



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Importancia actual del Género *Enterococcus* spp. en los alimentos y metodologías para su caracterización molecular

Current importance of Genus *Enterococcus* spp. in food and methodologies for their molecular characterization

Autor/es

Raquel Núñez Martínez

Director/es

M^a Pilar Conchello Moreno

Cristina Escolar Miñana

Facultad de Veterinaria

2019-2020

ÍNDICE

1. Resumen	2
1.1 Resumen en español	2
1.2 Abstract.....	2
2. Introducción.....	3
3. Objetivos	6
4. Metodología.....	6
4.1 Diseño.....	6
4.2 Estrategia de búsqueda	6
4.3 Criterios de inclusión y exclusión	7
4.4 Extracción de los datos	8
5. Resultados y discusión	9
5.1 Caracterización del Género <i>Enterococcus</i> spp.....	9
5.1.1 Características del Género <i>Enterococcus</i> spp.....	9
5.1.2 Diversidad genética del género <i>Enterococcus</i> spp.....	10
5.1.3 Hábitat.....	12
5.1.4 Presencia de enterococos en alimentos	14
5.2 Interés higiénico del Género <i>Enterococcus</i> spp. en la cadena alimentaria	18
5.2.1 Indicadores de contaminación fecal.....	18
5.3 Interés tecnológico del Género <i>Enterococcus</i> spp. en la industria alimentaria.....	19
5.3.1 Propiedades tecnológicas	19
5.3.2 Producción de bacteriocinas y acción probiótica.....	20
5.4 Interés sanitario del Género <i>Enterococcus</i> spp.	25
5.4.1 Impacto sobre la salud humana y animal	25
5.4.2 Determinantes de virulencia	26
5.4.3 Resistencia antimicrobiana.....	28
5.4.4 Especies emergentes de enterococos.....	33
5.5 Metodologías para caracterización molecular de <i>Enterococcus</i> spp. en los alimentos..	35
5.5.1 Electroforesis en Gel en Campo Pulsado (PFGE)	35
5.5.2 Técnicas de caracterización alternativas	37
6. Conclusiones.....	41
7. Referencias bibliográficas	42

1. Resumen

1.1 Resumen en español

El género *Enterococcus* spp. incluye a un conjunto de bacterias ácido-lácticas (BAL), capaces de adaptarse, y resistir a diversos ambientes. Aunque su mayor reservorio se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, están presentes en diferentes matrices alimentarias, involucrados en los procesos de fermentación de muchos alimentos, contribuyendo positivamente a sus características organolépticas.

La producción de bacteriocinas con acción antimicrobiana asociada a numerosas cepas de *Enterococcus* se aplica en la conservación de productos alimenticios y actualmente se está valorando su carácter probiótico.

Por otro lado, la incidencia del Género *Enterococcus* en infecciones nosocomiales, y su elevada resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos supone un problema terapéutico que afecta a nivel mundial, lo que hace imprescindible la caracterización genética de *Enterococcus* de origen alimentario y la determinación de su patogenicidad mediante la detección de genes de resistencia y factores de virulencia.

A pesar de que existen diversas técnicas para la caracterización molecular de microorganismos, la más utilizada para el género *Enterococcus* es la PFGE por ser la técnica más discriminatoria y reproducible, que permite determinar las similitudes genéticas entre los aislados aportando una información de gran utilidad para la identificación de reservorios en la cadena alimentaria y su implicación en la salud pública y en la industria de los alimentos.

Dada la controversia que existe sobre los *Enterococcus*, la finalidad de este trabajo es, en definitiva, evaluar el riesgo-beneficio asociado al género *Enterococcus* en alimentos.

1.2 Abstract

The genus *Enterococcus* spp. includes a group of lactic acid bacteria (LAB), able to adapt and withstand different environments. Although its largest reservoir is found in the gastrointestinal tract of humans and animals, they are present in different food matrices, involved in fermentation processes of many foods, contributing positively to their organoleptic characteristics.

The production of bacteriocins with antimicrobial action of numerous *Enterococcus* strains is applied in the preservation of food products and its probiotic character is currently being evaluated.

On the other hand, the incidence of the Genus *Enterococcus* in nosocomial infections, and their high intrinsic and acquired resistance to antibiotics is a therapeutic problem that affects on a global level. This makes the genetic characterization of *Enterococcus* of food origin essential in order to determine the pathogenicity of the strains by detecting resistance genes and virulence factors.

Despite the availability of different techniques for the molecular characterization of microorganisms, the most widely used for the *Enterococcus* genus is PFGE being the most discriminatory and reproducible technic, which allows to determine the genetic similarities between different isolates. Additionally, it provides useful information for the identification of reservoirs in the food chain and their implication in public health and in the food industry.

Due to the controversy that exists about *Enterococcus*, the purpose of this work is, definitely, to evaluate the risk-benefit associated with the *Enterococcus* genus in food.

2. Introducción

El género *Enterococcus* spp. engloba a un conjunto de bacterias ácido-lácticas (BAL), cocos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos que se agrupan en parejas o en cadenas cortas (Abriouel et al., 2008). Comprenden microorganismos patógenos y comensales capaces de adaptarse y resistir a diversos ambientes, lo que les convierte en bacterias ubicuas, estando presentes en suelo, agua y alimentos, aunque su mayor reservorio se encuentra en el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales, ayudando a mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal, y a reducir los niveles de colesterol mediante la excreción de sales biliares desconjugadas (Rehaïem et al., 2016; Hanchi et al., 2018; Russo et al., 2018).

Dada su tolerancia a las sales y a los ácidos, las cepas de *Enterococcus* spp. se adaptan fácilmente a una diversidad de matrices alimentarias como la carne, los vegetales, la leche o el queso, estando involucrados en los procesos de fermentación de muchos alimentos, y contribuyendo positivamente al desarrollo de las características organolépticas de estos productos (Abriouel et al., 2008; Rehaïem et al., 2016; Chajęcka-Wierżchowska et al., 2017; Gökmen et al., 2017; Hanchi et al., 2018; Russo et al., 2018).

Numerosas cepas de *Enterococcus* spp. se emplean en la producción de alimentos, debido a su capacidad para producir diversos tipos de sustancias con acción antimicrobiana como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, en algunos

casos denominadas enterocinas, al ser generadas por los enterococos. La producción de bacteriocinas es aplicable en la conservación de una amplia variedad de productos alimenticios y actualmente está siendo valorado su carácter probiótico y como una alternativa de lucha frente a la resistencia antimicrobiana emergente. A pesar de ello, hasta la fecha, el género *Enterococcus* no ha obtenido el estatus de alimento generalmente reconocido como seguro (sustancia GRAS por sus siglas en inglés Generally Recognised As Safe) por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU, ni tampoco se incluye en la lista de Calificación de Presunta Seguridad (QPS) por sus siglas en inglés (Qualified Presumption of Safety) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para su uso seguro en alimentos, aunque algunos miembros de este género son empleados como probióticos en la producción de aditivos en piensos.

Durante los últimos 30 años, los enterococos han pasado de ser considerados agentes comensales de escasa patogenicidad a convertirse en la segunda o tercera etiología más frecuente de infección nosocomial. Actualmente los microorganismos del género *Enterococcus* se encuentran entre los principales patógenos nosocomiales debido a su expansión y adaptación al medio hospitalario, a lo que se une la dificultad de tratamiento condicionada por su resistencia intrínseca a antibióticos, y a la adquisición de nuevos genes de resistencia antimicrobiana, aunque muy raramente representan un riesgo de infección humana fuera del ámbito sanitario (Rehaiem et al., 2016; Chajeka-Wierzchowska et al., 2017; Hanchi et al., 2018; Russo et al., 2018; Vandera et al., 2020).

La resistencia de los enterococos a diversos agentes antimicrobianos supone un problema de Salud Pública que afecta a todo el mundo, sobre todo a los países en los que el uso de antibióticos no está especialmente regulado (Rehaiem et al., 2016; Gökmen et al., 2017;). En los últimos años, el número de cepas detectadas resistentes a antibióticos ha ido aumentando (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017). La naturaleza de su resistencia viene determinada en función de la especie, pudiendo adquirirla a cefalosporinas, carbapenemes, aminoglucósidos, polimixinas, lincomicinas, clindamicinas, algunas quinolonas, glicopéptidos, macrólidos, tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol y ampicilina (Rehaiem et al., 2016).

La resistencia adquirida de enterococos a múltiples antibióticos se ve favorecida por la acumulación de mutaciones y resistencias adicionales adquiridas a través de genes exógenos (Russo et al., 2018). El genoma de estas bacterias se caracteriza por poseer la capacidad de incorporar a través de elementos genéticos móviles exógenos, genes de

resistencia a multitud de antibióticos, así como de transferir determinantes de resistencia generados por ellos mismos tras la exposición a ciertos antibióticos a otras especies patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Listeria* spp. (Rehaiem et al., 2016; Gökmen et al., 2017). Sin embargo, la detección de genes de resistencia no es un indicador de patogenicidad de las cepas por sí solas, es la combinación de estos genes con la presencia de factores de virulencia lo que hace que puedan resultar peligrosas. La creciente importancia de este microorganismo en las infecciones de pacientes con inmunidad deprimida ha aumentado el interés de los investigadores para caracterizar los factores de riesgo (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017).

Todo ello ha despertado el interés sobre la seguridad de las cepas presentes en alimentos, su repercusión en Salud Pública, la regulación de su uso como probióticos y la necesidad de distinguir entre las cepas potencialmente dañinas y las seguras (Hanchi et al., 2018).

Dado que la virulencia y resistencia antimicrobiana, así como, sus propiedades tecnológicas dependen de cada cepa, resulta imprescindible la caracterización genética de *Enterococcus* de origen alimentario (Abriouel et al., 2008).

Existen múltiples técnicas para la caracterización molecular de los microorganismos, como la tipificación multilocus de secuencias (MLST), las repeticiones en tándem de número variable (MLVA), la electroforesis enzimática multilocus (MEE), la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) o los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Sin embargo, la electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) en su variante CHEF continúa siendo el método más utilizado para la diferenciación molecular (Cardozo-Bernal et al., 2013).

La PFGE es la técnica más discriminatoria y reproducible para la caracterización molecular de microorganismos. Esta técnica se ha empleado en el estudio de brotes de infección, detección de transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, identificación de la fuente de infección y de cepas particularmente virulentas. Mediante el análisis de los perfiles de PFGE se pueden determinar las similitudes genéticas entre los aislados, lo que permite dilucidar si dos aislados aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva, aportando una información de gran utilidad para la identificación de reservorios en la cadena alimentaria y evaluación de su implicación en la salud pública y en la industria alimentaria (Cardozo-Bernal et al., 2013).

3. Objetivos

Debido a la controversia que existe sobre los *Enterococcus*, en este trabajo se plantea la evaluación con base científica, del riesgo-beneficio asociado al Género *Enterococcus* en alimentos mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar y caracterizar *Enterococcus* spp. en alimentos
2. Caracterizar el riesgo asociado a su presencia en los alimentos
3. Evaluar las implicaciones tecnológicas de *Enterococcus* spp. en la industria alimentaria
4. Evaluar la utilidad de la técnica de genotipado PFGE para la investigación epidemiológica y monitorización de *Enterococcus* spp. en la cadena alimentaria

4. Metodología

Para alcanzar los objetivos propuestos se plantea un trabajo bibliográfico basado en la búsqueda y revisión de la información disponible en fuentes procedentes de bases de datos especializadas, de acuerdo con el siguiente esquema metodológico:

4.1 Diseño

Se ha realizado una revisión sistemática de documentos referidos a la identificación y caracterización *Enterococcus* spp. en alimentos, la evaluación del riesgo para la salud, las implicaciones tecnológicas en la industria alimentaria y la técnica de tipado molecular PFGE.

4.2 Estrategia de búsqueda

La búsqueda de información, aunque más intensa en los primeros meses, se ha realizado durante todo el proceso de escritura del trabajo, unos 7 meses, utilizando las siguientes bases de datos de carácter científico:

- Alcorze (<http://eds.b.ebscohost.com/eds/search/basic?vid=3&sid=849c165b-b642-48d3-b894-bef904891768%40pdc-v-sessmgr03>)
- Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>)
- PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Web of Science (WOS) (<https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>)

Todas estas bases de datos permiten llevar a cabo una búsqueda sencilla o avanzada, filtrando la información por palabra, título, tipo de documento y/o año de publicación siendo este último uno de los criterios más importantes tenidos en cuenta a la hora de realizar las búsquedas intentando siempre incorporar la información más actualizada.

Además, para completar la búsqueda de información relevante, se ha utilizado información suministrada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

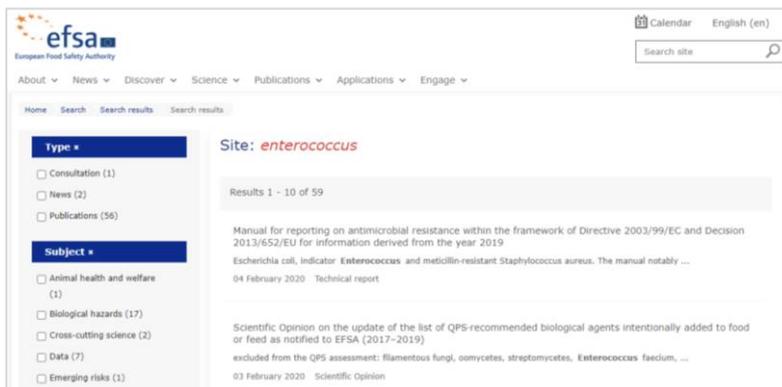


Ilustración 1. Búsqueda en el portal web de la EFSA

La búsqueda de información se ha dirigido mediante el uso de las siguientes palabras clave en español/inglés: “Enterococcus”, “alimentos/food”, “Propiedades tecnológicas/technological properties”, “bacteriocinas/bacteriocins”, “enterocinas/enterocins”, “resistencia antimicrobiana/antimicrobial resistance”, “factores de virulencia/ virulence factors”, “PFGE”, y “técnicas de caracterización/characterization techniques”.

