

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**

Caracterización molecular y desarrollo de métodos de PCR en tiempo real para evaluar y cuantificar genes de virulencia de enterococos en alimentos fermentados y no fermentados, y "*Bacillus sporothemodurans*" en leche UHT

**Mohamed Abouelnaga**

**Lugo, Julio de 2016**

**D. Carlos Manuel Franco Abuín**, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**D. José Manuel Miranda López**, Profesor Ayudante doctor, integrantes del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**AUTORIZAN A:**

**D<sup>a</sup> Mohamed Abouelnaga**, a la presentación de la tesis doctoral, titulada “**Caracterización molecular y desarrollo de métodos de PCR en tiempo real para evaluar y cuantificar genes de virulencia de enterococos en alimentos fermentados y no fermentados, y "Bacillus sporothermodurans" en leche UHT**” realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA) del Dpto de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, a 26 de Julio de 2016.

Fdo. Carlos Manuel Franco Abuín

Fdo. José Manuel Miranda López

Fdo. Mohamed Abouelnaga

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Carlos Manuel Franco Abuín y José Manuel Miranda López, por su supervisión, guiar mis pasos y su conducción científica que han hecho posible la realización de este trabajo.

Quiero extender este agradecimiento a los otros profesores e investigadores del LHICA (Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos) por su asistencia, colaboración en todo momento, trabajo en equipo y motivación que he recibido de todos

A todos los compañeros del Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA), siempre dispuestos a colaborar, dar ánimo y ayudar en todos los problemas que se han ido presentando a lo largo de todo el trabajo, nunca nos olvidaré.

A Alexandre (Alexandre lamas), por su asistencia y disposición a ayudarme en cada momento y su participación para resolver los problemas que me encontré en este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer el apoyo recibido de toda mi familia, tanto aquí en España o en Egipto, por sus apoyo, paciencia conmigo y por lo que han soportado y sufrido durante la realización de esta tesis doctoral.

También deseo hacer constar mi agradecimiento a la Ministerio de Educación Superior de Egipto, por concederme una beca por dos años, lo que han permitido realizar el trabajo de esta tesis doctoral: **“Caracterización molecular y desarrollo de métodos de PCR en tiempo real para evaluar y cuantificar genes de virulencia de enterococos en alimentos fermentados y no fermentados, y "*Bacillus sporothermodurans*" en leche UHT”**.

---

## ABREVIATURAS

AND	Ácido desoxirribonucleico
16S RNA	Gen que codifica para el ARN que constituye la subunidad menor de los ribosomas bacterianos
BHI	Medio de infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusion medium)
CT	Ciclo umbral (Cycle Threshold)
D140	El tiempo que se requiere cuando se calienta a 140 °C para inactivar las esporas por un ciclo logarítmico
E	Eficacia de reacción
EEA	Espacio Económico Europeo
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
HACCP	Análisis de Peligro y Puntos de Control Críticos “APPCC”
HRS	Esporas altamente resistentes al calor
IDF	International Dairy Federation
LAB	Bacterias ácido-lácticas
Mg	Miligramo
MGB	Enlazante al surco menor
MSCRAMMS	Moléculas de la matriz adhesiva que reconoce los componentes de la superficie microbiana

---

## Abreviaturas

---

NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (National Center for Biotechnology Information)
°C	Grados Celsius
Pb	Pares de bases
PCR	Polimerase chain reaction o Reacción en cadena de la polimerasa
RTi-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Real time - polymerase chain reaction)
TEM	Imágenes de Microscopio Electrónico de Transmisión (Transmission Electron Microscopy)
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias por gramo
UHT	Temperatura Ultra Alta (Ultra High Temperature)
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplification of Polymorphic DNA)
REP	Reacción en Cadena de la Polimerasa (repetitive extragenic palindromic)
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
Z	El valor de Z es la temperatura requerida para reducir el valor D por un ciclo logarítmico

---

---

# 1 ÍNDICE



## ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	7
3.1 Seguridad y calidad de los productos alimentarios.....	9
3.2 Aspectos microbiológicos.....	10
3.3 Genero <i>Enterococcus</i> .....	12
3.3.1 Características generales del género <i>Enterococcus</i> .....	12
3.3.2 La naturaleza dual de enterococos .....	15
3.3.3 El potencial de virulencia de los <i>Enterococcus</i> .....	18
3.3.3.1 Identificación de los factores de virulencia.....	19
3.3.3.1.1 Sustancia de agregación ( <i>agg</i> ) .....	19
3.3.3.1.2 Proteína de superficie ( <i>esp</i> ) .....	20
3.3.3.1.3 Proteína de unión al colágeno ( <i>ace</i> ) .....	20
3.3.3.1.4 Gelatinasa ( <i>gelE</i> ) .....	21
3.3.3.1.5 Adhesinas causantes de endocarditis en <i>Enterococcus faecium</i> ( <i>efaA<sub>fm</sub></i> ) y <i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>efaA<sub>fs</sub></i> ) .....	21
3.3.3.1.6 Las feromonas sexuales.....	22
3.3.4 Resistencia a los antibióticos de <i>Enterococcus</i> .....	22
3.3.4.1 Difusión de la resistencia a los antibióticos.....	23
3.4 Genero <i>Bacillus</i> .....	25
3.4.1 <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	26

3.4.2	Importancia de <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	26
3.4.3	Fuentes de contaminación por <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	27
3.4.4	Características generales de <i>Bacillus Sporothermodurans</i> .....	28
3.4.5	Esporas de <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	28
3.4.6	La identificación de <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	29
3.4.6.1	PCR para endosporas altamente resistente al calor (HRS-PCR) .....	30
3.4.6.2	La secuenciación de gen 16S rRNA .....	30
3.4.6.3	ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) .....	31
3.4.6.4	Amplificación de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP-PCR).....	31
3.5	Procesamiento ultra alta temperatura (UHT) .....	32
3.5.1	Tipos de tratamiento UHT .....	33
3.5.1.1	Sistema UHT directo.....	33
3.5.1.2	Sistema UHT indirecto .....	34
3.5.2	Diferencias entre los sistemas de UHT .....	34
3.6	Principales aplicaciones de métodos moleculares para la detección y cuantificación de los genes codificantes de factores de virulencia y <i>B. sporothermodurans</i> .....	34
3.6.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	34
3.6.2	PCR cuantitativa en tiempo real (RTi-PCR) .....	36
	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>47</b>

5.1.1 Evaluación de la extensión de la difusión de los factores de virulencia y la resistencia a los antibióticos en Enterococci aislados de los alimentos fermentados y no fermentados .....	49
<b>5.2 CAPÍTULO 2</b> .....	<b>61</b>
5.2.1 Evaluación de la seguridad de los alimentos utilizando un nuevo ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de los factores de virulencia de enterococos en muestras de alimentos.....	63
<b>5.3 CAPÍTULO 3</b> .....	<b>93</b>
5.3.1 Desarrollo de un ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación directa de <i>Bacillus sporothermodurans</i> en la leche UHT .....	95
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>111</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>123</b>
7.1 Conclusiones generales .....	123
7.2 Conclusiones específicas .....	126
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>131</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Subdivisiones del género <i>Streptococcus</i> .....	13
<b>Figura 2:</b> Análisis filogenético del género <i>Enterococcus</i> a partir de secuencias análisis del 16S ARNr.....	13
<b>Figura 3:</b> Dendograma basado en la amplificación del gen 16S rRNA que refleja la relación de especies y subespecies incluídas en el género <i>Enterococcus</i> .....	14
<b>Figure 4:</b> Porcentaje (%) de los aislamientos de <i>E. faecalis</i> con resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, por país, los países de la UE / EEA, 2014.....	17
<b>Figure 5:</b> Porcentaje (%) de los aislamientos de <i>E. faecium</i> con de la resistencia a la vancomicina, por país, los países de la UE / EEA, 2014.....	17
<b>Figure 6:</b> Naturaleza dual de los enterococos con indicación del lugar entre los beneficios y riesgos .....	18
<b>Figura 7:</b> Imágenes de Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) de una <i>B. sporothermodurans</i> esporas .....	29
<b>Figura 8:</b> Diagrama de flujo para la producción de leche UHT .....	33
<b>Figura 9:</b> Protocolo de amplificación de ADN mediante PCR.....	36
<b>Figura 10:</b> Fluorescencia relativa frente al número de ciclo ( $C_T$ ) .....	37
<b>Figura 11:</b> Esquema de funcionamiento de sonda TaqMan® .....	38

## 2 RESUMEN



## RESUMEN

La calidad y seguridad alimentaria es un asunto de vital importancia hoy en día en el campo de la alimentación tanto para los investigadores como para los consumidores. A pesar de los estudios realizados en la última década en este campo, existen pocos datos disponibles acerca de la influencia del tipo de alimento en la transferencia de genes entre la microbiota presente en los mismos y en la dinámica de la generación de resistencias a antibióticos y los factores de virulencia durante los procesos de fermentación, como en la producción de queso y productos cárnicos elaborados. Por lo tanto, es de gran importancia el desarrollo de técnicas analíticas rápidas y específicas que permitan detectar y cuantificar genes que codificantes de factores de virulencia en los microorganismos presentes en los alimentos. Por otro lado, es asimismo importante el desarrollo de un método rápido y específico para detectar y cuantificar *Bacillus sporothermodurans*, debido a que desde mediados de los 80 ha estado implicado en contaminaciones masivas de leche UHT.

Los enterococos son bacterias ácido-lácticas que representan una parte importante de la microbiota de alimentos, especialmente en los de origen animal como leche, quesos, carne fresca y embutidos. Además, varias cepas del género *Enterococcus* han sido utilizadas como probióticos, ya que tienen un impacto positivo en el equilibrio microbiano gastrointestinal e incluso podrían ser empleados en el tratamiento algunas enfermedades gastrointestinales. Por otro lado, su presencia en algunos casos puede ser perjudicial para algunos tipos de quesos y carnes procesadas, ya que este género también incluye especies consideradas alterantes de los alimentos.

Incluso, en algunos casos, pueden convertirse en un riesgo para la salud humana, ya que algunas cepas de enterococos son patógenos oportunistas, pudiendo ser responsables de infecciones nosocomiales.

El primer objetivo de esta Tesis doctoral fue abordar el impacto del proceso de fermentación en la presencia de los determinantes de virulencia y resistencia a los antibióticos en cepas de enterococcus de origen alimentario. El segundo objetivo fue desarrollar una técnica para la detección cuantitativa de genes que codifican factores de virulencia en cultivos puros de bacterias y en alimentos de forma que sirva como herramienta para la evaluación de la seguridad alimentaria. La determinación de dichos factores de virulencia nunca había sido llevada a cabo en cepas aisladas de alimentos. Además, se ha podido comprobar que la técnica RTi-PCR mediante sondas Taqman<sup>®</sup> es lo suficientemente sensible y específica para cuantificar los genes codificantes de dichos factores de virulencia y no había sido empleada hasta el momento para la detección y cuantificación de dichos genes en cultivos puros y en alimentos.

Por otra parte, *Bacillus sporothermodurans* es un importante bacteria no patógena en la industria láctea, debido a que produce endosporas de alta resistencia térmica que pueden sobrevivir a procesamientos a temperaturas ultra-altas (UHT) de la leche, suponiendo un importante problema para industria láctea. De este modo, la calidad de la leche UHT puede verse afectada por la presencia de *B. sporothermodurans*. Por este motivo, el tercer objetivo de la presente Tesis doctoral fue desarrollar un ensayo directo y preciso mediante RTi-PCR empleando sondas Taqman<sup>®</sup> para la rápida detección cuantitativa de *B. sporothermodurans* directamente en la leche UHT y en la leche cruda.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la importancia que los productos lácteos y la carne que pueden tener en la difusión de factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos a través de los enterococos de la cadena alimentaria, especialmente *E. faecalis*, que contiene muchos más factores de virulencia y resistencia a los antimicrobianos que otras especies de enterococos como *E. faecium*. Además, pudo comprobarse que los factores de virulencia fueron más prevalentes dentro de las cepas aisladas a partir de los alimentos fermentados, mientras que la resistencia a los antibióticos no presentó variaciones dependientes del proceso de fermentación.

Este estudio presenta métodos eficientes que pueden utilizarse directamente en los productos alimenticios para la cuantificación rápida y la monitorización de los genes codificantes de factores de virulencia, de *B. sporothermodurans*. Por otra parte, esta es la primera vez que se cuantifican directamente en muestras de alimentos factores de virulencia y en leche UHT *B. sporothermodurans* mediante ensayos RTi-PCR utilizando sondas Taqman®.

## 3 INTRODUCCIÓN

USC  
UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA

## INTRODUCCIÓN

### **3.1 Seguridad y calidad de los productos alimentarios**

La seguridad y calidad de los alimentos son los factores más importantes que determinan la decisión del consumidor acerca de qué tipo de alimento optan por comprar. Tanto es así que tanto los consumidores como las autoridades sanitarias se muestran cada vez más preocupados por la calidad y la seguridad de los alimentos y los efectos negativos que la ingesta de los mismos pueda tener sobre la salud. Para abordar estos retos, los sistemas de garantía de calidad permiten aplicar y verificar medidas de control con el fin de asegurar la calidad y seguridad de los alimentos. Dichas medidas son exigidas en cada paso en la cadena de producción de alimentos para garantizar una alimentación segura y de los productos comercializados cumplen con los requisitos legales y los exigidos por los clientes (Trienekens y Zuurbier, 2008).

La confianza en la seguridad y la integridad del suministro de alimentos es un requisito fundamental para los consumidores. En dicha seguridad e integridad se incluyen todos los factores que potencialmente pueden aportar algún peligro para los consumidores, incluyendo desde prácticas agrícolas inadecuadas, falta de higiene en la cadena alimentaria, falta de controles preventivos en las operaciones de procesamiento y preparación de alimentos, uso inadecuado de productos químicos, contaminación de materias primas, ingredientes y o el agua, así como almacenamiento y transporte inadecuado. El mantenimiento de unas prácticas adecuadas en todos estos pasos es

necesario para garantizar que los alimentos lleguen a los consumidores en buen estado y sean seguros para los mismos. A este fin, el procesamiento de alimentos es fundamental para conseguir la eliminación de microorganismos patógenos de los alimentos y controlar los potencialmente alterantes, a fin de evitar que estos se multipliquen y deterioren los alimentos al mismo tiempo que se evitan intoxicaciones (FAO/WHO, 2003).

