilada y hervir a 100°C durante 15 min. Alicuotar en tubo tipo *Eppendorf* y almacenar hasta su uso a -20°C.

Buffer Es (500mL)

[0,25 M EDTA pH 9.0, 0,5% Laurilsarcosina-Na]

Pesar 93,1 g de EDTA y disolver en 400 mL de agua destilada. Ajustar el pH=9.0 por el agregado de aproximadamente 10 g de grageas de NaOH. Agregar 5 g de Laurilsarcosina-Na. Ajustar el volumen a 500 mL con agua destilada. Autoclavar.

Buffer preSmal (500 mL)

Solución Stock	Agregar	Concentración final
Tris 1 M pH 8.0	3 mL	6 mM Tris pH 8.0
KCl	0,7456 g	20mM KCl
MgCl ₂ . 8H ₂ O	0,60993	6 mM MgCl ₂ .8H ₂ O

Ajustar el volumen a 500 mL con agua destilada. Autoclavar.

En el momento de usar agregar β-mercaptoetanol en una concentración final de 6mM, (15 mL preSmal + 6,3 uL de β-mercaptoetanol)

TBE 10X (1L)

Solución stock	Agregar
Trizma base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5M pH 8.0	40 mL

Agregar agua destilada hasta 1L. Autoclavar.

TBE 0,5X (2L)

Solución stock	Agregar
TBE 10X	100 mL

Agregar agua destilada hasta 2 L. Autoclavar.

TE 10:1 (10mM Tris – 1 mM EDTA pH 8.0) (1L)

Solución stock	Agregar	Concentración final
Tris 1 M pH 8.0	10 mL	10 mM Tris pH 8.0
EDTA 0,5 M pH 8.0	2 mL	1 mM EDTA pH 8.0

Agregar agua destilada hasta 1 L. Autoclavar.

Tris 1M pH 8.0 (1L)

Pesar 121,1 g de Trizma base y agregar 800 mL de agua destilada. Ajustar a pH= 8.0, por el agregado de aproximadamente 42 mL de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1L con agua destilada. Autoclavar.

Tris 1 M pH 7.5 (1L)

Pesar 121,1 g de Trizma base y agregar 800 mL de agua destilada. Ajustar a pH=5.5 por el agregado de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1L con agua destilada. Autoclavar.

EDTA 0.5 M pH 8.0 (1L)

Pesar 186,1 g de EDTA y agregar 800 mL de agua destilada. Mezclar y ajustar el p=8.0 con aproximadamente 20 g de grageas de NaOH. Ajustar el volumen a 1L con agua destilada. Autoclavar.

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1: Niveles y tipos de resistencia a VAN en enterococos	16
Tabla 2: Genes de resistencia enzimática a los aminoglucósidos en <i>Enterococcus</i>	18
Tabla 3: Efecto de la citolisina en infecciones producidas por <i>E. faecalis</i>	20
Tabla 4: Genes que codifican factores de virulencia en <i>Enterococcus</i> y sus productos	23
Tabla 5: Secuencia de oligonucleótidos y tamaño del fragmento amplificado para género y cada una de las especies tipificadas.	37
Tabla 6: Secuencia de oligonucleótidos y fragmentos amplificados para determinantes de virulencia	39
Tabla 7: Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de productos amplificados para genes de resistencia a VAN	41
Tabla 8: Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de productos amplificados para genes de resistencia a GEN	43
Tabla 9: Distribución de especies de enterococos caracterizadas fenotípicamente, recuperadas de alimentos cárnicos y lácteos	52
Tabla 10: Distribución de especies de enterococos caracterizadas genotípicamente, recuperadas de alimentos cárnicos y lácteos	52
Tabla 11: Origen de los aislamientos, resultado de la identificación fenotípica y genotípica.	54
Tabla 12: Concordancia entre la identificación genotípica y fenotípica en el total de los aislamientos analizados provenientes de alimentos de origen animal	57
Tabla 13: Distribución de <i>Enterococcus</i> spp. en alimentos cárnicos	57
Tabla 14: Distribución de <i>Enterococcus</i> spp. en alimentos lácteos	58
Tabla 15: Origen de los aislamientos, identificación molecular y determinantes de virulencia	58
Tabla 16: Combinación más frecuente de determinantes de virulencia y origen de alimento	63
Tabla 17: Prevalencia de <i>Enterococcus</i> spp en alimentos de origen animal	63
Tabla 18: Distribución de genes <i>vanA</i> y <i>vanC</i> en especies de enterococos recuperados de alimentos	64
Tabla 19: Aislamientos con resistencia de alto nivel a gentamicina	65
Tabla 20: Origen de los aislamientos EFA y patrón de <i>SmaI</i> -PFGE	68
Tabla 21: Origen de aislamientos EVR y patrón de <i>SmaI</i> -PFGE	70

Figuras

Figura 1: Técnicas de tipificación basada en amplificación molecular	6
Figura 2: Bio síntesis de peptidoglicano y mecanismo de acción de VAN	12
Figura 3: Resistencia a glucopéptidos tipo VanA	13
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del producto de amplificación del gen <i>tuf</i> (112 pb)	50
Figura 5: Identificación de <i>Enterococcus</i> por Sistema semiautomático API20 STREPT.	51
Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del producto de amplificación del gen <i>ddl</i> _{<i>Efaecalis</i>} (941 pb)	53
Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del producto de amplificación del gen <i>ddl</i> _{<i>Efaecium</i>} (535 pb)	53
Figura 8: Amplificación del gen <i>cyIA</i> (517 pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%	61
Figura 9: Amplificación del gen <i>esp</i> (933 pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%	62
Figura 10: Amplificación del gen <i>geIE</i> (213pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%	62
Figura 11: Amplificación del gen <i>vanA</i> (732pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%	64
Figura 12: Amplificación del gen <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (369pb). Electroforesis en gel de agarosa 1,5%.	65
Figura 13: Transferencia <i>in vitro</i> de resistencia plasmídica a gentamicina. A: <i>E. faecalis</i> JH-SS salvaje. B: <i>E. faecalis</i> JH-SS transconjugada. Amp: ampicilina; Van: vancomicina; Gen: gentamicina, Strep: estreptomina	66
Figura 14: Transferencia plasmídica <i>in vitro</i> por conjugación	67
Figura 15: Patrón <i>SmaI</i> -PFGE en aislamientos de <i>E. faecalis</i> ANRG	68
Figura 16: Patrón <i>SmaI</i> -PFGE en aislamientos EVR.	71