Se han utilizado los conectores “AND”, “OR”, “NOT” para poder encontrar artículos válidos para el objetivo general de trabajo. Asimismo, se ha evitado utilizar demasiado el conector “NOT” para evitar confusiones en el buscador de base de datos, el conector “OR” se ha usado juntando las palabras que significan casi lo mismo, como “alimentos” e “industria alimentaria”, escritas entre paréntesis, y el conector “AND” se ha empleado para dar mayor sensibilidad y especificidad a la búsqueda.

4.3 Criterios de inclusión y exclusión

La selección de la información óptima se ha realizado utilizando criterios de cribado. Los criterios de inclusión se han basado en los siguientes aspectos: estudios con base científica, publicados en los últimos 10 años, libres de pago y publicados en inglés o español, que traten sobre *Enterococcus* spp. en los alimentos, sobre todo aquellos que traten más en profundidad aspectos como el riesgo e interés tecnológico de los mismos, así como la metodología de tipificación molecular.

A su vez, se han utilizado criterios de exclusión para descartar información de la revisión bibliográfica, en concreto se han descartado aquellos que, cumpliendo los criterios de inclusión, aportan información repetitiva, escasa o falta de la misma. En

algunos casos también se ha tenido en cuenta el índice de impacto de la revista a la hora de decidir si incluir o no cierta información.

4.4 Extracción de los datos

El número de artículos científicos, libros, páginas web y reglamentos seleccionados para incluir en la revisión bibliográfica por su relevancia en el tema de estudio se encuentran recogidos en la tabla 1.

Tabla 1. Número de fuentes de información recopiladas y empleadas para la revisión.

FUENTES DE INFORMACIÓN		
Número de publicaciones recopiladas y analizadas	102	
Número total de publicaciones seleccionadas para la revisión	59	
Número de publicaciones utilizadas por objetivos	1) Identificar y caracterizar <i>Enterococcus</i> spp. en alimentos	23
	2) Caracterizar el riesgo asociado a su presencia en los alimentos	23
	3) Evaluar las implicaciones tecnológicas de <i>Enterococcus</i> spp. en la industria alimentaria	10
	4) Analizar la técnica de genotipado PFGE para la investigación epidemiológica y monitorización de <i>Enterococcus</i> spp. en la cadena alimentaria	25

5. Resultados y discusión

5.1 Caracterización del Género *Enterococcus* spp.

5.1.1 Características del Género *Enterococcus* spp.

Los Enterococos son bacterias ácido-lácticas, cocos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, son células esféricas y ovoides con un tamaño de entre 0,6-2,0 μm de ancho y 0,6-2,5 μm de largo que se agrupan en parejas o en cadenas cortas (Abriouel et al., 2008; Larrea-Murrel et al., 2013) que se pueden comportar como patógenas, comensales, o incluso como simbióticas en el tracto gastrointestinal, pero son microorganismos ubicuos en muchos ambientes (Hanchi et al., 2018). Pueden crecer en presencia de NaCl a concentraciones del 5 al 10%, o a una concentración de sales biliares del 40%, y a un pH que oscila entre 4,6 y 9,9. Además, pueden presentar hemólisis de tipo α , β o no ser hemolíticos, tienen la habilidad de hidrolizar esculina, con ciertas excepciones, reaccionar con el antisuero de microorganismos del grupo D de Lancefield, crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, en general son anaerobios aerotolerantes y su temperatura óptima de crecimiento son 37°C, además pueden resistir tratamientos térmicos de hasta 63,5°C durante 30 minutos (Abriouel et al., 2008; Larrea-Murrel et al., 2013; Chajeka-Wierzchowska et al., 2017; Gökmen et al., 2017).

Las cepas de *Enterococcus* spp. se adaptan con facilidad a diferentes alimentos, dada su tolerancia a las sales y a los ácidos, estando involucradas en actividades de fermentación, contribuyendo a desarrollar y conservar las características organolépticas de estos productos. Además, numerosas cepas de *Enterococcus* spp. son capaces de producir compuestos antimicrobianos, incluyendo a las bacteriocinas. La producción de bacteriocinas ha sido utilizada para la conservación de diversos alimentos, estando consideradas como una característica probiótica, y son una alternativa para luchar contra la resistencia antimicrobiana emergente. Hasta la fecha, el género *Enterococcus* spp. no ha obtenido el reconocimiento de sustancia Generalmente Reconocida como Segura, (GRAS), pero en algunos casos son utilizados como aditivos alimentarios para prevenir la diarrea o mejorar el crecimiento en animales (Hanchi et al., 2018). Además, ciertos enterococos presentan resistencias adquiridas a los antibióticos e incluso multi-resistencias por parte de una misma cepa, lo que supone un riesgo para la Salud Pública (Marin et al., 2014).

5.1.2 Diversidad genética del género *Enterococcus* spp.

El género *Enterococcus* inicialmente perteneció al género *Streptococcus* grupo D de Lancefield, pero en 1970 fue oficialmente clasificado como un género independiente (Larrea-Murrell et al., 2013). Actualmente pertenece a la familia *Enterococcaceae* junto con el género *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* (Lebreton et al., 2014). Los enterococos típicos, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. mundtii*, se pueden distinguir fácilmente de otros cocos Gram-positivos, catalasa-negativos, homofermentativos como estreptococos y lactococos por sus propiedades bioquímicas y fisiológicas características. Sin embargo, hay una serie de especies de enterococos que no poseen estas mismas propiedades que caracterizan a los enterococos típicos como *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, y *E. sulfureus* que no reaccionan con el antisuero del grupo D; *E. dispar*, *E. sulfureus* y *E. malodoratus* que no crecen a 45°C o *E. cecorum* y *E. columbae*, que no crecen a 10°C (Franz et al., 2003; Giraffa, 2007). Al mismo tiempo, un tercio de los miembros del género *Leuconostoc* aislados de material clínico se clasifican erróneamente como enterococos debido a que reaccionan con el antisuero del grupo D (Franz et al., 2003).

Inicialmente los enterococos se dividieron en 5 grupos mediante el uso de test fenotípicos rutinarios en base a la formación de ácido en caldo de manitol y sorbosa, así como, a la hidrólisis de arginina. Es importante puntualizar que la clasificación fenotípica debe distinguirse de la relación de secuencia rRNA 16S, ya que, aunque estos test son potencialmente utilizados para diagnóstico, no reflejan la relación evolutiva entre las especies de *Enterococcus* (Lebreton et al., 2014).

Dada la variabilidad en los rasgos bioquímicos y fenotípicos de los enterococos, es esencial la utilización de métodos de base molecular para una identificación fiable y rápida, especialmente cuando se trata de fuentes con una microbiota heterogénea (Giraffa, 2007). Existen mejoras en la metodología que permiten diferenciar muchas especies que varían tan sólo en un rasgo fenotípico, lo que ha supuesto un avance importante (Franz et al., 2003; Giraffa, 2007; Abriouel, 2008; Lebreton et al., 2014).

Lebreton et al (2014) indica que la taxonomía de los enterococos ha cambiado considerablemente con respecto de la conocida a finales del siglo XX. Actualmente, se han descrito numerosas nuevas especies como resultado de la mejora en los métodos de diferenciación.

Desde el punto de vista filogenético las diferentes especies de enterococos se pueden clasificar en al menos 6 grupos en base al análisis del polimorfismo nucleotídico único de las secuencias de rDNA 16S, existiendo algunos patrones con respecto a los hábitats en los que se identificaron las especies.

Siguiendo la Ilustración 2, los miembros que conforman el **Grupo I** son especies que están más alejadas de otros enterococos probablemente porque su especiación se produjo antes que la del resto del género. Este grupo incluye a *E. columbae* y *E. cecorum*

Dentro del **Grupo II** se

encuentran, *E.*

aquimarinus, *E.*

saccharolyticus, *E.*

sulfureus, *E. cameliae*

y *E. italicus*. La

presencia de estas

cepas en el medio

ambiente puede ser la

consecuencia de su

prevalencia en el tracto

gastrointestinal de

animales y humanos,

mientras que su

presencia en productos

alimenticios no refleja

un hábitat natural.

Dentro del **Grupo III**

destaca *E. faecalis* por

ser una especie

ubiquitaria a lo largo de

toda la cadena

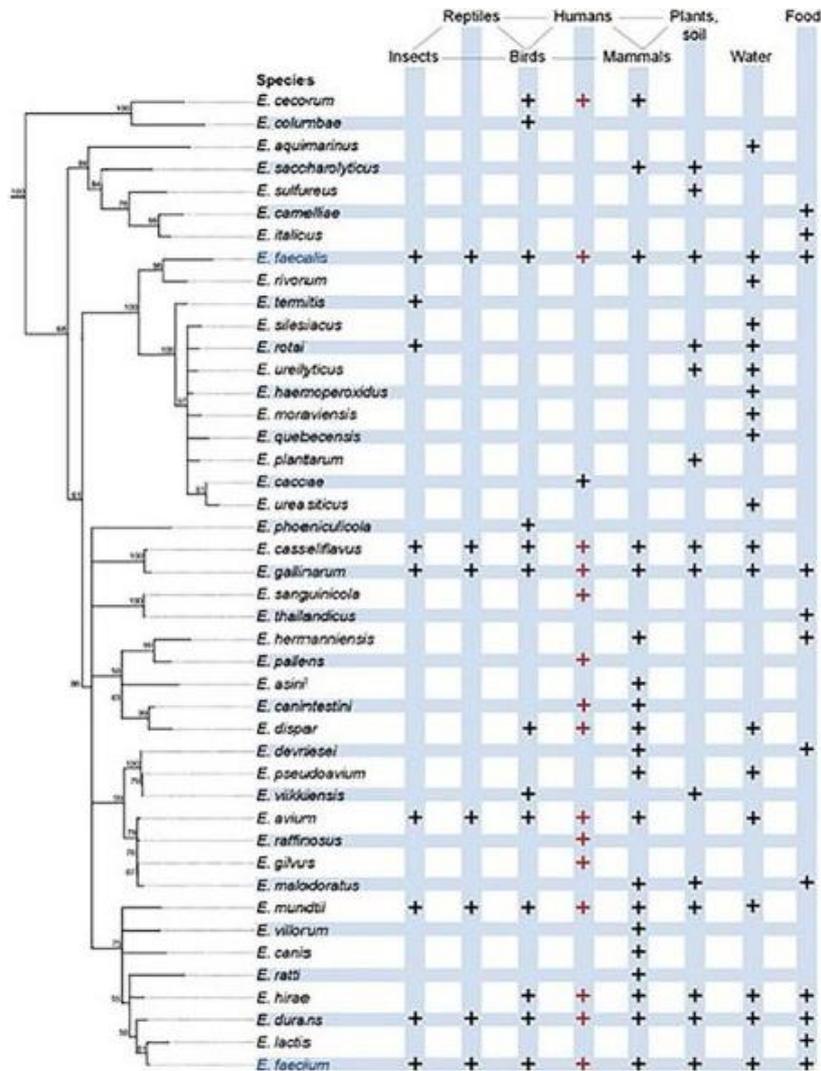


Ilustración 2. Dendrograma de la relación filogenética del género *Enterococcus* y las fuentes de aislamiento de cada una de ellas. Los símbolos rojos indican que la especie ha sido descrita en infecciones humanas mientras que en negro indica colonización (Lebreton et al., 2014)

alimentaria además de por ser un patógeno emergente oportunista hospitalario. Esta especie es muy próxima filogenéticamente a *E. rivorum*. Además, también forman parte de este grupo *E. termitis*, *E. silesiacus*, *E. rotai*, *E. urelyticus*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. quebecensis*, *E. plantarum*, *E. caccae*, y *E. ureasiticus*.

En el caso de los **Grupos IV, V y VI**, las especies muestran tropismo por humanos y animales, especialmente mamíferos. Las que pertenecen al Grupo IV y VI son más ubiquitarias y se pueden encontrar a lo largo de la cadena alimentaria desde los insectos hasta los mamíferos. Su aparición en ambientes como el agua o las plantas puede deberse a contaminación fecal. En cuanto a las especies que pertenecen al Grupo V son más específicas de humanos y mamíferos.

A pesar del gran número de especies de *Enterococcus* que están reconocidas, *E. faecium* y *E. faecalis*, representan las especies más relevantes del género, ya que juegan un importante papel en las enfermedades humanas, en los alimentos fermentados y como agentes probióticos (Franz et al., 2003).

5.1.3 Hábitat

Entre 1960 y 1970, Mundt y otros colaboradores exploraron una variedad de ambientes y encontraron a los enterococos en el tracto gastrointestinal y en las muestras de las heces de un 71,3% de mamíferos, un 85,7% de reptiles, un 31,8% de pájaros y un 53% de insectos. Este patrón generalizado de colonización sugiere que desde al menos el período Devónico temprano hace 412 millones de años (tiempo del último antepasado común de mamíferos, reptiles, aves e insectos), los enterococos han sido miembros de microbiomas intestinales, lo que probablemente los coloca entre los primeros miembros de la microbiota del tracto gastrointestinal (Lebreton et al., 2014).

