

Factores de virulencia, resistencia a los antimicrobianos y a metales pesados en *Enterococcus* spp. aislados de alimentos de origen animal

► Azul Sánchez Cabrera^{1a}, Romina Parada^{2a,b}, Emilio Marguet^{3a}, Marisol Vallejo^{4a*}

¹ Alumna de la Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (FCNyCS). Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB).

² Lic. en Ciencias Biológicas.

³ Dr. en Bioquímica.

⁴ Dra. en Biología.

^a Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo investigar la presencia de factores de virulencia, resistencia a antimicrobianos y metales pesados en 97 enterococos aislados de alimentos de origen animal. Se realizaron pruebas fenotípicas y genotípicas para la identificación a nivel de especie de los enterococos recuperados. Se identificaron 67 aislados como *Enterococcus faecium*, 9 como *Enterococcus faecalis*, 3 como *Enterococcus durans*, 2 como *Enterococcus hirae* y 1 como *Enterococcus raffinosus*. En 15 aislados no se logró su confirmación a nivel de especie por métodos fenotípicos ni genotípicos. La producción de exopolisacáridos fue el factor de virulencia más frecuente y se detectó en 46 enterococos, mientras que 19 exhibieron actividad gelatinasa y solo uno presentó beta-hemólisis. El estudio de la concentración inhibitoria mínima (CIM) reveló que 29 aislados resultaron resistentes a vancomicina (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) y 26 de ellos también eran resistentes a teicoplanina (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$). Del total de aislamientos, 21 presentaron resistencia a tetraciclina (≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) y sólo 3 exhibieron resistencia a la ampicilina (≥ 16 $\mu\text{g/mL}$). La prueba en agar reveló que 90 cepas resultaron resistentes al zinc (≥ 12 mM) mientras que todas exhibieron resistencia intermedia al cobre (4-12 mM). Los alimentos de origen animal actúan como reservorios de cepas de *Enterococcus* spp. que expresan factores de virulencia y resistencia a los antimicrobianos y a metales pesados. La implementación de una vigilancia continua en enterococos aislados de alimentos de origen animal es esencial para la salud humana.

Palabras clave: *Enterococcus*; Virulencia; Zinc

Virulence factors, antimicrobials and heavy metals resistance in Enterococcus spp. isolates from food of animal origin

Abstract

This study was aimed at investigating the presence of virulence factors, antimicrobial and heavy metals resistance in 97 isolated enterococci from food of animal origin. Phenotypic and genotypic tests for species-level identification of the recovered isolates were carried out. This resulted in the iden-

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

tification of 67 strains as *Enterococcus faecium*, 9 as *Enterococcus faecalis*, 3 as *Enterococcus durans*, 2 as *Enterococcus hirae* and 1 as *Enterococcus raffinosus*. In 15 isolates, their confirmation at species level was neither achieved by phenotypic nor by genotypic methods. Exopolysaccharides production was the most frequent virulence factor and was detected in 46 isolates, while 19 displayed gelatinase activity, and only one resulted beta-hemolytic. Minimum inhibitory concentration (MIC) study revealed that 29 isolates were vancomycin-resistant ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$), 26 of them were also resistant to teicoplanin ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$). On the other hand, of the total isolates, 21 exhibited resistance to tetracycline ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$) and only 3 enterococci exhibited resistance to ampicillin ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$). Agar plates test revealed that 90 strains were resistant to zinc ($\geq 12 \text{ mM}$) while all exhibited intermediate copper resistance (4-12 mM). Foods of animal origin act as a reservoir of *Enterococcus* spp. strains, expressing virulence factors, and resistance to antimicrobials and heavy metals. Therefore, the implementation of continuous surveillance in enterococci isolated from food of animal origin is essential to human health.