### **3.2 Aspectos microbiológicos**

Los microorganismos tienen una gran importancia y un gran impacto en nuestras vidas, pero no siempre de manera positiva. Distintos tipos de microorganismos se podrían emplear como indicadores de la seguridad alimentaria. Sin embargo, su presencia en los alimentos depende de muchos factores, tales como la presencia endógena de dichos microorganismos, la adición voluntaria de los mismos y contaminaciones cruzadas, las condiciones de almacenamiento, especialmente cuando se requieren temperaturas concretas, y finalmente el procesamiento de alimentos, incluyendo los tratamientos térmicos para lograr productos seguros. De entre las diferentes poblaciones microbianas que están habitualmente presentes en los alimentos, las bacterias ácido-lácticas (LAB) juegan un papel importante en el proceso de fermentación, aportando en muchos casos, propiedades beneficiosas a los alimentos fermentados en cuya elaboración participan. Su actividad metabólica contribuye a aumentar la seguridad y la demanda de productos alimenticios fermentados, como muchos tipos de quesos y carnes fermentadas (Caplice y Fitzgerald, 1999). Los enterococos son bacterias ácido-lácticas que pueden participar

tanto en fermentaciones naturales como artificiales, y son empleados en numerosas ocasiones como cultivos iniciadores. Sin embargo, estas bacterias plantean el problema de que también pueden ser patógenos oportunistas.

Por otra parte, algunos de los productos alimenticios que necesitan de tratamientos térmicos a altas temperaturas podrían encontrar problemas relacionados con el incumplimiento de las especificaciones legales. Por ejemplo, *Bacillus sporothermodurans* es un motivo de preocupación constante para los fabricantes de leche UHT, ya que es capaz de formar endosporas de alta resistencia térmica. Sin embargo, a día de hoy no se han desarrollado ningún método que permita la detección cuantitativa de *B. sporothermodurans* directamente en leche UHT, lo cual facilitaría de modo importante su temprana detección y la modificación de las condiciones del tratamiento para permitir su correcta eliminación.

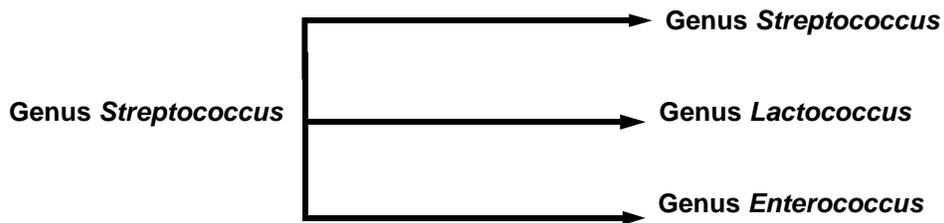
El empleo de criterios microbiológicos como herramientas de gestión de riesgos se debe aplicar cuando se puede demostrar que son eficaces y pueden contribuir al suministro de productos seguros. Sin embargo, los ensayos microbiológicos por sí solos no pueden garantizar la seguridad de los alimentos. Los criterios microbiológicos se utilizan para apoyar buenas prácticas de higiene y análisis de riesgos y puntos críticos de control (APPCC o HACCP, por sus siglas en inglés). La industria alimentaria tiene el deber de garantizar que los microorganismos se eliminan o minimizan en la medida en que no puedan causar daño a la salud humana, y los controles oficiales son conformes a los requisitos de las reglamentos de seguridad alimentaria.

La detección de las bacterias patógenas transmitidas por los alimentos preparados representa un riesgo inaceptable para la salud, independientemente del número de bacterias presentes. Además, la presencia de bacterias indicadoras en alimentos preparados, aunque no en todos los casos sea peligrosa, puede ser indicativo de una mala práctica higiénica durante el procesado como puede ser la utilización de materias primas inadecuadas, un insuficiente tratamiento térmico, presencia de contaminación cruzada; limpieza y desinfección inadecuada, o deficiente control de temperaturas y tiempo.

### **3.3 Genero *Enterococcus***

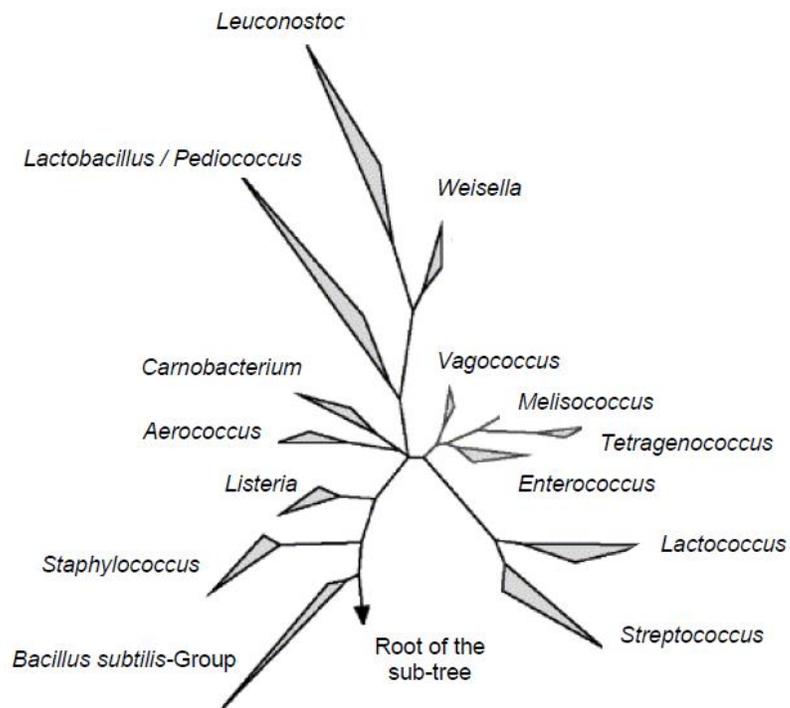
#### **3.3.1 Características generales del género *Enterococcus***

Anteriormente, los *Enterococcus* spp. fueron clasificados como pertenecientes a los *Streptococcus* grupo D de Lancefield. Más tarde, a partir de la década de los ochenta fueron considerados un género separado del género *Streptococcus*, gracias a estudios taxonómicos y genómicos que demostraron su relación distante con el género *Streptococcus* (Ogier y Serror, 2008). A partir de dichos estudios, el anterior género *Streptococcus* ha sido dividido en tres diferentes géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Figura 1).

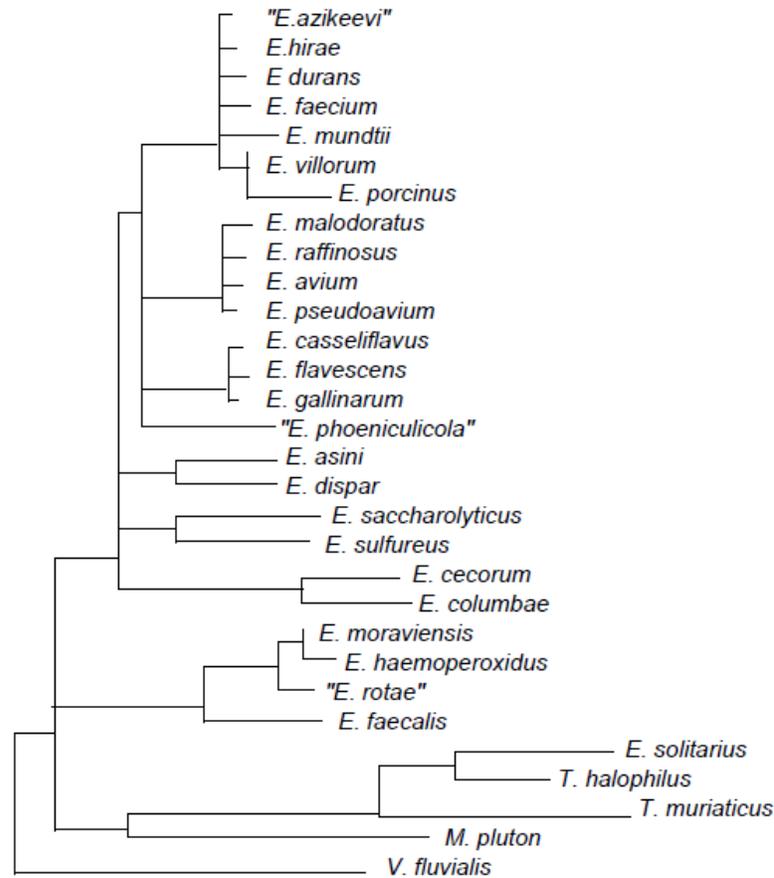


**Figura 1. Subdivisiones del género *Streptococcus***

Actualmente, la posición filogenética del género *Enterococcus*, determinado mediante comparación de secuencias de 16S rRNA y la posterior construcción de dendrogramas muestra la siguiente configuración, tal y como se muestra en las Figuras 2 y 3 (Klein y col., 2003).



**Figura 2. Análisis filogenético del género *Enterococcus* a partir de secuencias del gen 16S ARNr**



**Figura 3. Dendrograma basado en la amplificación del gen 16S rRNA que refleja la relación de especies y sub-especies incluidas en el género *Enterococcus*.**

Como se puede observar en la Figura 3, según el actual conocimiento científico, el género *Enterococcus* spp. está formado por 54 especies. Las bacterias incluidas dentro de este género son cocos gram-positivos, no formadores de endosporas, anaerobios facultativos que se presentan agrupadas en parejas o en cadenas. Son bacterias quimiorganotrofas, que fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de L (+)- ácido láctico pero no gas, acidificando el medio en el cual se encuentran hasta alcanzar un pH final de 4,2 – 4,6. Los enterococos son capaces de crecer en medios con concentraciones de sal de hasta un 6,5%, en un caldo con pH hasta de

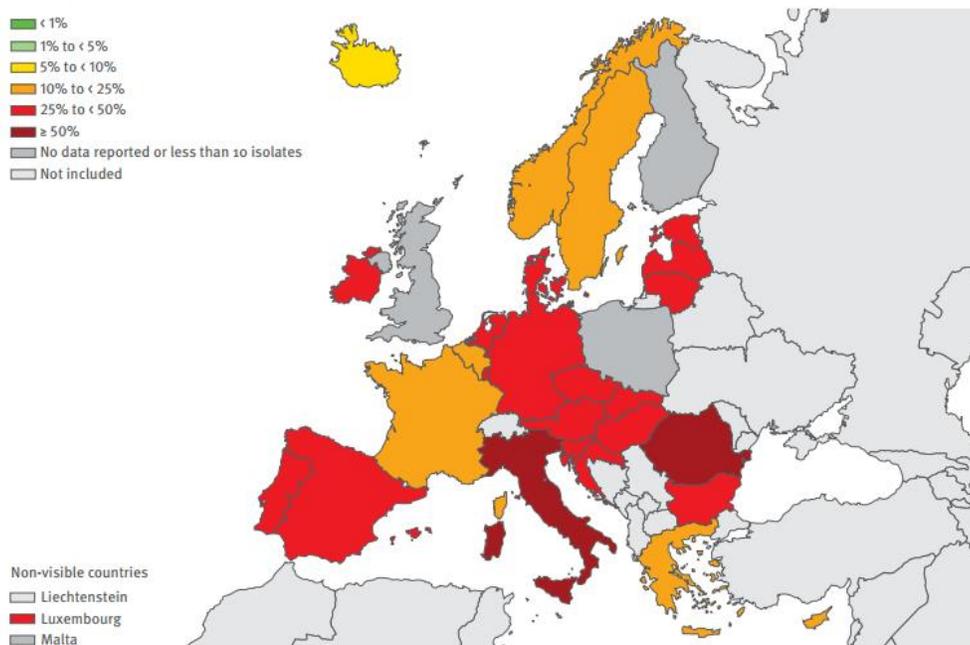
9,6, 40% de sales biliares y además sobreviven a temperaturas de entre 10 °C y 45°C (Manero y Blanch, 1999).

### 3.3.2 La naturaleza dual de los enterococos

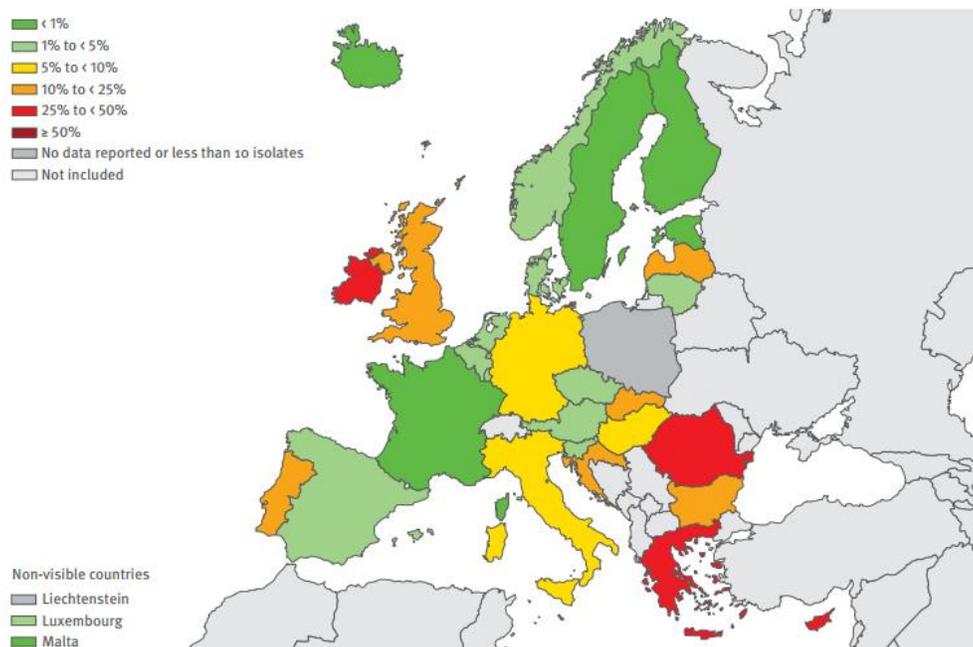
El género *Enterococcus* es el grupo más controvertido de las bacterias ácido-lácticas que forman una parte importante de la microbiota de alimentos, especialmente en los de origen animal. El hábitat natural de estas bacterias es el tracto gastrointestinal de humanos y animales, en los cuales son capaces de sobrevivir incluso en condiciones muy adversas. Como característica positiva, varias cepas del género *Enterococcus* han sido utilizadas como probióticos, ya que tienen un impacto positivo en el equilibrio microbiano gastrointestinal (Giraffa, 2003; Ogier y Serror, 2008). Además, varias especies de *Enterococcus* presentan potencial bacteriocinogénico, siendo capaces de producir una amplia variedad de enterocinas contra microorganismos patógenos. Algunas cepas también juegan un papel importante en la producción, maduración y desarrollo del aroma de diferentes tipos de quesos (Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno y col., 2006; Xu y Kong, 2013). Los enterococos tienen también una larga historia de utilización segura en la producción de productos tradicionales fermentados, tales como quesos y embutidos o en fermentaciones naturales (Hammad y col., 2015). Muchos productos cárnicos fermentados por métodos tradicionales y artesanales en los países mediterráneos dependen de la flora endógena de conservar sus cualidades organolépticas tradicionales.