Diversos autores (Abriouel et al., 2008; Lebreton et al., 2014; Zhong et al., 2017) señalan que los enterococos son ubiquitarios y además de formar parte de la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre y los animales, incluso del aparato digestivo de insectos, se encuentran también en alimentos (productos lácteos y alimentos fermentados), y en otros ambientes, incluyendo plantas, suelo y agua. A continuación, se analizan los nichos identificados de enterococos:

- En la colonización del intestino humano, los enterococos están localizados principalmente en yeyuno, íleon, ciego y recto sigmoidal. También se encuentran en heces humanas, aunque con una prevalencia mucho menor (hasta en 1%) que el resto de la microbiota intestinal. Los enterococos son comunes en la cavidad oral y menos frecuentes en el estómago. Las especies más prevalentes en la colonización del intestino son *E. faecium* y *E. faecalis*, aunque su proporción varía en función de muchos factores, como la región geográfica que tiene influencia sobre la dieta y el ambiente.

- El tracto gastrointestinal de animales representa el mayor reservorio de los enterococos que se encuentran de forma natural colonizando a roedores y a otros animales omnívoros más grandes, mientras que en animales herbívoros se encuentran sólo de forma esporádica. También se han localizado en murciélagos y mamíferos carnívoros como los zorros, osos, mapaches, mofetas y jabalíes. Probablemente las dietas propias de cada animal pueden determinar la capacidad de los enterococos para sobrevivir y prosperar en su tracto gastrointestinal. Existen especies que se encuentran asociadas a huéspedes concretos, por ejemplo, *E. columbae* se asocia con las palomas o *E. asini*, que sólo ha sido encontrado en monos.

Las especies de enterococos más comúnmente encontradas en el intestino de mamíferos son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans*, mientras que otras especies se encuentran ocasionalmente o en grupos particulares de animales en franjas de edad concretas, *E. cecorum* en pollos viejos y *E. durans* en hombre y aves, pero no en otras especies de granja. Por otro lado, también se han encontrado enterococos en una amplia variedad de insectos como moscas, abejas, termitas, escarabajos y gusanos, siendo predominantes las especies *E. faecium* y *E. faecalis*.

- Otros nichos en los cuales los enterococos son aislados de forma rutinaria son suelo, sedimentos, plantas terrestres y acuáticas y agua, que en contraste con el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, son hábitats que tienen temperaturas variables, y además presentan factores ambientales estresantes como la luz solar UV, la salinidad, la escasez de nutrientes o los depredadores. En el caso de las plantas, se desconoce si realmente constituyen un hábitat natural para los enterococos o si su presencia en ellas se debe únicamente a la contaminación fecal y su capacidad de supervivencia en este tipo de ambientes. Una fuente significativa de enterococos es el alga verde *Cladophora*.

Los enterococos también han sido aislados de plancton y macro-invertebrados, así como de prados, es el caso de *E. plantarum*, y de plantas, como *E. rotai* y *E. urealyticus* que también se han aislado de agua potable. Además, los enterococos se han encontrado en otras fuentes de agua como *E. aquimarinus* en agua marina, *E. rivorum* en agua de arroyo, o *E. moraviensis*, *E. silesiacus*, *E. ureasiticus* y *E. quebecensis* en aguas superficiales. Al mismo tiempo, se desconoce realmente si los enterococos crecen en forma de organismos de vida libre en los sedimentos, arenas o suelos, ya que estos microorganismos requieren de nutrientes complejos para crecer. Se han encontrado *E. faecium*, *E. casseliflavus* y *E. durans* en arena de agua dulce y

de playas marinas y *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* y *E. mundtii* en sedimentos marinos.

- En el caso de los alimentos los enterococos están presentes de forma natural como contaminantes de carne cruda y productos lácteos principalmente, teniendo una gran importancia en alimentos fermentados. Este aspecto se analiza con más detalle en el siguiente apartado.

5.1.4 Presencia de enterococos en alimentos

El género *Enterococcus* incluye una amplia variedad de cepas que actúan como cultivos iniciadores en el desarrollo de las características organolépticas de los alimentos fermentados, incluyendo derivados cárnicos, lácteos y vegetales, así como, por su capacidad para producir bacteriocinas, ambas características son consideradas importantes desde el punto de vista tecnológico e higiénico, respectivamente. El uso de los enterococos, con esta finalidad, se está normalizando y se ha aceptado que forman parte de la microbiota natural de ciertos alimentos, sin embargo, su capacidad para habitar en intestino y ambiente; así como, su facilidad de propagación hacen que exista cierto debate en cuanto a si su presencia en alimentos está asociada a infecciones en humanos por transmisión alimentaria (Lebreton et al., 2014; Hanchi et al., 2018).

La resistencia de los enterococos a la pasteurización y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento explican su presencia en alimentos elaborados a partir de materias crudas o tratadas térmicamente. Además, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a bacterias patógenas y de alteración, ha atraído considerablemente la atención para su aplicación en la conservación de alimentos, reduciendo el uso de conservantes químicos y/o disminuyendo la intensidad de tratamientos físicos como el calor. A continuación, se analiza la presencia de los enterococos en los productos alimenticios (Hanchi et al., 2018):

- Productos lácteos

Los enterococos, así como otras bacterias ácido-lácticas actúan como iniciadores de la fermentación natural en la leche cruda, sobreviviendo incluso a las temperaturas alcanzadas en los procesos de refrigeración y pasteurización gracias a su naturaleza psicrófila, su resistencia al calor y a la adaptabilidad que poseen a diferentes condiciones de crecimiento y sustratos. Los enterococos son importantes en la industria de los productos lácteos y se encuentran normalmente presentes como bacterias ácido-lácticas jugando un papel beneficioso en el desarrollo de las características organolépticas de los

quesos, especialmente en los originarios de países Mediterráneos Europeos, elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada, e interviniendo en la maduración de diferentes variedades de queso como Mozzarella, Feta, Cheddar o Pecorino Sardo, probablemente debido a su actividad lipolítica o proteolítica. En diferentes cuajadas de quesos se encontraron enterococos en rangos de 10^4 a 10^6 UFC/g y en quesos madurados de 10^5 a 10^7 UFC/g con *E. faecalis* y *E. faecium* como especies predominantes. Además, la capacidad de los enterococos para fermentar citrato y producir diacetilo y otros compuestos volátiles pueden contribuir a aportar un *flavor* característico.

En quesos elaborados a base de leche cruda de oveja, vaca o cabra se han encontrado, *E. durans* y *E. faecalis* y, en menor medida, otras especies de *Enterococcus* como *E. casseliflavus*. Por el contrario, la presencia de elevados niveles de enterococos en algunos quesos, especialmente quesos frescos o suaves, elaborados a partir de leche pasteurizada, es interpretada como resultado de una mala práctica higiénica durante su elaboración, lo que puede llevar al deterioro y la pérdida de propiedades sensoriales del producto (Giraffa., 2003; Bhardwaj et al., 2008; Hanchi et al., 2018).

Por otro lado, múltiples estudios han demostrado las aplicaciones de las enterocinas en la conservación de estos productos, algunos ejemplos de ello se pueden ver en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de cepas que producen bacteriocinas y sus aplicaciones (Hanchi et al., 2018)

Cepas	Aplicaciones
<i>E. faecalis</i> OSY- RM6	Producen enterocinas termolábiles
<i>E. faecalis</i> L3A21M3	
<i>E. faecalis</i> L3A21M8	
<i>E. faecium</i> RZS C5	Produce bacteriocinas con actividad frente a patógenos de origen alimentario en queso y leche
<i>E. durans</i> E204	Produce una bacteriocina que inhibe el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en queso, al igual que las enterocinas AS-48 y CRL 35 que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición como <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> en diferentes productos lácteos

- **Vegetales fermentados**

En el caso de productos vegetales, todavía no está claro si la fuente de enterococos es endógena o si es el resultado de una contaminación ambiental. En los ensilados están presentes de forma natural, jugando un papel importante en la fermentación, por lo que algunas cepas se utilizan como inóculos. Las especies de *Enterococcus* más asociadas a vegetales son *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, y *E. sulfurosus*, algunos de ellos se han encontrado en materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza, en sorgo y en fermentaciones de soja (Abriouel et al., 2008; Lebreton et al., 2014; Hanchi et al., 2018). En la fermentación de alimentos basados en sustratos amiláceos se ha detectado la presencia de *E. saccharolyticus*, y es común encontrar los enterococos en alimentos vegetales de origen africano como Hussuwa y DawaDawa (Abriouel et al., 2008).

Otro ejemplo donde se ha visto la participación de los enterococos es en la fermentación de olivas verdes, cuya presencia se asocia a la contaminación cruzada durante la manipulación de materias primas y a su adaptación a los niveles iniciales de pH y a las concentraciones de sales de la salmuera que se utilizan en este proceso. Concretamente en un estudio realizado sobre olivas verdes de mesa chipriotas todos los aislados de *Enterococcus* fueron identificados como *E. faecium* (Anagnostopoulos et al., 2018; Hanchi et al., 2018).

Por otro lado, las bacteriocinas de los enterococos se utilizan como agentes bio-protectores en alimentos de origen vegetal como zumos de frutas y alimentos listos para el consumo, en vegetales fermentados y no fermentados. La enterocina AS-48 es utilizada en un amplio rango de productos vegetales siendo efectivo su uso para la inactivación de *Salmonella entérica* en zumos de frutas contaminados, de *L. monocytogenes* y de microorganismos formadores de esporas en vegetales crudos y enlatados. Otros ejemplos que actúan de forma similar son las enterocinas CCM4231 y EJ97 que se utilizan para el control de *Listeria* en leche de soja y de *Bacillus* en puré de calabacín (Hanchi et al., 2018).

- **Productos cárnicos**

Los enterococos forman parte de la microbiota natural de muchos productos cárnicos fermentados, pero también los podemos encontrar en carne cruda, siendo las especies que más predominan *E. faecium* y *E. faecalis* seguidas de *E. hirae* y *E. durans*. En un estudio en el que se investigó la prevalencia de los enterococos sobre un total de 636 muestras de carne cruda de vacuno, pollo y cerdo, 211 resultaron positivas, encontrando *E. faecium*,

E. faecalis, y *E. avium* en todas las muestras y a *E. gallinarum* en muestras de pollo y en salchichas de cerdo (Pesavento et al., 2014). En otro trabajo, se han encontrado *E. faecium* y *E. mundtii* en carne de pollo y productos cárnicos fermentados como las salchichas, contribuyendo al desarrollo de propiedades sensoriales (Hanchi et al., 2018). Otras actividades importantes asociadas a los enterococos en este tipo de alimentos son la reducción de la actividad de metamioglobina, la habilidad de degradar factores anti-nutritivos como la estaquiosa y la rafinosa, y la producción de hidrolasa de sal biliar (Hanchi et al., 2018).

Las bacteriocinas también pueden jugar un papel importante en los productos cárnicos utilizándolas como cultivos protectores en derivados cárnicos listos para el consumo entre otros productos (Callewaert et al., 2000; Hanchi et al., 2018).

Debido a la actividad metabólica de la microbiota cárnica, pueden tener lugar reacciones de descarboxilación de ciertos aminoácidos con la formación de aminas biógenas, cuya presencia en alimentos constituye una potencial preocupación para la salud pública debido a su efecto toxicológico y fisiológico. A concentraciones elevadas, pueden constituir un riesgo para la salud debido a sus propiedades vasoactivas. Entre ellas, la histamina (producida de la histidina) y la tiramina (producida de la tirosina) son compuestos que pueden afectar a la salud de los consumidores más sensibles. Además, estas sustancias afectan a las propiedades organolépticas de la carne y los productos cárnicos. Las especies de *Enterococcus*, junto con otras bacterias ácido-lácticas, constituyen uno de los microorganismos que pueden acumular en los alimentos cantidades elevadas de aminas biógenas; de hecho, son conocidos como los productores de tiramina más eficientes en alimentos fermentados. Deben llevarse a cabo medidas de control para prevenir la formación de aminas biógenas en alimentos o reducir sus niveles una vez que se han formado (Hanchi et al., 2018; Zdolec et al., 2020).

El uso de las presiones hidrostáticas, irradiaciones y envasados en atmósferas protectoras, representan una importante herramienta tecnológica para controlar la producción de aminas biógenas. Se ha demostrado que el uso de cepas bacteriocinogénicas y/o bacteriocinas, puede contribuir a reducir el riesgo de supervivencia y multiplicación de bacterias amino-biógenas durante la maduración y almacenamiento de alimentos fermentados. Además, la producción de aminas biógenas durante la fermentación puede ser controlada mediante el uso de enzimas y bacterias oxidantes de aminas (Hanchi et al., 2018; Zdolec et al., 2020).

- Pescados y mariscos

A pesar de que los trabajos sobre la incidencia de enterococos en pescados y mariscos es escasa, *E. faecium* y *E. mundtii* parecen ser las especies predominantes (Sánchez et al., 2009; Hanchi et al., 2018). Algunos ejemplos de ello son *E. mundtii* LP17 y LP18 aislados de salmonete (*Mullus surmuletus*) y sardinas (*Sardina pilchardus*) respectivamente (Iseppi et al., 2019), *E. faecium* que se ha aislado de almejas (*Tapes decussata*) (Sánchez et al., 2009), jurel plateado (*Pseudocaranx dentex*), mújol (*Mugil cephalus*) y pargo (*Pagrus auratus*), y *E. avium* que sólo se encontró en jurel y mújol (Al bulushi et al., 2009). En otro estudio, se aisló *E. faecium* CN-25 en muestras de huevos de pescado fermentado tradicional tailandes (Sonsa-Ard et al., 2015).