Keywords: *Enterococcus*; Virulence; Zinc

Fatores de virulência, resistência a antimicrobianos e metais pesados em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos de origem animal

Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de fatores de virulência, resistência a antimicrobianos e metais pesados em 97 enterococos isolados de alimentos de origem animal. Foram realizadas provas fenotípicas e genotípicas para a identificação no nível de espécie dos enterococos recuperados. Foram identificados 67 isolados como *Enterococcus faecium*, 9 de *Enterococcus faecalis*, 3 de *Enterococcus durans*, 2 como *Enterococcus hirae* e 1 como *Enterococcus raffinosus*. Em 15 isolados, sua confirmação em nível de espécie não foi alcançada por métodos fenotípicos e/ou genotípicos. A produção de exopolissacarídeos foi o fator de virulência mais frequente e se detectou em 46 enterococos, enquanto que 19 apresentaram atividade de gelatinase e somente um apresentou beta-hemólise. O estudo da concentração inibitória mínima (CIM) revelou que 29 isolados eram resistentes à vancomicina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$), e 26 deles foram também resistentes a teicoplanina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$). Pelo contrário, da quantidade total de isolamentos, somente 21 apresentaram resistência à tetraciclina ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$) e apenas 3 cepas apresentaram resistência à ampicilina ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$). A prova em ágar revelou que 90 cepas eram resistentes ao zinco ($\geq 12 \text{ mM}$), enquanto que todas mostraram resistência intermediária ao cobre (4-12 mM). Os alimentos de origem animal atuam como reservatórios de cepas de *Enterococcus* spp. os quais expressam fatores de virulência, e resistência aos antimicrobianos e a metais pesados. A implementação de uma vigilância contínua em enterococos isolados de alimentos de origem animal é essencial para a saúde dos humanos.

Palavras-chave: *Enterococcus*; Virulência; Zinco

Introducción

El género *Enterococcus* integra la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de los mamíferos, pero puede también colonizar otros hábitats como agua, suelo, plantas y alimentos fermentados de origen vegetal y animal (1) (2). Además, pueden estar presentes en alimentos crudos (leche y carne) a través del contenido intestinal de los propios animales o por contaminación ambiental.

Dentro del género *Enterococcus* se encuentran aislados que pueden tener efectos beneficiosos en los alimentos, ya que presentan actividad antimicrobiana o colaboran en los procesos de fermentación (3). Estos microorganismos no son reconocidos como seguros (GRAS, del inglés *generally recognized as safe*), sin embargo, a algunas especies se las utiliza como probióticos para animales y seres humanos (4).

Existen numerosos estudios que han demostrado un aumento de enterococos resistentes a múltiples antimicrobianos, particularmente a vancomicina y a teicoplanina (2) (5) (6). Otra particularidad de este género es su plasticidad genética, demostrada por su capacidad de adquirir y/o transferir genes de resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia, mediante plásmidos y transposones, entre otros (7). Los determinantes genéticos que han adquirido algunas especies de enterococos, han incrementado la posibilidad de generar infección por medio de la producción de toxinas citolíticas, gelatinasa, sustancia de agregación, proteínas de superficie, etc. (2).

En la cría intensiva de animales, se usan antibióticos en dosis subterapéuticas y/o metales pesados (cobre y zinc), como promotores del crecimiento con el propósito de acelerar su desarrollo y el rendimiento de la

producción (8) (9). Los enterococos y las enterobacterias son microorganismos comensales, habitantes normales de la microbiota intestinal de animales de cría. Se utilizan con frecuencia como indicadores biológicos en programas de vigilancia y seguimiento, porque proporcionan información sobre el posible reservorio de genes de resistencia a los agentes antimicrobianos (10). El género *Enterococcus* resulta de especial interés, debido a su naturaleza ubicua, su capacidad de sobrevivir a condiciones extremas de pH y salinidad y su resistencia a tratamientos térmicos como los empleados en la elaboración de quesos (1).

El uso de antimicrobianos en medicina veterinaria ejerce una presión selectiva, por la cual se generan bacterias multirresistentes. Éstas pueden propagarse a los seres humanos, ya sea por contacto directo con animales como por el consumo de productos alimenticios derivados de ellos (10).

En la Argentina, desde hace unos años se han comenzado a estudiar las resistencias a los antimicrobianos (RAM) y los factores de virulencia en enterococos de origen alimentario (11) (12) (13) (14). Sin embargo, es escasa la información sobre la resistencia a metales pesados (MP) utilizados en la cría de animales y sus alimentos derivados. En consecuencia, el propósito del presente trabajo fue estudiar la presencia de factores de virulencia, RAM y MP en aislados del género *Enterococcus* provenientes de alimentos de origen animal.

