

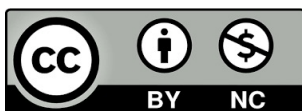
Cristina Escolar Miñana

Análisis molecular de la
resistencia antimicrobiana en
Enterococcus spp. de origen
alimentario y su impacto en salud
pública

Director/es

Rota García, María del Carmen
Conchello Moreno, María del Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN ENTEROCOCCUS SPP. DE ORIGEN ALIMENTARIO Y SU IMPACTO EN SALUD PÚBLICA

Autor

Cristina Escolar Miñana

Director/es

Rota García, María del Carmen
Conchello Moreno, María del Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Calidad, Seguridad y Tecnología de los
Alimentos

2022



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza

Tesis doctoral

Análisis molecular de la resistencia antimicrobiana
en *Enterococcus* spp. de origen alimentario y su
impacto en salud pública

Memoria presentada por:

Cristina Escolar Miñana

Directores:

D^a. M^a Carmen Rota García y D^a. M^a Pilar Conchello Moreno

Facultad de Veterinaria / Universidad de Zaragoza

Julio 2022

ÍNDICE GENERAL

LISTADO DE ACRÓNIMOS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

SUMMARY

1	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	3
1.1	ANTIBIÓTICOS Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN.....	5
1.1.1	Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular	5
1.1.2	Antibióticos que modifican la membrana citoplasmática.....	7
1.1.3	Antibióticos que inhiben la síntesis proteica.....	7
1.1.4	Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.....	10
1.1.5	Antibióticos que inhiben vías metabólicas.....	11
1.2	MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	12
1.3	MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	15
1.3.1	Resistencia natural	15
1.3.2	Resistencia adquirida.....	15
1.4	GENERACIÓN Y DISEMINACIÓN DE RAM EN LA INTERFAZ HOMBRE-ANIMAL-AMBIENTE	19
1.4.1	Medicina humana.....	21
1.4.2	Medicina veterinaria y producción animal.....	22

1.4.3	Agricultura	28
1.4.4	Cadena alimentaria	29
1.4.5	Medio ambiente	30
1.5	ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA RAM	32
1.5.1	Estrategia mundial de la OMS, la OIE y la FAO	32
1.5.2	Estrategia Europea	36
1.5.3	Plan Nacional frente a Resistencia a los Antibióticos (PRAN)	37
1.5.4	Percepción del riesgo asociado a la RAM: Eurobarómetro	39
1.6	PROPAGACIÓN DE RAM EN LA CADENA ALIMENTARIA	40
1.6.1	Importancia de los alimentos en la diseminación de RAM	40
1.6.2	Vigilancia Epidemiológica de RAM en la cadena alimentaria.....	42
1.7	GÉNERO <i>Enterococcus</i>.....	43
1.7.1	Características generales.....	43
1.7.2	Caracterización molecular	45
1.7.3	Resistencia antimicrobiana.....	46
1.7.4	Importancia clínica	53
1.7.5	Importancia en alimentos	55
1.7.6	Aspectos tecnológicos e higiénicos de enterococos aislados de productos lácteos fermentados	58
1.8	HERRAMIENTAS PARA LA TIPIFICACIÓN BACTERIANA Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	60
1.9	HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DE RAM	63
1.9.1	Métodos fenotípicos	65
1.9.1.1	Difusión en disco	65
1.9.1.2	Método Epsilon	66

1.9.1.3	Dilución en agar	66
1.9.1.4	Macrodilución y microdilución en caldo	67
1.9.2	Métodos moleculares.....	68
1.10	OBJETIVOS	71
2	CAPITULO II: MATERIAL Y MÉTODOS	74
2.1	Revivificación de los aislados del G^o <i>Enterococcus</i>	74
2.2	Identificación de <i>Enterococcus</i> spp. por MALDI-TOF.....	75
2.3	Determinación <i>in vitro</i> del patrón de sensibilidad/resistencia a antibióticos	75
2.4	Análisis de los determinantes genéticos de resistencia por RT PCR.....	77
2.4.1	Determinantes genéticos de resistencia y cepas dianas de referencia	77
2.4.2	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	79
2.4.2.1	Aislamiento del ADN total FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Mini Kit (Método 1) .	79
2.4.2.2	Aislamiento de ADN total: Lisostafina y Proteinasa K (Método 2).....	81
2.4.2.3	Aislamiento de ADN plasmídico	82
2.4.3	Amplificación por PCR en tiempo real.....	83
2.4.3.1	Cebadores	83
2.4.3.2	Reacción de amplificación por RT PCR	85
2.4.3.3	Confirmación del producto amplificado por secuenciación	88
2.4.4	Optimización de la RT PCR para la detección de resistencias antibióticas.....	90
2.4.4.1	Concentración de cebadores y temperatura de hibridación	90
2.4.4.2	Optimización de la concentración de ADN molde en la reacción de amplificación	91
2.5	Tipado molecular de <i>Enterococcus</i> spp.	92
2.5.1	Técnica RAPD PCR.....	92
2.5.1.1	Optimización del análisis RAPD PCR.....	94
2.5.1.2	Estudio de reproducibilidad	96

2.5.2	Técnica PFGE: Tipado molecular de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	98
2.5.3	Técnica MLST: Tipado molecular de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	101
3	CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	107
3.1	Caracterización fenotípica y genotípica de RAM en <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo	109
3.1.1	Identificación de especies de <i>Enterococcus</i> mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	109
3.1.2	Caracterización fenotípica de RAM en <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo	114
3.1.3	Caracterización genotípica de RAM en <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo.....	126
3.1.3.1	Resistencia a Antibióticos de importancia crítica	131
3.1.3.1.1	Resistencia a antibióticos de máxima prioridad	131
3.1.3.1.2	Resistencia a antibióticos de gran prioridad.....	145
3.1.3.2	Resistencia a antibióticos de importancia alta.....	153
3.2	Tipificación molecular de <i>Enterococcus</i> spp.	171
3.2.1	Tipado molecular de <i>Enterococcus</i> spp. mediante RAPD PCR.....	171
3.2.2	Tipado molecular de <i>Enterococcus</i> spp. mediante PFGE	177
3.2.3	Estudio comparativo de las técnicas RAPD PCR y PFGE para el seguimiento epidemiológico de RAM en <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo.....	183
3.2.4	Estudio de la relación clonal de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> de origen lácteo y su relación filogenética con aislamientos de otros orígenes por medio de la técnica MLST	187
3.2.4.1	Relación filogenética de <i>E. faecalis</i> de origen lácteo con aislados de otras fuentes	188
3.2.4.2	Relación filogenética de <i>E. faecium</i> de origen lácteo con aislados de otras fuentes....	197
3.2.5	Evaluación del impacto para la salud pública de la RAM en enterococos de origen lácteo	202
3.2.5.1	Evaluación del entorno de producción quesera como fuente de RAM	202

3.2.5.2	Relación clonal de cepas resistentes a antibióticos de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> de origen lácteo y su impacto para la salud pública	206
3.2.5.3	Relación clonal de cepas de <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i> y <i>E. casseliflavus</i> resistentes a antibióticos y su impacto para la salud pública	213
4	CONCLUSIONES	221
5	BIBLIOGRAFÍA.....	225
6	ANEXOS.....	250

LISTADO DE ACRÓNIMOS

AAC	Acetiltransferasa
ADN	Ácido desoxosiribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados)
AIC	Antibióticos de Importancia Crítica
ANT	Nucleotidiltransferasa
Antibióticos	TE, tetraciclina; MIN, minociclina; E, eritromicina; S, estreptomicina, VAN, vancomicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; STX, trimetoprina/sulfometoxazol
APH	Fosfotransferasa
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
BAL	Bacterias Ácidas Lácticas
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLEEs	Betalactamasas de Espectro Extendido
CASFM	Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie (Comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología)
CAT	Cloranfenicol Acetiltransferasa
CC	Complejos Clonales
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CISNS	Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de la Salud
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CP	Centro de Producción
Ct	Thershold (Ciclo umbral)
DDD	Dosis Diarias Definidas

DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares)
EE UU	Estados Unidos
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
EMA	European Medicines Agency (Agencia Europea del Medicamento)
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ERV	Enterococos Resistentes a Vancomicina
ESBLs	Betalactamasas de Espectro Extendido
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos)
FAO	Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drugs Administration (Administración Americana de Alimentos y Medicamentos)
GRAS	Generally Recognised As Safe (Generalmente Reconocido como Seguro)
I	Intermedio
IMS	Intercontinental Marketing Statistics
IRAS	Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria
IRYCIS	Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
ISO	Organización Internacional de Normalización (International Organization of Standardization)
KEA	Kanamicina Esculina Azida
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MLS _B	Macrólidos Lincosamidas Estreptograminas B
MLST	Tipificación Multilocus de Secuencias (Multilocus Sequence Typing)
mm	milímetros
MS _B	Macrólidos Estreptograminas B
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSLAB	Bacterias Ácido Lácticas No-Starter
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases

PBP	Penicillin-Binding Protein (Proteínas de unión a las penicilinas)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	Pulsed Field Electrophoresis (Electroforesis en campo pulsado)
PRAN	Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos
PROA	Programa de Optimización de Uso de los Antibióticos
PYR	Pirrolidonil-B-naftilamida
QPS	Qualified Presumption of Safety (Presunción Cualificada de Seguridad)
R	Resistente
RAM	Resistencia Antimicrobiana
RAPD PCR	Random Amplified Polymorphic DNA (Polimorfismo de ADN por amplificación aleatoria)
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real)
S	Sensible
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Análisis de Polimorfismos de Nucleótidos Simples)
ST	Secuencia Tipo
T _m	Temperatura de fusión (Melting temperature)
TSA	Tryptic Soy Agar
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UE	Unión Europea
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (Método de Agrupamiento Jerárquico Aglomerativo Simple)
WGS	Whole-Genome Sequencing (Secuenciación del Genoma Completo)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución y número de aislados de *Enterococcus* spp. estudiados en función del centro de producción y etapa del proceso de fabricación. 74

Tabla 2. Antibióticos ensayados, concentración y valores críticos de los diámetros (mm) de la zona de inhibición recomendados por CASFM (2013), CLSI (2014) y EUCAST (2020). 77

Tabla 3. Cepas diana de referencia, genes y resistencia antibiótica asociada. 78

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación por RT PCR de los determinantes de resistencia antibiótica. 86

Tabla 5. Concentración de cebadores empleada en la mezcla PCR para la amplificación de cada uno de los determinantes de resistencia antibiótica. 86

Tabla 6. Temperatura de hibridación para la amplificación de cada uno de los determinantes de resistencia antibiótica mediante la reacción de RT PCR. 87

Tabla 7. Temperatura de fusión (Tm) de cada uno de los genes de resistencia portados por las cepas de referencia. 88

Tabla 8. Condiciones térmicas ensayadas para la técnica RAPD PCR. 93

Tabla 9. Protocolo térmico para la amplificación de los genes *housekeeping*. 103

Tabla 10. Distribución de especies de enterococos en el proceso de elaboración de queso curado de leche cruda en dos centros de producción. 111

Tabla 11. Frecuencia de la susceptibilidad de 80 aislados de *Enterococcus* spp. de origen lácteo a 16 antibióticos. 115

Tabla 12. Patrones fenotípicos de multiresistencia antibiótica adquirida identificados en enterococos de origen lácteo. 124

Tabla 13. Perfil genotípico de resistencia antibiótica identificado en 80 aislados de enterococos de origen lácteo. 129

Tabla 14. Concordancia entre los pulsotipos PFGE y los genotipos RAPD PCR en los aislados de *E. faecalis* de origen lácteo. 184

Tabla 15. Concordancia entre los pulsotipos PFGE y los genotipos RAPD PCR en los aislados de <i>E. faecium</i> de origen lácteo.....	184
Tabla 16. Tipado molecular de <i>E. faecalis</i> de origen lácteo mediante MLST.....	188
Tabla 17. Tipado molecular de <i>E. faecium</i> de origen lácteo por MLST.....	197
Tabla 18. Perfil genotípico de resistencia antimicrobiana de los clones detectados de <i>E. faecalis</i> de origen lácteo.	207
Tabla 19. Clones detectados en la especie <i>E. faecium</i> de origen lácteo.....	212
Tabla 20: Perfil genotípico de resistencia antimicrobiana de los aislados de <i>E. hirae</i> y <i>E. casseliflavus</i> de origen lácteo.....	215
Tabla 21. Concentración y pureza del ADN total y plasmídico obtenido de las cepas diana de referencia.	251
Tabla 22. Resultados del análisis in silico de las secuencias de bases nitrogenadas obtenidas a partir de la secuenciación de cada uno de los amplicones obtenidos durante la optimización de la reacción de amplificación de cada uno de los determinantes genéticos de resistencia estudiados	254
Tabla 23. Resultados del análisis de las secuencias de bases nitrogenadas obtenidas a partir de la secuenciación de cada uno de los amplicones obtenidos mediante RT PCR de los genes <i>vat D</i> y <i>vat E</i> de los aislados de <i>E. hirae</i> y <i>E. casseliflavus</i> que mostraron amplificación, tanto en ADN total como en ADN plasmídico	259
Tabla 24. Intervalo dinámico determinado con la reacción de amplificación optimizada para cada uno de los genes a partir de ADN total aislado de cada cepa de referencia	260
Tabla 25: Intervalo dinámico determinado en la reacción de amplificación optimizada para cada uno de los genes a partir de ADN plasmídico aislado cada cepa de referencia.....	261
Tabla 26. Protocolo térmico seleccionado para cada cebador	264

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dianas de acción de los antibióticos que inhiben la síntesis proteica (Kapoor et al., 2017).
 8

Figura 2: Dianas de los antibióticos y mecanismos de resistencia de las bacterias (Wright, 2010). 12

Figura 3: Representación de los integrones incorporados en transposones y posteriormente en plásmidos (Torres Manrique, 2012). 17

Figura 4: Efecto de la presión selectiva antibiótica en bacterias (CDC, 2021). 19

Figura 5: Representación gráfica de las rutas de transmisión de RAM entre animales de producción, medio ambiente y humanos (McEwen and Collignon, 2018). 20

Figura 6: Uso de antibióticos en ganadería (O’Neill, 2015). 23

Figura 7: Antibióticos autorizados en EEUU en producción animal y su interés en salud humana (O’Neill, 2015). 25