En contraste, los enterococos son considerados como un parámetro indicador de higiene que proporcionan información sobre la posible contaminación fecal de los alimentos (De Medici y col., 2015). Por lo tanto, su presencia no está permitido en

algunos tipos de productos de queso y carne procesada porque se consideran una fuente de deterioro y, en algunos casos, un riesgo para la salud humana (Franz y col., 1999), principalmente *E. faecalis* (80%) y *E. faecium* (5-20%) (Morrison y col., 1997; Martin col., 2005). Los enterococos también han sido implicados como agentes patógenos causantes de una gran variedad de infecciones, tales como endocarditis, bacteriemia, infecciones de vías urinarias, del sistema nervioso central, así como infecciones intra-abdominales y pélvicas (Franz, 1999), así como en la difusión de la resistencia a los antibióticos a través de la cadena alimentaria (Giraffa, 2002). Estos niveles altos de resistencia a los antimicrobianos en los enterococos siguen siendo una causa importante de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria, en Europa y un gran desafío para controlar a las infecciones. *E. faecalis* ha mostrado una alta prevalencia de resistencia a aminoglucósidos, mientras que la resistencia a la vancomicina en *E. faecium* mostró una tendencia creciente durante los últimos años (2011- 2014), como puede observar en las Figura 4 y 5, respectivamente, según los países de la UE / EEA (ECDC, 2014).



**Figura 4. Porcentaje (%) de los aislamientos de *E. faecalis* con resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, en los diferentes países de la UE / EEA, 2014.**



**Figura 5. Porcentaje (%) de los aislamientos de *E. faecium* resistentes a la vancomicina, en los países de la UE / EEA, 2014.**

Sin embargo, para causar la infección, los *Enterococcus* deben poseer factores de virulencia que permiten que dichas bacterias puedan colonizar e invadir el tejido del huésped y posteriormente translocarse a través de las células epiteliales, evitando la respuesta inmune del huésped (Valenzuela y col., 2008). En cualquier caso, los efectos beneficiosos de algunas especies de enterococos para la salud humana y animal frente a los efectos negativos observados confirman la naturaleza dual de los enterococos (Figura 6).

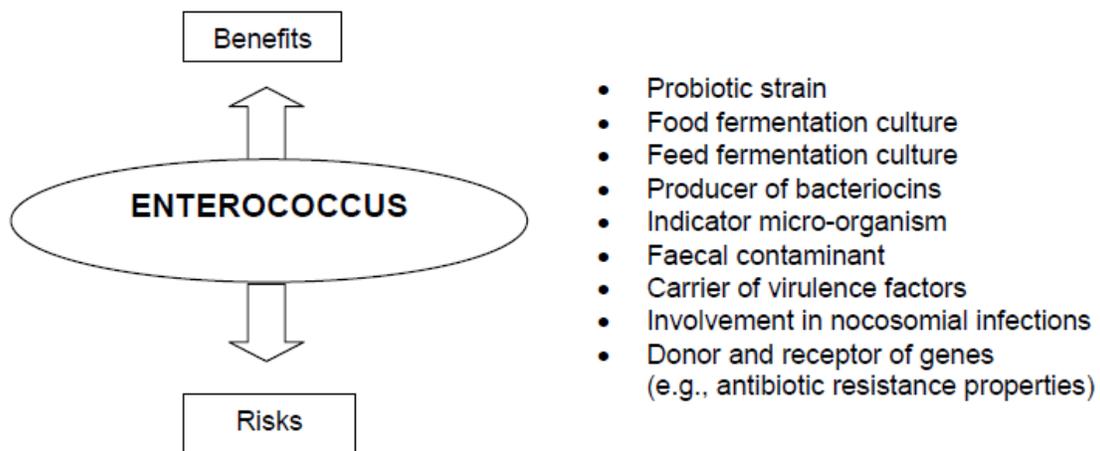


Figura 6. Naturaleza dual de los enterococos con indicación de sus beneficios y riesgos.

### 3.3.3 El potencial de virulencia de los *Enterococcus*

El primer paso hacia la comprensión del potencial patógeno de los enterococos es la identificación de los factores de virulencia potenciales que dirigirá las líneas generales de la infección por estas bacterias en el tracto gastrointestinal del huésped. “Factor de virulencia” es el nombre que se le da a una molécula que mejora la capacidad de un

microorganismo para causar la enfermedad más allá de la virulencia intrínseca de dicho microorganismo (Mundy y col., 2000). Por ejemplo, dichos factores se pueden favorecer la adherencia de los tejidos del huésped, o el establecimiento y mantenimiento de la colonización.

### **3.3.3.1 Identificación de los factores de virulencia**

#### **3.3.3.1.1 Sustancia de agregación (*agg*)**

La *agg* es un gen que codifica para la elaboración de una sustancia de agregación, que es una proteína localizada en la superficie que promueve la formación de agregados durante la conjugación bacteriana a partir de células donantes a los receptores de plásmidos libres (Clewel, 1993). Esta proteína también actúa como un factor de virulencia durante la infección del hospedador, que puede contribuir a la patogénesis de la infección por enterococos a través de diferentes mecanismos. Además, esta proteína ayuda a la adherencia a los tejidos del hospedador (Sartingen y col., 2000; Sübmuth y col., 2000). La proteína *agg* desempeña también un papel importante en la adhesión a la fibrina y el aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular (Hirt y col., 2000). Estudios relativos al papel de los enterococos en la endocarditis infecciosa demostraron que existe sinergismo entre la Citolisina y *agg* (Foulquié Moreno y col., 2006), así como un incremento en la virulencia en endocarditis causadas por enterococos a conejos (Schlievert y col., 1998; Johnson y col., 2004).

### 3.3.3.1.2 Proteína de superficie (*esp*)

El gen codificante de la denominada proteína de superficie de los enterococos (*esp*) es una proteína de alto peso molecular extracelular que fue descrita por primera vez en *Enterococcus* por Shankar y col. (1999). Esta proteína puede promover la adhesión, colonización a células epiteliales y la evasión del sistema inmune, y se cree que también juega un papel en la resistencia a los antibióticos (Foulquié Moreno y col., 2006). Esta proteína contribuye también a la formación biofilms sobre superficies abióticas (Toledo-Arana y col., 2001). El gen que codifica la proteína *esp* juega un papel importante en la formación de biopelículas por enterococos, lo que podría producir resistencia a las tensiones ambientales, y la adhesión a las células eucariotas, tales como los del tracto urinario (Borgmann y col., 2004). Otros estudios han demostrado que la proteína *esp* se encuentra comúnmente en *E. faecalis* mientras que apenas se encuentra en *E. faecium* (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001).

### 3.3.3.1.3 Proteína de unión al colágeno (*ace*)

El gen codificante de la proteína de unión al colágeno (*ace*) está implicada en la unión de la bacteria a las proteínas de la matriz extracelular. Dicha proteína se encuentra generalmente en *E. faecalis*, constituyendo una de las proteínas perteneciente al grupo de los MSCRAMMs (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*), y es capaz de interactuar con proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo I, colágeno tipo IV, colágeno de tipo VI, y laminina (Hall y col., 2007; Nallapareddy y col., 2000a; Nallapareddy y col., 2000b; Nallapareddy y Murray, 2006). Algunos autores señalan que *ace* puede desempeñar un papel en la patogénesis de la endocarditis

enterocócica (Koch y col., 2004).

#### **3.3.3.1.4 Gelatinasa (*gelE*)**

La gelatinasa (*gelE*) es una endopeptidasa extracelular dependiente del zinc que tiene capacidad para hidrolizar gelatina, colágeno, laminina, hemoglobina, caseína y otros péptidos bioactivos (Park y col., 2007, 2008; Steck y col., 2011). De este modo, *gel* podría contribuir a la virulencia por la degradación de las proteínas específicas del hospedador y dañando de este modo sus tejidos. El papel principal de la gelatinasa en la patogénesis enterococos se cree que está relacionada con el suministro de nutrientes a las bacterias mediante la degradación de tejido del huésped y en la capacidad de los enterococos para formar biofilms (Gilmore, 2002; Mohamed y Huang, 2007). Sin embargo, la presencia del gen codificante de *gelE* en una cepa de *Enterococcus* no significa que el gen sea funcional, ya que ha demostrado en diversos aislados que llevan *gelE* no producen gelatinasa (Eaton y Gasson, 2001).

#### **3.3.3.1.5 Adhesinas causantes de endocarditis en *Enterococcus faecium* (*EfaA<sub>fm</sub>*) y *Enterococcus faecalis* (*EfaA<sub>fs</sub>*)**

Los genes codificantes de las adhesinas *EfaA<sub>fm</sub>* y *EfaA<sub>fs</sub>* también son considerados como factores potenciales de virulencia de los enterococos. *EfaA<sub>fm</sub>* y *EfaA<sub>fs</sub>* son genes codificantes de adhesinas expresadas por *E. faecium* y *E. faecalis*, respectivamente, que están habitualmente relacionadas con las endocarditis enterocócica Singh y col., (1998).

### 3.3.3.1.6 Las feromonas sexuales

Las feromonas sexuales no son considerados como factores de virulencia en sí mismos, aunque su papel en los enterococos puede implicar la difusión de los determinantes de virulencia así como de resistencia a los antibióticos (Eaton y Gasson, 2001; Valenzuela y col., 2008; Ben Belgacem y col., 2010). Algunos enterococos excretan las feromonas sexuales con el fin de poder recopilar plásmidos de feromonas sexuales correspondientes a otras cepas. Las feromonas sexuales (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*) codifican para la síntesis de péptidos lineales pequeños que inducen una respuesta en otras bacterias que poseen plásmidos que responden al contacto con dichos péptidos. La transferencia de plásmidos a través de este sistema es muy importante para la diseminación entre la microbiota tanto genes codificantes de factores de virulencia como de resistencia a antibióticos.

### 3.3.4 Resistencia a los antibióticos de *Enterococcus*

Se han encontrado cepas de enterococos resistentes a varios antibióticos en numerosos productos cárnicos, lácteos, en comidas preparadas, e incluso en las cepas de enterococos utilizados como probióticos (Franz y col., 2001). La transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre las cepas de enterococos está bien documentada, y estos genes podría ser transferidos mediante la acción de feromonas, plásmidos (conjugativos o no conjugativos) o mediante transposones (Franz y col., 1999; Giraffa, 2002). La resistencia a los antibióticos puede ser natural (intrínseca), adquirida mediante mutaciones espontáneas de su ADN o adquirida a partir de material genético transferido por cepas resistentes. Los enterococos muestran resistencia intrínseca a las cefalosporinas, muchos

betalactámicos, sulfonamidas, y hacia bajos niveles de clindamicina y aminoglucósidos (Murray, 1990; Charles y col., 2004), mientras que la resistencia a otros antibióticos como cloranfenicol, tetraciclinas y glicopéptidos generalmente se debe a la adquisición de material genético exógeno. La prevalencia de resistencias adquiridas en los enterococos es generalmente mayor que la asociada con resistencia intrínseca (Becquet, 2003; Ammor y col., 2007). No obstante, hay que tener en cuenta que en algunas ocasiones, la resistencia intrínseca de los enterococos a muchos antibióticos puede conducir a que su tratamiento sea muy difícil (Giraffa, 2002).

#### **3.3.4.1 Difusión de la resistencia a los antibióticos**

El altísimo nivel de resistencia a algunos tipos de antibióticos observada en los enterococos y su frecuente presencia en alimentos crudos hace que sea habitual encontrar cepas de enterococos resistentes a varios antibióticos, tanto en alimentos fermentados como en alimentos no fermentados (Giraffa, 2002). Dado esta amplia difusión de resistencias, generalmente las infecciones por enterococos son tratadas con vancomicina, que está considerado el fármaco de elección para el tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias. Sin embargo, por desgracia ya han sido aisladas muchas cepas de enterococos resistentes a la vancomicina en hospitales de la Unión Europea (Giraffa, 2002), lo cual es muy preocupante, porque este fármaco se considera en algunos casos el último recurso antibiótico usado para tratar infecciones graves por bacterias Gram-positivas resistentes.

La transferencia de materiales genéticos que contengan un gen de resistencia a la vancomicina entre diferentes especies de enterococos puede ocurrir durante las

fermentaciones de embutidos y quesos (Coconcelli y col., 2003). Además, la transferencia de la resistencia a la vancomicina se ha demostrado en el intestino del ratón entre los enterococos y una cepa comercial *Lactobacillus acidophilus*, demostrando así que el uso de enterococos en los alimentos puede ocasionar que otras especies bacterianas adquieran resistencia a los antibióticos (Mater, 2008).