Materiales y Métodos

Aislamiento y selección de enterococos

Se procesaron muestras de alimentos lácteos (n=52 quesos vacunos y n=15 quesos ovinos) y cárnicos (n=63). Las muestras de origen cárnico correspondieron a fiambres chacinados: embutidos frescos (n=25), embutidos cocidos (n=16), todos de origen industrial y embutidos secos (n=22) de origen industrial y artesanal. Todas las muestras se recolectaron en establecimientos comerciales de la ciudad de Trelew, provincia del Chubut, Argentina, desde marzo a septiembre de 2019.

Se pesó 1 g de cada muestra en condiciones de esterilidad y éstas se transfirieron a un recipiente plástico estéril con tapa a rosca de cierre hermético. Luego se ajustaron a un volumen final de 10 mL utilizando como diluyente agua peptonada estéril (1,5% p/v). Se agregó Tween 80 (1,0%) para favorecer la disolución de la materia grasa presente y se homogeneizaron mediante vórtex. Cada muestra enriquecida en agua peptonada se conservó durante 12 h (35 °C) y una alícuota de 0,1 mL se extendió sobre placas de agar bilis esculina (Merck, Alemania) suplementado con ácido nalidíxico (20 µg/mL) y nistatina (10 µg/mL). Después de 48 h de incubación a 35 °C en aerobiosis, se efectuó la coloración de Gram de las

colonias compatibles con enterococos y se realizaron las pruebas de catalasa y oxidasa y actividad de pirrolidonil aminopeptidasa (Pyr-A-Enterococo®, Britania, Argentina). Posteriormente los aislados se conservaron por duplicado a -30 °C en caldo tripteína de soya (TS) (Britania, Argentina) y glicerol 10% (v/v) hasta su identificación.

Identificación fenotípica

La caracterización fenotípica a nivel de género y especie se realizó en cada aislado presuntivo de *Enterococcus* spp. Las pruebas bioquímicas convencionales realizadas incluyeron la producción de pigmento en agar, la hidrólisis de arginina y el estudio de fermentación de hidratos de carbono, como arabinosa, metil- α -D-glucopiranosido, manitol, melizitosa, rafinosa, ribosa, sacarosa, sorbitol y sorbosa.

Identificación molecular mediante PCR

Luego de la identificación fenotípica, los enterococos se incubaron a 35 °C durante 12 h en caldo TS, se centrifugaron a 12 000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación *Wizard Genomics, Promega* (Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Para la identificación de especie se utilizó el protocolo descrito por Jackson *et al.* (15) basado en la amplificación del gen *sodA* que codifica para la superóxido dismutasa, mientras que para la identificación de género se utilizaron cebadores para el rRNA 16S (*rrs*) descrito por Kariyama *et al.* (16) como un control interno de PCR. Como controles se utilizaron las cepas de referencia *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Enterococcus faecium* ATCC 19434, y las cepas pertenecientes a nuestro cepario: *Enterococcus hirae* Tw463 (MH588158) y *Enterococcus durans* S22 (FJ892743). En cada ensayo se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos excepto el ADN.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Mastecycler®* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La electroforesis de los productos de la amplificación genética se realizó en gel de agarosa al 1,8%, a 70 V durante 1 h en *buffer* TAE (Tris, ácido acético, EDTA, pH 8). Para calcular los tamaños moleculares de los productos de amplificación se utilizó un marcador de 100-1000 pb (*Inbio Highway*). Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de *buffer* TAE y bromuro de etidio de 0,5 µg/mL; posteriormente se lo visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó.

Ensayo de actividad hemolítica y gelatinasa

La producción de hemolisinas de los enterococos se evaluó en agar cerebro-corazón suplementado con 5% (v/v) de sangre humana desfibrinada. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 h, en aerobiosis. La presen-

cia o ausencia de zonas claras alrededor de las colonias se interpretó como beta-hemólisis o gamma-hemólisis respectivamente.

Para evaluar la actividad de gelatinasa se utilizó el ensayo propuesto por Kanemitsu *et al.* (17), mediante placas de agar TS suplementado con 0,8% (m/v) de gelatina. Las placas se incubaron durante 48 h a 35 °C y se revelaron con una solución de ácido tricloroacético al 20% (v/v). La aparición de zonas claras alrededor de las siembras se consideró como resultado positivo.