Figura 8: Media ponderada del consumo total de antimicrobianos en seres humanos y animales productores de alimentos durante el periodo 2014-2018 en 27 países de la Unión Europea (ECDC, EFSA & EMA, 2021a). 26

Figura 9: Ventas de varias clases de antibióticos para uso en animales de producción (mg/PCU), en 31 países europeos en 2019 (EMA, 2021). 27

Figura 10: Esferas de trabajo prioritarias de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en relación con los cinco objetivos del Plan de Acción Mundial sobre la RAM (FAO, 2016). 35

Figura 11. Clases de antibióticos categorizados de importancia crítica para la medicina humana (WHO, 2019a). 36

Figura 12. Presentación de varios métodos convencionales de prueba de susceptibilidad a antibióticos. 68

Figura 13. Temperaturas de hibridación ensayadas. 91

Figura 14. Esquema del diseño experimental para el estudio de reproducibilidad del método RAPD PCR con un cebador. 97

Figura 15. Esquema del análisis de los perfiles RAPD PCR para cada una de las cepas y con cada uno de los cebadores, así como patrones obtenidos para una única cepa tras normalizar los perfiles.	98
Figura 16. Distribución de las especies de enterococos identificadas en el proceso de elaboración de queso curado de leche cruda de oveja.	110
Figura 17. Distribución de especies de enterococos identificadas en dos centros de producción a lo largo del proceso de elaboración del queso.	112
Figura 18. Representación gráfica del perfil de sensibilidad de <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo a 16 antibióticos.....	116
Figura 19. Número de aislados que mostraron susceptibilidad reducida a los 16 antibióticos analizados mostrados en función de la importancia para la medicina humana.....	118
Figura 20. Representación gráfica de multirresistencia a antibióticos en <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo.....	119
Figura 21: Perfil de resistencia a los antibióticos en especies de <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo.	120
Figura 22. Representación gráfica del perfil de multirresistencia a antibióticos en especies de <i>Enterococcus</i> de origen lácteo.	122
Figura 23. Frecuencia de detección de genes RAM en 80 aislados de <i>Enterococcus</i> spp. de origen lácteo.....	127
Figura 24. Distribución de los determinantes genéticos de resistencia detectados, en especies de enterococos de origen lácteo.....	128
Figura 25. Número de aislados que mostraron susceptibilidad reducida a los 16 antibióticos analizados en función de la importancia para la medicina humana y su asociación a al menos un mecanismo de resistencia.....	130
Figura 26. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a vancomicina y teicoplanina en especies de enterococos de origen lácteo.	133
Figura 27. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a eritromicina en enterococos de origen lácteo.	137

Figura 28. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a eritromicina en enterococos de origen lácteo.	142
Figura 29. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a estreptomicina y gentamicina en enterococos de origen lácteo.....	147
Figura 30. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a clindamicina en enterococos de origen lácteo.	155
Figura 31. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a Q/D en enterococos de origen lácteo.....	157
Figura 32. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a cloranfenicol en diferentes especies de enterococos de origen lácteo.....	163
Figura 33. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a tetracilina y minociclina en especies de enterococos de origen lácteo.....	166
Figura 34. Dendograma basado en polimorfismos de RAPD aplicado a enterococos aislados del proceso de elaboración de queso curado.....	173
Figura 35. Perfiles PFGE <i>Sma</i> I obtenidos de los aislados de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	178
Figura 36. Perfiles PFGE <i>Sma</i> I obtenidos de los aislados de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	179
Figura 37. Dendograma derivado del agrupamiento por UPGMA de los perfiles electroforéticos PFGE de <i>E. faecalis</i> de origen lácteo.....	180
Figura 38. Dendograma derivado del agrupamiento por UPGMA de los perfiles electroforéticos PFGE de <i>E. faecium</i> de origen lácteo.....	182
Figura 39. Análisis <i>eBURST</i> de las secuencias tipo detectadas en <i>E. faecalis</i> de origen lácteo (<i>Phyloviz</i> 2.0).	189
Figura 40. Distribucion de los complejos clonales (CC) y las secuencias tipo (ST) en la especie <i>E. faecalis</i>	195
Figura 41. Análisis <i>eBURST</i> de las secuencias tipo detectadas en <i>E. faecium</i> de origen lácteo (<i>Phyloviz</i> 2.0).	199
Figura 42. Distribución de las secuencias tipo en la especie <i>E. faecium</i>	199

Figura 43. Distribución de los genes de RAM en las distintas etapas del proceso de maduración en ambos centros de producción.....	203
Figura 44. Distribución de los genes de RAM en las distintas etapas del proceso de maduración en los centros de producción 1 y 2.	204
Figura 45. Curvas de fusión y valores de Tm de los genes de resistencia amplificados.	252
Figura 46. Curvas de fusión y Tm obtenidas tras la amplificación de ADN total y ADN plasmídico de <i>Enterococcus</i> spp.....	253
Figura 47: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación obtenidos con los cebadores.....	253
Figura 48. Perfil RAPD PCR de las cepas de referencia empleando el cebador M13 y los tres protocolos de PCR ensayados para este cebador.	262
Figura 49. Perfil RAPD PCR de las cepas de referencia empleando el cebador D8635 y los tres protocolos de PCR ensayados para este cebador.	263
Figura 50. Perfil RAPD PCR obtenido con el cebador M13.	265
Figura 51. Perfil RAPD PCR obtenido el cebador D8635	266
Figura 52. Dendograma obtenido en el estudio de reproducibilidad de la técnica RAPD PCR empleando los cebadores M13 y D8635.....	267

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mecanismo y determinantes genéticos de resistencia a antibióticos descritos en aislados de enterococos..... 51

Cuadro 2. Ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares disponibles para la tipificación de patógenos transmitidos por alimentos (Adzitey et al., 2013)..... 61

Cuadro 3: Características de los cebadores utilizados para la amplificación de los diferentes genes de resistencia. 84

Cuadro 4. Protocolo térmico empleado para la amplificación en tiempo real de los determinantes de resistencia antibiótica. 87

Cuadro 5. Secuencias de los cebadores seleccionados para la técnica RAPD PCR. 93

Cuadro 6. Condiciones térmicas ensayadas para la reacción RAPD PCR. 95

Cuadro 7. Cebadores seleccionados para el análisis de *E. faecium* mediante la técnica MLST..... 102

Cuadro 8. Cebadores seleccionados para el análisis de *E. faecium* mediante la técnica MLST..... 103

Cuadro 9. Estudios publicados en enterococos de origen lácteo con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a eritromicina asociados. 138

Cuadro 10. Estudios publicados en enterococos de origen lácteo con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a aminoglucósidos asociados. 149

Cuadro 11. Estudios publicados en enterococos (*no E. faecalis*) de animales y alimentos de origen animal con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a Q/D asociados. 158

Cuadro 12. Estudios publicados en enterococos de origen lácteo con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a tetraciclinas asociados. 167

Cuadro 13. Información epidemiológica de los clones descritos para cada una de las secuencias tipo de *E. faecalis* identificadas en este trabajo..... 190

Cuadro 14. Información epidemiológica de las *Single* y *Double Locus Variant* de la secuencia tipo 1056..... 193

Cuadro 15. Información epidemiológica de las *Single* y *Double Locus Variant* de la secuencia tipo 1057..... 194

Cuadro 16. Información epidemiológica de las secuencias tipo de *E. faecium* identificadas en este trabajo 197

RESUMEN

Los antimicrobianos son utilizados como tratamiento de mayor eficacia en la terapia médica de enfermedades infecciosas; sin embargo, su excesiva utilización y mal uso en medicina humana y veterinaria han derivado en que los microorganismos causantes adquieran mecanismos que les permitan resistir al efecto antimicrobiano de éstos. La resistencia antimicrobiana es un problema global, de epidemiología compleja que implica a humanos, animales, alimentos y medio ambiente, y por lo tanto debe ser abordado desde el enfoque *Una Sola Salud*.

Los enterococos forman parte de la microbiota comensal de animales y humanos, y están presentes en múltiples nichos ecológicos incluido los alimentos. Su capacidad para adaptarse a situaciones adversas y para intercambiar material genético con otras bacterias, lo convierte en un indicador idóneo de la transferencia horizontal de material genético. Por ello, los estudios dirigidos a la tipificación y caracterización de *Enterococcus* spp., permiten determinar las rutas de transmisión de Resistencia Antimicrobianas (RAM) entre el sector animal, medio ambiente y humano.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la cadena alimentaria como entorno favorable para la transmisión y diseminación de resistencias antimicrobianas y exposición a genes de resistencia.

En primer lugar, se ha caracterizado fenotípicamente y genotípicamente la resistencia antimicrobiana en 80 aislados de *Enterococcus* spp. obtenidos del proceso de elaboración de queso artesano de leche cruda de oveja, en dos centros de producción diferentes. En general, *E. faecalis* y *E. faecium* fueron las especies más prevalentes; también se identificaron *E. hirae*, *E. casseliflavus* y *E. durans*. La técnica de difusión en disco ha permitido detectar resistencia al menos a un antibiótico de los 16 analizados en el 72 % de los aislados, con tasas altas de resistencia a tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos; además, el 29 % de los aislados han presentado multirresistencia.

Mediante RT PCR se han analizado 19 genes de resistencia e identificado 10 genes diferentes en ADN plasmídico, relacionándose en la mayoría de los casos el patrón fenotípico con un mecanismo de resistencia adquirido. Los genes *tet M*, *erm B* y *ant (6)-Ia*, han estado presentes en el 50 %, 30 % y 25 % de los aislados, respectivamente. *E. faecalis* ha sido la especie que ha presentado las mayores tasas de RAM tanto a nivel fenotípico como genotípico, seguido de *E. hirae* y *E. casseliflavus*,

mientras que *E. faecium* ha presentado únicamente resistencia *in vitro* a quinupristina/dalfopristina y ausencia de genes de RAM, y *E. durans* ha sido sensible a todos los antibióticos tanto a nivel fenotípico como genotípico.

En segundo lugar, la caracterización molecular ha permitido estudiar la dinámica poblacional de enterococos identificándose un total de 55 genotipos mediante RAPD PCR. Así mismo, mediante PFGE se han identificado 12 pulsotipos de *E. faecalis* y 6 de *E. faecium*, confirmando el importante papel que juegan los enterococos en el proceso de elaboración del queso. Los resultados han demostrado la utilidad de la técnica RAPD PCR como alternativa rápida, sencilla y económica para la caracterización molecular de *Enterococcus* spp. cuando se aplica bajo condiciones previamente optimizadas y controladas.

Por último, mediante el análisis MLST se ha estudiado la relación filogenética de los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* de origen lácteo con los de origen humano, animal y ambiental a nivel mundial.

E. faecalis ha presentado una elevada diversidad genética representada por 10 secuencias tipo, dos de las cuales (ST1056 y ST1057) se han identificado por primera vez a nivel mundial depositándose en la base de datos MLST. Los clones detectados se han asociado mayoritariamente al ambiente hospitalario (ST25, ST133, ST55, ST40, ST16, ST206, ST538), agrupándose 3 de ellos (ST538, ST16 y ST40) en complejos clonales de alto riesgo epidemiológico (CC2, CC16 y CC40, respectivamente). Los aislados clasificados en estos complejos clonales presentaron altas tasas de resistencia, codificada por los determinantes genéticos *erm* B (CC2), *tet* M y *ant*(6)-Ia (CC40) y *Inu* B, *tet* M, *erm* B, *cat* A, *cat*_p C221, *ant*(6)-Ia y *aac*(6')-Ie-aph(2'')-Ia (CC16).

La tipificación por MLST permitió identificar un total de 5 secuencias tipo de *E. faecium*: ST47, ST1491, ST286, ST1853 y ST1854, las dos últimas detectadas por primera vez a nivel mundial. Los resultados han demostrado una escasa relación filogenética entre los aislados obtenidos del proceso de elaboración de queso y de otros orígenes epidemiológicos depositados en la base de datos MLST.

Por último, el análisis del proceso de elaboración de queso ha revelado que la leche cruda de oveja y el queso curado constituyen una vía de exposición a bacterias resistentes y genes de resistencia con implicaciones para la seguridad alimentaria y la salud pública.

En conclusión, el estudio molecular llevado a cabo en este trabajo ha permitido conocer la dinámica poblacional de *Enterococcus* spp. en el entorno quesero y los genes de resistencia antibiótica asociados, así como la relación epidemiológica de *E. faecalis* y *E. faecium* desde el enfoque *Una Sola Salud*.

SUMMARY

Antimicrobials are used as the most effective treatment in the medical therapy of infectious diseases; however, the overuse and misuse in human and veterinary medicine has been linked to the emergence and spread of microorganisms which are resistant to them, rendering treatment ineffective and posing a serious risk to public health. Antimicrobial resistance is a global problem, with a complex epidemiology involving humans, animals, food and environment, and therefore should be addressed from a *One Health* approach.

Enterococci are part of the commensal microbiota of animals and humans and are present in multiple ecological niches including food. Their ability to adapt to adverse situations and to exchange genetic material with other bacteria makes them an ideal indicator of horizontal transfer of genetic material. Therefore, studies aimed at typing and characterization of *Enterococcus* spp. allow determination of the routes of transmission of Antimicrobial Resistance (AMR) between the animal sector, environment and humans.

The objective of this work has been to evaluate the food chain as a favourable environment for the transmission and dissemination of antimicrobial resistance and exposure of microorganisms to resistance genes.

First, antimicrobial resistance was phenotypically and genotypically characterized in 80 isolates of *Enterococcus* spp. obtained from the production process of artisan cheese made with raw sheep's milk in two different production centres. In general, *E. faecalis* and *E. faecium* were the most prevalent species; *E. hirae*, *E. casseliflavus* and *E. durans* were also identified. The disk diffusion technique detected resistance to at least one antibiotic of the 16 tested in 72 % of the isolates, with high rates of resistance to tetracyclines, macrolides and aminoglycosides; in addition, 29 % of the isolates showed multidrug resistance.