El género de *Enterococcus* generalmente presentan resistencia antibiótica intrínseca de bajo nivel a betalactámicos como la penicilina, ampicilina y piperacilina. Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos implican la producción de proteínas de unión a penicilina de baja afinidad (beta-lactamasas). Los genes para la producción de beta-lactamasas en los enterococos pueden estar localizados tanto en plásmidos, como en el propio cromosoma. Estudios anteriores han demostrado resistencia de los enterococos a algunos antibióticos como la penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, lincomicina, rifampicina, o ácido fusídico en proporciones distintas, todos estos aislados a partir de muestras de quesos. Además, También han sido aislados enterococos resistentes a antibióticos como la bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, penicilina, rifampicina, estreptomina y tetraciclina a partir de muestras de carne, tanto cruda como fermentada (Son y col., 1999; Hayes y col., 2004; Barbosa y col., 2009). Así pues, existe una amplia variedad de antibióticos a los cuales algunas cepas de enterococos ya han conseguido mostrar resistencia. Este incremento en la resistencia a los antibióticos de las especies de *Enterococcus* pone de relieve la necesidad de una mayor comprensión del impacto ecológico de este género.

La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías:

- Inactivación enzimática, consiste en la inactivación o destrucción de los antimicrobianos por medio de las enzimas que producen los microorganismos.
- Modificaciones en el punto de acción sobre el que actúa el agente antimicrobiano.
- Alteraciones de la permeabilidad, lo que dificulta la penetración o acumulación de los antimicrobianos en el interior de la célula bacteriana.

### 3.4 Genero *Bacillus*

Los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* son bacilos, grampositivos y esporógenos, que forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables. Son bacterias caracterizadas por la capacidad de crecer a temperaturas mesófilas y termófilas, y pueden ser además tanto aerobias estrictas como anaerobias facultativas. Por estos motivos, debido a su extraordinaria capacidad de adaptación, el género *Bacillus* a menudo se encuentra en la leche cruda, pasteurizada, leche de ultra alta temperatura (leche de UHT), leche en polvo, queso y yogur (Klijn y col., 1997). Las especies de *Bacillus* presentan una acción para el hombre muy diversa. Así, aunque la mayoría de las especies de *Bacillus* son seguras, algunas son potencialmente patógenas, para las personas como para los animales. Algunos ejemplos significativos de *Bacillus* para la industria alimentaria son *B. coagulans*, *B. sporothermodurans*, *B. subtilis* y *B. cereus*, que en algunos casos son potencialmente patógenos. Gracias a su capacidad de producir esporas altamente resistentes al calor, estos microorganismos son capaces de tolerar tratamientos térmicos tan severos como la UHT. Anteriores estudios

investigación han demostrado la extrema resistencia al calor de esporas de *B. sporothermodurans* (Huemer y col., 1998; Scheldeman y col., 2002). Esta especie constituye un serio problema para las fábricas de productos lácteos, debido a sus efectos sobre la estabilidad de las proteínas y el cumplimiento de los requisitos legales para la comercialización de la leche UHT.

### **3.4.1 *Bacillus sporothermodurans***

El proceso de UHT es un tratamiento térmico alto de corta duración empleado con el fin de producir productos comercialmente estériles. El tratamiento UHT utiliza una temperatura de 135-140 °C durante 1-2 segundos (Jay y col., 2005), que es capaz de destruir las células vegetativas y las endosporas presentes en la leche cruda (Pettersson y col., 1996). Por lo tanto, la leche UHT puede ser almacenada sin necesidad de refrigeración. Sin embargo, algunas las bacterias formadoras de esporas con una alta resistencia al calor como *B. sporothermodurans* suponen un importante problema para la industria láctea, ya que deben asegurar los procesos de esterilización y la seguridad alimentaria en productos de leche UHT.

### **3.4.2 Importancia de *Bacillus sporothermodurans***

La especie *B. sporothermodurans* puede producir endosporas que posteriormente pueden germinar durante el almacenamiento en productos UHT y crecer hasta  $10^5$  ufc/ml, degradando el producto debido a su acción proteolítica (Klijn y col., 1997; Montanari y col., 2004). De este modo, estas especie bacteriana provoca una reducción en la calidad de la leche, un acortamiento de su vida útil, así como una reducción en la

aceptabilidad por parte del consumidor (Pettersson y col., 1996; Claeys y col., 2001).

*B. sporothermodurans* se detectó por primera vez en leche UHT en Italia y Austria en 1985 y luego también en Alemania en 1990 (Hammer y col., 1995). Ya más recientemente, Herman y col., (2000) encontraron esta especie en leche esterilizada y otros productos lácteos, como la leche UHT, leche con chocolate, leche evaporada y leche reconstituida. De acuerdo con las regulaciones relativas a la comercialización de la leche y los productos lácteos, cuya norma básica es la Directiva Europea 92/46/CEE, los recuentos de colonias de paquetes sin abrir, después de 15 días de incubación a 30 °C, deben estar por debajo de 10 ufc por 0.1 ml (Anónimo, 1992). Por lo tanto, las esporas que sobreviven después del proceso de esterilización han llegado a ser un obstáculo para la industria láctea, ya que complican el cumplimiento de los requisitos legales establecidos por la legislación europea.

### **3.4.3 Fuentes de contaminación por *Bacillus sporothermodurans***

*B. sporothermodurans* ha sido indentificado en contaminaciones masivas de productos de leche UHT desde mediados de los años ochenta. Esta especie puede proceder de numerosos orígenes, como son el suelo, compost, tracto digestivo de los animales, estiércol, ubre, utensilios de ordeño, la leche cruda, así como de la propia alimentación que reciban los animales (Vaerewijck y col., 2001; Guillaume-Gentil y col., 2002). Como resultado de la naturaleza competitiva de la flora de leche cruda, es difícil aislar *B. sporothermodurans* en cultivos microbiológicos convencionales. Para una correcta detección de *B. sporothermodurans* en muestras de leche, debe realizarse empleando Brain Heart Infusion (BHI) agar después de calentar la muestra hasta 100 °C

durante 30-40 minutos (Scheldeman y col., 2006). También se han descrito casos en los cuales la contaminación de los productos UHT con esporas de *B. sporothermodurans* no procedían del origen de la material prima, sino que llegaron al producto durante el procesamiento en la planta de envasado (Hammer y col., 1995).

#### **3.4.4 Características generales de *Bacillus Sporothermodurans***

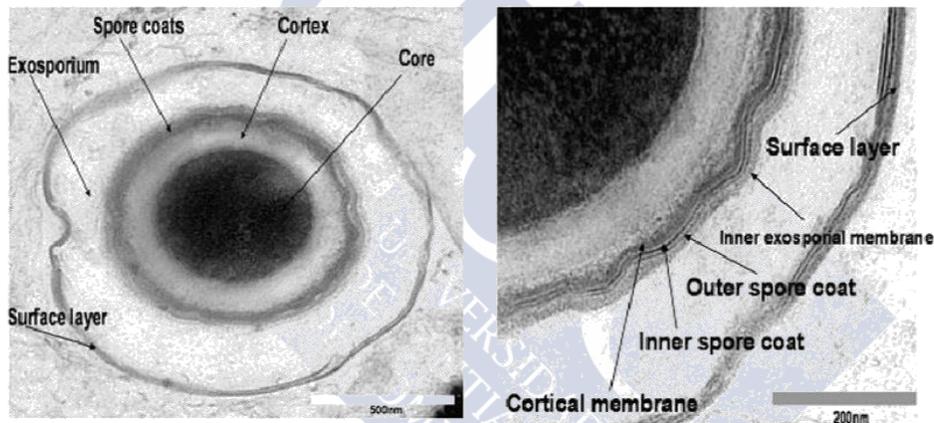
Al igual que otras especies de *Bacillus*, *B. sporothermodurans* es una bacteria gram positiva, con forma de bastón, es formadora de esporas. Las propiedades hidrófobas de las endosporas producidas por esta especie, permiten que dichas esporas se adhieran al acero y su elevada resistencia general a la desecación y acción de los desinfectantes les permiten contaminar los productos durante el procesamiento (Andersson y col., 1995; Simmonds y col., 2003).

Aunque los métodos fenotípicos juegan un papel importante en su identificación a nivel de género, el escaso de crecimiento y las reacciones negativas para muchas pruebas estándar y bioquímicas como el API 50CHB pueden acarrear algunas dificultades para conseguir una identificación fiable de *B. sporothermodurans* mediante métodos fenotípicos. Además, estos métodos de identificación tardan mucho tiempo, debido a la baja velocidad de crecimiento de esta especie (Pettersson y col., 1996).

#### **3.4.5 Esporas de *Bacillus sporothermodurans***

Las esporas producidas por *B. sporothermodurans* tienen forma cilíndrica y su rango de longitud va desde 1,1 – 1,2  $\mu\text{m}$  y 0,7 – 0,8  $\mu\text{m}$  para la anchura. La principal diferencia estructural entre las esporas producidas por diferentes especies de *Bacillus* es la estructura

y el número de capas de revestimiento, mientras que la corteza y el núcleo de dichas esporas son muy similares (Burgess y col., 2010). Por ejemplo, las esporas producidas por *B. sporothermodurans* tienen varias capas de revestimiento, que pueden protegerlos del tratamiento UHT (Figura 7). Además, diversos estudios han demostrado que la estructura de las endosporas de *B. sporothermodurans* se ve afectada por las condiciones ambientales. Las esporas aisladas de leche UHT son generalmente más densas y más pequeñas que las aisladas a partir de leche cruda (Scheldeman y col., 2006), lo que las hace aún más resistentes.



**Figura 7.** Imágenes de Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) de una espora producida por *B. sporothermodurans* (Fuente: Tabit y Buys, 2010).

### 3.4.6 La identificación de *Bacillus sporothermodurans*

Debido al hecho de que las esporas producidas por *B. sporothermodurans* son un obstáculo para el correcto cumplimiento de la legislación europea por parte de la industria láctea, numerosos métodos de identificación molecular se han utilizado para identificar y caracterizar *B. sporothermodurans*, tales como la PCR para endosporas altamente resistentes al calor (HRS-PCR), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD),

amplificación de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP) o el análisis de la secuencias amplificadas del gen 16S rRNA (Pettersson y col., 1996; Klijn y col., 1997; Hermany col., 1997; Herman y col., 1998).

#### **3.4.6.1 PCR para endosporas altamente resistentes al calor (HRS-PCR)**

La técnica HRS-PCR fue empleada previamente para detectar esporas de *B. sporothermodurans* en muestras de leche cruda. Los cebadores empleados para la realización de éste método se han realizado con secuencias obtenidas mediante hibridación sustractiva; SH2-F1 (5' GAT TCA GGC AGA ATG TAG CA 3') y SH2-R (5' TTT CGC CAC TTG ATG GTA CA 3'), (Herman y col., 1997; Scheldeman y col., 2002). Mediante esta técnica, la detección de *B. sporothermodurans* en la leche cruda se basa en provocar en primer lugar la activación y germinación de las esporas, seguido de su identificación mediante PCR.

#### **3.4.6.2 La secuenciación del gen 16S rRNA**

La secuenciación del gen 16S rRNA se puede utilizar para la identificación de *B. sporothermodurans* porque el gen 16S rRNA contiene regiones con una alta variabilidad (Klijn y col., 1997). El gen 16S rRNA de *B. sporothermodurans* ha sido amplificado mediante PCR, y los productos resultantes de la PCR fueron posteriormente purificados y secuenciados, con los que constituyó una gran base de datos. Una vez realizada esta etapa, las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16S rRNA, pueden ser identificados por búsqueda de la secuencia en las bases de datos conocidas. Las porciones

de los genes 16S rRNA se han amplificado para la detección de *B. sporothermodurans* utilizando cebadores específicos: BSPO-F2 (5'ACG GCT CAA CCG TGG AG 3') y BSPO-R2 (5' GTA ACC TCG CGG TCT A 3') (Scheldeman y col., 2002). Sin embargo, la presencia de muchas copias del gen 16S rRNA en el bacteriana genómico causa dificultad ADN en 16S rRNA análisis de la secuencia de *B. sporothermodurans* (Klijn y col., 1997).

#### **3.4.6.3 ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)**

La técnica amplificación polimórfica al azar (RAPD) es una forma de PCR arbitrariamente cebada que utiliza cebadores aleatorios de aproximadamente 10 pares de bases; mediante las cuales se buscan amplicones en todo el genoma y se amplifican. Esta técnica se emplea para repetir el ensayo con cada uno de una serie de diferentes cebadores porque diferentes cebadores producen diferentes fragmentos y de este se modo se consigue aumentar la probabilidad de detección de diferencias entre las cepas. La técnica de RAPD se ha utilizado para discriminar *B. sporothermodurans* de otros *Bacillus* spp. aislado de muestras de compost (Zhang y col., 2002).

#### **3.4.6.4 Amplificación de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP-PCR)**

El método ADN Rep-PCR se dirige a la secuencia palindrómica extragénica repetitiva que está presente en varios lugares, produciendo como característica una especial de “huellas dactilares” de las diferentes cepas bacterianas. *B. sporothermodurans* ha sido previamnete identificado mediante REP-PCR con éxito. Los cebadores

específicos se han empleado previamente para amplificar en el gen 16S rRNA de *B. sporothermodurans* segmentos de reacción de PCR, a lo cual sigue una etapa de análisis de electroforesis en gel de agarosa (Scheldeman y col., 2002; Herman y col., 1997). Además, la técnica REP-PCR no sólo ha permitido distinguir *B. sporothermodurans* de otras especies de *Bacillus* conocidos, sino que también puede diferenciar entre los *B. sporothermodurans* aislados de UHT y leche cruda (Scheldeman y col., 2006), lo que hace que esta técnica sea especialmente interesante para este trabajo.

### 3.5 Procesamiento ultra alta temperatura (UHT)

Según la *International Dairy Federation*, el tratamiento UHT utiliza un rango de temperatura de 135 a 150 °C durante un tiempo corto, tales como 140 °C durante 2-3 s (Comité del Codex sobre la Leche y los Productos Lácteos, 2000). Este proceso garantiza la eliminación de las células vegetativas y las endosporas presentes en la leche cruda. Sin embargo, las esporas de *B. sporothermodurans* tienen una resistencia al calor excepcionalmente alta a temperaturas UHT, que es los valores D140 de esta especie que van desde 3.4 - 7.9s y los valores Z que van desde 13.1 – 14.2 °C (Huemer y col., 1998). Debido al hecho de que el aumento de la temperatura o el tiempo durante el cual se aplica el tratamiento térmico podrían conducir a la desnaturalización de proteínas, procesos de isomerización de la lactosa y reacciones de Maillard, no es recomendable incrementar el tratamiento térmico o su duración. Por este motivo, estas esporas de *B. sporothermodurans* pueden alcanzar el producto final y sus recuentos en el mismo pueden llegar hasta incluso  $10^5$  ufc/ml.