Producción de exopolisacáridos

La producción de exopolisacáridos (EPS) se evaluó de manera cualitativa en agar infusión cerebro corazón adicionado con sacarosa 50 g/L y 0,8 g/L de rojo Congo. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Se interpretó como resultado positivo la coloración negra de las colonias (18).

Sensibilidad a antimicrobianos

Con todos los enterococos aislados se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ampicilina, teicoplanina, tetraciclina y vancomicina mediante el método de dilución en agar Mueller Hinton (Britania, Argentina), según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para antimicrobianos de uso humano (19). Las placas se incubaron durante 20-24 h a 35 °C y se utilizó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 como microorganismo de control. La CIM se definió como la menor concentración de antibiótico capaz de producir la inhibición completa del microorganismo.

Resistencia al cobre y al zinc

Los ensayos de sensibilidad al cobre y al zinc se llevaron a cabo por el método de dilución en agar propuesto por Aarestrup y Hasman (20). Para tal fin, se utilizó el agar Mueller Hinton, al cual se le adicionaron concentraciones crecientes entre 2-28 mM de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Cicarelli Labo-

ratorios, Argentina) y entre 2-64 mM de sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Cicarelli Laboratorios, Argentina). Las soluciones de cobre y zinc se prepararon en agua destilada, se esterilizaron mediante filtración por membrana (0,22 μm) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Todas las placas se inocularon con 5 μL de cultivos bacterianos ajustados al estándar 0,5 de la escala de McFarland y se incubaron a 35 °C. Los resultados se registraron a las 24 h y se reconfirmaron a las 48, según la recomendación de Hasman *et al.* (8). La CIM se definió como la menor concentración de metal (cobre o zinc) que produjo la inhibición completa del microorganismo.

Resultados

En total se aislaron y conservaron 97 enterococos, 54 de los cuales provenían de muestras de quesos (11 de oveja y 43 de vaca) y 43 de alimentos cárnicos (8 de embutidos cocidos, 15 de embutidos secos y 20 de embutidos frescos). Mediante las pruebas bioquímicas, se identificaron 70 enterococos como *E. faecium*, 9 como *E. faecalis*, 6 como *E. hirae*, 3 como *E. durans* y uno como *E. raffinosus*, mientras que no se logró la identificación a nivel de especie de 8 aislados. Utilizando los cebadores específicos para especie se observó una concordancia del 100% para *E. faecalis*, *E. durans* y *E. raffinosus*, del 95,7% para *E. faecium*, mientras que para *E. hirae* el porcentaje resultó menor (33,3%). Ninguno de los 8 enterococos no identificados por métodos fenotípicos pudo identificarse a través de la PCR. En 7 casos identificados por pruebas bioquímicas no pudo confirmarse la especie por el método molecular (Tabla I). En total, los enterococos no identificados por PCR fueron 15.

La mayor prevalencia de los factores de virulencia estudiados correspondió a la producción de EPS, detectada en 46 aislados, mientras que 19 exhibieron actividad de gelatinasa y sólo 1 resultó beta-hemolítico (Tabla I).

Los perfiles de resistencia a cuatro antimicrobianos de los enterococos aislados se presentan en la

Tabla I. Origen de los enterococos aislados y sus factores de virulencia

Identificación fenotípica	N°	Identificación genotípica	Origen		H	G	E
			Lácteo	Cárnico			
<i>E. faecium</i>	70	67/70	40	30	1/70	13/70	36/70
<i>E. faecalis</i>	9	9/9	3	6	0/9	6/9	3/9
<i>E. hirae</i>	6	2/6	4	2	0/6	0/6	5/6
<i>E. durans</i>	3	3/3	2	1	0/3	0/3	1/3
<i>E. raffinosus</i>	1	1/1	1	0	0/1	0/1	0/1
<i>Enterococcus</i> spp.	8	0/8	4	4	0/8	0/8	1/8

H: beta-hemólisis; G: gelatinasa; E: exopolisacáridos.

Tabla II. Sólo 3 resultaron resistentes a la ampicilina (CIM \geq 16 μ g/mL), 29 resultaron resistentes a vancomicina (CIM \geq 32 μ g/mL), mientras que 26 de estos últimos, además, presentaron resistencia a teicoplanina (CIM \geq 32 μ g/mL). Del total de aislados, 20 exhibieron resistencia a tetraciclina (CIM \geq 16 μ g/mL).