19 resistance genes have been analysed by RT PCR and 10 different genes have been identified in plasmid DNA, relating in most cases to the phenotypic pattern of an acquired resistance mechanism. The genes *tet M*, *erm B* and *ant(6)-Ia* were present in 50 %, 30 % and 25 % of the isolates, respectively. *E. faecalis* was the species with the highest AMR rates at both phenotypic and genotypic levels, followed by *E. hirae* and *E. casseliflavus*, while *E. faecium* showed only *in vitro*

resistance to quinupristin/dalfopristin and absence of AMR genes. *E. durans* was sensitive to all antibiotics at both phenotypic and genotypic levels.

Secondly, molecular characterization has allowed us to study the population dynamics of enterococci, identifying a total of 55 genotypes by RAPD PCR. Likewise, PFGE has identified 12 pulsetypes of *E. faecalis* and 6 of *E. faecium*, confirming the important role played by enterococci in the cheese-making process. The results have demonstrated the usefulness of the RAPD PCR technique as a fast, simple and economical alternative for the molecular characterization of *Enterococcus* spp. when applied under previously optimized and controlled conditions.

Finally, the phylogenetic relationship of *E. faecalis* and *E. faecium* isolates of dairy origin with those of human, animal and environmental origin worldwide has been studied by MLST analysis.

E. faecalis showed high genetic diversity represented by 10 type sequences, two of which (ST1056 and ST1057) have been identified for the first time worldwide and deposited in the MLST database. The clones detected were mostly associated with the hospital environment (ST25, ST133, ST55, ST40, ST16, ST206, ST538), 3 of which (ST538, ST16 and ST40) were grouped in clonal complexes of high epidemiological risk (CC2, CC16 and CC40, respectively). Isolates classified in these clonal complexes presented high rates of resistance, encoded by the genetic determinants *erm B* (CC2), *tet M* and *ant(6)-Ia* (CC40) and *lnu B*, *tet M*, *erm B*, *cat A*, *cat_{PC221}*, *ant(6)-Ia* and *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (CC16).

MLST typing identified a total of 5 type sequences of *E. faecium*: ST47, ST1491, ST286, ST1853 and ST1854, the last two detected for the first time worldwide. The results have shown a poor phylogenetic relationship between isolates obtained from the cheese-making process and from other epidemiological origins deposited in the MLST database.

Finally, the analysis of the cheese making process has revealed that raw sheep milk and aged cheese constitute a pathway of exposure to resistant bacteria and resistance genes with implications for food safety and public health.

In conclusion, the molecular study carried out in this work has allowed us to better understand the population dynamics of *Enterococcus* spp. in the cheese environment and the associated antibiotic

resistance genes, as well as the epidemiological relationship of *E. faecalis* and *E. faecium* in the *One Health* approach.



CAPÍTULO I

Introducción y objetivos

1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1927 por Alexander Fleming, se han descrito diversos agentes antimicrobianos, ya sean naturales o sintéticos, con diferentes mecanismos de acción y un espectro de actividad cada vez más amplio frente a bacterias, hongos, parásitos y virus. El uso de estas sustancias antimicrobianas es una de las formas de terapia más eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Su introducción en la práctica clínica supuso uno de los mayores avances de la medicina, permitiendo reducir las tasas de mortalidad e incrementar la esperanza de vida. Sin embargo, su excesiva utilización y mal uso ha derivado en que los microorganismos causantes de una infección pierdan con el tiempo su sensibilidad natural a una gran parte de los antimicrobianos desarrollados. Dentro de las sustancias antimicrobianas destacan los antibióticos, cuya actividad va dirigida al tratamiento de infecciones bacterianas.

La pérdida de sensibilidad bacteriana frente a los antibióticos se ha ido solventando mediante el desarrollo de nuevos compuestos; sin embargo, la aparición de bacterias multirresistentes y las escasas perspectivas de desarrollo de nuevas sustancias antimicrobianas durante la próxima década indican que este modelo no puede mantenerse y podría derivar en una “crisis antibiótica”.

La aparición y propagación de microorganismos farmacorresistentes es un fenómeno codificado por genes de resistencia o mutaciones espontáneas que se transmiten de una generación a otra. Es especialmente alarmante la rápida propagación mundial de bacterias multirresistentes y panresistentes (denominadas también «superbacterias») responsables de infecciones que no pueden tratarse con los antibióticos al uso. Por tal razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha notificado que en el siglo XXI la resistencia antimicrobiana constituye uno de los tres problemas más importantes a los que se enfrenta la salud humana siendo una de las mayores amenazas para la salud mundial (Christaki et al., 2020). A lo largo de este trabajo se empleará el acrónimo RAM para hacer referencia al término resistencia antimicrobiana específica a los antibióticos.

En la Unión Europea (UE), la RAM es responsable de alrededor de 33.000 muertes al año, mientras que en España mueren alrededor de 3.000 personas al año como consecuencia de infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos, cifra que, según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), asciende a 35.000 fallecidos (AEMPS,

2019). En Estados Unidos (EE. UU.), al menos 2 millones de personas adquieren, cada año, infecciones graves causadas por bacterias resistentes a uno o más de los antibióticos diseñados para tratarlas, y aproximadamente 23.000 mueren como resultado directo de infecciones multirresistentes, mientras que otras personas fallecen por afecciones que se complican con la aparición de una infección provocada por un microorganismo resistente (CDC, 2017).

A nivel mundial se estima que actualmente mueren al menos 700.000 personas cada año debido a infecciones resistentes a los antibióticos y que la RAM podría ser la causa de 10 millones de muertes anuales en 2050. Por otra parte, el costo de la RAM para la economía es considerable, ya que la prolongación de las enfermedades se traduce en estancias hospitalarias más largas, necesidad de medicamentos más caros y dificultades financieras para las personas afectadas. Los gastos añadidos asociados a la atención médica de estas infecciones ascienden a 1.100 millones de euros anuales en la UE y hasta 26.000 millones de dólares en EE. UU. (OECD, 2019). El Banco Mundial ha advertido que en 2050 las infecciones resistentes a los fármacos podrían ocasionar daños económicos a escala mundial comparables a la crisis financiera de 2008 (Comunicación de la Comisión Europea, 339 final, 2017).

1.1 ANTIBIÓTICOS Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN

Los antimicrobianos en general son sustancias que se utilizan para prevenir y tratar infecciones en los seres humanos, los animales y las plantas. Éstos incluyen los antibióticos, utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas, los antivíricos, los antifúngicos y los antiparasitarios (Christaki et al., 2020). En este apartado se abordarán los aspectos microbiológicos y mecanismos de acción de los compuestos con actividad antibacteriana.

Los antibióticos actúan inhibiendo los diferentes procesos metabólicos llevados a cabo por las bacterias, los cuales son vitales para su crecimiento o supervivencia. Pueden actuar alterando la actividad bacteriana, la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de los ácidos nucleicos. También pueden actuar modificando la estructura celular o alterando la integridad de la membrana citoplasmática. Otros antibióticos protegen de compuestos enzimáticos que hidrolizan la bacteria como es el caso de los β -lactámicos, que inhiben la actividad de las enzimas β -lactamasas (Calvo and Martínez-Martínez, 2009).

Tradicionalmente los antibióticos se han clasificado atendiendo al efecto antibacteriano, considerándose bacteriostáticos aquellos que impiden temporalmente el crecimiento bacteriano, y bactericidas aquellos que destruyen la bacteria. Aunque cada clase de antibiótico actúa preferentemente de una forma u otra dependiendo de la concentración que alcance en la diana o de su afinidad por ésta. En general, los antibióticos que ejercen su acción a nivel de la envoltura celular (impidiendo la síntesis de la pared o alterando la membrana citoplasmática) o interfiriendo con las funciones metabólicas del Ácido desoxirribonucleico (ADN), son bactericidas, mientras que los que actúan a nivel de la síntesis proteica son bacteriostáticos, a excepción de los aminoglucósidos (Calvo and Martínez-Martínez, 2009; Kapoor et al., 2017).

1.1.1 Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Las células bacterianas poseen una pared externa formada por al menos dos capas de peptidoglicanos que le confieren protección y resistencia osmótica. La alteración de esta estructura provoca un desequilibrio en el gradiente de osmolaridad y en consecuencia la destrucción del microorganismo. Existen diferentes clases de antibióticos cuya diana es dicha pared, algunos

bloquean el lugar de unión de enzimas que actúan en su síntesis y otros inhiben la síntesis de peptidoglicanos.

Los **β -lactámicos** son antibióticos de amplio espectro que constituyen una de las clases más antiguas de agentes antibacterianos. Se trata de compuestos bactericidas que actúan en el último paso de las síntesis de peptidoglicanos activando la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. Se caracterizan por poseer en su estructura un anillo β -lactámico con un oxígeno en posición β con respecto a un nitrógeno. En función de los radicales que se unen a este anillo se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a cocos gram positivos y bacterias gram negativas, aunque no son activos frente a bacterias intracelulares como *Chlamydia* spp. y *Rickettsia* spp. (Gómez, 2015).

Los **glucopéptidos** actúan en un paso previo al de los β -lactámicos evitando la elongación del peptidoglicano. Pertenecen a este grupo los glucopéptidos clásicos (**vancomicina y teicoplanina**) y los nuevos derivados (**oritavancina, telavancina y dalbavancina**). Debido a su gran tamaño no son capaces de atravesar la pared celular de las bacterias gram negativas de forma que sólo resultan activos frente a las gram positivas, siendo bactericidas frente a *Staphylococcus* spp., y bacteriostáticos frente a *Enterococcus* spp. (Kapoor et al., 2017).

Los antibióticos **derivados del ácido fosfónico (fosfomicina)**, tienen actividad bactericida ya que actúa bloqueando la formación de N-acetilmurámico, precursor del peptidoglicano. El hecho de que tanto las bacterias gram positivas como las gram negativas necesiten la formación del N-acetilmurámico para la síntesis del peptidoglicano, hace que el espectro de acción de la fosfomicina sea muy amplio, presentando actividad frente a los principales géneros de la práctica clínica tales como *Staphylococcus* spp. (excepto *S. saprophyticus* y *S. capitis*), *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Candel et al., 2019).

Las **Isoxazolidinonas (cicloserina)**, tienen un efecto competitivo con dos enzimas bacterianas, la alanina-racemasa y la alanina-sintetasa, ambas implicadas en la síntesis de la pared bacteriana. Como consecuencia la síntesis de péptidoglicanos es incompleta, produciéndose una pared imperfecta que conduce a la lisis de las bacterias. La cicloserina es un antibiótico de amplio espectro

pero por su elevada toxicidad se utiliza únicamente como antibiótico de segunda línea para tratar la tuberculosis (Laws et al., 2019; Martínez, 2007).

1.1.2 Antibióticos que modifican la membrana citoplasmática

La membrana plasmática actúa como barrera de permeabilidad selectiva para las bacterias, controlando la composición del medio interno celular. Los antibióticos que actúan a este nivel provocan cambios en la permeabilidad induciendo a la muerte celular. A este grupo pertenecen las polimixinas, los lipopéptidos, los antibióticos poliénicos (activos frente a hongos) y dos grupos de escaso interés clínico (ionóforos y formadores de poros).

Las **polimixinas (polimixina B, colistina)** se comportan como detergentes catiónicos por ser antibióticos polipeptídicos, cíclicos y policatiónicos, con una cadena de ácido graso unido al péptido. Su estructura permite desorganizar la membrana citoplasmática dando lugar a un aumento de su permeabilidad y en consecuencia la pérdida de metabolitos esenciales. Las bacterias gram negativas son más sensibles a la acción de estos agentes que las gram positivas debido a la presencia de mayor cantidad de fosfolípidos en la membrana. Con frecuencia, son la única opción terapéutica contra cepas multirresistentes por lo que ha resurgido su interés (Calvo and Martínez-Martínez, 2009; Sabnis et al., 2021).

Dentro de los antibióticos **lipopéptidos**, se encuentra la daptomicina, la cual posee una gran actividad frente a bacterias gram positivas, siendo inactiva frente a gram negativas debido a la incapacidad de atravesar la pared de éstas. Este antibiótico se une a la membrana bacteriana, tanto en fase de crecimiento como estacionaria, causando una despolarización y conduciendo al bloqueo de la síntesis de proteínas, de ADN y de Ácido ribonucleico (ARN) y provocando la muerte de la célula bacteriana (Calvo and Martínez-Martínez, 2009; Martínez, 2007).

1.1.3 Antibióticos que inhiben la síntesis proteica

Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contienen ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad 50S) y diversas proteínas llamadas S (*small* o pequeña, en la subunidad 30S) o L (*large* o grande, en la subunidad 50S). Diferentes componentes de esta estructura pueden ser el lugar de unión de los antibióticos

siendo la síntesis proteica uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de éstos (**Figura 1**). La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, aunque algunos se comportan como bactericidas dependiendo de las concentraciones del antimicrobiano y del microorganismo afectado (Calvo and Martínez-Martínez, 2009).

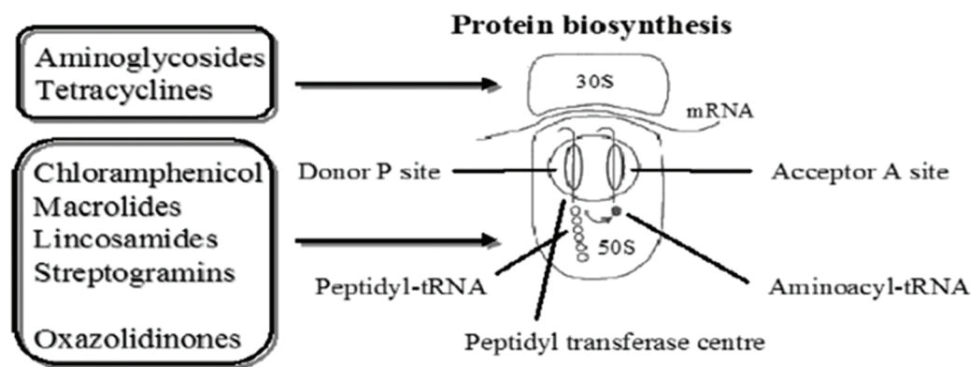


Figura 1. Dianas de acción de los antibióticos que inhiben la síntesis proteica (Kapoor et al., 2017).

Los **aminoglucósidos** y **tetraciclinas** tienen su acción principalmente en la subunidad 30S.