### 3.5.1 Tipos de tratamiento UHT

#### 3.5.1.1 Sistema UHT directo

En los sistemas de UHT directos, el calentamiento se realiza mediante la mezcla del producto con el vapor de agua (medio de calentamiento), seguido de un enfriamiento ultrarápido en una cámara de vacío (Figura 8). El proceso UHT directo puede incluir un sistema de calentamiento mediante inyección o mediante infusión. En el sistema de inyección, el vapor se inyecta en el product, mientras que en el sistema calentamiento por infusion, el producto es introducido en un recipiente lleno de vapor de agua. Sin embargo, el proceso UHT directo no se utiliza a menudo debido a que resulta más difícil y complejo controlar su correcto funcionamiento (Grijnspeerdt y col., 2004).

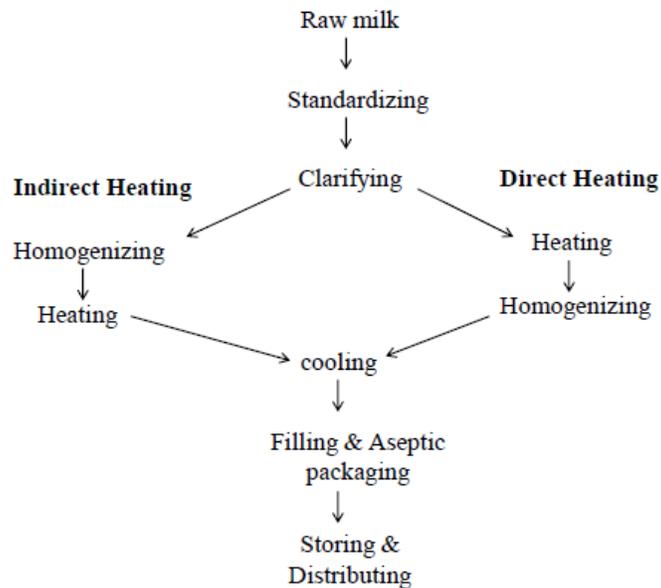


Figura 8. Diagrama de flujo para la producción de leche UHT (Jay y col., 2005).

### **3.5.1.2 Sistema UHT indirecto**

En los sistemas UHT indirectos, el calentamiento se transfiere desde el agua o vapor (medio de calentamiento) hacia el producto a través de un intercambiador del calor con presiones de funcionamiento elevadas para evitar la ebullición de la leche. Los sistemas indirectos se pueden basar en dos tipos de intercambiador, estos son los intercambiadores de calor de placas y los intercambiadores de calor tubulares. Además, es posible combinar los intercambiadores de calor en los sistemas indirectos de acuerdo con los requisitos del producto y de proceso.

### **3.5.2 Diferencias entre los sistemas de UHT**

De acuerdo con los dos tipos de proceso UHT, la calidad de la leche UHT que se procesa a través de UHT indirecto difiere de la producida mediante el sistema UHT directo. El proceso UHT directo requiere el consumo de una mayor cantidad de energía que el tratamiento UHT indirecto. Además de este importante inconveniente, el daño causado al producto, especialmente en los cambios químicos inducidos en la leche debidos al calentamiento, también son mayores en el sistema UHT directo que en el UHT indirecto (Hammer y col., 2000a).

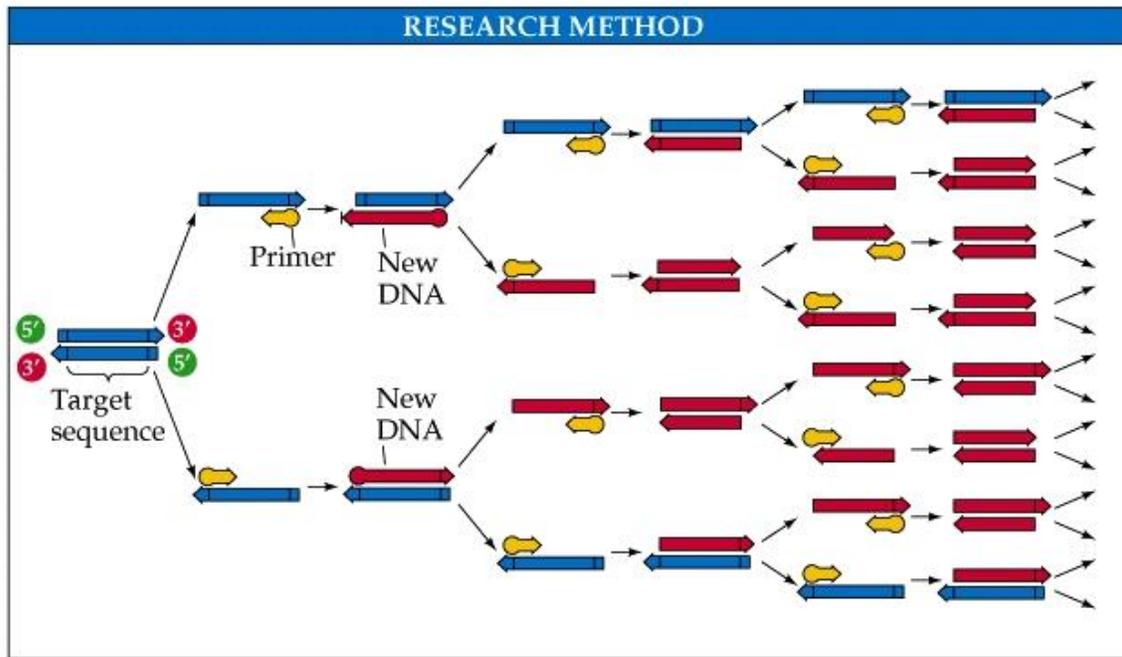
## **3.6 Principales aplicaciones de métodos moleculares para la detección y cuantificación de los genes codificantes de factores de virulencia y *B. sporothermodurans***

### **3.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica genética consistente en

producir *in vitro* múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de otras muchas moléculas de ADN. Esta técnica tiene el potencial para la identificación de especies microbianas y los genes de virulencia rápidamente por la amplificación de secuencias únicas a un gen particular. Un ciclo típico de PCR implica la desnaturalización del ADN bicatenario en cadenas sencillas, alineación de dos cebadores de oligonucleótidos a dos cadenas sencillas opuestas, y una extensión de las secuencias de cebador usando una enzima ADN polimerasa para completar la síntesis de cadenas complementarias a las cadenas individuales originales (Figura 9).

La amplificación por PCR de ADN se ha convertido en un protocolo de clave que utiliza para con frecuencia para confirmar la presencia de diferentes especies de *Enterococcus* en clínica (Dutka-Malen y col., 1995) y las muestras de alimentos (Macovei y Zurek, 2006) utilizando cebadores específicos de especie. Además, esta técnica se ha aplicado ampliamente para la detección de factores de virulencia en enterococos, por ejemplo para la determinación de la presencia de los genes *agg*, *efaA<sub>fm</sub>* y *gelE* (Eaton y Gasson, 2001), *esp* (Shankar y col., 1999) o *ace* (Dupre y col., 2003). Además, la presencia de genes codificantes de resistencia a los antibióticos también puede ser evaluada utilizando PCR (Poeta y col., 2005).



**Figura 9. Resumen del proceso de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN.**

[http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public\\_html/pcr.png](http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public_html/pcr.png)

### 3.6.2 PCR cuantitativa en tiempo real (RTi-PCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (RTi-PCR) es una modificación de la PCR que se utiliza para amplificar y detectar una región específica de ADN. A diferencia de la PCR convencional, en lugar de separarse las bandas en un gel al final de la reacción, el proceso se controla en "tiempo real", cuantificando los productos resultantes de la reacción de PCR al mismo tiempo que se desarrolla dicha reacción. La PCR, teóricamente amplifica el ADN de manera exponencial, duplicando el número de moléculas diana con cada ciclo de amplificación. A partir del número de ciclos a partir del cual se obtenga señal del

ADN diana, la cantidad de ADN del producto final podría ser utilizado para calcular la cantidad inicial de material genético por comparación con un estándar conocido. El cambio en la fluorescencia durante el transcurso de la reacción se mide mediante un instrumento que combina el ciclo térmico con la capacidad de escanear la fluorescencia originada. De este modo, mediante comparación de la fluorescencia frente al número de ciclo, el equipo de PCR en tiempo real genera un gráfico de amplificación que representa la acumulación de producto durante de toda la reacción PCR. Estos resultados finales indican la cantidad inicial de amplificación del ADN diana (Figura 10), (Life Technologies, 2012).

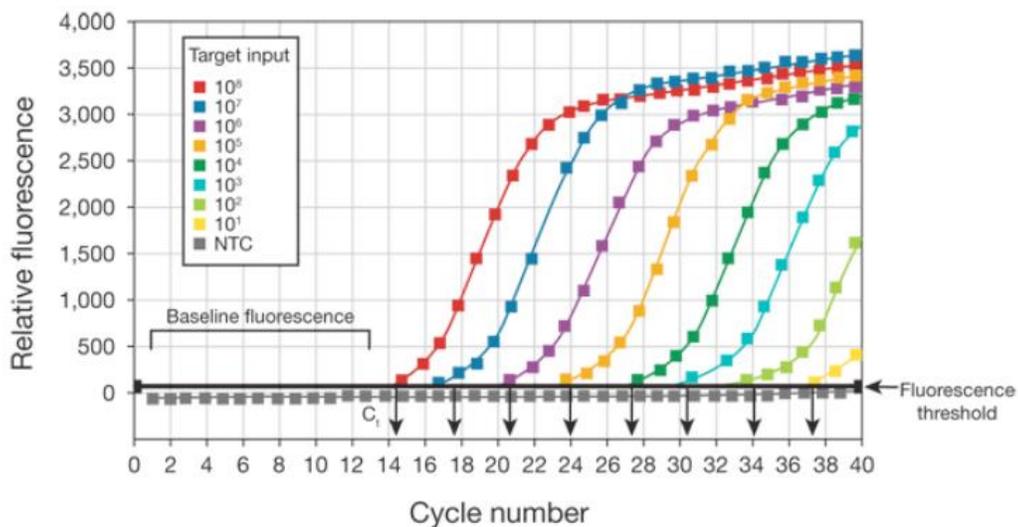


Figura 10. Fluorescencia relativa frente al número de ciclo ( $C_T$ ).

La PCR en tiempo real tiene muchas ventajas sobre las formas más convencionales de PCR:

- Capacidad para vigilar el progreso de la reacción PCR, ya que se produce en tiempo

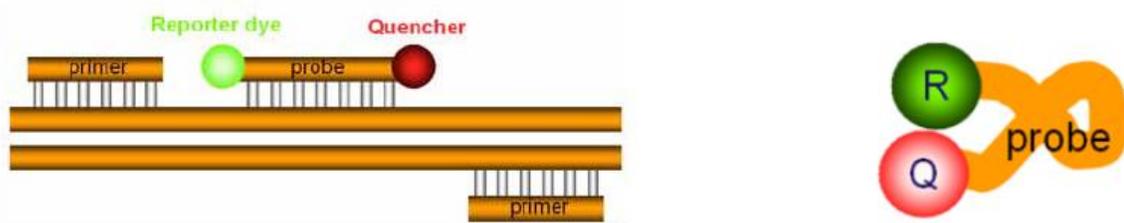
real. Se puede ver, literalmente, si las reacciones han funcionado bien o por el contrario han fracasado.

- La eficiencia de la reacción se puede calcular con precisión.
- No existe la necesidad de separar los productos finales de PCR en un gel de agarosa después de la reacción.
- La mayor ventaja de todas, es que mediante la RTi-PCR se puede realizar análisis verdaderamente cuantitativo de la expresión génica.

Las dos sondas más comúnmente utilizadas de tiempo real PCR son:

1- La sonda TaqMan<sup>®</sup>

Las sondas TaqMan<sup>®</sup> son oligonucleótidos que tienen un colorante fluorescente (*reporter*) en su extremo 5' y un *quencher* en su extremo 3'. Estas sondas están diseñadas para hibridar con una región interna de un producto de PCR (Figura 11). Las sondas TaqMan<sup>®</sup> se pueden dividir en dos tipos: TaqMan<sup>®</sup> MGB, que utiliza colorante TAMRA como *quencher* y las sondas TaqMan<sup>®</sup> que incluyen una molécula llamada MGB (*Minor Groove Binder*) que se une al surco menor del ADN y que otorga a la sonda una mayor estabilidad y especificidad durante la hibridación a la secuencia diana.



**Figura 11. La sonda de TaqMan<sup>®</sup> tiene una secuencia de genes específicos y está diseñado para unirse a la diana entre los dos cebadores de PCR.**

## 2- El SYBR Green

El SYBR Green proporciona la forma más sencilla y económica para detectar y productos obtenidos mediante la RTi-PCR. El SYBR Green se une al ADN de doble cadena, y tras la excitación emite luz. Por lo tanto, como se acumula un producto de PCR, la fluorescencia aumenta. Aunque SYBR Green se caracteriza por que es barato, fácil de usar y sensible, es unirse a cualquier ADN de doble cadena en la reacción, incluyendo dímeros de cebadores y otros productos de reacción no específicos, lo que resulta en una sobreestimación de la concentración objetivo.



## 4 OBJETIVOS



## OBJETIVOS

Como primer objetivo de este trabajo fue poner de relieve los efectos del proceso de fermentación en la prevalencia real de los factores virulencia y los determinantes de resistencia a antimicrobianos en bacterias aisladas a partir de alimentos fermentados y no fermentados. Como marcador, fueron empleadas bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* aisladas de alimentos de diferentes fuentes.

Por otra parte, se desarrolló un método molecular, sensible, específico y rápido, capaz de detectar y cuantificar de forma directa los genes de virulencia *ace*, *esp* y *gelE* en los alimentos fermentados o no fermentados. Este método fue desarrollado mediante RTi-PCR TaqMan<sup>®</sup>, que es una técnica sensible y específica, que no había probada con anterioridad para la detección y cuantificación de genes de virulencia, en aislamientos procedentes de muestras de alimentos.