Mediante la técnica de dilución en agar, todas las cepas aisladas presentaron un patrón de resistencia intermedio al cobre (4-12 mM), mientras que 90 resultaron resistentes a zinc (\geq 12 mM). Para la determinación de enterococos resistentes y/o tolerantes a estos metales se tomaron como referencia los puntos de corte propuestos por Hasman *et al.* (8) y Aarestrup y Hasman (20), respectivamente (Tabla III).

Discusión y Conclusiones

En el presente trabajo se caracterizaron fenotípicamente 97 enterococos provenientes de alimentos de origen animal y se confirmó la identificación genotípica de 82 de ellos mediante cebadores específicos para cada especie. Los resultados obtenidos revelaron discrepancias en la identificación de especies entre los métodos fenotípicos y los genotípicos. Varios autores han documentado una baja confiabilidad de las pruebas bioquímicas para reconocer ciertas especies de *Enterococcus*, especialmente aquellas poco frecuentes (21). Actualmente y a pesar de los avances tecnológicos con la utilización de sistemas de identificación microbiana

Tabla II. Resistencia a cuatro antimicrobianos en enterococos aislados de alimentos

Antibiótico	N° de aislamientos y CIM (μ g/mL)				Resistencia
	4	8	16	32	n/N
Ampicilina ^{a*}					
<i>E. faecium</i>		65	2		2/67
<i>E. faecalis</i>		9			0/9
<i>E. durans</i>		3			0/3
<i>E. hirae</i>		2			0/2
<i>E. raffinosus</i>		1			0/1
<i>Enterococcus</i> spp.		14	1		1/15
Teicoplanina ^{b*}					
<i>E. faecium</i>		50	1	16	16/67
<i>E. faecalis</i>		9			0/9
<i>E. durans</i>		2		1	1/3
<i>E. hirae</i>		2			0/2
<i>E. raffinosus</i>			1		0/1
<i>Enterococcus</i> spp.		6		9	9/15
Tetraciclina ^{c*}					
<i>E. faecium</i>	43	11	13		13/67
<i>E. faecalis</i>	6		3		3/9
<i>E. durans</i>	3				0/3
<i>E. hirae</i>	1		1		1/2
<i>E. raffinosus</i>		1			0/1
<i>Enterococcus</i> spp.	9	3	3		3/15
Vancomicina ^{d*}					
<i>E. faecium</i>	47		1	19	19/67
<i>E. faecalis</i>	8	1			0/9
<i>E. durans</i>	2			1	1/3
<i>E. hirae</i>	2				0/2
<i>E. raffinosus</i>			1		0/1
<i>Enterococcus</i> spp.	6			9	9/15

* Puntos de corte según CLSI (19); ^a \leq 8: sensible, \geq 16: resistente; ^b \leq 8: sensible, 16: intermedio, \geq 32: resistente; ^c \leq 4: sensible, 8: intermedio, \geq 16: resistente; ^d \leq 4: sensible, 8-16: intermedio, \geq 32: resistente.

completamente automatizados, persiste la controversia en la identificación a nivel de especie. Esta tecnología está validada con más de un 90% de confiabilidad solamente en las especies más frecuentes, *E. faecalis* y *E. faecium*, recuperadas de muestras de origen clínico en medicina humana (22).

Analizando las especies se observa que la más frecuente fue *E. faecium* y en menor proporción *E. faecalis*, tanto en alimentos cárnicos como en los de origen lácteo (vacuno y ovino). Previamente, otros autores también fueron coincidentes con estos hallazgos, ya que señalaron a *E. faecium* como la más frecuente, seguida por *E. faecalis* (1) (23) (24). En la Argentina, en un estudio realizado por Fontana *et al.* (13) en la ciudad de Tucumán se aislaron *E. faecium* (56%) y luego *E. faecalis* (17%) como especies predominantes en embutidos secos. Marguet *et al.* (14) también informaron la presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* en quesos ovinos artesanales elaborados en el valle inferior del Río Chubut. En el trabajo realizado por Delpech *et al.* (11) la especie predominante fue *E. faecalis*, en alimentos cárnicos y *E. faecium* en alimentos lácteos artesanales de la provincia de Buenos Aires.

Por otra parte, en el presente trabajo, también se recuperaron en menor proporción otras especies como *E. durans*, *E. hirae* y *E. raffinosus*, microorganismos habituales en alimentos fermentados de origen animal (3).