Entre los fármacos que se unen a la subunidad ribosomal 50S, se encuentra el **cloranfenicol**, las **lincosamidas** (clindamicina), las **oxazolidinonas** (linezolid), las **estreptograminas** (dalfopristina o estreptogramina A y quinupristina o estreptogramina B), los **macrólidos** y los **cetólidos**. Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas presentan un mecanismo de acción similar denominándose complejo MLS (Dowling et al., 2017).

Los **aminoglucósidos** (**neomicina**, **estreptomina**, **kanamicina**, **gentamicina** y **tobramicina**) se unen a diferentes proteínas S y al ARN 16S de la subunidad ribosomal 30 S, provocando una traducción errónea del ARN mensajero (ARNm) que deriva en la formación de proteínas no funcionales. Este grupo de antibióticos puede tener un efecto bactericida dependiente de su concentración y son activos frente a un amplio número de especies bacterianas, especialmente frente a bacterias gram negativas aerobias, aunque pueden actuar sinérgicamente frente a ciertas bacterias gram positivas (Dowling et al., 2017).

Dentro del grupo de las **tetraciclinas**, la **tetraciclina** es un antibiótico de origen natural aislado en la década de 1940 a partir de especies del género *Streptomyces*. Desde entonces, modificando su molécula se han obtenido compuestos semisintéticos con el objetivo de producir otras moléculas

con diferentes propiedades farmacocinéticas y actividades antimicrobianas como son la **oxitetraciclina**, **doxiciclina** o **minociclina** (Dowling et al., 2017). Las **tetraciclinas** también actúan a nivel de la fracción ribosomal 30S presentando actividad bactericida. Esta clase de antibióticos de amplio espectro se han empleado durante muchos años para el tratamiento de una gran variedad de infecciones provocadas tanto por bacterias gram positivas como negativas. Derivado de la minociclina se encuentra la tigeciclina, clasificado dentro del grupo de las glicilciclinas, que posee el mismo mecanismo de acción aunque se unen al ribosoma con una afinidad 5 veces superior que la minociclina y, además, se fija a la membrana citoplásmica alterando su permeabilidad. Este compuesto es más potente y activo frente a bacterias con modificaciones ribosómicas, incluyendo enterococos resistentes a glucopéptidos, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *S. pneumoniae* multirresistentes y diversas bacterias gram negativas resistentes a otros compuestos (Kapoor et al., 2017; Martínez, 2007; Yaghoubi et al., 2021).

Dentro del grupo de los **anfenicoles**, el **cloranfenicol** y su derivado el **tiamfenicol** son antibióticos bacteriostáticos que se unen al ARNr 23S de la subunidad 50S bloqueando la unión del ARN de transferencia (ARNt) al ribosoma, evitando así la síntesis proteica. Poseen un amplio espectro de actividad contra microorganismos gram positivos, gram negativos y anaerobios, no obstante este antibiótico puede causar mielod depresión y su uso se reserva como última alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas graves (Kapoor et al., 2017).

Las lincosamidas son generalmente sustancias bacteriostáticas, aunque pueden ser bactericidas dependiendo de su concentración y del microorganismo considerado. Estos antibióticos se unen reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la transpeptidación necesaria para la síntesis proteica bacteriana, siendo la **clindamicina** la lincosamida de referencia. Es activa frente a bacterias gram positivas, excepto enterococos y microorganismos anaerobios, incluido el grupo de *B. fragilis* y no presentan actividad frente a ciertas bacterias gram negativas probablemente porque no pueden atravesar la pared bacteriana (Calvo and Martínez-Martínez, 2009).

Los macrólidos forman un grupo de antimicrobianos que se caracteriza por la presencia de un anillo lactónico macrocíclico al que se unen uno o varios azúcares. La **eritromicina** fue el primer macrólido utilizado en clínica, a partir del cual se introdujeron modificaciones en su estructura química que dieron lugar a derivados semisintéticos con mejores propiedades farmacocinéticas. Dependiendo

del número de elementos contenidos en el anillo, se clasifican en macrólidos de 14 átomos de carbono (**eritromicina, claritromicina, roxitromicina**), 15 átomos de carbono (**azitromicina**) y 16 átomos de carbono (**espiramicina, josamicina, midecamicina**). Estos antibióticos afectan a la translocación uniéndose al ARNr 23S de la subunidad 50S del ribosoma, interfiriendo así el proceso de elongación de la síntesis proteica. Generalmente son considerados bacteriostáticos, aunque a altas concentraciones y con un bajo inóculo pueden mostrar acción bactericida especialmente frente a *Streptococcus* spp., siendo poco activos frente a bacterias gram negativas (Calvo and Martínez-Martínez, 2009; Kapoor et al., 2017).

Las estreptograminas forman un grupo de antimicrobianos con una estructura compleja constituida por una macrolactona (**estreptogramina grupo A**) y un polipéptido cíclico (**estreptogramina grupo B**). Su principal representante es la asociación quinupristina-dalfopristina. La **dalfopristina** (estreptogramina A) se une al ARNr 23S de la subunidad 50S y modifica la estructura terciaria de ciertas proteínas ribosómicas, de manera que aumenta la afinidad por la **quinupristina** (estreptogramina B). Ambos compuestos actúan sinérgicamente de forma bactericida, ya que por separado son bacteriostáticos. Presentan actividad principalmente frente a bacterias gram positivas (excepto *E. faecalis*) y también frente a algunas bacterias de difícil crecimiento así como anaerobios (Calvo and Martínez-Martínez, 2009).

Las **oxazolidinonas** representan una de las últimas familias de antibióticos incorporadas en la práctica clínica. Su representante en uso, el **linezolid**, actúa a nivel de la subunidad ribosómica 50S evitando la formación del complejo de iniciación 70S. Este antibiótico está indicado para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos gram positivos incluido cepas multirresistentes de *S. aureus* y *Enterococcus* spp., no siendo aprobado su uso frente a bacterias gram negativas (Azzouz and Preuss, 2022).

1.1.4 Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos

El metabolismo de los ácidos nucleicos requiere la transcripción y replicación del ADN en varias fases. La transcripción tiene lugar cuando el ADN molde contenido en el genoma bacteriano se transmite a través del ARNm dando lugar a la síntesis de ARNr que a su vez formará parte de los ribosomas bacterianos y, cuando la bacteria se divide, se produce la replicación del ADN. En ambos

procesos participan diferentes enzimas y sustratos que constituyen las dianas para la acción de diversos antibióticos, así como el ADN molde que también puede actuar como diana. Por lo general, los antibióticos que actúan a este nivel presentan cierta toxicidad para las células eucariotas ya que no son particularmente selectivos en su acción. La mayoría de los antibióticos que actúan sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes del inóculo y de la fase de crecimiento bacteriano (Calvo and Martínez-Martínez, 2009).

Las **quinolonas** y las **rifamicinas** (y análogos de la rifampicina) son los dos grupos de antibióticos clínicamente relevantes que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación del ADN.

Las **quinolonas** (**ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacino, levofloxacin, gemifloxacino, moxifloxacino**) actúan mediante la inhibición de la topoisomerasa, llamada ADN girasa, enzima esencial para la replicación del ADN, provocando la degradación del genoma y por tanto un daño irreversible que resulta en la muerte rápida de la bacteria.

Las **rifamicinas** impiden el inicio del proceso de transcripción inhibiendo la síntesis de ARNr, por lo que carecen de efecto antimicrobiano si la transcripción ya se ha iniciado. La **rifampicina**, derivado semisintético de la rifamicina B, es el antibiótico representativo de este grupo y tiene actividad bactericida frente a microorganismos gram positivos, así como *Neisseria* spp. y *Chlamydia* spp. (Calvo and Martínez-Martínez, 2009).

Los **nitrofuranos** (**nitrofurantoína, furazolidona**) y **nitroimidazoles** (**metronidazol, ornidazol, tinidazol**), actúan directamente sobre el ADN formando compuestos tóxicos para las bacterias. Los productos de reducción del grupo "*nitro*" se conjugan con el ADN produciendo su desestabilización y por lo tanto provocando la muerte celular (Dowling et al., 2017).

1.1.5 Antibióticos que inhiben vías metabólicas

Ciertos antibióticos, como las sulfonamidas y la trimetoprima, inhiben vías metabólicas tales como la síntesis de ácido fólico, impidiendo el crecimiento bacteriano. Estos antibióticos tienen por lo tanto acción bacteriostática y si se administran en forma conjunta su acción es bactericida contra un amplio espectro de microorganismos.

Las **sulfonamidas** inhiben competitivamente la incorporación de ácido paraaminobenzoico (PABA) por su semejanza química, impidiendo a partir de este precursor la síntesis de ácido fólico bacteriano, factor esencial en el crecimiento de los microorganismos.

Dentro del grupo de las **diaminopirimidinas** la **trimetoprima** inhibe la dihidrofolato reductasa (enzima reductora del ácido dihidrofólico), con lo cual obstruye la formación de ácido tetrahidrofólico, metabolito esencial para la síntesis de purinas por la bacteria.

1.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

A medida que se ha expandido el uso de antibióticos, los microorganismos han ido desarrollando mecanismos de RAM como respuesta adaptativa natural a la presión selectiva que generan los propios antibióticos. Comprender cómo estos compuestos antimicrobianos alteran la biología de los microorganismos, contribuye a comprender a su vez los mecanismos por lo que los microorganismos sucumben o evaden a los antibióticos (Bottery et al., 2021) (Figura 2).

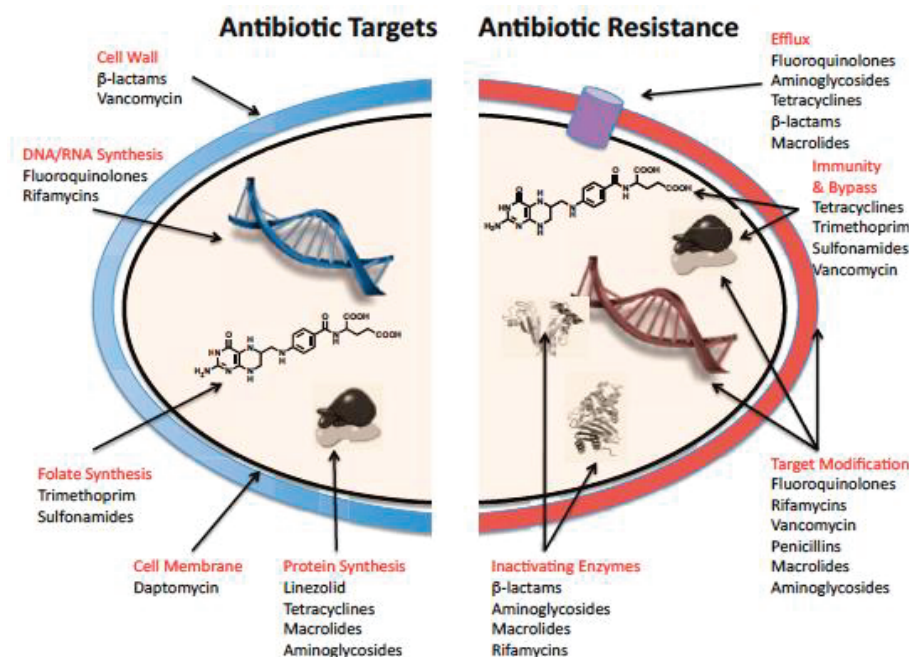


Figura 2: Dianas de los antibióticos y mecanismos de resistencia de las bacterias (Wright, 2010).

Desde el punto de vista bioquímico la mayoría de los mecanismos de resistencia antimicrobiana pueden agruparse en tres categorías: inactivación enzimática, modificación de la barrera de

permeabilidad y modificación de la diana del antibiótico. Estos mecanismos pueden combinarse en una misma célula bacteriana, permitiendo un alto nivel de resistencia a múltiples compuestos antibióticos simultáneamente (Laws et al., 2019). Del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos.

1. Inactivación enzimática del antibiótico

Este mecanismo se produce cuando enzimas elaboradas por la misma bacteria inactivan la molécula del antibiótico incapacitando su actividad. Estas enzimas pueden clasificarse según el mecanismo de acción (hidrólisis, fosforilación, acetilación o adenilación) y el antibiótico sobre el que actúan, siendo las más importantes las enzimas β -lactamasas inhibidoras de los antibióticos β -lactámicos, la acetiltransferasa (AAC) y nucleotidiltransferasa (ANT) y fosfotransferasa (APH) que actúan frente a los aminoglucósidos, y la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) que impide la acción del cloranfenicol (Laws et al., 2019). Asimismo, la mayoría de las resistencias a carbapenemas esta mediada en gran medida por la producción de carbapenemasas, las cuales son capaces de hidrolizar no solo las carbapenemas sino también todos los demás antibióticos betalactámicos (Aurilio et al., 2022).

Se han descrito más de 400 tipos de β -lactamasas que, aunque comparten el mecanismo general de acción, difieren en el tipo de sustratos que reconocen y en su susceptibilidad a sustancias inhibidoras. En particular, las llamadas betalactamasas de espectro extendido (BLEEs o ESBLs) actúan sobre un amplio rango de sustratos y están constituyendo un grave problema epidemiológico global desde principios de los años 90 del siglo pasado (Carcione et al., 2021).

2. Modificación de la barrera de permeabilidad

Los cambios producidos en la membrana celular reducen la entrada del antibiótico o facilitan su salida y por tanto impiden que el antibiótico pueda desarrollar su actividad en el interior. Las bacterias gram negativas poseen canales proteicos denominados porinas que permiten la entrada de nutrientes y otras sustancias al interior celular. Una pérdida o modificación estructural de las porinas conduce a una disminución de la permeabilidad que afecta a un amplio número de grupos de antibióticos.

Por otra parte, las bacterias también poseen proteínas en la membrana citoplasmática denominadas bombas de eflujo, capaces de expulsar al medio externo las moléculas de antibiótico que previamente han entrado. Algunas de estas bombas de eflujo tienen un reducido espectro de sustrato, mientras que otras poseen la capacidad de eliminar muchos otros compuestos como metales pesados, disolventes orgánicos y biocidas, además de antibióticos (Laws et al., 2019).

3. Modificación de la diana del antibiótico impidiendo su unión

Este mecanismo produce una reducción de la afinidad del receptor por la molécula del antibiótico de tal manera que éste no es capaz de unirse donde tiene lugar su actividad. Ejemplo de ello es la metilación de la subunidad ribosómica 23 S o la protección ribosomal, que afecta a aquellos antibióticos que actúan en la síntesis proteica (Christaki et al., 2020).