5.2 Interés higiénico del Género *Enterococcus* spp. en la cadena alimentaria

5.2.1 Indicadores de contaminación fecal

Las bacterias indicadoras de contaminación fecal son utilizadas para valorar la calidad de los alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación. Para que un microorganismo se considere buen indicador de contaminación fecal debe cumplir con una serie de requisitos como ser un constituyente habitual de la microbiota intestinal de individuos sanos, estar presente de forma exclusiva en las heces de animales homeotermos, ser capaces de reproducirse fuera del tracto gastrointestinal del ser humano y de los animales, poseer un tiempo de supervivencia y resistencia a los factores ambientales igual o superior al de las bacterias patógenas, y ser fácil de aislar y cuantificar (Larrea-Murrel et al., 2013). Dado que los enterococos cumplen con todos estos requisitos por su preferencia por el hábitat intestinal, su amplia ocurrencia, robustez y facilidad de cultivo, estos microorganismos son utilizados como indicadores de contaminación fecal para la evaluación de los estándares higiénicos en la cadena alimentaria (Werner et al., 2013).

En heces humanas podemos encontrar de forma habitual *E. faecium* y *E. faecalis*, de forma ocasional *E. durans* y *E. avium* (aunque este último también es común en heces de pollo), y con una prevalencia más baja *E. caccae*. Se ha estimado la prevalencia de las siguientes especies de enterococos en heces humanas, *E. faecium* (100%), *E. faecalis* (78%), *E. durans* y *E. gallinarum* (33%), y *E. avium* y *E. hirae* (11%). En agua las especies consideradas como contaminantes fecales son *E. faecalis* y *E. faecium*. En animales de granja, las especies *E. bovis* y *E. equinus* son utilizadas como indicadoras de

contaminación reciente ya que son especies que mueren rápidamente en el medio exterior (Larrea-Murrel et al., 2013; Lebreton et al., 2014).

La contaminación alimentaria puede ocurrir en diferentes puntos de la cadena alimentaria, desde el campo hasta el lugar de venta donde se distribuyen. Dicha contaminación tiene repercusiones tanto económicas como de Salud Pública ya que cada vez con mayor frecuencia se producen brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos cuyo vehículo es un patógeno que está asociado al contacto directo o indirecto con heces humanas o de animales en algún momento de la cadena de producción. La determinación de bacterias indicadoras de contaminación fecal es una práctica estándar para evaluar el riesgo microbiano de exposición a patógenos fecales (Ordaz et al., 2019).

Los enterococos son utilizados como indicadores de contaminación fecal en ambientes, especialmente en agua; sin embargo, su valor como indicador de higiene en los procesos industriales de producción de alimentos está siendo cuestionado debido a su capacidad para crecer por ejemplo en equipos de ordeño o plantas de procesado, y a su presencia natural en leche cruda y suero como cultivo iniciador en la fabricación de una variedad de productos lácteos donde forma parte de la microbiota habitual del queso y otros productos fermentados. Además, dada su naturaleza psicrótrofa, su resistencia al calor y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento, los enterococos pueden incrementarse en número durante la refrigeración y sobrevivir a la pasteurización. Todo esto pone en duda la fiabilidad de los recuentos de enterococos como un reflejo de la contaminación fecal en los procesos industriales alimentarios (Giraffa et al., 2003; Bhardwaj et al., 2008; Lebreton et al., 2014).

5.3 Interés tecnológico del Género *Enterococcus* spp. en la industria alimentaria

5.3.1 Propiedades tecnológicas

Autores como Abriouel et al (2008) y Serio et al (2010) señalan el papel de los enterococos en la elaboración de alimentos fermentados y su contribución al desarrollo de las propiedades organolépticas durante los procesos de maduración, debido a su tolerancia a condiciones ambientales desfavorables, su metabolismo fermentador y a las actividades enzimáticas que poseen.

Dentro de sus características metabólicas que contribuyen al desarrollo de sabores y texturas específicas en los alimentos destacan la presencia de actividad proteolítica y lipolítica, su capacidad para utilizar piruvato y citrato, que contribuye al sabor y aroma

en determinados tipos de queso, o la producción de compuestos volátiles. Por otro lado, las actividades enzimáticas más frecuentes en cepas aisladas de alimentos son la actividad leucina y valina arilamidasa, β -galactosidasa, α - y β -glucosidasa, fosfatasa ácida, esterasa y esterasa-lipasa.

Las enzimas glicolíticas son importantes en los enterococos para el aprovechamiento de los azúcares presentes en los alimentos, la producción de ácidos orgánicos, la degradación de rafinosa o estaquiosa u otros componentes como los glucósidos que pueden resultar tóxicos para la célula. La actividad β -glucosidasa puede disminuir la toxicidad que generan ciertos compuestos fenólicos en alimentos de origen vegetal. Las actividades esterasa y esterasa lipasa están relacionadas con la capacidad de los enterococos para degradar componentes lipídicos en los alimentos. La actividad lipolítica amplifica el desarrollo de aromas y sabores, aportados por los ácidos grasos hidrolizados y por los compuestos resultantes de posteriores transformaciones y reacciones con otros componentes del alimento durante los procesos de maduración.

Una característica bastante común en el género *Enterococcus* es la capacidad de actividad proteolítica, muy importante tecnológicamente en productos lácteos, ya que la hidrólisis de la caseína induce cambios de textura. Además, los péptidos que se liberan pueden aportar sabores característicos al queso ya sean agradables o inapropiados. La mayoría de las cepas también presentan actividad exopeptidasa.

5.3.2 Producción de bacteriocinas y acción probiótica

Los probióticos se definen como cultivos puros o mixtos de microorganismos que cuando son administrados a los animales o al hombre afectan al hospedador de forma beneficiosa; manteniendo o restaurando la microbiota intestinal normal, previniendo o reduciendo los trastornos gastrointestinales, reduciendo la hipersensibilidad a sustancias alérgicas, reduciendo la intolerancia a la lactosa, los niveles de colesterol en suero, la actividad anticarcinogénica, estimulando el sistema inmune y mejorando el valor nutricional de los alimentos (Abriouel et al., 2008; Ferreira et al., 2013; Wang et al., 2020).

Los enterococos se han estudiado como posibles candidatos probióticos. Para poder seleccionar las cepas adecuadas hay que tener en cuenta diversos criterios como son la identificación molecular utilizando las técnicas de tipificación genética, la seguridad para su uso en humanos y animales, la capacidad de supervivencia en el tracto gastrointestinal, la fabricación, distribución y aplicación dirigida. Los requerimientos

funcionales de los probióticos incluyen la tolerancia a los jugos gástricos y a las sales biliares humanas, la adherencia a las superficies epiteliales, su persistencia en el tracto gastrointestinal humano (GIT), la estimulación inmune, la actividad antagonística hacia patógenos intestinales, y la capacidad para estabilizar y modular la microbiota intestinal (Ferreira et al., 2013; Hanchi et al., 2018).

La producción de bacteriocinas es una de las características deseables en la selección de una cepa probiótica y algunos *Enterococcus* son capaces de producirlas, llamándose también enterocinas. Existen diferentes formas para clasificar las bacteriocinas, por un lado, está la clasificación tradicional en la que se incluyen bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas (LABs), sin embargo, no todas pueden ser clasificadas de esta forma. Otro método de clasificación consiste en la agrupación de las enterocinas en cuatro clases de acuerdo con su estructura (Hanchi et al., 2018; Braïek et al., 2019;).

Por otro lado, existen algunos enterococos capaces de producir simultáneamente varios tipos de bacteriocinas denominados productores de multi-bacteriocinas y que resultan de utilidad para ser aplicados en alimentos frenando su deterioro y posibles contaminaciones con organismos patógenos. Algunos ejemplos son la producción de enterocina L50A y L50B por *E. faecium* L50 (Hanchi et al., 2018).

En los últimos años, las bacteriocinas de enterococos purificadas e identificadas han sido añadidas a alimentos en forma de preparaciones concentradas o producidas *in situ* mediante iniciadores bacteriocinogénicos. Estas bacteriocinas han sido consideradas como candidatas para reemplazar a los antibióticos y hacer frente a patógenos multirresistentes. Las bacteriocinas han demostrado efectos sinérgicos o aditivos en combinación con otros agentes antimicrobianos proporcionando otras oportunidades en el control efectivo de patógenos tanto en medicina humana como veterinaria. Las actuales aplicaciones de cepas de *Enterococcus* y sus bacteriocinas como probióticos, en alimentos, en campos veterinarios y médicos se muestran en la Tabla 3 (Hanchi et al., 2018).

Tabla 3. Resumen de las aplicaciones de cepas de enterococos y sus bacteriocinas (Hanchi et al., 2018)

Sistema Alimentario	Productos lácteos	Enterocina RM6, Enterocina AS-48, Enterocina CRL35, <i>E. durans</i> E204, <i>E. faecium</i> RZS C5, <i>E. faecium</i> K77D, <i>E. faecalis</i> L3A21M3, <i>E. faecalis</i> L3A21M8
	Carne y Pescado	Enterocina AS-48, Enterocina LM-2, Enterocinas A y B (<i>E. faecium</i> CTC492), <i>E. faecium</i> ATCC 8459, Dur 152A
	Vegetales fermentados	Enterocina 416K1, Enterocina AS-48
Aplicaciones veterinarias	Lechones	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415, <i>E. faecium</i> NHRD IHARA
	Pollos	Enterocina E-760, Enterocina DD14
	Mascotas	<i>E. faecium</i> SF68 (FortiFlora)
Aplicaciones Médicas	Enfermedades asociadas al TGI	Enterocina CRL35, Enterocina E50-52, Enterocina S760, Enterocina A
	Infecciones de piel	CBT SL-5, Enterocina AS-48
	Anti-MRSA	Bacteriocina E520-52, Bacteriocina B602, Enterocina DD28, Enterocina DD93
	Anti-VRE	<i>E. faecium</i> DSH20, <i>E. faecalis</i> 478
	Anti-inflamatoria	<i>E. durans</i> M4-5, <i>E. durans</i> EP1

Algunas de las bacteriocinas incluidas en esta tabla 3, presentan un amplio espectro de actividad frente a patógenos Gram positivos, inhibiendo *Listeria monocytogenes* como en el caso de la enterocina E-760 y AS-48, actuando frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y previniendo la formación de biofilms como las enterocinas DD28 y DD93. Además, otras como *E. durans* 61A, *E. mundtii* ST15 y ST4SA muestran un amplio espectro de acción incluyendo bacterias Gram negativas. Por otro lado, existen enterocinas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias formadoras de esporas, como son la enterocina DD14 activa frente a *Clostridium*, o la duracina TW-49M potente frente a *Bacillus circulans*. Presenta actividad frente a endosporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y de *Bacillus licheniformis* la enterocina AS-48 cuando es combinada con tratamiento térmico. Algunas también presentan actividad antiviral como la enterocina CRL35 producida por *E. mundtii*. CRL35 frente al virus del herpes simple HSV-1 y HSV-2 (Braïek et al., 2019; Hanchi et al., 2018; Wang et al., 2020).

Dentro de las enfermedades asociadas al tracto gastrointestinal las especies bacterianas más involucradas en infecciones gástricas severas son *H. pylori*, *C. difficile*, *L. monocytogenes* y *Salmonella*. Los espectros de inhibición amplios de las bacteriocinas producidas por los enterococos, las hacen candidatas apropiadas para prevenir o tratar este tipo de enfermedades, solas o en combinación con otros antibióticos. Un ejemplo de ello es la administración de la enterocina CRL35 que muestra actividad frente a *L. monocytogenes*. En el caso de la enterocina S760 y la enterocina A son capaces de reducir significativamente infecciones de *Bacillus anthracis* en ratón y *Salmonella* en codorniz. Tratamientos combinados de duracina 61A con reuterina frente a *Clostridium difficile* proveen un posible uso terapéutico en infecciones gastrointestinales (Hanchi et al., 2018).

Las enterocinas también están involucradas en el tratamiento frente al acné como alternativa al uso de antibióticos, por ejemplo, la loción CBT SL-5 se prepara con bacteriocinas producidas por *E. faecalis* SL-5, consiguiendo reducir significativamente las lesiones inflamatorias causadas por *Propionibacterium acnés* (Hanchi et al., 2018).

Por otro lado, las infecciones nosocomiales involucran a bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos. Los principales organismos multirresistentes incluyen a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enterococos resistentes a vancomicina (VRE) y miembros de *Enterobacteriaceae* que generan betalactamasas de espectro extendido (ESBL). Debido a su actividad frente a importantes cepas clínicas y su sinergismo con otras bacteriocinas y antibióticos, las enterocinas pueden usarse en el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por patógenos resistentes. Por ejemplo, en infecciones causadas por MRSA que es normalmente resistente a oxacilina, cloxacilina y otros antibióticos semi sintéticos relacionados con la penicilina.

Como alternativa a los antibióticos que se utilizan para tratar este tipo de infecciones se encuentran las bacteriocinas E50-52, y la duracina 61A sola o en combinación con la vancomicina entre otras. Frente a VRE muestran una potente actividad dos péptidos producidos por *E. faecium* DSH20 (35 kDa) y *E. faecalis* 478, así como, la duracina 61A. Para evitar enfermedades inflamatorias del intestino existe un novedoso tratamiento profiláctico en el que *E. durans* M4-5 produce butirato, además, este mismo enterococo y algunos otros exhiben anticarcinógenos, hipocolesterolemicos, así como, efectos de regulación inmune. De forma similar, la administración de *E. faecium* M74® se ha visto asociada a una reducción de las concentraciones de colesterol en suero, y la cepa *E.*

durans LAB18s ha sido recomendada como una fuente de suplementación de selenio en la dieta (Hanchi et al., 2018; Braïek et al., 2019).

Aunque los *Enterococcus* todavía no han obtenido la calificación de sustancia GRAS por la FDA de Estados Unidos, en la Unión Europea, hay algunas cepas como *E. faecium* M74 y *E. faecium* SF-68 que están incluidas como suplementos alimenticios en varias preparaciones probióticas, en las que se ha comprobado que son efectivas y seguras como es el caso de Cernivet® y fortiflora® (que contienen *E. faecium* SF68), y Symbioflor® 1 con *E. faecalis*. Los probióticos enterococicos pueden usarse en tratamientos y/o prevenciones de ciertas enfermedades humanas y animales, por ejemplo, aliviando los síntomas del síndrome del intestino irritable, reduciendo la inducción de los antibióticos a la diarrea y previniendo diferentes enfermedades funcionales y crónicas intestinales (Lebreton et al., 2014; Hanchi et al., 2018; Braïek et al., 2019; Wang et al., 2020).