Este género bacteriano, especialmente la especie *E. faecalis*, es utilizado como indicador de contaminación ambiental de origen fecal (25); sin embargo, se ha cuestionado su uso como indicador de higiene en la elaboración de alimentos (26). La resistencia de los en-

terococos a los procesos de pasteurización y posibilidad de crecimiento en condiciones extremas de pH y salinidad, hacen posible que sean contaminantes habituales en alimentos fermentados (1).

La gelatinasa es una metaloproteasa dependiente de zinc (27), capaz de hidrolizar la insulina, la caseína, el colágeno, la gelatina y el fibrinógeno; además suministra nutrientes a la bacteria por degradación del tejido del hospedador. La actividad de gelatinasa es uno de los factores de virulencia estudiados en el género *Enterococcus*, tanto en aislados de origen clínico como en otros provenientes de alimentos (2) (28). Al igual que en el trabajo de Camargo *et al.* (29), en este estudio se determinó su presencia en *E. faecalis* (6/9) y en *E. faecium* (13/70) aislados de quesos vacunos y de las tres clases de embutidos procesados; sin embargo, se diferencia de lo hallado por Eaton y Gasson (28), quienes sólo la detectaron en *E. faecalis* provenientes de alimentos.

La citolisina es una proteína hemolítica que promueve la lisis de los eritrocitos, así como también es bactericida para otras bacterias gram positivas (30). Solo un aislado de *E. faecium* resultó ser beta-hemolítico, en concordancia con trabajos previos (2) (30) (31), donde se observó una mayor frecuencia de este rasgo en cepas de origen clínico, que en aquellas provenientes de alimentos y/o animales.

Los componentes capsulares de polisacáridos juegan un papel importante en el proceso de patogénesis y supervivencia de los *Enterococcus* spp., tanto en el tracto gastrointestinal como en el ambiente, puesto que pueden conferir resistencia a la fagocitosis y de esta manera

Tabla III. Resistencia al cobre y al zinc en enterococos aislados de alimentos

Metal pesado	N° de aislamientos y CIM (mM)										Resistencia n/N	
	2	4	8	12	16	20	24	28	32	64		
Cobre^a												
<i>E. faecium</i>		32	25	10								0/67
<i>E. faecalis</i>		6	3									0/9
<i>E. durans</i>		1	1	1								0/3
<i>E. hirae</i>		2										0/2
<i>E. raffinosus</i>		1										0/1
<i>Enterococcus</i> spp.		9	4	2								0/15
Zinc^b												
<i>E. faecium</i>			3	6	25				15	18		64/67
<i>E. faecalis</i>									3	6		9/9
<i>E. durans</i>		1	1	1								1/3
<i>E. hirae</i>					1					1		2/2
<i>E. raffinosus</i>			1									0/1
<i>Enterococcus</i> spp.			1	5	3				4	2		14/15

^a Puntos de corte según Hasman *et al.* (8); ^a ≤2: sensible, 4-24: intermedio, ≥28: resistente.

^b Punto de corte según Aarestrup y Hasman (20); ^b ≤4: sensible; ≥12: resistente.

ayudar al microorganismo a evadir la respuesta inmune. También podría actuar como un elemento disuasivo para los protozoos y los bacteriófagos (31). La producción de exopolisacáridos se presentó en un alto porcentaje de aislados (47%), por lo que resultó ser un rasgo ampliamente extendido en este grupo bacteriano. Sin embargo, sería prematuro considerar a un microorganismo como patógeno sólo evaluando esta característica fenotípica. En el futuro se debería vincular esta característica con la presencia de proteínas de superficie (esp) y sustancia de agregación (agg), factores que promueven la colonización mediante la formación de biopelículas y juegan un rol en el intercambio de material genético entre las células (2). El estudio de la presencia de hemolisina, gelatinasa y producción de sustancias de adhesión en enterococos que integran la microbiota de los alimentos presenta una relevancia significativa por la posibilidad de su colonización en el tracto gastrointestinal humano y el riesgo de intercambio génico con la microbiota presente en ese sitio.

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia intrínseca de grado variable a un gran número de antibióticos; entre ellos se destacan los beta-lactámicos, aminoglucósidos, glucopéptidos, lincosamidas y trimetoprima/sulfametoxazol (32).