El tercer objetivo de la presente Tesis doctoral fue el desarrollo de un nuevo método para la detección cuantitativa de *B. sporothermodurans* directamente en muestras de leche. Este método podría ser utilizado para el control de estos microorganismos en la leche UHT, y es el primer método diseñado para cuantificar *B. sporothermodurans* mediante RTi-PCR TaqMan<sup>®</sup> en muestras de leche.

## 5 RESULTADOS





## 5.1 CAPÍTULO 1



## RESULTADOS

### 5.1 CAPÍTULO 1

<http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1138-6>



## 5.2 CAPÍTULO 2



## 5.2 CAPÍTULO 2

<http://dx.doi.org/10.1111/jam.13306>



## 5.3 CAPÍTULO 3



### 5.3 CAPÍTULO 3

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-10852>



## 6 DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

Actualmente, existe una amplia demanda por parte de los consumidores por el consumo de productos que no incluyan en su composición ingredientes artificiales o aditivos químicos a modo de conservantes (Miranda y col., 2011). No obstante, una consecuencia indirecta de esta tendencia entre los consumidores, es que el control en los alimentos de los diferentes agentes microbianos que pueden ser potencialmente peligrosos para la salud humana o que pueden alterar los alimentos, se hace más necesario (Barbosa y col., 2010). Como consecuencia de dicha necesidad, se ha llevado a cabo recientemente una intensa actividad investigadora acerca de los métodos de control de los microorganismos típicamente patógenos, como *Salmonella* o *Listeria monocytogenes*, pero no obstante se ha prestado menos atención a los patógenos oportunistas y los microorganismos alterantes (Carlos y col., 2010). A pesar de que éstos no originen tanta preocupación ni impacto mediático como los patógenos tradicionales, las pérdidas que originan a la industria alimentaria y las infecciones nosocomiales que originan, también son un problema muy a tener en cuenta.

Por ello, durante este trabajo se profundizó en el conocimiento de los factores de virulencia de agentes microbianos potencialmente patógenos, como los *Enterococcus*, incluyendo su resistencia a antibióticos, y en el control de un importante microorganismo alterante para la industria láctea como es el *B. sporothermodurans*. En consecuencia, mediante esta tesis doctoral se han desarrollado métodos para la detección y

cuantificación de los genes codificantes de factores de virulencia *ace*, *esp*, *gelE* en *Enterococcus* aislados de leche, queso y carne, y *B. sporothermodurans* en leche UHT. Previamente, ya existía un importante número de autores que han utilizado la PCR en tiempo real con sondas Taqman para detectar y cuantificar especies bacterianas a partir de diferentes alimentos (Elizaquível y col., 2008; Fernandez-No y col., 2011; Guarddon y col., 2011), así como bacterias portadoras de los genes de resistencia (Guarddon y col., 2011). No obstante, esta es la primera vez en la cual la cuantificación de los genes codificantes de factores de virulencia por bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* y *B. sporothermodurans* se realiza directamente en los alimentos, en el caso de los *Enterococcus* en diversas matrices alimentarias y en el caso de *B. sporothermodurans* en leche UHT, respectivamente. Por este motivo, dado que los métodos desarrollados permiten la detección de estos genes y bacterias, son de gran importancia desde el punto de vista sanitario y económico para la industria alimentaria y en particular, para la industria láctea.

En la primera parte de la presente tesis doctoral se ha desarrollado un método que permite la determinación de la presencia de diversos genes codificantes de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos en bacterias del género *Enterococcus*, así como la comparación de los resultados obtenidos en alimentos fermentados y no fermentados. Con dichos métodos, se ha realizado una clusterización jerárquica de perfiles genómicos mediante los cuales se han podido identificar y agrupar por afinidad genética las diferentes especies de *Enterococcus* presentes en las diferentes matrices alimentarias incluidas en el estudio. Asimismo, el empleo de cebadores M13R2 y CC1 que

se utilizaron con el ensayo RAPD-PCR han aumentado el potencial de discriminación dentro de las especies de *Enterococcus* con respecto a otros cebadores empleados anteriormente (Franz et al. 2001).

Los resultados obtenidos por los perfiles de RAPD-PCR resultaron más discriminativos en la detección de diferencias intra-específica que los de análisis filogenético basado en las secuencias de rRNA 16S, y han demostrado ser un método eficaz para la caracterización molecular de la variación entre las cepas (Martin col., 2005). Sin embargo, también se ha podido comprobar que la técnica desarrollada no tiene el suficiente potencial de discriminación para distinguir las cepas de *Enterococcus* de acuerdo con su alimento de origen (leche, leche fermentada, queso, carne fresca y carne fermentada), lo cual representa una limitación del método desarrollado.

Por otra parte, se ha resaltado el efecto del proceso de fermentación en la presencia de genes codificantes de factores de virulencia y en la resistencia a los antibióticos de bacterias pertenecientes al género *Enterococcus*. A pesar de que se han realizado varios estudios durante la última década en relación con los determinantes de virulencia en aislamientos clínicos y de alimentos, poco se sabe acerca de los factores ambientales que regulan su expresión (Carlos y col., 2010). Los resultados obtenidos muestran concordancia con trabajos previos realizados tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium* (Cariolato y col., 2008; Valenzuela y col., 2009; Barbosa y col., 2010; Ozmen y col., 2010). Es destacable que genes que apenas aparecen en *E. faecium*, como *ace* y *esp* (Valenzuela y col., 2008; Barbosa y col., 2010), han sido frecuentemente detectados en *E.*

*faecium*. Además, han podido aislarse cepas de *E. faecium* portadoras del gen *agg* a partir de alimentos fermentados. Las feromonas sexuales *ccf* y *cpd* también mostraron una alta incidencia entre las cepas de enterococos, particularmente en aquellas aisladas a partir de alimentos fermentados, siendo estos resultados compatibles con los publicados previamente por Canzek Mahjhenic y col., (2005).

Asimismo, también pudo concluirse que *E. faecalis* presentó mayores tasas de resistencias a antibióticos que *E. faecium*, lo cual es compatible con los resultados publicados por Valenzuela y col., (2009). De hecho, la mayor parte de las cepas de *Enterococcus* estudiadas en el presente trabajo mostraron resistencia a múltiples antibióticos. Esta multiresistencia a los antibióticos entre los enterococos podría estar relacionada con la presencia de mecanismos eficientes para la transferencia de genes de resistencia, ya sea mediante plásmidos de conjugación o transposones (Franz col., 1999; Clewell 1990). Hemos aislado cepas de enterococos resistentes a varios antibióticos (C, CIP, E, N, Ra y Te, lo cual es también consistente con resultados publicados anteriormente (Miranda col., 2007; McGowan-Spicer col., 2008; Valenzuela col., 2009). La presencia de enterococos resistentes a antibióticos representa un importante problema en el tratamiento de infecciones clínicas humanas, especialmente cuando son resistentes a Va, que se utiliza como último recurso para el tratamiento enterococos resistentes a múltiples antibióticos (Huycke col., 1998). Al contrario que lo observado en el caso de los factores de virulencia, no pudo determinarse una mayor proporción de resistencia a antimicrobianos en los aislamientos procedentes de alimentos fermentados que en los

procedentes de alimentos fermentados que en los procedentes de alimentos no fermentados.

En una segunda parte de la presente tesis doctoral, hemos conseguido desarrollar unos métodos válidos para la detección y la cuantificación de los genes de virulencia *ace*, *esp*, *gelE* en alimentos mediante RTi-PCR. Dichos factores de virulencia fueron detectados en altas porporciones tanto en aislamientos clínicos como alimentarios (Cariolato y col., 2008; Semedo-Lemsaddek y col., 2013) mediante técnicas de PCR convencionales, y mediante SybrGreen RTi-PCR (Lenz y col., 2010; Dardir y col., 2011). A pesar de que la eficiencia de la PCR convencional o SYBR Green RTi-PCR para la detección de genes de virulencia utilizados hasta el momento habían mostrado utilidad, resultaban insuficientes para proporcionar una evaluación amplia de seguridad alimentaria en muestras de alimentos, porque dichos factores de virulencia no habían sido cuantificados directamente en muestras de alimentos, sino únicamente en aislamientos bacterianos.

En este estudio, se utilizaron ensayos de RTi-PCR mediante sondas Taqman para la detección y cuantificación de genes seleccionados en muestras de alimentos. Los resultados permitieron una detección cuantitativa de la presencia absoluta de los genes de virulencia seleccionados, *ace*, *esp* y *gelE*, en muestras de alimentos. Por otra parte, los genes *ace*, *esp* y *gelE* en muestras de queso. El límite de detección obtenido por el nuevo método desarrollado fue de  $10^2$  ufc/ml o (g) tanto en cultivos puros como en muestras reales de carne, y de  $10^3$  ufc/g en el caso de las muestras de queso. Estos límites de

detección son similares a los previamente obtenidos en un trabajo realizado recientemente por nuestro grupo investigador (Guarddon y col., 2011). Este mayor límite de detección en el caso del queso con respecto a otras matrices alimentarias podría deberse al elevado contenido lipídico en las muestras de queso (Cankar col., 2006), que puede provocar dificultades en la extracción de ADN. Excluyendo esta matriz, el método desarrollado presenta unos límites de detección que hacen que lo hacen adecuado para la detección rápida y directa de genes de virulencia en un gran número de muestras de alimentos en relación con la evaluación de la seguridad alimentaria.

Así pues, los resultados obtenidos mostraron que los ensayos RTi-PCR mediante sondas Taqman representan un método rápido y específico para la detección y cuantificación de los genes de virulencia, *ace*, *esp* y *gelE*, en muestras de alimentos, lo que puede ayudar a impedir su propagación y distribución a través de la cadena alimentaria. Se demostró además que los ensayos Taqman RTi-PCR podrían detectar la presencia de genes codificantes de factores de virulencia en el AND bacteriano extraído directamente de matrices alimentarias.

En el ultimo capítulo de esta Tesis se ha abordado un problema muy com-un para la industria lactea. *B. sporothermodurans* ha sido responsable de una gran cantidad de contaminaciones masivas de productos de leche UHT desde mediados de la década de 1980. Sin embargo, es muy difícil poder aislar este microorganismo a partir de leche cruda mediante métodos microbiológicos convencionales, debido a la existencia una microbiota propia de la matriz alimentaria que es altamente competitiva (Scheldeman y

col., 2006). En consecuencia, algunos autores han desarrollado previamente técnicas de PCR convencionales para detectar *B. sporothermodurans* (Herman y col., 1998; Scheldeman et al., 2002; Tabit y Buys 2011), si bien éstas habían sido desarrolladas sobre cultivos puros de microorganismos y no sobre la leche UHT, que es una matriz mucho más complicada. En este trabajo hemos desarrollado por primera vez, desarrollar un método para detectar mediante RTi-PCR TaqMan la presencia de *B. sporothermodurans* en leche UHT. El límite de detección del método desarrollado fue de 10 bacterias por ml (1 log ufc/ml) de *B. sporothermodurans* en muestras de leche UHT, que confirman la sensibilidad de este método para la detección y cuantificación de la especie bacteriana diana, mejorando resultados previos como el Martínez-Blanche y col., (2009), desarrollado para la detección de *B. cereus* en alimentos (60 ufc/ml). Es interesante observar que el límite de detección para nuestro nuevo método cumple con la legislación de la UE para la leche y productos lácteos (Anónimo 1992), así como con otros límites legales establecidos en algunos países terceros. Como otros resultados relevantes obtenidos en este trabajo, pudimos comprobar que los recuentos obtenidos en muestras comerciales de *B. sporothermodurans* result ser significativamente mayor en muestras de leche UHT entera en comparación con leche UHT desnatada. Esta diferencia podría relacionarse con la capacidad de la grasa para aliviar el efecto de las altas temperaturas en *B. sporothermodurans* (Ahmed y col., 1995). Además, algunas muestras de leche UHT recogidas en el mercado han dado resultados positivos mediante la técnica desarrollada RTi-PCR TaqMan, mientras que no mostraba resultados positivos mediante los métodos microbiológicos convencionales consistentes en siembra en placas de medios de cultivo. Esto podría ser debido a la acción residual de agentes inhibidores del crecimiento que

pueden usarse en algunas industrias lácteas como son: nisina y /o sorbato de potasio en las esporas y células vegetativas de *B. sporothermodurans* o también tratamientos de homogeneización de ultra-alta presión (Espejo col., 2014; Aouadhi col., 2015).

No obstante es llamativo comprobar que es relativamente frecuente la presencia de *B. sporothermodurans* en muestras de leche UHT tomadas directamente de los mercados al por menor. Este hecho es posible explicarlo debido a que su presencia ocurre con mayor frecuencia en leches tratadas mediante UHT indirecta, en comparación la tratada mediante UHT directa (Scheldeman y al., 2006), además de contaminación de la leche en la granja (Vaerewijck y al., 2001). Estas bacterias formadoras de esporas tienen un efecto negativo en la calidad, la vida útil y la aceptabilidad por parte de los consumidores de leche UHT (Pettersson y col., 1996; Herman et al., 1998). Sin embargo, es posible controlar estos problemas mediante el uso del RTi-PCR Taqman desarrollado en este trabajo, para detectar las esporas o células vegetativas de *B. sporothermodurans* en un gran número de muestras de leche cruda de un modo rápido (menos de 2 h) para identificar las granjas lecheras con altas cantidades de estas bacterias. Del mismo modo, también ayudaría a dichas granjas, ya que una vez conocida su presencia deben modificar sus protocolos de limpieza, desinfección y ordeño a fin de comercializar leche con una mayor calidad microbiológica.

Del mismo modo, es también un hecho muy importante el que a pesar de que se encontró una mayor presencia de dicho microorganismo en leche entera, muy probablemente debido a la capacidad de la grasa para aliviar el efecto de las altas

temperaturas en *B. sporothermodurans* (Ahmed et al., 1995), las diferencias encontradas no resultados estadísticamente significativas comparando los resultados obtenidos en leche UHT entera y desnatada. Este resultado abre la puerta a que el método desarrollado pueda ser empleado a nivel de industria láctea tanto en el caso de la leche UHT entera como en el caso de la leche UHT desnatada.