La aplicación de los probióticos en la Unión Europea en nutrición animal necesita de una autorización previa. En la regulación de la alimentación animal, los probióticos están incluidos en el grupo de aditivos alimentarios como estabilizantes de comunidades microbianas del tracto digestivo en animales rumiantes y monogástricos. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) autoriza el uso de ciertas cepas de enterococos como aditivos de ensilaje y suplementos dietéticos, concretamente ha aprobado el uso de las cepas *E. faecium* NCIMB 11181 y *E. faecium* DSM 7134 como aditivos alimentarios para pavos y cerdos. Asimismo, los probióticos *E. faecium* SF68® y *E. faecalis* Symbioflor® 1 han sido utilizados para prevenir o tratar la diarrea en cerdos, pollos, ganado y mascotas. Los probióticos muestran un efecto positivo sobre el crecimiento y la salud de los animales de granja, por ejemplo, en el caso de los cerdos se ha visto como el uso de probióticos de *Enterococcus* en su alimentación, reduce la incidencia de patógenos intestinales (Hanchi et al., 2018; Braïek et al., 2019; Wang et al., 2020).

Por otro lado, multitud de estudios demuestran los efectos beneficiosos de enterococos en acuicultura, donde *E. faecium* muestra un amplio espectro de inhibición hacia patógenos acuáticos, incluyendo *Yersinia ruckeri*, *Vibrio harveyi*, *Streptococcus agalactiae* y *Aeromonas veronii*. También se han realizado estudios para comprobar el efecto que tiene la incorporación de *E. faecium* en la alimentación de peces en la mejora de su crecimiento y estimulación de la respuesta inmune (Hanchi et al., 2018; Braïek et al., 2019).

5.4 Interés sanitario del Género *Enterococcus* spp.

5.4.1 Impacto sobre la salud humana y animal

A pesar de que en un principio los enterococos apenas tenían un mínimo impacto a nivel clínico, a partir de los años 70 y 80 comenzaron a emerger como principales causas de infecciones adquiridas en hospitales y actualmente se encuentran entre los patógenos nosocomiales más comunes en humanos pudiendo causar infecciones y enfermedades como endocarditis, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales y pélvicas, e infecciones del sistema nervioso central entre otras, afectando especialmente a pacientes inmunodeprimidos (Lebreton et al., 2014; Marin et al., 2014; Braïek et al., 2019). Como se ha visto en los apartados anteriores, los factores de virulencia y el incremento de cepas resistentes a antibióticos especialmente de VRE son los causantes de ese aumento de patogenicidad (Braïek et al., 2019).

El incremento de infecciones hospitalarias causadas por enterococos se atribuyó inicialmente al uso de cefalosporinas de amplio espectro, que son capaces de eliminar gran parte de la microbiota residente en el tracto gastrointestinal, sin embargo, los enterococos presentan resistencia intrínseca a este tipo de antibióticos, lo que hace que estos microorganismos predominen en el tracto intestinal de la mayoría de los pacientes hospitalizados. Factores como la presencia de catéteres, inmunosupresión o mucositis por quimioterapia, alteran el equilibrio habitual entre el huésped y su microbiota, facilitando la infección. A principios de los años 90, el 90-95% de los enterococos clínicos aislados en hospitales eran *E. faecalis* y un 5% *E. faecium*. La resistencia emergente a ampicilina y vancomicina por parte de *E. faecium* hizo que esos porcentajes se invirtieran con los años, obteniendo una mayor prevalencia en los hospitales con respecto a *E. faecalis*. Aproximadamente, entre el 40-50% de las infecciones nosocomiales por enterococos se atribuyen a *E. faecium* (EFSA, 2012).

Otros ejemplos que reflejan el efecto que causan los enterococos sobre la salud humana son *E. gilvus* y *E. pallens* aislados de la bilis de pacientes con colecistitis y peritonitis, o resultados de otros estudios en los que se identificó a *E. cecorum* como responsable del 0,2% de los casos de bacteriemia diagnosticados en un centro médico de Taiwán, y a esta misma especie junto con *E. canintestini* en algunos casos de endocarditis (Lebreton et al., 2014).

Por otro lado, se ha visto que en los casos asociados a enterococos resistentes a vancomicina la infección es mucho peor si se compara con infecciones por enterococos

susceptibles a vancomicina, existiendo una correlación entre infecciones con VRE y el incremento de las terapias fallidas (Nilsson et al., 2012).

En animales, el uso extensivo de la avoparcina a partir de 1975 en alimentación animal para acelerar su crecimiento, especialmente en pollos, cerdos, pavos y terneros, confirió resistencia cruzada a la vancomicina que se administraba en humanos durante los mismos años. Por tanto, durante la década de los 90, por ejemplo, *E. faecium* con el genotipo *vanA* se encontró de forma común en la microbiota intestinal de animales de granja en Europa. Como en USA y Canadá no se permitió su uso, hasta 2008 no fueron aislados esos genotipos. Una vez se dieron cuenta de la conexión existente entre la avoparcina y VRE en animales de granja, se comenzó a reducir su uso como medida de precaución para evitar más propagación de VRE, hasta su prohibición en toda la UE a través de la Directiva 97/6/EC, esta medida tuvo como resultado un descenso de la prevalencia de VRE en animales de granja y también como consecuencia, la disminución de la incidencia de VRE en alimentos de origen animal, así como su prevalencia de colonización en humanos, lo que nos lleva a ver este hecho como una zoonosis transmitida por alimentos (Nilsson et al., 2012).

5.4.2 Determinantes de virulencia

Los factores de virulencia son unas moléculas que aumentan la capacidad de causar una enfermedad entre especies de microorganismos. Particularmente, esto ocurre cuando los genes que confieren o expresan resistencia a antibióticos presentan a su vez factores de virulencia localizados en los mismos elementos genéticos móviles (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017). Hasta donde sabemos, el intercambio genético entre enterococos se produce mediante elementos genéticos móviles (MGEs) procarióticos que se clasifican como bacteriófagos, plásmidos o transposones que pueden contribuir en la plasticidad del genoma de los enterococos. Los elementos móviles potenciales o el DNA extraño dentro de un genoma particular pueden representar hasta el 38% del genoma total en el caso de *E. faecium* y más de un 25% en el caso de *E. faecalis*. Distribuidos en ambos, cromosomas y plásmidos, los elementos transponibles constituyen la mayoría de los MGEs en enterococos (Werner et al., 2013).

La patogénesis de la mayoría de las infecciones involucra una secuencia de eventos que incluyen la colonización y la adhesión a las células del huésped, invadiendo tejidos y resistiendo a mecanismos de defensa inespecíficos. En diversos estudios realizados se ha visto que las cepas de enterococos que presentan factores de virulencia

causan infecciones más severas que los que no las poseen. El estudio de las infecciones por enterococos en pacientes con inmunidad deprimida ha aumentado el interés de los investigadores para caracterizar los factores que permiten a las bacterias colonizar de una forma efectiva en los organismos del huésped, atravesando las barreras inmunológicas y provocando cambios patológicos (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017; Wang et al., 2020).

En los últimos años se ha progresado considerablemente en la detección de factores de virulencia en enterococos de origen clínico (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017):

- **Factores de virulencia que promueven la colonización**

Los enterococos presentan capacidad para adherirse a los tejidos de su huésped. Su resistencia a pH bajos y a elevadas concentraciones de sales biliares contribuye a que sean microorganismos habituales del colon. Las adhesinas que presentan hacen posible su unión a receptores de las membranas mucosas o a proteínas de la matriz extracelular, consiguiendo la colonización del epitelio. La colonización se vuelve potencialmente dañina al combinarse con otros factores de virulencia y con la presencia de genes de resistencia a antibióticos. Algunos de los factores de virulencia que favorecen la colonización son; sustancias de agregación (AS), las proteínas de unión a colágeno (Ace), antígenos específicos de endocarditis (Efa A), y la proteína de superficie enterocócica (Esp) (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017).

Actualmente, hay 20 feromonas dependientes de plásmidos encontrados en enterococos, en los cuales, los genes que codifican resistencias a antibióticos se han encontrado junto con los que codifican AS (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017; Ferreira et al., 2013).

- **Factores de virulencia que afectan tejidos**

Una vez producido el proceso de colonización, las cepas patógenas de *Enterococcus* spp. secretan sustancias tóxicas que tienen un efecto destructivo sobre los tejidos del huésped. Entre estas sustancias se incluyen citolisinas, gelatinasas e hialuronidasas (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017).;

Además de todos estos factores, los enterococos tienen un mecanismo de acumulación de plásmidos basado en la producción de genes de feromonas sexuales. Las

feromonas son péptidos que facilitan la transferencia conjugada de plásmidos entre células. Generalmente, una misma cepa secreta varias feromonas diferentes. Cuando las feromonas se unen a los receptores de superficie de la célula donante, la señal transduce e induce el gen de las sustancias de agregación (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017).

En estudios realizados de aislados de enterococos (20 de alimentos crudos, 20 de cocinados y 20 de camarones listos para el consumo), encontraron genes codificantes de feromonas sexuales en 31 muestras: *cpd* (100%), *cob* (94,3%), *ccf* (94,3%). También en aislados de enterococos en carne de pollo y de pavo tuvieron una elevada prevalencia de *cpd* (100% y 92,4% respectivamente) y *ccf* (98% y 99% respectivamente) (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017). Debido a que las feromonas sexuales, facilitan la conjugación, su elevada incidencia en aislados de alimentos debería ser considerada como un riesgo en seguridad alimentaria.

Otro factor alarmante es la habilidad de los enterococos aislados de alimentos de formar biofilms que incrementan la tasa de supervivencia y la propagación de genes de resistencia en diferentes condiciones ambientales. Las cepas que viven en los biofilms son entre 10 y 100 veces más resistentes a los antibióticos que fuera de ellos (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017).

Cabe destacar que, aunque generalmente los estudios se centran en *E. faecalis* y *E. faecium* por ser los que con mayor frecuencia presentan factores de virulencia asociados a los alimentos, existen otras especies que también los presentan y que pueden llegar a ser incluso más virulentas como son cepas de *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. cecorum*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus*, *E. faffinosus* y *E. mundtii*. Todos estos hechos reflejan la importancia de monitorizar la presencia de los factores de virulencia en cepas del género *Enterococcus* aisladas de alimentos. (Chajeka-Wierzchowska et al., 2017).

5.4.3 Resistencia antimicrobiana

La presencia de los enterococos en los alimentos también puede suponer una amenaza debido al impacto negativo que puede causar la dispersión de la resistencia a antibióticos a través de la cadena alimentaria. En alimentación animal se utilizan multitud de agentes antimicrobianos como terapia y profilaxis frente a infecciones bacterianas y para fomentar el crecimiento animal. Este uso excesivo de antibióticos en producción animal está directamente relacionado con el aumento de las resistencias a los antibióticos,

encontrando muchas similitudes entre las resistencias de los enterococos aislados de alimentación animal con las de enterococos aislados de infecciones humanas nosocomiales (Marin et al., 2014).

Enterococcus spp. exhibe una variedad de mecanismos de resistencias intrínsecas y adquiridas frente a las mayores clases de antibióticos de uso clínico y están dotados de mecanismos de intercambio genético eficientes que facilitan la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos (Marin et al., 2014). Las resistencias adquiridas especialmente frente a penicilina/ampicilina, aminoglicósidos y glicopéptidos han ido en aumento, limitando tremendamente su espectro terapéutico.

Existen evidencias de las resistencias a multitud de fármacos destacando las siguientes (Werner et al., 2013; Marin et al., 2014):

- **Resistencia frente a antibióticos β -lactámicos**

En general, las especies del género *Enterococcus* muestran una baja resistencia intrínseca frente a antibióticos β -lactámicos como penicilina, ampicilina, piperacilina e imipenem, los cuales ejercen sobre ellos un efecto bacteriostático (Marin et al., 2014; Torres et al., 2018).

En un estudio se analizó la prevalencia de resistencia antimicrobiana en aislados de *Enterococcus* obtenidos de muestras de carne al por menor, encontrando una baja resistencia a la ampicilina en aislados de *E. faecium* de chuletas de ternera y cerdo (4 y 2,7% respectivamente), pero más elevada en pollo (26%) y pavo (62,6%) (Torres et al., 2018).

- **Resistencia frente a aminoglicósidos**

Diversos estudios demuestran que la resistencia de los enterococos a los aminoglucósidos viene determinada a través de tres mecanismos de resistencia. En general, todos los enterococos presentan una resistencia intrínseca moderada (MIC, 62-500 μ g/ml) debido a la baja permeabilidad celular, que puede solventarse mediante la adición de penicilina, facilitando así la entrada del aminoglucósido a la célula (Marin et al., 2014).

Abouelnaga et al (2015) encontraron resistencias a neomicina en aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* de muestras de leche, queso y carne fresca.

- **Resistencia frente a glicopéptidos**

Desde una perspectiva médica, la resistencia adquirida a glicopéptidos (vancomicina/teicoplanina), es el rasgo clave de resistencia en enterococos (Werner et al., 2013).

Se han encontrado al menos ocho tipos de resistencias adquiridas a glicopéptidos en base a criterios fenotípicos y genotípicos (*Van A*, *Van B*, *Van D*, *Van E*, *Van G*, *Van L*, *Van M* y *Van N*). Frecuentemente, los genes *van* se localizan en plásmidos o transposones, los cuales, facilitan su diseminación mediante transferencia horizontal de genes. (Werner et al., 2013; Marin et al., 2014).