En este estudio, se detectaron mediante dilución en agar 29 enterococos provenientes de quesos vacunos, embutidos y fiambres resistentes a vancomicina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$) (19 *E. faecium*, 1 *E. durans* y 15 aislados sin identificar), de los cuales 26 también resultaron resistentes a teicoplanina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$), provenientes de quesos vacunos, embutidos y fiambres. Estos resultados son coincidentes con los reportados por diferentes autores en enterococos aislados de alimentos de origen animal (11) (24) (33) (34).

En el futuro debería corroborarse si la resistencia a vancomicina observada en estos enterococos es debida a marcadores de resistencia transferibles (VanA, VanB, VanG, VanM) por la posibilidad de su intercambio horizontal hacia otras bacterias a través del mecanismo de conjugación bacteriana (7).

Los resultados obtenidos de resistencia a tetraciclina ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$), demuestran una mayor frecuencia en cepas de origen cárnico (16/43), si se las compara con la de origen lácteo (4/54). La resistencia a tetraciclina en bacterias aisladas de alimentos de origen animal, especialmente porcino, está extendida debido al uso de este antimicrobiano en medicina veterinaria para tratar infecciones y como promotor del crecimiento (7) (31).

Aunque la tetraciclina no se utiliza con frecuencia en clínica humana, resulta importante como factor de selección, debido a que las cepas resistentes a este antimicrobiano se asocian a menudo con resistencias a otros agentes (por ejemplo vancomicina y gentamicina) (6). Esta característica se determinó en seis aislados de *E. faecium*, que además de la citada resistencia exhibieron una CIM de vancomicina $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

Cabe destacar que ninguno de los aislados provenientes de quesos ovinos (11/55) de elaboración artesanal resultaron resistentes a los antimicrobianos evaluados.

Las sales inorgánicas de cobre y zinc son utilizadas con frecuencia en la cría intensiva de cerdos y aves como promotoras del crecimiento y, además, por su actividad antimicrobiana (35). En este estudio se detectó una elevada frecuencia de resistencia al zinc ($\geq 12 \text{ mM}$) en los aislados, tanto de productos lácteos como cárnicos; mientras que la resistencia al cobre resultó intermedia (4-12 mM). En Europa y América del Norte existen numerosos estudios sobre resistencia al cobre/zinc y antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp. provenientes del ambiente, así como de animales de cría y alimentos (20) (36) (37). Como se ha mencionado anteriormente, en la Argentina existen diversos trabajos sobre resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de origen alimentario (11) (12) (13) (14), pero hasta la fecha no se han realizado estudios sobre la resistencia a metales como el cobre y el zinc. La resistencia bacteriana a los MP también es motivo de preocupación, ya que estos genes con frecuencia se encuentran en los mismos elementos móviles que aquellos que confieren resistencia a los antibióticos, aumentando de esta manera la posibilidad de una selección cruzada (5).

Los enterococos son bacterias versátiles, ampliamente distribuidas en el ambiente. La presión selectiva de los antibióticos utilizados en medicina veterinaria y humana no afecta solamente a la viabilidad de la microbiota autóctona, sino que también promueve la transferencia de elementos que codifican resistencia a los antimicrobianos. La posibilidad de transferencia génica horizontal de determinantes de virulencia hacia enterococos autóctonos del tracto gastrointestinal humano realza la importancia de su detección en alimentos. La resistencia a metales pesados podría ser un factor para la coselección de resistencia a antimicrobianos en ausencia de una presión selectiva de antibióticos.

Fuentes de financiación

Este trabajo fue financiado con fondos otorgados por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (Proyecto de Investigación N° 1531).

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. MARISOL VALLEJO
Inmigrantes 58
(9100) TRELEW, CHUBUT, Argentina
Correo electrónico: soltrelew@gmail.com