1.3 MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Todos los mecanismos de RAM están codificados en el material genético de las bacterias, pudiendo distinguir entre resistencia natural o adquirida.

1.3.1 Resistencia natural

La **resistencia natural**, también llamada intrínseca, es propia de cada familia, género, especie o grupo bacteriano, el cual posee en el genoma cualquiera de los mecanismos de RAM anteriormente descritos; por ejemplo, resistencia a ampicilina en *Klebsiella* spp. Este tipo de resistencia también puede deberse a la ausencia de la diana para un determinado antibiótico (resistencia a vancomicina en lactobacilos) o a la ausencia de rutas metabólicas o enzimas necesarias para la activación del antimicrobiano (resistencia a metronidazol en bacterias aeróbicas). En todos los casos, dicha resistencia se transmite de una generación a otra mediante transferencia genética vertical (Laws et al., 2019).

1.3.2 Resistencia adquirida

La **resistencia adquirida** es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria, bien por **mutación cromosómica** o por **transferencia genética** extracromosómica. Esta resistencia afecta a algunas bacterias de una misma especie o cepa, pero no a la totalidad. Cualquier bacteria que adquiera nuevos mecanismos de RAM, bien sea por mutación o por intercambio genético con otras bacterias, tiene la capacidad de resistir a uno o varios antibióticos, pudiendo acumular múltiples rasgos de resistencia a diferentes clases de antibióticos (Gullberg et al., 2011).

La resistencia adquirida por mutación es una alteración en la secuencia de bases del ADN que implican cambios en la información genética. El fenómeno de la mutación tiene su origen en el proceso de replicación celular de las bacterias y aparece espontáneamente con una frecuencia de 10^{-5} a 10^{-10} por célula y división, según el tipo de bacterias y las características ambientales (Florez-Cuadrado et al., 2018).

Algunas mutaciones cromosómicas pueden conferir resistencia simultánea a varios antibióticos pertenecientes a clases diferentes. Tal es el caso de bacterias multirresistentes a los betalactámicos,

cloranfenicol, trimetopina y tetraciclinas debido a la mutación que modifica las porinas provocando la impermeabilidad de la célula bacteriana. Este tipo de resistencia se da con frecuencia en algunas enterobacterias como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*.

En otras ocasiones, la mutación puede tener lugar en un gen de RAM ya conocido ampliando sus efectos. Este es el caso de las mutaciones que pueden surgir en genes que codifican enzimas específicas frente a las penicilinas. A consecuencia de esta mutación la enzima producida posee doble actividad que afecta tanto a penicilina como a cefalosporinas. Estas mutaciones puntuales se dan con menos frecuencia (Oromí, 2000).

Las resistencias adquiridas por este mecanismo son heredadas verticalmente por la población descendiente de la bacteria mutante, aunque no hay que olvidar que estas bacterias solo sustituyen a las sensibles cuando en su entorno está presente el antibiótico que las selecciona, de forma que es el propio uso de los antibióticos el que conduce a la extensión de estas resistencias.

En la **resistencia adquirida por transferencia de genes**, la bacteria puede adquirir información genética exógena que codifique resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con éstos. Esta información se acumula, moviliza y disemina entre microorganismos mediante elementos genéticos móviles de manera independiente a cualquier mecanismo de reproducción, además, la adquisición de dichos genes puede transferirse verticalmente a toda la progenie durante la reproducción bacteriana. La transferencia de material genético tiene lugar a través de **plásmidos**, **ADN desnudo**, **bacteriófagos** o **trasposones** pudiendo ser intracelular cuando se produce de un plásmido al cromosoma bacteriano o intercelular cuando tiene lugar la transferencia horizontal. Aproximadamente el 80 % de la RAM descrita en clínica corresponde a información genética transferida (Torres Manrique, 2012).

Los **plásmidos** son fragmentos circulares de ADN bicatenario, capaces de replicarse de forma autónoma, existiendo normalmente varias copias de un mismo plásmido dentro de la célula. Contienen genes que en general no son vitales para la bacteria pero que le permiten tener ventajas para mantenerse en medios adversos. Pueden ser transferidos a un amplio rango de huéspedes, traspasando incluso los límites de género y especie. Un mismo plásmido puede vehicular varios genes de resistencia, conocido como **plásmido Resistente (R)**. El ensamblaje de múltiples genes de

RAM en un solo plásmido está mediado por elementos genéticos móviles como transposones e integrones (**Figura 3**) (Laws et al., 2019).

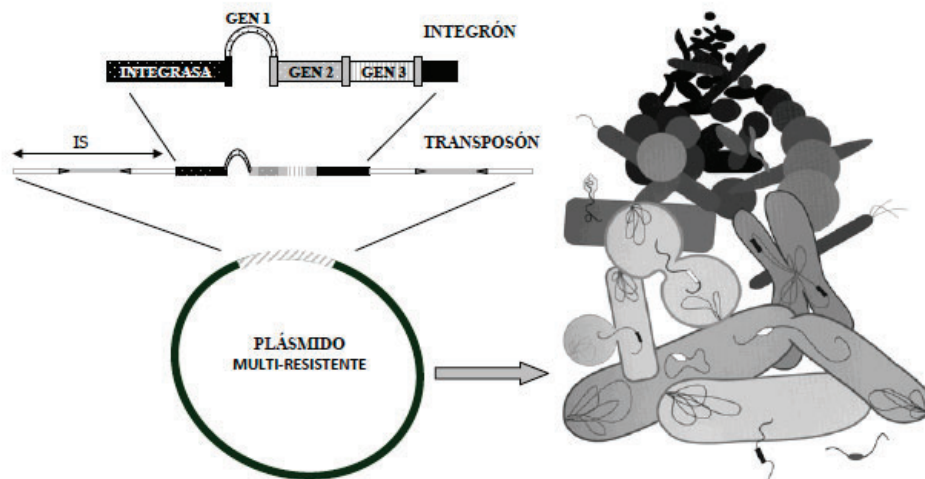


Figura 3: Representación de los integrones incorporados en transposones y posteriormente en plásmidos (Torres Manrique, 2012).

Los **transposones** son secuencias de ADN de doble cadena, con gran capacidad de movimiento ya que se comportan como unidades independientes capaces de intercambiar aleatoriamente secuencias no homólogas de ADN, entre un cromosoma y un plásmido o entre plásmidos distintos dentro de una bacteria. Los transposones participan activamente en la diseminación de genes entre bacterias filogenéticamente alejadas lo que representa una seria amenaza por su facilidad de diseminación entre bacterias de muy diversos ecosistemas (Laws et al., 2019).

Los **integrones** son sistemas genéticos capaces de captar y acumular múltiples genes de resistencia. Se caracterizan por presentar una enzima que permite integrar de manera consecutiva genes en forma de casetes génicos, principalmente de resistencia a antibióticos, permitiendo a la bacteria hospedadora una amplia versatilidad de adaptación a nuevas condiciones de supervivencia. Las bacterias que poseen integrones tienen la posibilidad de incorporar genes que se encuentran en el citoplasma bacteriano. Estos integrones pueden estar incluidos en transposones y, posteriormente éstos en plásmidos dando lugar a plásmidos R, los cuales tienen la capacidad de transferirse fácilmente entre bacterias (Laws et al., 2019).

Existen tres mecanismos de transferencia horizontal de material genético: transducción, transformación y conjugación (Florez-Cuadrado et al., 2018).

- La **transducción** es un mecanismo por el cual un bacteriófago transfiere ADN plasmídico o fragmentos de ADN cromosómico de una bacteria a otra. La transducción es un mecanismo de transferencia muy eficaz, pero debido a la estrecha especificidad de la relación virus-bacteria está limitada a intercambios entre microorganismos filogenéticamente próximos, fundamentalmente pertenecientes al mismo género.
- La **transformación** permite la adquisición y la incorporación de un fragmento de ADN desnudo presente en el medio externo por parte de las bacterias. Este mecanismo ocurre cuando las bacterias mueren y liberan fragmentos de ADN al exterior y posteriormente penetran en otra bacteria en forma de pequeños fragmentos de nucleótidos. Se puede producir entre bacterias muy distantes en el plano filogenético.
- La **conjugación** es un mecanismo que implica un contacto estrecho entre bacterias mediante el cual se transfiere ADN plasmídico de una bacteria donante a una bacteria receptora. Uno solo de los dos filamentos de ADN se transmite de una bacteria a otra de tal manera que la bacteria donante sintetiza de nuevo la hebra complementaria a partir de la hebra conservada, mientras que la bacteria receptora lo hace a partir de la hebra que ha recibido, lo que amplía notablemente la resistencia. Este mecanismo es responsable de la mayoría de las transferencias horizontales de material genético y ha sido descrito en casi la totalidad de las especies bacterianas, aunque será más eficaz cuanto menor sea la diferencia genética entre las bacterias implicadas.

1.4 GENERACIÓN Y DISEMINACIÓN DE RAM EN LA INTERFAZ HOMBRE-ANIMAL-AMBIENTE

La selección de RAM es un mecanismo evolutivo generado como consecuencia de enfrentar las bacterias a cualquier sustancia antimicrobiana. Coincidiendo con el uso masivo de los antibióticos, desde hace poco más de 70 años, la prevalencia de la resistencia ha aumentado, no solo en bacterias patógenas causantes de la infección, sino también en las comensales, que son muy mayoritarias, seleccionando cepas resistentes y genes de resistencia. En circunstancias normales, el intercambio de material genético entre bacterias no es frecuente, sin embargo, la intensa presión selectiva generada por el uso de los antibióticos no solo selecciona aquellas resistentes, sino que potencia el mecanismo de mutación e induce la transferencia y recombinación genética, favoreciendo su diseminación (**Figura 4**) (McEwen and Collignon, 2018).

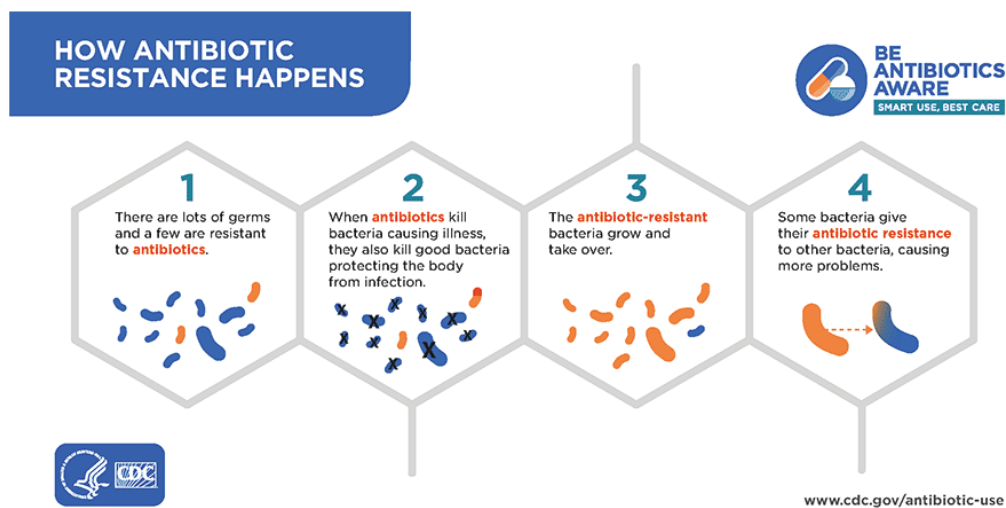


Figura 4: Efecto de la presión selectiva antibiótica en bacterias (CDC, 2021).

En este contexto ha surgido el concepto “**resistoma**”, el cual se define como la totalidad de los genes de RAM en el amplio ecosistema (humano, animal y ambiental). Cada comunidad tiene un conjunto muy importante de genes de resistencia distintos y la microbiota de cada uno de los ambientes actúa como reservorio de resistoma, pudiendo éste ser transferido entre diferentes especies y géneros bacterianos de distintos ambientes (**Figura 5**) (Aslam et al., 2021).

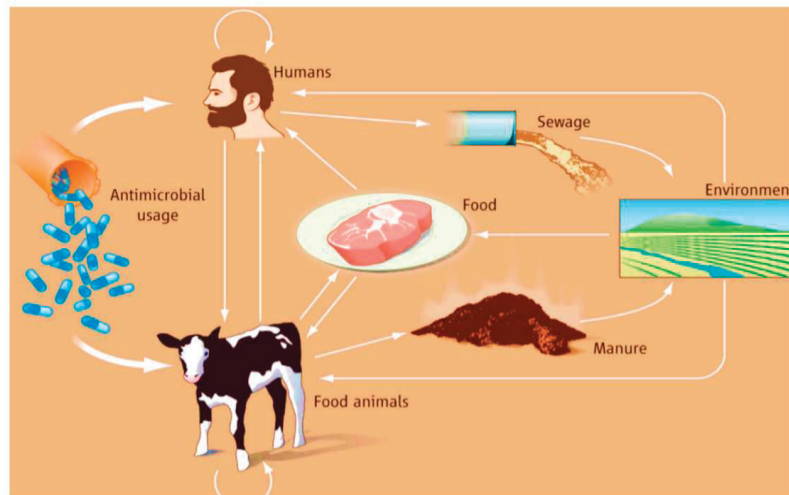


Figura 5: Representación gráfica de las rutas de transmisión de RAM entre animales de producción, medio ambiente y humanos (McEwen and Collignon, 2018).

Existen evidencias claras de transmisión y diseminación al ser humano de bacterias resistentes a los antibióticos procedentes de fuentes no humanas, y cada vez hay más evidencias que implican a los genes de resistencia de bacterias ambientales como el principal reservorio de los genes de resistencia de las bacterias que colonizan e infectan a los humanos y los animales. Además de considerar el origen ambiental de genes de resistencia, hay que tener en cuenta que dichos genes pueden evolucionar una vez son adquiridos por bacterias patógenas o comensales del hombre o de animales. El intestino humano y de los animales, donde hay una alta densidad bacteriana, es especialmente adecuado para el intercambio de genes inter e intraespecies y de selección de bacterias resistentes por tratamientos antibióticos (Aslam et al., 2021).