En alimentos de origen animal se ha visto que el VRE más frecuente es *E. faecium* con el gen *Van A*, aunque también se detectaron en este tipo de muestras *E. durans* y *E. hirae*. De forma más inusual, se ha detectado *Van A* en aislados de *E. cecorum* de muestras de pollo en Japón y, en aislados de *E. gallinarum* de pescado en Egipto. VRE con el gen *Van B* se han encontrado en aislados de *E. faecium* de ternera y pollo en España, y en diferentes tipos de alimentos griegos. Además, en España se han aislado *E. faecalis* con el gen *Van C* a partir de muestras de leche de oveja (Torres et al., 2018).

- **Resistencia frente a macrólidos y lincosamidas**

Los antibióticos macrólidos se utilizan en los tratamientos de infecciones en humanos, siendo la eritromicina el antibiótico empleado en primer lugar en pacientes alérgicos a las penicilinas (Marin et al., 2014). Los determinantes de resistencia a eritromicina más comunes que se han detectado en enterococos aislados de alimentos son *ermA*, *ermB* y *msrC* (Werner et al., 2013).

Por otro lado, se ha visto que *E. faecium* presenta resistencia intrínseca a lincosamida aunque pueden presentar genes adquiridos (*lnu*) (Marin et al., 2014).

- **Resistencia frente a tetraciclina**

Esta resistencia es frecuente en aislados clínicos y animales de *Enterococcus* spp. y también se ha descrito en diversos aislados de alimentos de origen animal (Marin et al., 2014). Los determinantes de resistencia predominantes de las tetraciclinas en aislados de enterococos en alimentos son los genes *tetL*, *tetM* y *tetO* (Werner et al., 2013).

- **Resistencia frente a rifampicina**

A pesar de que no es común el uso de rifampicina en las infecciones causadas por enterococos, frecuentemente presentan resistencia frente a este antibiótico debido a la exposición de la microbiota comensal a este antimicrobiano durante tratamientos de otras infecciones bacterianas (Marin et al., 2014).

- **Resistencia frente a oxazolidinonas**

El antibiótico representativo dentro de este grupo es el linezolid, el cual muestra una elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas (MIC, 4 µg/ml) (Marin et al., 2014). Principalmente el gen de resistencia *optrA*, se ha detectado en enterococcus aislados de alimentos de origen animal en varios países europeos sudamericanos y asiáticos (Torres et al., 2018).

- **Resistencia frente a quinolonas**

Las quinolonas muestran una elevada actividad frente a los enterococos. El uso de fluoroquinolonas en aplicaciones clínicas ha causado un incremento de resistencia en enterococos, y mutaciones que afectan a la subunidad GyrA de la DNA girasa y, más frecuentemente, la subunidad ParC de la topoisomerasa IV (Marin et al., 2014; Torres et al., 2018)

La dispersión de la resistencia de animales a humanos se ha estudiado mostrando una posible ruta alimentaria de transmisión, identificando cepas idénticas de *E. faecalis*, y *E. casseliflavus*, aisladas, de leche, queso y heces fecales humanas. En otros muchos estudios, enterococos genéticamente indistinguibles se han encontrado tanto en animales como en humanos, lo que sugiere que enterococos derivados de animales puedan colonizar el intestino humano. La transferencia de resistencia en *Enterococcus* se propaga principalmente por elementos conjugativos y transferibles a través de la transferencia horizontal de genes desde aislados de origen animal a aislados de origen humano durante su paso al intestino humano (Werner et al., 2013).

Yilmaz et al., (2016) investigaron la susceptibilidad a los antibióticos en alimentos de origen animal, analizando un total de 105 muestras de carne de pollo en las que encontraron *E. faecalis*, *E. hirae* y *E. faecium*, y 100 muestras de carne de ternera en las que únicamente encontraron *E. faecalis*. Todos los aislados de *E. faecalis* procedentes de carne de pollo presentaron resistencia a tetraciclina (89,3%), ciprofloxacino (34,9%), eritromicina (59,2%), trimetoprim/sulfametoxazol (33%) y cloranfenicol (18,4%). Una

cepa de *E. faecium* aislada de carne de pollo presentó resistencia frente a todos los antimicrobianos testados excepto frente a cloranfenicol, mientras que los aislados de *E. hirae* presentaron resistencia frente a penicilina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol. En el caso de las muestras procedentes de carne de ternera las resistencias principales se observaron frente a tetraciclina (53%), ciprofloxacino (12%), trimetoprim/sulfametoxazol (7%), penicilina (3%) y eritromicina (2%).

En otra investigación se analizaron un total de 90 muestras provenientes de alimentos vegetales, suelo y agua de riego de las cuales 65 presentaron enterococos, siendo más prevalente *E. faecium* seguido de *E. hirae*, *E. faecalis* y *E. casseliflavus*.

Del conjunto de estas muestras todos los aislados excepto los de *E. casseliflavus* mostraron resistencia a gentamicina, kanamicina, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol. Además 2 aislados de *E. faecalis* presentaron resistencia a estreptomicina y 4 de *E. casseliflavus* presentaron resistencia intrínseca a vancomicina (Said et al., 2016).

Utilizando la técnica PFGE y la tipificación bioquímica, han podido determinar una ruta de transferencia de enterococos nosocomiales de un hospital a otro, a las aguas residuales urbanas y a las aguas superficiales. Estas aguas se pueden utilizar para el riego, pudiendo contaminar de forma hipotética los productos alimenticios y llegar al intestino humano con la posible incorporación de los genes de resistencia. Existe cierta preocupación, acerca de si la resistencia a antibióticos puede transferirse también, durante la producción de los alimentos, especialmente en alimentos fermentados (Werner et al., 2013). En un estudio realizado sobre muestras de alimentos fermentados y no fermentados (leche, leche fermentada, queso, carne fresca y fermentada), los enterococos que se aislaron de las muestras fueron principalmente *E. faecium* y *E. faecalis*, obteniendo unas tasas de resistencia en alimentos fermentados del 75 % frente a clindamicina y del 72 % frente a neomicina y, en alimentos no fermentados resultaron más frecuentes las resistencias a penicilina y también a clindamicina y neomicina (Abouelnaga et al., 2015). Gazzola et al., (2012) comprobaron que los genes de resistencia a vancomicina y tetraciclina pueden ser transferidos en modelos de fermentación de queso y salchichas.

Estos estudios indican que los alimentos y el agua son fuentes potenciales de transmisión de enterococos resistentes a los antibióticos. La presencia de estas bacterias en los alimentos es inevitable, ya que forman parte de la microbiota natural de plantas y animales de producción. Por otro lado, es poco probable prevenir la ingestión de

enterococos viables en los alimentos. Para prevenir el desarrollo de nuevas cepas resistentes y la transferencia de enterococos con múltiples resistencias a través de la cadena alimentaria es importante el uso prudente de los antibióticos como agentes terapéuticos en animales de ganadería, manteniendo unas condiciones apropiadas para los animales, y la posibilidad de utilizar alternativas a los antibióticos (Werner et al., 2013).

5.4.4 Especies emergentes de enterococos

Como se ha visto en el apartado de diversidad genética de *Enterococcus* spp., este género contempla numerosas especies reconocidas, sin embargo, se han descrito nuevas especies como resultado del interés creciente que existe hacia estos microorganismos y a las mejoras en los métodos de diferenciación que harán que las especies emergentes se incrementen continuamente (Lebreton et al., 2014). En la actualidad existen un total de 59 cepas de enterococos con publicaciones reconocidas incorporadas. Desde el año 2013 al 2018 se han incluido dentro del género *enterococcus* spp. las especies., *E. alcedinis* (Frolková et al., 2013), *E. eurekensis* y *E. lemanii* (Cotta et al., 2013), *E. diestrammenae* (Kim et al., 2013), *E. olivae* (Lucena-Padrós et al., 2014), *E. xiangfangensis* (Li et al., 2014), *E. bulliens* (Kadri et al., 2015), *E. saigonensis* (Harada et al., 2016), *E. crotali* (McLaughlin et al., 2017) y *E. wangshanyuanii* (Jin et al., 2017).

En 2019, se han identificado 6 nuevas especies de enterococos, entre ellas *E. pingfangensis* con la cepa tipo 241-2-2^T, *E. dongliensis* 63-4^T, *E. hulaniensis* 190-7^T, *E. nangangensis* 94-2^T y *E. songbeiensis* 85-4^T, todas ellas fueron aisladas de jugo de encurtido tradicional chino y caracterizadas mediante el análisis de secuencia del gen *pheS* y *rpoA*, la determinación del contenido en G + C de DNA, el análisis de identidad de nucleótidos promedio (ANI), la hibridación *in silico* DNA-DNA (isDDH), el análisis de ácidos grasos metil-ester y el análisis de las características fenotípicas. Las cepas de *E. pinfangensis*, *E. dongliensis* y *E. hulaniensis* presentaron entre un 99,1 y un 99,9 % de similitudes de secuencia del gen rRNA 16S con las cepas de *E. devriesei*, *E. viikkiensis*, *E. pseudoavium*, *E. xiangfangensis*, *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus* y *E. gilvus*, mientras que *E. nangangensis* poseía entre un 95,2-96,1% de similitud con las cepas de *E. phoeniculicola*, *E. rivorum* y *E. faecalis*, y la cepa de *E. songbeiensis* presentó una similitud de un 95,7-97,8% con las cepas *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. dispar*, *E. canintestini*, *E. saigonensis*, *E. diestrammenae*, *E. asini*, *E. cecorum* y *E. columbae*. La relación filogenética entre estas 5 nuevas cepas fue de menos del 91,5% tras el ANI y del 45,3% en base a isDDH (Li et al., 2019).

Por último, para completar el conjunto de las seis nuevas cepas quedaría hablar de *E. florum* Gos 25-1^T, aislado de una flor de algodón que mostró estar estrechamente relacionado con *E. pallens* (98,9%), *E. hermanni* (99,1%), *E. avium* (77,0%) y con *E. raffinosus* (82,0%) de similitud de secuencias. El análisis filogenético de *E. florum* indicó que la cepa Gos25-1T se distinguía claramente de las especies estrechamente relacionadas con ella., representando una nueva especie dentro del género *Enterococcus* (Techo et al., 2019).

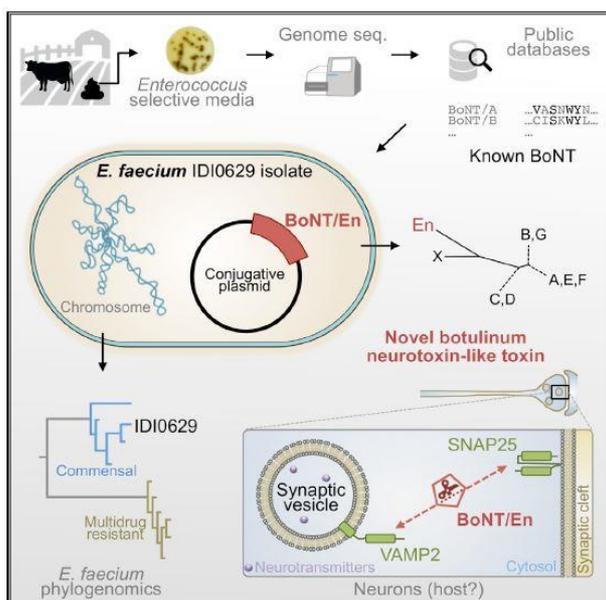


Ilustración 3. Identificación de una toxina similar a la neurotoxina botulínica en una cepa comensal de *E. faecium* (Zhang et al., 2018)

Por otro lado, en el 2018 se ha descubierto una toxina similar a la neurotoxina botulínica (BoNT) denominada BoNT/En asociada a una cepa comensal de *Enterococcus faecium*, (IDI0629) aislada de heces de vaca. Esta toxina mostró un 29-38,7% de similitud con otras BoNT y está más estrechamente relacionada con la neurotoxina botulínica de tipo X (BoNT/X). Las neurotoxinas botulínicas son producidas por varias cepas de *Clostridium* y constituyen un

grupo de toxinas bacterianas potentes y consideradas como posibles agentes bioterroristas. La toxina BoNT/En escinde las proteínas VAMP2 y SNAP-25 que median la exocitosis de vesículas sinápticas en neuronas, en sitios distintos de los sitios de escisión de BoNT conocidos en estas dos proteínas. Al realizar el análisis genómico comparativo se determinó que la cepa de *E. faecium* que porta BoNT/En es de tipo comensal y el gen BoNT/En está ubicado en un plásmido supuestamente conjugado de 206 kb. Los investigadores concluyeron que la toxina botulínica probablemente se transfirió a la bacteria *C. botulinum* en el medio ambiente a la bacteria *E. faecium* en el intestino de la vaca, lo que demuestra que la toxina se puede transferir entre especies muy diferentes.

Este hallazgo demuestra la capacidad de *E. faecium* de adquirir horizontalmente, y posiblemente diseminar, genes BoNT (Zhang et al., 2018).

5.5 Metodologías para caracterización molecular de *Enterococcus* spp. en los alimentos

Las técnicas de tipificación bacteriana son utilizadas para discriminar entre cepas bacterianas, sirviendo como herramienta importante para la investigación de brotes, vigilancia y estudios filogenéticos. Los primeros estudios de tipificación bacteriana se llevaron a cabo por medio del uso de pruebas bioquímicas, pero con la llegada de la biología molecular, los métodos de tipificación basados en DNA ganaron popularidad, ya que debido a la naturaleza estable del DNA estas técnicas son más reproducibles y generalmente más rápidas y menos laboriosas (Forbes et al., 2009; Neoh et al., 2019).