Referencias bibliográficas

- Lebreton F, Willems RJJ, Gilmore MS. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore M, Clewell D, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p. 1–59.
- Chajęcka-Wierżchowska W, Zadernowska A, Łaniewska-Trokanheim Ł. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT-Food Sci Technol* 2017; 75: 670–6.
- Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 215–22.
- Ferreira Araujo T, de Lucena Fortes Ferreira C. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Braz Arch Biol Technol* 2013; 56: 457–66.
- Marin Garrido A. Antimicrobial resistance in enterococci. *J Infect Dis Ther* 2014; 2: 1000150.
- Hammerum AM. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 619–25.
- Werner G, Coque TM, Franz CMAP, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, *et al.* Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol* 2013; 303: 360–79.
- Hasman H, Kempf I, Chidaine B, Cariolet R, Ersbøll A, Houe H, *et al.* Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. *J Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 5784–9.
- Vahjen W, Pietruszyńska D, Starke I, Zentek J. High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut Pathog* 2015; 7: 23.
- Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, *et al.* Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotics* 2017; 6: 1–38.
- Delpech G, Pourcel G, Schell C, De Luca M, Basualdo J, Bernstein J, *et al.* Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from artisanal food of animal origin in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9: 939–44.
- Sparo M, Urbizu L, Solana MV, Pourcel G, Delpech G, Confalonieri A, *et al.* High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Lett Appl Microbiol* 2011; 54: 119–25.
- Fontana C, Gazzola S, Cocconcelli PS, Vignolo G. Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 411–4.
- Marguet E, Vallejo M, Olivera N. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42: 543–8.
- Jackson C, Fedorka-Cray P, Barrett J. Use of a genus- and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3558–65.
- Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3092–5.
- Kanemitsu K, Nishino T, Kunishim H, Okamura N, Takemur, Yamamoto H, *et al.* Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Methods* 2001; 47: 11–6.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42: 872–4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 28th ed. CLSI supplement M100. Table 2E. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Enterococcus* spp. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Disponible en: URL: https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf
- Aarestrup F, Hasman H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet Microbiol* 2004; 100: 83–9.
- Day A, Sandoe J, Cove J, Phillips-Jones M. Evaluation of biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 392–6.
- Blanco M, Mónaco M, Lopardo H. Evaluación de un sistema automatizado para la identificación de especies de enterococos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2010; 44: 239–42.
- Barbosa J, Ferreira V, Teixeira P. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol* 2009; 26: 527–32.
- Talebi M, Sadeghi J, Rahimi F, Pourshafie M. Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8: 1–5.
- Boehm A, Sassoubre L. Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. En: Gilmore M, Clewell D, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p. 1–21.
- Birollo G, Reinheimer J, Vinderola C. Enterococci vs. non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiol* 2001; 18: 597–604.
- Giridhara Upadhyaya PM, Umapathy BL, Ravikumar KL. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Lab Phys* 2010; 2: 100–4.
- Eaton T, Gasson M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628–35.
- Camargo C, Bruder-Nascimento A, Lee S, Júnior A, Kaneno R, Rall V. Prevalence and phenotypic charac-

- terization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. *Braz J Microbiol* 2014; 45: 111–5.
30. Semedo T, Santos M, Martins P, Silvia Lopes M, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, *et al.* Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2569–76.
 31. Zaheer R, Cook SR, Barbieri R, Goji N, Cameron A, Petkau A, *et al.* Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a one-health continuum. *Sci Rep* 2020; 10: 1–16.
 32. Abriouel H, Knapp CW, Gálvez A, Benomar N. Antibiotic resistance profile of microbes from traditional fermented foods. En: Frías J, Martínez-Villaluenga C, Peñas E, editors. *Fermented foods in health and disease prevention*. Elsevier Inc.; 2017. p. 675–704.
 33. Sánchez Valenzuela AJ, Lerma L, El Bakali N, Gálvez A, Pulido R, Abriouel H. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 10: 1–7.
 34. Jahan M, Krause D, Holley R. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *Int J Food Microbiol* 2013; 163: 89–95.
 35. Yazdankhah S, Rudi K, Bernhoft A. Zinc and copper in animal feed-development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microb Ecol Heal Dis* 2014; 25: 1–7.
 36. De Niederhäusern S, Bondi M, Anacarso I, Iseppi R, Sabia C, Bitonte F, *et al.* Antibiotics and heavy metals resistance and other biological characters in enterococci isolated from surface water of Monte Cotugno Lake (Italy). *J Env Sci Heal [A]* 2013; 48: 939–46.
 37. Silveira E, Freitas A, Antunes P, Barros M, Campos J, Coque T, *et al.* Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *J Antimicrob Chemother* 2014; 64: 899–906.

Recibido: 21 de agosto de 2020

Aceptado: 2 de diciembre de 2020