La transmisión de microorganismos de un ambiente a otro trae consigo la diseminación de reservorios de RAM, lo que acarrea consecuencias aún más graves teniendo en cuenta que el tratamiento de dichas infecciones requiere principalmente el uso de antibióticos, tanto en humanos como en animales (EFSA & ECDC, 2018).

La interrelación existente entre la salud humana, veterinaria, los sistemas de producción de alimentos y piensos y los entornos agroecológicos respalda la necesidad de aplicar el enfoque de **Una Sola Salud (One Health)** para hacer frente a la amenaza de la RAM. Este concepto se considera el enfoque más útil para comprender la dinámica de las enfermedades infecciosas y otros factores relacionados con la RAM. El mayor riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas se produce

en la interfaz entre el ser humano y los animales a través de la exposición directa o indirecta, pudiendo intervenir los productos derivados de éstos o su entorno. Se estima que al menos seis de cada diez infecciones conocidas en humanos han sido transmitidas a partir de animales, y tres de cada cuatro enfermedades infecciosas nuevas o emergentes en las últimas décadas son zoonosis (McEwen and Collignon, 2018)

Los clones virulentos que causan las infecciones son muchas veces más transmisibles y, por tanto, tienen mayor probabilidad de estar expuestos a antibióticos y de adquirir determinantes de resistencia a éstos. La prevalencia local y global de resistencia depende de la diseminación local y global de ciertos clones resistentes con especial capacidad, en comparación con otros, para colonizar diversos ecosistemas y persistir en ellos (Woodford et al., 2011).

Factores como la falta de agua potable, la pobreza y una densidad alta de población favorecen la extensión, tal es el caso de las bacterias que causan enfermedades transmitidas por la vía fecal-oral. Otra vía posible es la de los animales de compañía a humanos y viceversa. También los animales salvajes pueden actuar como reservorio y potencial fuente de diseminación y la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en aves migratorias podría favorecer la diseminación de la resistencia a larga distancia. Además, la presencia de microorganismos resistentes en la cadena alimentaria es una ruta potencial de exposición a través de la ingestión de alimentos.

A continuación, se analizan las principales rutas de diseminación y propagación de la RAM entre los diferentes ecosistemas.

1.4.1 Medicina humana

En medicina humana, el uso de los antibióticos está indicado para el tratamiento clínico individual de los pacientes. Su uso en profilaxis tanto individual como colectivo es limitado y se reduce a casos en los que es necesario gestionar una infección grave y fácilmente transmisible.

Un tratamiento a tiempo con los agentes antimicrobianos apropiados es la intervención más efectiva para reducir el riesgo de resultados deficientes ante infecciones graves. El tratamiento efectivo asegura la prevención y predispone ante complicaciones bacterianas que pueden darse en caso de intervenciones médicas como cirugías mayores, trasplante de órganos, terapias intensivas,

implantación de dispositivos o tratamientos agresivos frente al cáncer. De hecho, los antibióticos se encuentran entre los medicamentos más frecuentemente recetados en medicina humana y en el 50% de las ocasiones no se prescriben o no se utilizan de manera óptima (CDC, 2013).

Estudios publicados con anterioridad han evidenciado la existencia de una relación entre el consumo de antibióticos y la presencia de RAM, siendo los países nórdicos los que presentan menores tasas de RAM y los países del sur de Europa, los que mayores. Sin embargo, esta relación sólo se ha estudiado en un número limitado de microorganismos resistentes asociados a infecciones hospitalarias graves (*Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Escherichia coli*) (McDonnell et al., 2017).

Tal y como recoge el último informe del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) sobre el uso de antimicrobianos en la Unión europea, en 2019, el consumo medio total de antimicrobianos tanto en el sector comunitario como en el hospitalario en Europa fue de 16,4 dosis diarias definidas (DDD) por 1.000 habitantes, oscilando entre 8,5 y 28,9 DDD por 1.000 habitantes en Holanda y Chipre, respectivamente, lo que demuestra una amplia variación entre países. Durante el periodo 2011-2020, se han observado cambios estadísticamente significativos, siendo Bélgica, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Italia, Holanda, Noruega y Suiza los países que presentaron mayor disminución en el consumo de antibióticos en el periodo 2019-2020 (ECDC, 2021).

1.4.2 Medicina veterinaria y producción animal

En medicina veterinaria hay notables diferencias en la manera en la que los antimicrobianos son usados en animales de compañía en comparación con los animales de producción, siendo en los primeros bastante similar al uso en humanos, usándose de forma individual con el objetivo de tratar una infección o en algunos casos como profilaxis después de una cirugía (McEwen and Collignon, 2018). Sin embargo, en animales destinados a la producción de alimentos con frecuencia los antibióticos son utilizados con el objetivo de prevenir, controlar o tratar enfermedades, así como por intereses zootécnicos. En este caso, por cuestiones prácticas y de eficiencia, los medicamentos se administran a un grupo de animales a través del alimento o del agua incluso cuando la mayoría de los animales no presentan ningún signo de infección, como es el caso de las explotaciones

porcinas o avícolas, aunque en otros casos, el antibiótico se administra con un objetivo terapéutico para tratar de forma individual a animales que presentan sintomatología clínica (**Figura 6**).

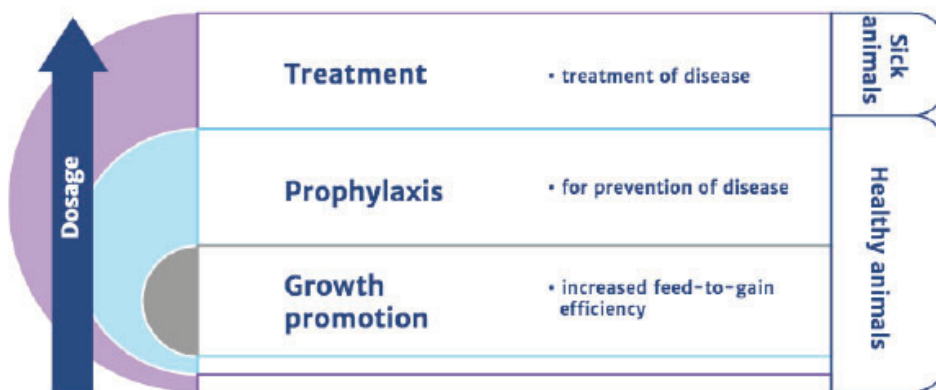


Figura 6: Uso de antibióticos en ganadería (O'Neill, 2015).

El concepto metafílaxia es un término usado para describir el tratamiento terapéutico y/o profiláctico a nivel de grupo. En la mayoría de los casos se administran dosis terapéuticas de forma masiva a un grupo de animales con alto riesgo de infección, debido a la exposición a algún agente infeccioso o condiciones de hacinamiento (McEwen and Collignon, 2018). Está demostrado por O'Neill (2015) que, en acuicultura, las sustancias que se utilizan o se añaden a los piensos, así como los residuos excretados por los peces, pueden permanecer en el ambiente acuático por un periodo largo de tiempo y ejercer una presión selectiva que puede propagarse rápidamente por el agua.

El uso de antibióticos como **promotores del crecimiento** ha sido la práctica más polémica en la producción animal. Durante las últimas décadas la administración masiva a dosis subterapéuticas durante largos periodos, con el fin de promover el crecimiento animal, ha sido justificada por motivos económicos, ajenos al tratamiento de infecciones. Aunque las investigaciones realizadas no son del todo concluyentes, a lo largo de las últimas décadas los antibióticos se han considerado como sustancias cuyos efectos sobre la microbiota del sistema gastrointestinal de los animales desencadenan mecanismos que contribuyen a un mejor aprovechamiento de las proteínas que constituyen la dieta.

La utilización de este tipo de sustancias adquirió tales proporciones que se estima que tan solo en el ámbito veterinario, a finales del siglo XX en España, se estaban utilizando aproximadamente 5.100

toneladas de antibióticos, casi igualando las 5.400 que se habían destinado para tratamientos terapéuticos en personas (Estévez, 2016). Entre los antibióticos permitidos, algunos como colistina, fluoroquinolonas y macrólidos están categorizados a día de hoy por la OMS como críticos para su uso en salud humana (McEwen and Collignon, 2018).

Según los cálculos realizados por la empresa americana IMS Health, (*Intercontinental Marketing Statistics*), en 2012 el consumo de antibióticos en el sector animal en EE. UU. fue entorno a 9.000 toneladas frente al consumo humano de 3.400 toneladas (O'Neill, 2015). En términos globales, algunos autores (Cheng et al., 2019) estiman que la ingesta de un kilogramo de carne procedente de vacuno, pollo o cerdo conlleva la administración de 45 mg, 148 mg, y 172 mg de antibiótico, respectivamente, estimaciones que se espera que se incrementen un 67 % de 2010 a 2030.

La Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drugs Administration, FDA*) afirma que más del 70 % de los antibióticos vendidos en EE. UU. y considerados clínicamente importantes para los humanos, son usados en ganadería. De los 41 antimicrobianos que en 2012 fueron autorizados para su venta en EE. UU., 31 fueron considerados como importantes para la salud humana, siendo únicamente 10 los que se deberían considerar para su uso en animales (**Figura 7**). En consecuencia, existen muy pocas alternativas terapéuticas para tratar animales cuyo uso no supongan un riesgo para la salud humana (O'Neill, 2015).

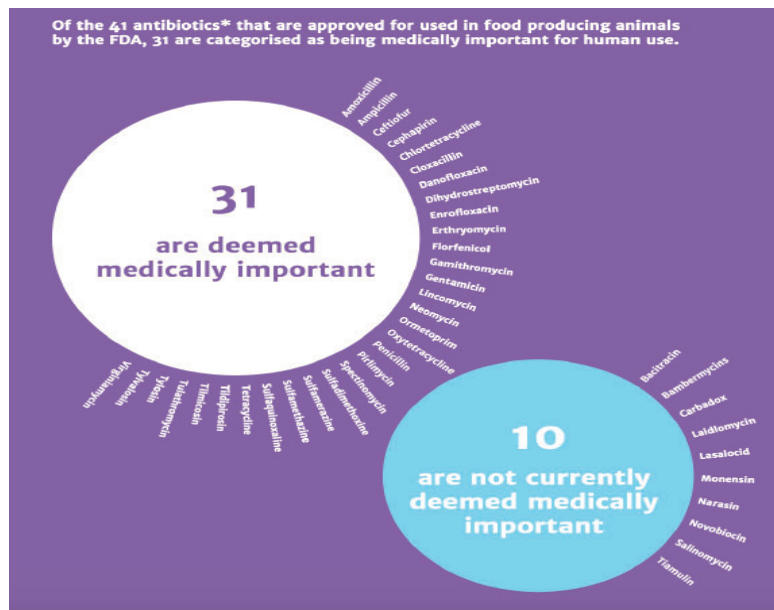


Figura 7: Antibióticos autorizados en EEUU en producción animal y su interés en salud humana (O’Neill, 2015).

En Europa, en cambio, el consumo de antibióticos es más elevado en humanos que en los animales de producción. Según el último informe publicado conjuntamente en 2021 por el ECDC, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority, EFSA*) y la Agencia Europea del Medicamento (*European Medicines Agency, EMA*) sobre el análisis de RAM y consumo de antimicrobianos, la media de consumo de antibióticos en Europa en 2017 fue mayor en humanos (130 mg/kg) que en animales de producción (108,3 mg/kg). Estas cifras muestran una reducción significativa en el consumo de antibióticos en ambos sectores con respecto a años anteriores, siendo la primera vez que se obtienen resultados de consumo inferiores en animales de producción que en humanos desde que comenzó esta iniciativa en 2011. Sin embargo, 8 países de los 29 que participaron en dicho programa, todavía presentan cifras de consumo superiores en animales de producción (ECDC, EFSA & EMA, 2021a). La **Figura 8** muestra la diferencia del consumo de antimicrobianos en humanos y animales en 27 países de la UE que mostraron datos durante el periodo 2014-2018.

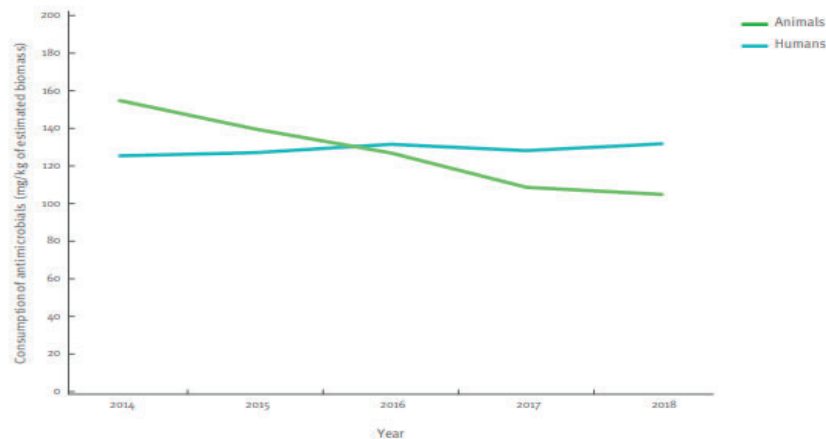


Figura 8: Media ponderada del consumo total de antimicrobianos en seres humanos y animales productores de alimentos durante el periodo 2014-2018 en 27 países de la Unión Europea (ECDC, EFSA & EMA, 2021a).

A día de hoy, en Europa, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento está prohibido y en el resto del mundo esta práctica es bastante limitada. En 2015, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) informó una reducción del 51 % en el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en los 151 países declarantes en 2012. Aun así, la OMS estimó que un 48 % de los 28 millones de toneladas de antibióticos producidos en el mundo cada año se destinaban a su uso en ganadería, hecho que continúa preocupando a la sociedad y por el que la OMS ha promovido actividades y programas encaminados a acabar con esta práctica (Estévez, 2016).

A nivel mundial, tanto Europa como Estados Unidos han sido los principales reguladores del uso de antibióticos, junto con algunos países que han seguido su ejemplo, particularmente el enfoque de EE. UU. (McEwen and Collignon, 2018).

En 1970 tras los primeros indicios de RAM, la Comunidad Europea expresó su preocupación por el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal. Así, la Directiva del Consejo 70/524/CEE clasificó el uso de antibióticos a pequeñas dosis como aditivos, reforzando la idea de que los antibióticos utilizados bajo este concepto no debían afectar a la salud humana o animal. Dos décadas después, el 15 % de los antibióticos que se utilizaban en el sector de la producción animal en Europa eran destinados a su uso como promotores del crecimiento.