5.5.1 Electroforesis en Gel en Campo Pulsado (PFGE)

La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) ha demostrado ser una técnica con un elevado poder discriminatorio, muy útil en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos. Esta técnica permite detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, identificar la fuente de infección y reconocer y diferenciar cepas particularmente virulentas de otras. Mediante el análisis de los perfiles de PFGE se pueden determinar las similitudes genéticas entre los aislados, lo que permite dilucidar si dos aislados aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva aportando una información de gran utilidad para la identificación de reservorios en la cadena alimentaria y su implicación en la Salud Pública y en la industria alimentaria (Cardozo-Bernal et al., 2013).

La PFGE tiene su origen en 1984, momento en el que Schwartz y Cantor idearon una manera de separar moléculas grandes de DNA de hasta 10 Mb en el que el DNA viaja a través de un gel de agarosa concentrado, bajo la influencia de dos campos eléctricos de manera que, en un gel de forma rectangular un campo es homogéneo y es generado por dos filas de electrodos de puntos ubicados paralelamente y en lados opuestos del gel, y el otro campo no es homogéneo y es generado por una fila de electrodos de puntos como cátodo y un electrodo de punto al lado opuesto como ánodo. En este sistema, el ángulo entre los vectores de fuerza del campo varía en regiones diferentes del gel, por lo tanto, las moléculas de igual tamaño migran con velocidades diferentes, dependiendo de su posición inicial en el gel; esto complica la comparación de las movilidades electroforéticas de los DNA que se encuentran en los carriles vecinos, por lo que es imposible calcular con precisión la talla molecular (Cardozo-Bernal et al., 2013).

A partir de este momento se desarrollaron variantes de la PFGE con variaciones en las características y posibilidades de los equipos, y en los resultados que se pueden obtener, como la Electroforesis en Gel en Campo Alterno Ortogonal (OFAGE), la Electroforesis en Gel en Campo Invertido (FIGE), la Electroforesis en Campo Alterno Transverso (TAFE), la Electroforesis de Campo Eléctrico Homogéneo Restringido al Contorno (CHEF), los Electroodos Programables Autónomamente Controlados (PACE), la Electroforesis en Gel Rotativo (RGE), la Electroforesis en Gel en Campo Continuo (CFGE), la Electroforesis en Campo con Integración Zero (ZIFE) y, la Electroforesis Decusada con Inversión Rectangular/Tangencial Simultánea (Cardozo-Bernal et al., 2013).

En la variante PFGE-CHEF el campo eléctrico es generado por varios electrodos organizados a lo largo de un contorno hexagonal, el campo es pulsado alternamente, generando así un ángulo de reorientación del DNA de aproximadamente 120°. Esta técnica presenta varias ventajas en comparación con las mencionadas de la PFGE original y otras como la FIGE ya que la CHEF tiene mayor poder de resolución con moléculas de hasta 7 Mb, además en este equipo se pueden separar mayor número de muestras de DNA por cada electroforesis (Cardozo-Bernal et al., 2013).

Un sistema típico de PFGE contiene la fuente de alimentación desde la cual se regulan todas las funciones, la cubeta electroforética, y el módulo de refrigeración. También se requiere de un sistema de documentación para ver y capturar los resultados de la PFGE, que se muestran en forma de bandas de electroforesis cuyos patrones determinan la asignación clonal bacteriana. De manera que, para seguir unos criterios de interpretación de las bandas, las cepas bacterianas “estrechamente relacionadas” presentarán 2 o 3 bandas diferentes en el patrón de bandas de la PFGE, las que presenten de 4 a 6 bandas diferentes estarán “posiblemente relacionadas”, y 7 o más bandas diferentes indicarán que son cepas que no están relacionadas. Para facilitar el análisis cuando se procesan muchas muestras en un gel o al comparar muestras de distintos geles, se han desarrollado algoritmos para asignar representación numérica de un patrón PFGE específico. Es necesario que todos los patrones de banda que se comparan se produzcan utilizando el mismo protocolo y estándar de referencia. Los árboles filogenéticos permiten la comparación de la relación genética y la asignación clonal. Se ha establecido un coeficiente de similitud del 80% para la asignación de clones (Neoh et al., 2019).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los EEUU tiene publicado un protocolo PFGE unificado y validado para la tipificación de cepas bacterianas Gram positivas como *Enterococcus* spp, con el objetivo de simplificar las tareas de laboratorio, mejorar la eficiencia de las pruebas, aprovechar los reactivos y fungibles y limitar errores de procedimiento (CDC., 2012; Neoh et al., 2019).

Existen múltiples estudios en los que se ha empleado esta técnica con diferentes propósitos como por ejemplo para comparar los perfiles de enterococos de aislados humanos y de alimentos, dando como resultado cepas fuertemente relacionadas genéticamente y sugiriendo una alta similitud de la composición de la comunidad enterocócica de estos dos ambientes (Templer et al., 2008). En otros trabajos se ha empleado para comparar el nivel de resistencia a ciertos antibióticos según el perfil genético molecular de cepas de origen clínico y alimentario demostrándose la relación clonal entre aislamientos de diferente origen (Pourcel et al., 2017). También ha permitido caracterizar enterococos aislados de diversas fuentes de origen bovino (Pettersson-Wolfe et al., 2009), o para caracterizar cepas de *E. faecalis* provenientes de la cavidad oral, alimentos y muestras clínicas (Anderson et al., 2016), entre otros muchos estudios.

5.5.2 Técnicas de caracterización alternativas

Si es cierto que la PFGE es la técnica estándar de referencia para tipificar la mayoría de los microorganismos por poseer un elevado poder de discriminación y reproducibilidad, también es verdad que es una técnica muy laboriosa y duradera por lo que su uso en el laboratorio es poco práctico. Esto hace necesario buscar otros métodos de tipificación alternativos, que sean más flexibles, rápidos, y menos laboriosos (Cuenca, 2004; Martín et al., 2009).

Por un lado, el análisis de restricción de genes de RNA ribosomal o **ribotipificación** utiliza sondas de ácido nucleico para detectar los genes ribosomales. El rRNA puede ser 23S, 16S y 5S. En la práctica el DNA cromosómico es aislado y se realiza su restricción en pequeños fragmentos que son separados por electroforesis en gel de agarosa. Al utilizar las sondas que contienen las secuencias 23S, 16S y 5S, cada fragmento de DNA bacteriano que las contenga se resaltará, creando un patrón distintivo en forma de huella digital. En comparación con la PFGE esta técnica no es adecuada para la identificación de cepas y subespecies, pero si para su discriminación, aunque sigue teniendo un poder más bajo. La ribotipificación tiene una elevada tasa de reproducibilidad

entre laboratorios y ofrece algún potencial para la identificación epidemiológica de genotipos importantes (Domig et al., 2003).

Tabla 4. Características más relevantes de algunos métodos de tipificación basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR en comparación con la PFGE (Cuenca, 2004).

Método	Facilidad técnica	Interpretación de resultados	Duración de la técnica (días)	Reproducibilidad entre laboratorios	Reproducibilidad intraensayo	Coste por prueba
PFGE	Moderada	Fácil	3	Buena	Buena	Moderado
PCR-RFLP	Fácil	Fácil	1	Buena	Buena	Bajo
Rep-PCR	Fácil	Fácil	1	Buena	Moderada	Bajo
AP-PCR	Fácil	Fácil	1	Moderada	Baja	Bajo
AFLP	Moderada	Moderada	2	Buena	Buena	Moderado
MLST	Difícil	Moderada	2	Buena	Buena	Elevado

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**) son una alternativa, y todas ellas se fundamentan en la amplificación de genes o secuencias de DNA polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación. Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente, con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos. Como se puede ver en la tabla 4, en general, estas técnicas son menos laboriosas, más rápidas, menos costosas, y permiten trabajar con un mayor número de muestras que la PFGE, sin embargo, son menos discriminatorias para diferenciar subtipos entre cepas relacionadas genéticamente (Cuenca, 2004).

La técnica de **PCR-ribotipado** aprovecha la heterogeneidad encontrada en las regiones espaciadoras que existen entre los genes de rRNA 16S, 23S y 5S. También puede mostrar un alto grado de variación dentro de la secuencia y longitud tanto en el género como en el nivel de especie.

En la PCR con iniciadores arbitrarios (**AP-PCR**) se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan

con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja astringencia. La baja reproducibilidad de la AP-PCR se debe a que es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción de ADN, la temperatura de anillamiento y la concentración de iones magnesio entre otras. La AP-PCR se ha utilizado en diversos estudios para tipificar bacterias, entre ellas los enterococos, aunque no de forma frecuente (Domig et al., 2003; Cuenca, 2004; Delboni et al., 2017). La amplificación al azar de DNA polimórfico (**RAPD**) es similar a la AP-PCR y se ha empleado, por ejemplo, en estudios para el rastreo e identificación de *Enterococcus* spp. en salchichas fermentadas tradicionales (Martín et al., 2009).

En el caso de la amplificación específica y al azar o (**SARA**)-PCR fue desarrollada para identificar especies de enterococos y detectar el gen *vanA* en una única reacción (Domig et al., 2003).

La **rep-PCR** es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de DNA repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se muestran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias grampositivas y hongos. Se amplifican regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de DNA (Domig et al., 2003; Cuenca., 2004).

La técnica de **PCR-RFLP** se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de DNA polimórficas. Se estudia una región muy limitada del genoma, por lo que su poder de discriminación y reproducibilidad suelen ser algo inferior a los métodos citados anteriormente. Esta técnica combinada con la PCR-ribotipado, SDS-PAGE y la secuencia de análisis rDNA 16S se aplica para la identificación de enterococos asociados a plantas (Domig et al., 2003; Cuenca., 2004).

La amplificación por PCR de regiones de rRNA espaciador (**ITS-PCR**) pueden producir perfiles de amplificación entre los genes 16S y 23S que son característicos de especies de *Enterococcus* cuando se examinan con alta resolución. Las especies *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. maloduratus*, *E. pseudoavium*, *E. faecalis* y *E. hirae* producen perfiles de amplificación similares. Por otro lado, el análisis de restricción de DNA ribosómico amplificado (**ARDRA**) se basa en la amplificación de fragmentos de genes que abarca el 16S, la región espaciadora entre 16S y 23S y parte del rDNA 23S, seguido mediante el

análisis de restricción y esta técnica se ha utilizado para tipificar entre otras bacterias, *Enterococcus* relacionados con productos lácteos (Domig et al., 2003).

El análisis de polimorfismo de longitud intergénica de tRNA (**tDNA-PCR**) es de utilidad en la diferenciación de especies de enterococos de origen humano y animal. Además, a partir de la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa, **RT-PCR**, se ha desarrollado un método para detectar mRNA específico en enterococos enfocado a la identificación de los genes *vanA* y *vanB* (Domig et al., 2003).

El estudio del **AFLP** se fundamenta en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos. Utiliza la fluorescencia para detectar fragmentos de geles de poliacrilamida evaluando el tamaño de banda exacto requerido para su homología. Esta técnica suele ser menos discriminativa que la PFGE, sin embargo, para algunos microorganismos como *E. faecium* se ha visto que ambos métodos son muy similares (Domig et al., 2003; Cuenca., 2004).

El método de **tipificación multilocus de secuencias (MLST)** se ha convertido en el estándar para estudios epidemiológicos en *Enterococcus* como alternativa a la PFGE. Esta técnica se basa en la amplificación y secuenciación de genes *housekeeping*, genes ribosomales y/o genes relacionados con factores de virulencia. En esquemas de MLST, fragmentos de genes constitutivos son secuenciados y cada secuencia tiene asignado un alelo, resultando en un “código de barras” consistente en siete alelos numéricos, los cuales pueden ser asignados a una secuencia tipo (ST). Los resultados obtenidos de la técnica MLST pueden ser depositados en una base de datos de libre acceso, por lo que existe un elevado número de secuencias disponibles que permiten una visión global de la estructura de la población de este microorganismo cuando se comparan entre sí cada una de las secuencias tipo obtenidas. Mientras que el MLST provee una importante visión de la estructura de población de *E. faecalis* y *E. faecium*, su resolución está inherentemente limitada por el pequeño número de genes constitutivos que son analizados (Domig et al., 2003; Cuenca., 2004; Lebreton et al., 2014).

6. Conclusiones

Primera. Los enterococos contribuyen positivamente al desarrollo de las propiedades organolépticas en la elaboración de alimentos fermentados gracias a las características metabólicas que poseen.

Segunda. La producción de bacteriocinas y la viabilidad en el tracto gastrointestinal de humanos y animales y en alimentos, de algunas cepas de *Enterococcus*, avalan su uso potencial como conservante natural, como probiótico, o como alternativa viable a los antibióticos.

Tercera. El uso de cepas de enterococos con potencial probiótico y antimicrobiano como suplemento alimenticio está siendo limitado por la potencial transmisión de resistencias antimicrobianas.

Cuarta. Existen evidencias científicas que relacionan el uso de antibióticos en la cría de animales con la aparición de cepas de enterococos resistentes en los alimentos, corroborando la implicación de éstos en la diseminación de resistencias con repercusión en Salud Pública.

Quinta. El desarrollo de técnicas moleculares como la PFGE está permitiendo avanzar sobre la seguridad de las cepas de enterococos presentes en alimentos y piensos, y evaluar su implicación en la Salud Pública y en la industria alimentaria.