## 7 CONCLUSIÓN



## CONCLUSIONES

### 8.1 Conclusiones generales

Mediante este trabajo se ha revelado los efectos del proceso de fermentación de los alimentos tiene en la prevalencia de factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos en bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* spp en alimentos fermentados y no fermentados. Por otra parte, se ha diseñado un método específico y eficaz, capaz de detectar y cuantificar de forma directa, rápida y sensible tres de los genes de virulencia de enterococos en alimentos. Asimismo, se ha desarrollado también un método para la detección y la cuantificación *B. sporothermodurans* en leche UHT, lo cual puede servir como herramienta de control en la industria láctea.

La incidencia de genes determinantes de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos en enterococos presentes en diferentes matrices alimentarias (leche, leche fermentada, queso, carne fresca y carne fermentada), varía dependiendo de las condiciones de los procesos de fermentación (temperatura, presencia de nitritos, alta presión, la sal, pH). Por ello es necesario conocer que factores promueven su presencia, ya que dichos factores de virulencia desempeñan un papel crucial en la patogenia y en el tratamiento de la enfermedades nosocomiales producidas por enterococos. Adicionalmente, por lo general dichas enfermedades nosocomiales producidas por enterococos suelen ser tratadas mediante la aplicación de antibióticos, que en el caso de no ser efectivos, pueden aumentar la virulencia de las cepas causantes de dichas

enfermedades en lugar de eliminar las bacterias. Varios estudios han intentado esclarecer esta regulación en respuesta a los efectos del medio ambiente de los alimentos. Dichos estudios han demostrado que la capacidad de adaptación genética y la capacidad de multiplicación de los enterococos desempeña un papel importante en el desarrollo de los linajes problemáticos, pero aportaron pocos datos acerca del efecto de las condiciones en las cuales se procesan los alimentos sobre la transferencia de genes en microbiota de alimentos y sobre la dinámica de la difusión de resistencia a antibióticos en alimentos fermentados como el queso y la carne curada. Además, algunos de estos estudios sobre los enterococos se han llevado a cabo utilizando las condiciones ambientales óptimas, lo que permite que las células crecen y se dividen normalmente. Esto siempre se corresponde con las condiciones reales, por lo que la presente investigación resulta más relevante a la hora de esclarecer el impacto del proceso de fermentación en la prevalencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos en los alimentos fermentados y no fermentados.

Un aspecto importante del concepto de seguridad alimentaria se basa en el control de los factores ambientales que eliminan o limitan el crecimiento de bacterias patógenas o no deseados en una matriz alimentaria. A fin de lograr eficazmente este objetivo, se requiere el conocimiento de las respuestas bacterianas a las condiciones ambientales, así como el desarrollo de nuevos métodos para detección de estas bacterias o genes de virulencia. El ensayo desarrollado mediante RTi-PCR TaqMan demostró ser una técnica más sensible y específica que empleando SYBR Green, y no había sido empleada anteriormente para la detección y cuantificación de genes de virulencia en muestras de alimentos. Por lo tanto, el método desarrollado podría ser utilizado directamente en los

productos alimenticios para la detección y cuantificación rápida de genes codificantes de factores de virulencia, lo cual representa un importante avance con respecto a la evaluación de la seguridad alimentaria. Por otra parte, este es el primer estudio para cuantificar estos factores de virulencia por ensayo específico TaqMan RTi-PCR en muestras de alimentos.

Además trabajo también incluye un nuevo método para la detección cuantitativa en muestras de leche de *B. sporothermodurans*, una especial bacteriana capaz de producir esporas de alta resistencia térmica, que puede resistir la temperatura ultra alta tratamiento (UHT) o la esterilización industrial. Para su detección se ha diseñado un ensayo de PCR cuantitativa altamente específica capaz de cuantificar *B. sporothermodurans* directamente en muestras de leche, que podría ser utilizado para el control de estos microorganismos en leche UHT envasada. Los métodos similares que habían sido previamente publicados no eran directamente aplicables a muestras de leche, sino que habían sido realizados en cultivos puros.

## 8.2 Conclusiones específicas

1- Los productos lácteos y la carne pueden desempeñar un papel importante en la difusión de factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos a través de la cadena alimentaria. Se ha determinado que en este proceso puede tener una especial importancia *E. faecalis*, que contiene múltiples determinantes de virulencia y resistencia a los antibióticos en comparación con *E. faecium*.

2- Los factores de virulencia fueron más prevalentes dentro de las cepas de *Enterococcus* aisladas a partir de alimentos fermentados y de origen lácteo, mientras que la resistencia a los antibióticos no pudo correlacionarse con el proceso de fermentación.

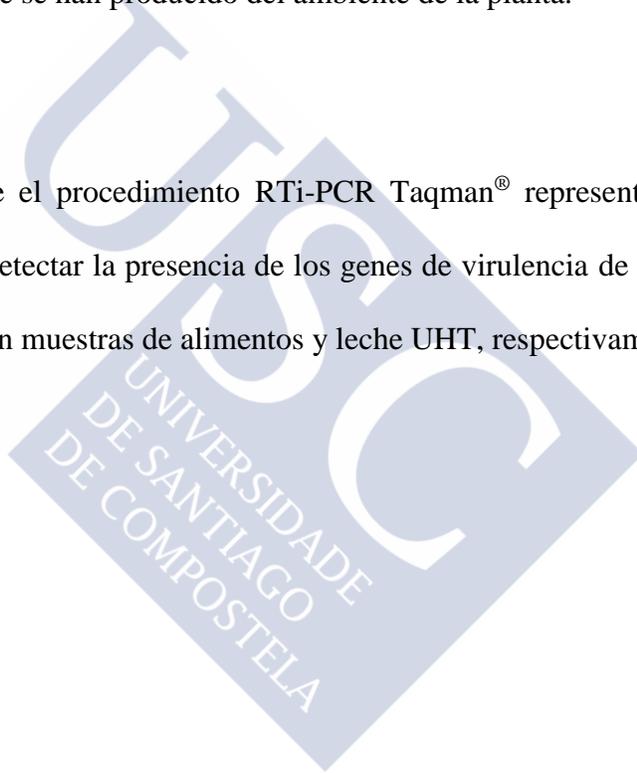
3- En particular, los resultados obtenidos también han demostrado que el gen *ace* fue detectado en *E. faecium*, especialmente en cepas de alimentos fermentados. Por lo tanto, más interés se debe dar a las cepas utilizadas en aplicaciones biotecnológicas para la presencia de determinantes de virulencia y los antibióticos, especialmente en los productos lácteos fermentados para reducir la incidencia de infección nosocomial asociada a enterococos.

4- Se ha desarrollado un método original de RTi-PCR acoplado a sondas TaqMan® que permite la detección y cuantificación de los genes de virulencia; *ace*, *esp* y *gelE* en

muestras de alimentos, lo que puede permitir un control microbiológico estricto de la presencia de estos factores de virulencia en cepas de enterococos.

5- Ha podido establecerse un método basado en RTi-PCR TaqMan<sup>®</sup> que permite la detección y cuantificación de *B. sporothermodurans* en leche UHT, lo que puede ayudar en la localización de la presencia de este microorganismo en muestras de leche cruda o incluso en las muestras que se han producido del ambiente de la planta.

6- Se ha demostrado que el procedimiento RTi-PCR Taqman<sup>®</sup> representa un método rápido y específico para detectar la presencia de los genes de virulencia de *Enterococcus* y *B. sporothermodurans* en muestras de alimentos y leche UHT, respectivamente.



## 8 BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Abouelnaga, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J. M., Cepeda, A., Franco, C.M. (2015) Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in Enterococci isolated from fermented and unfermented foods. *Ann Microbiol*, doi: 10.1007/s13213-015-1138-6
- Ahmed, M. N., Conner, D. E., Huffman, D.L. (1995) Heatresistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J. Food Sci.* 60: 606-610.
- Ammor, M., Flórez, S., Mayo, B. (2007) Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24: 559–570.
- Andersson, A., Rönner, U., Granum, P. E. (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* 28: 145– 155.
- Anónimo (1992) Directiva 92/46. Consejo de las Comunidades Europeas de 16 de julio. normas sanitarias para la producción y la comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos basados en la leche. *Off. J. Eur. Un.* L 268: 1-32.
- Aouadhi, C., Mejri, S., Maaroufi, A. (2015) Inhibitory effects of nisin and potassium sorbate alone or in combination on vegetative cells growth and spore germination of *B. sporothermodurans* in milk. *Food Microbiol.* 46: 40-45.

- Barbosa, J., Ferreira, V., Teixeira, P. (2009) Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol.* 76: 527–532.
- Barbosa, J., Gibbs P., Teixeira, P. (2010) Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 21: 651–656.
- Becquet, P. (2003) EU assessment of enterococci as feed additives. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 247–254.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., Manai, M. (2010) Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Cont.* 21: 462-470.
- Borgmann, S., Niklas, D. M., Klare, I., Zabel, L. T., Buchenau, P., Autenrieth, I. B., Heeg, P. (2004) Two episodes of vancomycinresistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*, 207: 386–389.
- Brom, R. V., Santman-Berends, I., Luttikholt, S., Moll, L., Van Engelen, E., Vellema, P. (2015) Bulk tank milk surveillance as a measure to detect *Coxiella burnetii* shedding dairy goat herds in the Netherlands between 2009 and 2014. *J. Dairy Sci.* 98: 3814-3825.
- Burgess, S., Lindsay, D., Flintb S. (2010) Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 144: 215–225.

- Campos, C. A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros-Velázquez, J. (2006) Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res Int.* 39: 356-364.
- Cankar, K., Štebih, D., Dreo, T., Žel, J., Gruden, K. (2006) Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotech.* 6 :1-15.
- Cattani, F., Ferreira, C. A., Oliveira, S. D. (2013) The detection of viable vegetative cells of *Bacillus sporothermodurans* using propidium monoazide with semi-nested PCR. *Food Microbiol.* 34: 196-201.
- Canzek Mahjhenic, A., Rogelj, I., Perko, B. (2005) Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 239-244.
- Caplice, E., Fitzgerald G. F. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131–149.
- Cariolato, D., Andrighetto, C. Lombardi, A. (2008) Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Cont.* 19: 886-892.
- Carlos, A., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M., Tenreiro, R. (2010) Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *J. Appl. Microbiol.* 108: 1563–1575.

- Charles, M. A., Wilhelm H. H. (2004) The genus *Enterococcus* biotechnological and safety issues. En Salminen, S., Von Wright, A. (Eds.) (2004) Handbook of lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Vol. 139). CRC Press.
- Claeys, W. L., Ludikhuyze, L. R., Hendrickx, M. E. (2001) Formation kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine in milk heated under isothermal and non-isothermal conditions. *J. Dairy Res.* 68: 287-301.
- Clewell, D. (1990) Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 9: 90-102.
- Clewell, D. (1993) Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73: 9-12.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard, 3rd Ed. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA.
- Cocconcelli, P. S., Porro, D., Galandini, S., Senini, L. (1995) Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 376-379.
- Cocconcelli, P. S., Cattivelli, D., Gazzola, S. (2003) Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 315-323.
- Comité del Codex sobre la Leche y los Productos Lácteos, conjunto FAO/WHO Comité del Codex programa de normas alimentarias sobre la leche y productos lácteos. El

cuarto reunión Wellington, Nueva Zelanda, 28 de febrero - 3 de marzo de 2000.

Acceso en <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x4888e/x4888e00.htm> (el 8 de abril de 2016).

Dardir, H. A., Aba-Elkhail, N. A. Abdel-All, A. A. (2011) Safety evaluation of enterococcal strains isolated from dairy products and clinical samples using RT-PCR. *World J. Dairy Food. Sci.* 6: 234-240.

De Medici, D., Kuchta, T., Knutsson, R., Angelov, A., Auricchio, B., Barbanera, M., Diaz-Amigo, C., Fiore, A., Kudirkiene, E., Hohl, A., Horvatek, D., Gotcheva, V., Popping, B., Prukner-Radovic, E., Scaramaglia, S., Siekel, P., To, K., Wagner, M. (2015) Rapid methods for quality assurance of foods: the next decade with polymerase chain reaction (PCR)-based food monitoring. *Food Anal. Methods* 8: 255–271.

Domig, K. J., Mayer, H. K., Kneifel, W. (2003) Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 147-164.

Dupre, I., Zanetti, S., Schito, A., Fadda, G., Sechi, L. (2003) Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected from Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* 52: 491-498.

Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P. (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1628–1635.

- Eaton, T. J., Gasson, M. J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
- El-Sharoud, W. M. (2015) Developing a time and effort-effective, highly sensitive TaqMan probe based real-time polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* in milk, yoghurt, and cheese. *Int. Dairy J.* 40: 62-66.
- Espejo, G. A., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., Trujillo. A. J. (2014) Inactivation of *Bacillus* spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. *Food Microbiol.* 44: 204-210. <http://www.fao.org/docrep/006/y8705e/y8705e00.htm>
- Fan, W., Hamilton, T., Webster-Sesay, S., Nikolich, M. P. Lindler L. E. (2007) Multiplex real-time SYBR Green IPCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Mol. Cell. Probes* 21: 245-256.
- FAO/WHO (2003) FAO food and nutrition paper 76, Garantizar la seguridad y calidad alimentaria: Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control alimentario (<http://www.fao.org/docrep/006/y8705e/y8705e00.htm>)
- Fernandez-No, I. C., Guarddon, M., Böhme, K., Cepeda, A., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J. (2011) Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiol.* 28: 605-610.
- Foulquié-Moreno, M, Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., de Vuyst, L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1-24.

- Franz, C., Holzapfel, W., Stiles, M. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1-24.
- Franz, C., Muscholl-Silberhorn, A., Yousif, N., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W. (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385–4389.
- Franz, C., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. Holzapfel, W. H. (2003) Enterococci in food: a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105-122.
- Franz, C., Huch M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. (2011) Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151: 125-140.
- Gilmore, M. (2002) The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Giraffa, G. (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163-171.
- Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215-222.
- Grijspeerdt, K., Mortier, L., Block, J. D., Van Renterghem, R. (2004) Applications of modelling to optimise ultra high temperature milk heat exchangers with respect to fouling. *Food Cont.* 15: 117–130.

- Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C. V., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., Franco B. D. G., DeMartinis, E. C. P. (2008) Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 25: 668-675
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A. Cotter, P. D. (2015) The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front. Microbiol.* 6: 1418. doi: 10.3389/fmicb.2015.01418.
- Guarddon, M., Miranda, J. M., Rodríguez, J. A., Vázquez, B. I., Cepeda, A. and Franco, C. M. (2011) Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. *Int. J. Food Microbiol.* 146: 284-289.
- Guillaume-Gentile, O., Scheldeman, P., Marugg, J., Herman, L., Joosten, H., Heyndrickx, M. (2002) Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4216-4224.
- Hall, A. E., Gorovits E. L., Syribeys, P. J. Domanski, P. J. Ames, B. R. Chang, C. Y. Vernachio, J. H. Patti, J. M. Hutchins, J. T. (2007) Monoclonal antibodies recognizing the *Enterococcus faecalis* collagen-binding MSCRAMM ace: Conditional expression and binding analysis. *Microb. Pathog.* 43: 55-66.
- Hammad, A. M., Hassan, H. A., Shimamoto, T. (2015) Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Cont.* 50: 815-820.

- Hammer, P., Herman, L., Heyndricks, M., Heumer, I.A., De Jong, P., Kiesner, C., Klijn, N., Langeveld, L.P.M., De Jong, P., Kiesner, C. (2000a) *Bacillus sporothermodurans*-a *Bacillus* forming highly heat-resistant spores. *Bull. Int. Dairy Fed.* 357: 3–27.
- Hammer, P., Lembke, F., Suhren, G., Heeschen, W. (1995) Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk - a preliminary report. *Kieler Milchwirtschaft Forschungsberichte*, 47: 303-311.
- Hayes, J. R., English, L. L., Carr, L. E., Wagner, D. D., Joseph, S. W. (2004) Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6005–6011.
- Herman, L., Vaerewijck, M., Moermans, R., Waes, G., (1997) Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1,10, and 100 milliliters of raw milk by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3138-3143.
- Herman, L., Heyndrickx, M., Waes, G. (1998) Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 183-188.
- Herman, L., Heyndrickx, M., Vaerewijck, M., Klijn, N. (2000) *Bacillus sporothermodurans* – a *Bacillus* forming highly heat-resistant spores. 3. Isolation and methods of detection. *Bull Int Dairy Federation*, 357: 9-14.

- Hein, I., Jorgensen, H. J., Loncarevic, S., Wagner, M. (2005) Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. *Res. Microbiol.* 156: 554-563.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. I. (1993) Kinetic PCR analysis-real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Hirt, H., Erlandsen, S. L., Dunny, G. M. (2000) Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 Aggregation Substance *Asc10* in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin. *J. Bacteriol.* 182: 2299-2306.
- Hirt, H., Schlievert, P. M., Dunny, G.M. (2002) In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of *pcf10*. *Infect. Immun.* 70: 716-723.
- Huycke, M. M., Sahm, D. F., Gilmore, M. S. (1998) Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 239-249.
- Huemer, I. A., Klijn, N., Vogelsang, H. W. J., Langeveld, L. P. M. (1998) Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *Int. Dairy J.* 8: 851-855.
- Jaouani, I., Salah, A. M., Ribeiro, S. I. C., Khemiri, M., Mansouri, R., Messadi, L., Silva, C. C. (2015) Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* doi: 10.1111/jam.12916

- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005) Milk, fermentation, and fermented and nonfermented dairy products. In: *Modern food microbiology* (7th edition). New York, Springer Science. P: 155-160.
- Jett, B. D., Atkuri, R. V., Gilmore, S. M. (1998) *Enterococcus faecalis* localization in experimental endophthalmitis: role of plasmid-encoded aggregation substance. *Infect. Immun.* 66: 843-848.
- Johnson, A. P. (1994) The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 33: 1083-1089.
- Klein, D. (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends. Mol. Med.* 8: 257-260.
- Klein, G. (2003) Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 123-131.
- Klibi, N., Jouini, A., Borgo, F., Said, L., Ferrario, C., Dziri, R., Boudabous, A, Torres, C., Slama, K. B. (2015) Antibiotic resistance and virulence of faecal enterococci isolated from food-producing animals in Tunisia. *Ann. Microbiol.* 65: 695-702.
- Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A., Huemer, I., Weerkamp, A. (1997) Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. *Int. Dairy J.* 7: 421-428.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J. (2004) Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22: 822-830.

- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K. (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 9: 299-306.
- Ladero, V., Martinez, N., Martin, M., Fernandez, M., Alvarez, M. (2010) qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Res. Int.* 43: 289-295.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lenz, C. A., Ferst, C. M., Vogel, R. F. (2010) Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. *Food Microbiol.* 27: 317-326.
- Li, X., Nie, J., Hammill, D. L., Smith, D. Xu, H., De Boer, S. H. (2014). A comprehensive comparison of assays for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *J. Appl. Microbiol.* 117: 1132-1143.
- Life Technologies® (2012) PCR en tiempo real manual, Fundamentos de la PCR en tiempo real.
- Lopez-Enríquez, L., Rodríguez-Lazaro, D., Hernández, M. (2007) Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3747-3751.

- Lurchachaiwong, W., Payungporn, S., Srisatidnarakul, U., Mungkundar, C., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y. (2008) Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR. *Let. Appl. Microbiol.* 46: 55-60.
- Macovei, L., Zurek, L. (2006) Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4028-4035.
- Manero, A., Blanch, A. R. (1999) Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4425-4430.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T. (2005) Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1177-1190.
- Martínez-Blanch, J., Sánchez, G., Garay, E. Aznar, R. (2009) Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 15-21.
- Mater, D. D., Langella, P., Corthier, G., Flores, M. J. (2008) A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14: 123-127.
- McCabe, K. M., Zhang, Y. H., Huang, B. L., Wagar, E. A., McCabe, E. R. (1999) Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. *Mol. Genet. Metab.* 66: 205-211.

- McGowan-Spicer, L. L., Fedorka-Cray, P. J., Frye, J. G., Meinersmann, R. J. (2008) Antimicrobial resistance and virulence of *Enterococcus faecalis* isolated from retail food. *J. Food Prot.* 71: 760-769.
- Miranda, J. M., Guarddon, A., Mondragon, A., Vazquez, B. I., Fente, C., Cepeda, A., Franco, C. M. (2007) Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, and turkey meat: a comparative survey. *J. Food Prot.* 70: 1021-1024.
- Miranda, J. M., Jorge, F., Dominguez, L., Cepeda, A., Franco, C.M. (2011). In vitro growth inhibition of food-borne pathogens and food spoilage microorganism by vitamin K5. *Food Bioprocess Technol.* 4, 1060-1065.
- Mohamed, J. A., Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 56: 1581–1588.
- Montanari, G., Borsari, A., Chiavari, C., Ferri, G., Zambonelli, C., Grazia, L. (2004) Morphological and phenotypical characterisation of *Bacillus sporothermodurans*. *J. Appl. Microbiol.* 97: 802-809.
- Morrison, D., Woodford, N., Cookson, B. (1997) Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* 83: 89S–99S.
- Mundy, L. M., Sahm, D. F., Gilmore, M. (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 513– 522.
- Murray, B. E. (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46-65.

- Nallapareddy, S. R., Murray, B. E. (2006) Ligand-signaled unregulation of *Enterococcus faecalis ace* transcription, a mechanism for modulating host-*E. faecalis* interaction. *Infect. Immun.* 74: 4982- 4989.
- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Duh, R. W., Weinstock, G. M., Murray, B. E. (2000a). Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of *ace* during human infections. *Infect. Immun.* 68: 5210-5217.
- Nallapareddy, S. R., Qin, X., Weinstock, G. M., Höök, M., Murray, B. E. (2000b). *Enterococcus faecalis* adhesin, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* 68: 5218-5224.
- Ogier, J., Serror, P. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 291-301.
- Ozmen, S., Celebi, A., Acik, L., Temiz, A. (2010) Virulence gene, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1084-1092.
- Park, S. Y., Kim, K. M., Lee, J. H., Seo, S. J., Lee, I. H. (2007) Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect. Immun.* 75: 1861- 1869.

- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L. (2003) Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 311-314.
- Paul, M., Baranzoni, G. M. Albonetti, S., Brewster, J. D. (2015) Direct, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in fresh raw whole milk by qPCR, *Int. Dairy J.* 41: 46-49.
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, Priest, F. G., (1996) *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 759-764.
- Poeta, P., Costa, D., Sáenz, Y., Klibi, N., Ruiz-Larrea, F., Rodrigues, J., Torres, C. (2005) Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J. Vet. Med. Series B*, 52: 396-402.
- Reichert-Schwillinsky, F., Pin, C., Dzieciol, M., Wagner, M., Hein, I. (2009) Stress- and Growth Rate-Related Differences between Plate Count and Real-Time PCR Data during Growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microb.* 75: 2132–2138.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M., Rodríguez, J. (2005) Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21: 131-137.
- Rodríguez-Lazaro, D., Lombard, B., Smith, H., Rzezutka, A., D' Agostino, M., Helmuth, R., Schroeter, A., Malorny, B., Miko, A., Guerra, B., Davison, J., Kobilinsky, A., Hernandez, M., Bertheau, Y., Cook, N. (2007) Trends in analytical

methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 306-319.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Santos, K. M., Vieira, A. D., Rocha, C. R., Nascimento, J. C., Lopes, A. C., Bruno, L. M., Carvalho, J. D., Franco, B. D., Todorov, S. D. (2014) Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. *Ann. Microbiol.* 64: 1463-1471.

Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., Marre, R. (2000) Aggregation substance increases adherence and internalization, but no translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 68: 6044-6047.

Semedo-Lemsaddek, T., Nobrega, C., Ribeiro, T., Pedroso, N., Sales-Luís, T., Lemsaddek, A., Tenreiro, R., Tavares, L., Vilela, C., Oliveira, M. (2013) Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Vet. Microbiol.* 163: 378–382.

Schlievert, P. M., Gahr, P. J., Assimacopoulos, A. P., Dinges, M. M., Stoehr, J. A., Harmala, J. W., Hirt, H., Dunny, G. M. (1998) Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect. Immun.* 1: 218–223.

- Scheldeman, P., Herman, L., Goris, J., De Vos, P., Heyndrickx, M., (2002) Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. *J. Appl. Microbiol.* 92: 983-991.
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M. (2006) *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *J. Appl. Microbiol.* 101: 542-555.
- Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G., Gilmore, M. S. (1999) Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 67: 193–200.
- Simmonds, P., Mossel, B. L., Intaraphan, T., Deeth, H. C. (2003) Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *J. Food Prot.* 66: 2070-2075.
- Singh, K. V., Qin, X., Weinstock, G. M., Murray, B. E. (1998) Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* 178: 1416-1420.
- Son, R., Nimita, F., Rusul, G., Nasreldin, E., Samuel, L., Nishibuchi, M. (1999) Isolation and molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 118–122.
- Steck, N., Hoffmann, M., Sava, I. G., Kim, S. C., Hahne, H., Tonkonogy, S. L., Mair, K., Krueger, D., Pruteanu, M. y otros autores. (2011) *Enterococcus faecalis*

- metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 141: 959-971.
- Süßmuth, S. D., Muscholl-Silberhorn, A., Wirth, R., Susa, M., Marre, R., Rozdzinski, E. (2002) Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect. Immun.* 68: 4900-4906.
- Svec, D., Tichopadb, A., Novosadovaa, V., Pfaffld, M. W., Kubistaa, M. (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol. Detect. Quantif.* 3: 9-16.
- Templer, S. P., Baumgartner, A. (2007) Enterococci from Appenzeller and Schabziger raw milk cheeses: Antibiotic resistance, virulence factors and persistence of particular strains in the products. *J. Food Prot.* 70: 450–455.
- Trienekens, J., Zuurbier, P. (2008) Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. *Int. J. Prod. Econom.* 113: 107-122.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J. R., Lasa, I. (2001) The enterococcal surface protein, *esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4538-4545.
- Tabit, F. T., Buys, E. (2010) The effects of wet heat treatment on the structural and chemical components of *Bacillus sporothermodurans* spores. *J. Food Microbiol.* 140: 207–213.

- Tabit, F. T., Buys, E. (2011) Incidence and survival of *Bacillus sporothermodurans* during processing of UHT milk. *Br. Food J.* 113: 505-518.
- Valenzuela, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., López, R., Ortega, E., Cañamero, M., Gálvez, A. (2008) Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem. Toxicol.* 46: 2648–2652.
- Valenzuela, A. S., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Veljovic, K., Cañamero, M. M., Topisirovic, M. K., Gálvez, A. (2009) Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Cont.* 20: 381-385.
- Vaerewijck, M. J., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hoste, B., Heyndrickx, M. (2001) Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *J. Appl. Microbiol.* 91: 1074-1084.
- Vigilancia de las resistencias a los antimicrobianos en Europa, el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades, (ECDC), informe de vigilancia 2014.
- West, D. M., Sprigings, K. A., Cassar, C., Wakeley, P. R., Sawyer, J., Davies R. H. (2007) Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan1 PCR assays. *Vet. Microbiol.* 122: 323-331.
- Wirth, R. (1994) The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than plasmid collection mechanisms? *Eur. J. Biochem.* 222: 235-246.

- Xu, Y., Kong, J. (2013) Construction and potential application of controlled autolytic systems for *Lactobacillus casei* in cheese manufacture. *J. Food Prot.* 7: 1187-1193.
- Zanardi, G., Caminiti, A., Donne, G. D., Moroni, P., Santi, A., Galletti, G., Tamba, M., Bolzoni, G., Bertocchi, L. (2014) Comparing real-time PCR and bacteriological cultures for *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* in bulk-tank milk samples. *J. Dairy Sci.* 97: 5592-5598.
- Zhang, Y. C., Ronimus, R. S., Turner, N., Zhang, Y., Morgan, H. W. (2002) Enumeration of thermophilic *Bacillus* species in composts and identification with a Random amplification polymorphic DNA (RAPD) protocol. *Syst. Appl. Microbiol.*, 25: 618-626.