Como consecuencia de la detección de resistencias cruzadas, en 1997 la avoparcina y otros antibióticos empleados como promotores de crecimiento fueron suprimidos, y finalmente, en 2005

se prohibió el uso de ciertos antimicrobianos como estimulantes así como la autorización de nuevos antibióticos como promotores en todo el territorio de la UE (Estévez, 2016).

Algunos de los países comunitarios adoptaron medidas de modo individualizado para proteger sus producciones y garantizar la seguridad de sus consumidores. Tal es el caso de Suecia, que en 1995 prohibió el uso de antibióticos como promotores de crecimiento preservando su uso únicamente como tratamiento terapéutico. Es por ello que dentro de los 27 países de la UE existe variabilidad del orden de 100 veces en el uso de antibióticos, sin existir diferencias aparentes en la productividad (WHO, 2016a).

Fruto de los planes de acción nacionales implantados en España, las ventas de antimicrobianos para uso en producción animal se redujeron en un 43 % entre 2011 y 2020. No obstante, según los datos de la EMA, en 2019 España fue el país europeo que facturó más antibióticos para uso veterinario, no obstante, ajustando estas cifras a la población animal existente en cada país, ocupa el séptimo lugar después de Chipre, Polonia, Italia, Portugal, Hungría y Bulgaria (**Figura 9**) (AEMPS, 2019; EMA, 2021, 2020).

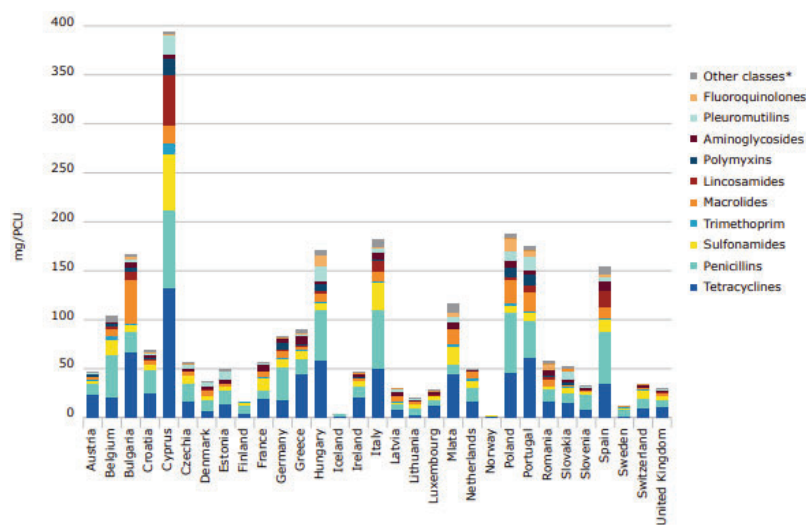


Figura 9: Ventas de varias clases de antibióticos para uso en animales de producción (mg/PCU), en 31 países europeos en 2019 (EMA, 2021).

*PCU (population correction unit)

Recientemente, el 28 de enero de 2022, ha entrado en vigor el Reglamento (UE) 2019/6 que establece la nueva normativa sobre el uso del medicamento veterinario. El Reglamento prevé una

amplia gama de medidas concretas para luchar contra la RAM con el enfoque de *Una Sola Salud*, tales como:

- La prohibición del uso preventivo de antibióticos en grupos de animales.
- Las restricciones al uso metafiláctico de antimicrobianos en animales.
- La prohibición reforzada del uso de antimicrobianos para promover el crecimiento y aumentar el rendimiento (además de la prohibición de 2006 de usar antibióticos como promotores del crecimiento en los piensos).
- La posibilidad de reservar determinados antimicrobianos únicamente para los seres humanos.
- La obligación de los Estados Miembros de recopilar datos sobre las ventas y el uso de antimicrobianos en animales.

A diferencia de las estrategias implantadas en Europa durante las últimas décadas; Estados Unidos, Canadá y muchos otros países, no establecieron una separación entre antimicrobianos destinados para animales de producción y aquellos usados en terapia veterinaria o los empleados como aditivos para piensos. En América del Norte no se prohibió el uso de medicamentos de relevancia clínica para la salud humana como promotores del crecimiento hasta el año 2017. Actualmente y tras años de conflictos, la nueva normativa de los EE. UU. se iguala con la situación establecida en 2006 en la Unión Europea, representando un punto de inflexión importante en lo que ha sido una lucha de décadas sobre el uso de antibióticos en animales de producción en los EE. UU. (McEwen and Collignon, 2018).

1.4.3 Agricultura

Al igual que el ser humano y los animales, los vegetales también son susceptibles de ser infectados por microorganismos difíciles de controlar, dando lugar a devastadoras pérdidas económicas en la producción agrícola (FAO, 2016). Los sistemas de vigilancia y recopilación de datos sobre el consumo anual total de antimicrobianos a nivel mundial en el sector agrícola son deficientes, por lo que no se pueden estimar. Sin embargo, se calcula que la cantidad de antimicrobianos utilizada en la producción de cultivos es relativamente baja en comparación con el uso en la ganadería siendo del 0,2 al 0,4 %.

A pesar de todo, la administración de antibióticos en árboles y plantas es notoriamente diferente al uso clínico, ya que se aplica en áreas muy extensas en regiones de producción densa. Gran parte de las sustancias utilizadas van a parar a aguas residuales y alcantarillados, favoreciendo de esta manera la aparición y diseminación de bacterias resistentes (O'Neill, 2015).

1.4.4 Cadena alimentaria

La cadena alimentaria es un ecosistema en el que coexisten una gran variedad de microorganismos. En este entorno, únicamente se emplean antibióticos en producción primaria, lo que genera una gran presión selectiva en el tracto gastrointestinal de los animales, además de un ambiente idóneo para la interacción e intercambio de material genético entre las bacterias de su microbiota (Cheng et al., 2019).

Durante el procesado de los alimentos se utilizan agentes desinfectantes para el control de los microorganismos, tales como amonios cuaternarios o metales pesados, los cuales ejercen una presión selectiva fomentando la resistencia cruzada y la co-resistencia.

La **resistencia cruzada** tiene lugar cuando uno o varios genes codifican un mecanismo de resistencia que puede afectar a múltiples productos químicos y/o antibióticos con mecanismos de acción similares. Un ejemplo de ello son las bombas de eflujo que actúan disminuyendo la concentración intracelular de sustancias antimicrobianas, mediante la expulsión de sustancias indeseables al exterior de la bacteria. La adquisición de este mecanismo de resistencia dará lugar a su vez a resistencia a una gran variedad de antibióticos, aún cuando éstos no están presentes, acelerando la transferencia horizontal de genes de RAM asociados a plásmidos (Laws et al., 2019).

La **co-resistencia** es el fenómeno por el cual la información genética que codifica varios mecanismos de resistencia no relacionados se transmite en una sola acción y se expresa en los nuevos huéspedes bacterianos.

Por otra parte, en la industria alimentaria se emplean sistemas de conservación de alimentos con el objetivo de reducir o prevenir el crecimiento microbiano. En muchas ocasiones se aplican tratamientos a dosis subletales permitiendo mantener las características nutricionales y sensoriales de los alimentos. Estos tratamientos de baja intensidad incrementan la resistencia al estrés de las

bacterias mediante adaptaciones fenotípicas y/o genotípicas que en ocasiones se asocian con un incremento de la resistencia a sustancias antimicrobianas. Algunos trabajos han demostrado que determinados factores de estrés pueden incrementar la tasa de transferencia horizontal de genes de RAM (EFSA, 2019).

Por ello, a lo largo de toda la cadena alimentaria tiene lugar un proceso continuo de interacción que tiene como consecuencia la aparición y diseminación de microorganismos resistentes en el producto final (Cheng et al., 2019).

Los alimentos tanto de origen vegetal como animal que se consumen crudos o poco cocinados son una fuente de transmisión de bacterias resistentes y su ingesta supone una de las principales vías de transmisión de determinantes genéticos de RAM al hombre (Florez-Cuadrado et al., 2018).

1.4.5 Medio ambiente

El uso indebido de antimicrobianos en las personas, las plantas y los animales contribuye a la carga ambiental de bacterias, genes, residuos y sus metabolitos resistentes a los antimicrobianos. De esta manera el medio ambiente se convierte en un reservorio natural para las RAM, que se propagan por el agua, el suelo y el aire.

Las vías de diseminación de las RAM en el medio ambiente se resumen en las siguientes:

- Aguas residuales de las plantas de fabricación de antimicrobianos
- Efluentes y lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales
- Aguas residuales de los hospitales, hogares y de las zonas urbanas
- Suelos contaminados por tratamientos antimicrobianos utilizados para el control de enfermedades en la producción de plantas
- Residuos en estiércol y desechos aplicados como fertilizantes para cultivos

Cada año se generan cientos de toneladas de residuos antibióticos que una vez excretados por las aguas residuales, encuentran su destino en el medio ambiente. El suelo y otras matrices medioambientales albergan poblaciones bacterianas muy diversas que conviven con la existencia de estos residuos antibióticos. El constante vertido al medio ambiente de antibióticos a través de aguas residuales supone un riesgo de selección de bacterias resistentes sobre todo en lugares como

las depuradoras, donde en poco espacio hay bacterias ambientales, de origen humano y animal. Las depuradoras se consideran lugares especialmente adecuados para la selección y posterior diseminación de bacterias resistentes y de genes de resistencia en el medio ambiente.

La actividad humana y animal en estos ambientes conlleva un intercambio y adaptación continua de microorganismos, que se traduce en la aparición y diseminación de genes que confieren RAM.

1.5 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA RAM

El origen multifactorial y alcance global de la RAM requiere acciones inmediatas, integradas y multisectoriales bajo el enfoque *Una Sola Salud*, de manera que la solución requiere un abordaje coordinado, colaborativo, transversal y multidisciplinar en el interfaz animal-ser humano-ecosistema.

La acción más sencilla e importante para evitar el desarrollo de resistencias y la propagación de infecciones resistentes a antibióticos es modificar el uso de antibióticos. Se ha comprobado que, hasta la mitad de los antibióticos administrados en medicina humana, así como gran parte de los utilizados en medicina veterinaria son innecesarios y hace su uso menos seguro. El compromiso de un tratamiento seguro comprende la selección del antibiótico correcto, administración de manera apropiada y dispensación sólo cuando son necesarios para tratar infecciones (CDC, 2013).

Pero más allá de los riesgos para la salud, las consecuencias indirectas de la resistencia a los antimicrobianos repercuten en gran medida en la economía mundial. Las pérdidas económicas debidas a la menor productividad a causa de la enfermedad y el incremento de los costos de tratamiento tienen amplios efectos en el desarrollo. Es necesario invertir a largo plazo y contar con el apoyo financiero y técnico de los países en desarrollo para fortalecer los sistemas de salud y contribuir al acceso y uso de agentes antimicrobianos de forma más adecuada (WHO, 2016b). Organismos internacionales como la OMS, la FAO (Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura) y la OIE están implementando planes de acción que impliquen a todos los sectores con el fin de evitar el aumento y diseminación de la RAM.

1.5.1 Estrategia mundial de la OMS, la OIE y la FAO

El problema de la RAM requiere esfuerzos a nivel mundial, así como una estrecha cooperación internacional. Actualmente constituye uno de los tres objetivos prioritarios de la Alianza Tripartita firmada por la OMS, la FAO y la OIE con el objetivo de luchar contra las enfermedades de gran impacto sanitario y económico con un enfoque *Una Sola Salud*.

En 2015, la Asamblea Mundial de la Salud adoptó un plan de acción que destacaba la necesidad de coordinar diferentes sectores como, medicina humana y veterinaria, agricultura, finanzas y medio

ambiente, además de impulsar programas informativos dirigidos a los consumidores. Este plan de acción mundial tiene por objetivo principal asegurar la continuidad del tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros y de calidad garantizada, que se usen de modo responsable y sean accesibles a todas las personas que los necesiten (WHO, 2019a). La estrategia de acción aborda cinco objetivos principales:

- 1) Mejorar el **conocimiento de la RAM** mediante la incorporación y mejora de programas de comunicación pública destinados a diferentes sectores como salud humana, salud animal, agricultura y consumidores.
- 2) **Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación.** Los gobiernos, organismos, organizaciones, industria y el sector académico han de generar conocimiento y ser capaces de llevarlo a la práctica con el objetivo de dar apoyo para establecer medidas e inversiones costo-eficaces. Esto supone el estudio de incidencias y prevalencias de los diferentes tipos de patógenos y su distribución geográfica relacionada con la RAM, conocer como aparece, se propaga y circula la RAM entre los diferentes hábitats, caracterizar con rapidez la RAM reciente y entender los mecanismos asociados, así como realizar estudios clínicos e investigaciones encaminados a mejorar la vigilancia, el diagnóstico y tratamiento de las infecciones bacterianas comunes.
- 3) **Reducir la incidencia de las infecciones** con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de la infección. Trabajar en la mejora de acciones básicas como la higiene y las medidas de prevención de las infecciones que contribuyan a una menor propagación de infecciones resistentes a los antibióticos sobre todo en centros de salud. En este objetivo, las vacunas juegan un importante papel ya que la inmunización previene de enfermedades infecciosas cuyo tratamiento exige el uso de medicamentos antimicrobianos, además de reducir la prevalencia de infecciones víricas tanto en salud humana como en el sector de la producción pecuaria.
- 4) **Buen uso de los agentes antimicrobianos** en la salud humana y animal, mediante la reducción de los niveles globales de uso de antibióticos, así como la selección de los tipos de antibióticos a utilizar. Se necesitan medios de diagnóstico efectivos, rápidos y de bajo costo que permitan una prescripción o administración basada en datos científicos.

- 5) Preparar los argumentos económicos a favor de una **inversión sostenible** que tenga en cuenta las necesidades de todos los países y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

En consonancia con estos objetivos, los Estados Miembros y los asociados nacionales e internacionales de diferentes sectores han de trabajar sus respectivos planes de acción nacionales apoyándose en las normas y directrices establecidas por organismos intergubernamentales como la Comisión del Codex Alimentarius, la FAO y la OIE (WHO, 2016b).