7. Referencias bibliográficas

1. Abouelnaga, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J., Cepeda, A., Franco, C. (2016). "Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in Enterococci isolated from fermented and unfermented foods". *Annals of Microbiology*, 66(2), pp. 577-585 DOI: 10.1007/s13213-015-1138-6.
2. Al Bulushi, I.M., Poole, S.E., Barlow, R., Deeth, H.C. y Dykes, G.A. (2010). "Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish". *International Journal of Food Microbiology*, 138(1), pp. 32-38 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.021.
3. Anagnostopoulos, D., Bozoudi, D. y Tsaltas, D. (2018). "Enterococci Isolated from Cypriot Green Table Olives as a New Source of Technological and Probiotic Properties". *Fermentation*, 4(2), pp. 48 DOI: 10.3390/fermentation4020048.
4. Anderson, A.C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Wittmer, A. y Al-Ahmad, A. (2015). "Enterococcus faecalis from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation". *Frontiers in microbiology*, 6, pp. 1534 DOI: 10.3389/fmicb.2015.01534/full.
5. Ben Braïek, O. y Smaoui, S. (2019). "Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics". *BioMed Research International*, 2019, pp. 5938210-13 DOI: 10.1155/2019/5938210.
6. Bhardwaj, A., Malik, R. y Chauhan, P. (2008). "Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods". *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), pp. 317-325 DOI: 10.1007/s12088-008-0041-2.
7. Callewaert, R., Hugas, M. y Vuyst, L.D. (2000). "Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages". *International Journal of Food Microbiology*, 57(1), pp. 33-42 DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00228-2.
8. Cardozo-Bernal, Á.M., Poutou-Piñales, R.A., Carrascal-Camacho, A.K., Ramón-Rodríguez, L.F. y Zambrano, D.C. (2013). "Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria*

- monocytogenes". *Universitas Scientiarum*, 18(2), pp. 203-222 DOI: 10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp.
9. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (2012) *Unified-Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Protocol for Gram Positive Bacteria*.
 10. Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. y Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2017). "Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food". *LWT - Food Science and Technology*, 75, pp. 670-676 DOI: 10.1016/j.lwt.2016.10.026.
 11. Cotta, M.A., Whitehead, T.R., Falsen, E., Moore, E. y Lawson, P.A. (2013). "Erratum to: Two novel species *Enterococcus lemanii* sp. nov. and *Enterococcus eurekaensis* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit ". *Springer*.
 12. Domig, K.J., Mayer, H.K. y Kneifel, W. (2003) *Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp.: 2. Phenotypic and genotypic criteria*. Netherlands: Elsevier B.V.
 13. European Food Safety Authority (2012) *Guidance on the safety assessment of Enterococcus faecium in animal nutrition*. Parma, Italy.
 14. Fernández-Cuenca, F. (2004). "Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(6), pp. 355-360 DOI: 10.1016/S0213-005X(04)73108-0.
 15. Ferreira, T. y Luces Fortes, C.L. (2013). "The Genus *Enterococcus* As Probiotic: Safety Concerns ". *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
 16. Forbes, B., Sahm, D.F. y Weissfeld, A.S. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. (12th ed.) Editorial Médica Panamericana S.A.
 17. Francois Lebreton, Rob J. L. Willems y Michael S. Gilmore *Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization*.
 18. Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. y Holzapfel, W.H. (2003). *Enterococci in foods—a conundrum for food safety*. Netherlands: Elsevier B.V.
 19. Frolková, P., Švec, P., Sedláček, I., Mašlaňová, I., Černohlávková, J., Ghosh, A., Zurek, L., Radiměřský, T. y Literák, I. (2013). "*Enterococcus alcedinis* sp. nov.,

- isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*)". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 8), pp. 3069-3074 DOI: 10.1099/ijse.0.049833-0.
20. Gazzola, S., Fontana, C., Bassi, D. y Cocconcelli, P.S. (2012). "Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and -independent methods". *Food Microbiology*, 30(2), pp. 348-354 DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.005.
 21. Giraffa, G. (2003) "Functionality of enterococci in dairy products". Netherlands: Elsevier B.V.
 22. Giraffa, G. (2007). "Enterococci and Dairy Products". En: *Handbook of Food Products Manufacturing*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, pp. 85-97.
 23. Gökmen, M., Önen, A., Ektik, N., Kara, R., Torlak, E. y Metli, M. (2017). "Detection of Prevalence, Antibiotic Resistance and Virulence Factors of *Enterococcus* spp. Isolated From Ready to Eat Foods ". *Kocatepe Veterinary Journal*,.
 24. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. y Hammami, R. (2018). "The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update". *Frontiers in microbiology*, 9, pp. 1791 DOI: 10.3389/fmicb.2018.01791.
 25. Harada, T., Dang, V.C., Nguyen, D.P., Nguyen, T.A.D., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Motooka, D., Nakamura, S., Uchida, K., Jinnai, M., Yonogi, S., Kawahara, R., Kanki, M., Kawai, T., Kumeda, Y. y Yamamoto, Y. (2016). "*Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(10), pp. 3779-3785 DOI: 10.1099/ijsem.0.001264.
 26. Issepi, R., Stefani, S., Niederhausern, S., Bondi, M., Sabia, C. y Messi, P. (2019). "Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Properties of two Bacteriocin-Producing *Enterococcus mundtii* Isolated from Fresh Fish and Seafood "

27. Jin, D., Yang, J., Lu, S., Lai, X., Xiong, Y. y Xu, J. (2017). "Enterococcus wangshanyuanii sp. nov., isolated from faeces of yaks (*Bos grunniens*)". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(12), pp. 5216-5221 DOI: 10.1099/ijsem.0.002447.
28. Kadri, Z., Spitaels, F., Cnockaert, M., Praet, J., El Farricha, O., Swings, J. y Vandamme, P. (2015). "Enterococcus bulliens sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk". *Springer*.
29. Kim, J.Y., Shin, N., Na, H., Hyun, D., Whon, T.W., Kim, P.S., Yun, J. y Bae, J. (2013). "Enterococcus diestrammenae sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena coreana*". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 12), pp. 4540-4545 DOI: 10.1099/ijse.0.050062-0.
30. Larrea-Murrell, J.A., Rojas-Badia, M.M., Romeu-Alvarez, B., Rojas-Hernandez, N.M. y Heydrich-Perez, M. (2013). "Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura". *Revista CENIC: Ciencias Biologicas*, 44(3), pp. 24.
31. Li, C.Y., Tian, F., Zhao, Y.D. y Gu, C.T. (2014). "Enterococcus xiangfangensis sp. nov., isolated from Chinese pickle". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 3), pp. 1012-1017 DOI: 10.1099/ijse.0.058917-0.
32. Li, Y.Q. y Gu, C.T. (2019). "*Enterococcus pingfangensis* sp. nov., *Enterococcus dongliensis* sp. nov., *Enterococcus hulanensis* sp. nov., *Enterococcus nangangensis* sp. nov. and *Enterococcus songbeiensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle juice". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(10), pp. 3191-3201 DOI: 10.1099/ijsem.0.003608.
33. Lucas López, R., Gálvez, A., Abriouel, H. y Ben Omar, N. (2008). "La doble faceta del género "*enterococcus*", y su importancia en alimentos". *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 21, pp. 65-84.
34. Lucena-Padrós, H., González, J.M., Caballero-Guerrero, B., Ruiz-Barba, J.L. y Maldonado-Barragán, A. (2014). "*Enterococcus olivae* sp. nov., isolated from Spanish-style green-olive fermentations". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 3), pp. 1012-1017 DOI: 10.1099/ijse.0.058917-0.

- evolutionary microbiology*, 64(Pt 8), pp. 2534-2539 DOI: 10.1099/ijs.0.062208-0.
35. Marin, A., Gálvez, A. y Pérez, R. (2014). "Antimicrobial Resistance in Enterococci".
 36. Martín, B., Corominas, L., Garriga, M. y Aymerich, T. (2009). "Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment". *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), pp. 66-77 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03976.x.
 37. McLaughlin, R.W., Shewmaker, P.L., Whitney, A.M., Humrighouse, B.W., Lauer, A.C., Loparev, V.N., Gulvik, C.A., Cochran, P.A. y Dowd, S.E. (2017). "*Enterococcus crotali* sp. nov., isolated from faecal material of a timber rattlesnake". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(6), pp. 1984-1989 DOI: 10.1099/ijsem.0.001900.
 38. Neoh, H., Tan, X., Sapri, H.F. y Tan, T.L. (2019). "Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives". *Infection, Genetics and Evolution*, 74, pp. 103935 DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103935.
 39. Nilsson, O. (2012). "Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance". *Infection Ecology & Epidemiology*, 2(1), pp. 16959-8 DOI: 10.3402/iee.v2i0.16959.
 40. Ordaz, G., Merino-Mascorro, J.Á, García, S. y Heredia, N. (2019). "Persistence of Bacteroidales and other fecal indicator bacteria on inanimated materials, melon and tomato at various storage conditions". *International Journal of Food Microbiology*, 299, pp. 33-38 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.015.
 41. Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A. y Lo Nostro, A. (2014). "Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat". *Food Microbiology*, 41, pp. 1-7 DOI: 10.1016/j.fm.2014.01.008.
 42. Petersson-Wolfe, C.S., Wolf, S.L. y Hogan, J.S. (2009). "Experimental challenge of bovine mammary glands with *Enterococcus faecium* during early and late

- lactation". *Journal of Dairy Science*, 92(7), pp. 3158-3164 DOI: 10.3168/jds.2008-1755.
43. Pourcel, G., Sparo, M., Corso, A., Delpech, G., Gagetti, P., de Luca, M.M., Bernstein, J., Schell, C., Lissarrague, S. y Basualdo, J.A. (2017). "Molecular Genetic Profiling of Clinical and Foodborne Strains of Enterococci with High Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin". *Clinical microbiology*, 6(1) DOI: 10.4172/2327-5073.1000272.
44. Rehaïem, A., Fhoula, I., Slim, A.F., Ben Boubaker, I.B., Chihi, A.B. y Ouzari, H. (2016). "Prevalence, acquired antibiotic resistance and bacteriocin production of *Enterococcus* spp. isolated from tunisian fermented food products". *Food Control*, 63, pp. 259-266 DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.11.034.
45. Russo, N., Caggia, C., Pino, A., Coque, T.M., Arioli, S. y Randazzo, C.L. (2018). "*Enterococcus* spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano cheese types: A snapshot of their antibiotic resistance distribution". *Food and Chemical Toxicology*, 120, pp. 277-286 DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.023.
46. Said, L.B., Klibi, N., Dziri, R., Borgo, F., Boudabous, A., Slama, K.B. y Torres, C. (2015). "Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of *Enterococcus* spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia". *SCI*.
47. Sánchez, A., Benomar, N., Pérez, R., Abriuouel, H. y Gálvez, A. (2019). "Resistencia a antimicrobianos en enterococos aislados de alimentos de origen animal, pescado y mariscos". *Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*.
48. Serio, A., Chaves-López, C., Paparella, A. y Suzzi, G. (2010). "Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese". *International Dairy Journal*, 20(7), pp. 459-464 DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.02.005.
49. Sonsa-Ard, N., Rodtong, S., Chikindas, M.L. y Yongsawatdigul, J. (2015). "Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe". *Food Control*, 54, pp. 308-316 DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.02.010.

50. Techo, S., Shiwa, Y., Tanaka, N., Fujita, N., Miyashita, M., Shibata, C., Booncharoen, A. y Tanasupawat, S. (2019). "*Enterococcus florum* sp. nov., isolated from a cotton flower (*Gossypium hirsutum* L.)". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(8), pp. 2506-2513 DOI: 10.1099/ijsem.0.003524.
51. Templer, S.P., Rohner, P. y Baumgartner, A. (2008). "Relation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Foods and Clinical Specimens". *Journal of Food Protection*, 71(10), pp. 2100-2104 DOI: 10.4315/0362-028X-71.10.2100.
52. Torres, C., Alonso, C.A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R. y Coque, T.M. (2018). "Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin". *Microbiology spectrum*, 6(4) DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
53. Vandera, E., Parapouli, M., Kakouri, A., Koukkou, A., Hatziloukas, E. y Samelis, J. (2020). "Structural enterocin gene profiles and mode of antilisterial activity in synthetic liquid media and skim milk of autochthonous *Enterococcus* spp. isolates from artisan Greek Graviera and Galotyri cheeses". *Food Microbiology*, 86, pp. 103335 DOI: 10.1016/j.fm.2019.103335.
54. Wang, X., Yang, Y. y Huycke, M.M. (2020). "Risks associated with enterococci as probiotics". *Food Research International*, 129, pp. 108788 DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108788.
55. Werner, G., Coque, T.M., Franz, Charles M. A. P, Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., van Schaik, W. y Weaver, K. (2013). "Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker". *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), pp. 360-379 DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.03.001.
56. Yılmaz, E.Ş, Aslantaş, Ö, Önen, S.P., Türkyılmaz, S. y Kürekci, C. (2016). "Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey". *LWT - Food Science and Technology*, 66, pp. 20-26 DOI: 10.1016/j.lwt.2015.10.009.
57. Zdolec, N., Bogdanović, T., Pažin, V., Šimunić-Mežnarić, V., Martinec, N. y Lorenzo, J.M. (2020). "Control of biogenic amines in dry sausages inoculated

- with dairy-originated bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* EF-101". *Veterinarski arhiv*, 90(1), pp. 77-85 DOI: 10.24099/vet.arhiv.0459.
58. Zhang, S., Lebreton, F., Mansfield, M.J., Miyashita, S., Zhang, J., Schwartzman, J.A., Tao, L., Masuyer, G., Martínez-Carranza, M., Stenmark, P., Gilmore, M.S., Doxey, A.C. y Dong, M. (2018). "Identification of a Botulinum Neurotoxin-like Toxin in a Commensal Strain of *Enterococcus faecium*". *Cell Host & Microbe*, 23(2), pp. 169-176.e6 DOI: 10.1016/j.chom.2017.12.018.
59. Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H. y Sun, Z. (2017). "Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*". *Microbiological Research*, 196, pp. 95-105 DOI: 10.1016/j.micres.2016.12.009.