Debido a esta relación entre uso de antibióticos en animales productores de alimentos y el incremento de infecciones resistentes en humanos, la OMS está trabajando mediante el establecimiento y expansión de una vigilancia integrada de la resistencia antimicrobiana en bacterias transmitidas por alimentos, aplicando el enfoque *Una Sola Salud*.

Las normas y directrices de la OIE promueven el uso responsable y prudente de los agentes antimicrobianos en los animales impulsando el apoyo a los servicios veterinarios, así como contribuyendo a políticas que mejoren y defiendan la sanidad y el bienestar de los animales.

El papel de la FAO en la lucha contra la RAM consiste en apoyar a los gobiernos, productores y comerciantes para que adopten medidas destinadas a minimizar el uso de antimicrobianos y reducir la resistencia a los mismos, teniendo en cuenta las necesidades de los sectores de la alimentación y la agricultura en todo el mundo (FAO, OIE & WHO, 2010).

En la **Figura 10**, se refleja gráficamente las áreas de trabajo prioritarias consideradas por la FAO para la lucha frente a las RAM.



Figura 10: Esferas de trabajo prioritarias de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en relación con los cinco objetivos del Plan de Acción Mundial sobre la RAM (FAO, 2016).

Posterior a la implantación del plan de acción mundial y con el objetivo de analizar el progreso de los países en el marco de la RAM, se ha establecido un plan de monitoreo y evaluación donde expertos en salud humana y animal de todo el mundo pertenecientes a la OMS, la OIE y la FAO, se reúnen y evalúan si la actuación y las acciones establecidas están teniendo el efecto deseado. Además, este monitoreo permite establecer nuevos indicadores que muestren de una forma realista los avances de cada país en la lucha contra la RAM y proporcionen datos útiles para la toma de decisiones operativas y estratégicas en los próximos 5 a 10 años (FAO, OIE & WHO, 2019).

En este contexto, la OMS ha elaborado una lista de antimicrobianos de importancia crítica para la salud humana teniendo en cuenta, entre otros criterios, las consecuencias para la salud pública que tiene el uso de antimicrobianos en animales destinados a la producción de alimentos **Figura 11**). Dentro de los antibióticos de máxima prioridad se encuentran las quinolonas, cefalosporinas de tercera, cuarta y quinta generación, macrólidos y cetólidos, glucopeptidos y polimixinas, dado que son una de las pocas alternativas disponibles para tratar las infecciones graves en humanos. Otros antibióticos que están incluidos en la lista como antimicrobianos de importancia crítica y de gran prioridad son los aminoglucósidos, carbapenémicos, monobactámicos y penicilinas entre otros (WHO, 2021).

Clase de antimicrobiano		Criterio / Factor de priorización (Sí = ●)				
ANTIMICROBIANOS DE IMPORTANCIA CRÍTICA		C1	C2	P1	P2	P3
<i>MÁXIMA PRIORIDAD</i>						
De importancia crítica	Máxima prioridad					
	Cefalosporinas (de tercera, cuarta y quinta generación)	●	●	●	●	●
	Glicopéptidos	●	●	●	●	●
	Macrólidos y cetólidos	●	●	●	●	●
	Polimixinas	●	●	●	●	●
Quinolonas	●	●	●	●	●	
<i>GRAN PRIORIDAD</i>						
	Aminoglucósidos	●	●		●	●
	Ansamicinas	●	●	●	●	
	Carbapenémicos y otros penémicos	●	●	●	●	
	Gliciliclinas	●	●	●		
	Lipopéptidos	●	●	●		
	Monobactámicos	●	●	●		
	Oxazolidinonas	●	●	●		
	Penicilinas (antipseudomonales)	●	●		●	
	Penicilinas (aminopenicilinas)	●	●		●	●
	Penicilinas (aminopenicilinas con inhibidores de la β-lactamasa)	●	●		●	●
	Derivados del ácido fosfónico	●	●	●	●	
	Fármacos para tratar únicamente la tuberculosis/enfermedades micobacterianas	●	●	●	●	

Figura 11. Clases de antibióticos categorizados de importancia crítica para la medicina humana (WHO, 2019a).

C1 = Criterio 1; Clase de antimicrobianos que constituye uno de los pocos o el único tratamiento disponible para tratar infecciones bacterianas graves en humanos.

C2 = Criterio 2; Clase de antimicrobianos utilizada para tratar infecciones humanas causada por: 1) bacterias que pueden ser transmitidas a los humanos a partir de fuentes no humanas, o 2) bacterias que pueden adquirir genes de resistencia a partir de fuentes no humanas.

P1 = Factor de priorización 1; Gran número de personas en la comunidad o en determinados grupos de alto riesgo afectadas por enfermedades para las cuales son muy pocos los antimicrobianos que se pueden elegir.

P2 = Factor de priorización 2; Clase de antimicrobianos de uso muy frecuente en cualquier indicación médica humana o en determinados grupos de alto riesgo, dado que dicho uso puede favorecer la selección de resistencias.

P3 = Factor de priorización 3; Clase de antimicrobianos que se utiliza para tratar infecciones humanas en las que ya hay numerosas pruebas de la transmisión de bacterias resistentes o genes de resistencia a partir de fuentes no humanas.

1.5.2 Estrategia Europea

Desde 1999, Europa es líder en la puesta en marcha de programas e iniciativas que aspiran a coordinar y armonizar las actividades de investigación en materia de RAM, con una inversión de más de 1.300 millones de euros en la investigación de RAM.

En 2011 la Comisión Europea tras el análisis del problema estableció un plan de acción destacando el enfoque *Una Solo Salud* y abordando la RAM tanto en humanos como en animales. En 2017, tal y

como lo indicaba el plan de acción mundial establecido por la OMS, se puso en marcha un nuevo plan de acción europeo reforzando la política de *Una Sola Salud*, permitiendo expandir las iniciativas, así como mejorar la recopilación de datos, seguimiento y vigilancia de RAM incluyendo no solo el sector de la salud humana y animal, sino también el medio ambiente (Comunicación de la Comisión Europea, 339 final, 2017).

El objetivo general de este plan consiste en mantener la posibilidad de un tratamiento eficaz de las infecciones en seres humanos y animales. Para ello proporciona medidas que permiten atenuar la aparición y propagación de RAM tanto dentro como fuera de la UE fomentando el uso apropiado de agentes antimicrobianos, la prevención y control de infecciones y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos efectivos o alternativas para el tratamiento.

La participación de los organismos científicos de la UE, en particular la EFSA, la EMA y el ECDC permite adoptar conjuntamente dichas medidas permitiendo reforzar la vigilancia, coordinar la ejecución de normas, así como concienciar a la población. Se prevé que este plan sea una vía de acción eficaz contra el aumento de la RAM mitigando así el impacto negativo en la economía, por lo que puede considerarse una contribución al crecimiento económico, a unos presupuestos sanitarios sostenibles mediante la reducción de los costes sanitarios y a una población sana y productiva.

Sobre la base de los datos recopilados por los Estados miembros de la UE, la EFSA elabora en cooperación con el ECDC informes resumidos anuales que ilustran la evolución de la situación de la RAM en Europa.

1.5.3 Plan Nacional frente a Resistencia a los Antibióticos (PRAN)

En 2014, en España, el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de la Salud (CISNS) y la Conferencia Intersectorial de Agricultura aprobaron el **Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos** (PRAN). Siguiendo las recomendaciones de la Alianza Tripartita (OMS, OIE y FAO) así como las directrices de la Comisión Europea, la EMA y la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) han coordinado, con la colaboración de 8 ministerios (Sanidad, Agricultura, Economía, Educación, Interior, Defensa, Ciencia y Transición Ecológica), 70 sociedades científicas, organizaciones colegiales, asociaciones profesionales y universidades y más

de 300 colaboradores expertos, la instauración de dicho plan, manteniendo el enfoque *Una Sola Salud*.

Tras la instauración del PRAN 2014-2018 se observó una disminución muy relevante en el consumo de antibióticos que constituyó un cambio de tendencia significativo, con una reducción del 11,8 % (desde 2015 a 2019) y del 58,84 % (desde 2014 a 2019) en salud humana y área veterinaria, respectivamente (AEMPS, 2019).

En salud humana se mejoró el sistema de vigilancia del consumo de antibióticos, aprobándose el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria (**IRAS**), se implementaron los Programas de Optimización de Uso de los Antibióticos (**PROA**) tanto en hospitales como en Atención Primaria y aproximadamente el 72 % de los hospitales españoles desarrollaron alguna iniciativa para la optimización del uso de los antibióticos. Asimismo, se ha creado el Registro de Utilización de Antimicrobianos de Alto valor estratégico y reciente aprobación (**RAVARA**) para conocer las condiciones reales de utilización de estos antimicrobianos en tiempo real.

En sanidad animal se trabajó en la implementación de un sistema nacional de recogida de datos de prescripción veterinaria de antibióticos, mejorando de esta manera el sistema nacional de recogida de datos de ventas de antibióticos de uso veterinario y poniendo en marcha el **Programa REDUCE** en distintos sectores ganaderos, consiguiendo una reducción del consumo de colistina del 85,8 % entre 2015 y 2019. Asimismo, se ha desarrollado una herramienta interactiva en el entorno web de ayuda a la prescripción veterinaria (AEMPS, 2019). El progresivo descenso del consumo en España cada vez nos sitúa más cerca de los principales competidores europeos en producción animal.

En España, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) es el responsable de la coordinación y ejecución del programa de vigilancia de resistencias ligadas a agentes zoonóticos y anualmente elabora y publica un informe con los principales datos.

En salud ambiental se ha creado, en 2019, el Grupo de Trabajo de Resistencias en el Medioambiente, con el objetivo de profundizar en el conocimiento del papel del medioambiente en la producción y transferencia de resistencias y de su posible impacto en salud pública y animal.

Otra de las labores a destacar durante este periodo fue el fomento de estrategias formativas en materia de antibióticos y resistencias tanto para los profesionales de la salud humana como para

veterinarios, así como la difusión de todas las actividades realizadas tanto en redes sociales como en páginas web.

Actualmente, el objetivo del PRAN 2019-2021 es seguir trabajando en la reducción del incremento de RAM y su impacto en la salud de toda la población (AEMPS, 2020). En 2022 se espera la publicación del nuevo PRAN 2022-2024 que dará continuidad a las seis líneas estratégicas establecidas anteriormente (AEMPS, 2022):

1. Vigilancia del consumo de antibióticos y la resistencia.
2. Control de la resistencia a los antibióticos.
3. Prevención de la necesidad del uso de antibióticos.
4. Estrategia común en investigación de resistencias.
5. Formación en materia de resistencias.
6. Comunicación y sensibilización de la población.

1.5.4 Percepción del riesgo asociado a la RAM: Eurobarómetro

En los últimos años se han puesto en marcha diversos programas enfocados a concienciar a la población de las consecuencias de la RAM y establecer medidas acordes a cada sector de la población.

En este sentido, la EFSA, mediante el empleo del Eurobarómetro, ha realizado en los últimos años entrevistas y encuestas dirigidas a diferentes colectivos entre los que se encuentran veterinarios, ganaderos y consumidores. El objetivo principal de esta iniciativa es ofrecer una visión detallada de la tendencia y evolución de la opinión pública sobre el riesgo que supone para la salud humana el uso de antibióticos en producción animal.

En el último Eurobarómetro realizado en 2018, se seleccionaron ganaderos, veterinarios y consumidores de distintos países, con el fin de conocer su punto de vista en relación al uso de antibióticos en animales de producción y el papel de los alimentos en la posible transmisión de la RAM al hombre. Se observó que en su mayoría, veterinarios y ganaderos recibían información relacionada con la aparición y diseminación de RAM a través de revistas científicas y foros profesionales, sin embargo, un grupo minoritario llegaron a cuestionar esta implicación.

Por otra parte, una minoría de ciudadanos europeos habían recibido información suficiente acerca del uso de antibióticos en animales de producción y conocían la repercusión que tiene su uso. De hecho, tan solo el 38 % de los encuestados eran conscientes de la prohibición del uso de antibióticos en producción animal para estimular su crecimiento. Los resultados de las encuestas demostraron que el conocimiento y las actitudes del público juegan un papel clave, permitiendo establecer estrategias dirigidas a informar sobre el riesgo y concienciar a diferentes sectores de la población sobre el impacto que tiene el uso de antibióticos en producción animal (EFSA, 2017; European Commission, 2018). En España, el 36 % de los ciudadanos piensa equivocadamente que los antibióticos curan el resfriado (descenso desde el 45 % en 2016), el 42 % confirma haber tomado antibióticos en los últimos 12 meses (descenso desde el 47% en 2016) y el 5 % confirma que los ha tomado sin receta médica (descenso desde el 6% de 2016) (AEMPS, 2019).

1.6 PROPAGACIÓN DE RAM EN LA CADENA ALIMENTARIA

El problema de aparición de bacterias resistentes se ha abordado principalmente en relación al uso y abuso de antibióticos en medicina humana y veterinaria. Sin embargo, se trata de un problema emergente a nivel mundial que afecta no solo al ámbito hospitalario, sino también al ambiente extrahospitalario. El medio ambiente juega un papel importante derivado de la presencia de antibióticos, bacterias resistentes y elementos genéticos móviles implicados en la transferencia horizontal de genes. Esta contaminación emergente del medio ambiente, como consecuencia de la liberación y vertido de fármacos, constituye una vía de exposición del ser humano a través de diferentes vectores como el agua y los alimentos.

1.6.1 Importancia de los alimentos en la diseminación de RAM

El intestino animal contiene un denso ecosistema microbiano, el cual está formado cientos de diferentes especies microbianas. Este ecosistema está en contacto con los antibióticos que se utilizan en el sector de la agricultura y la ganadería, ofreciendo la oportunidad de promover la aparición y posterior transferencia horizontal de material genético donde se incluyen los genes que codifican RAM.

Los alimentos, así como el medio ambiente, pueden albergar estas bacterias resistentes como resultado de la contaminación fecal durante el sacrificio y los procesos de producción. De esta

manera, cohabitan numerosos microorganismos tanto comensales como patógenos creando un hábitat singular que actúa como reservorio de bacterias resistentes (Casals-Pascual et al., 2018).

Los tratamientos tecnológicos o el uso de sustancias antimicrobianas a dosis subletales o la adición intencionada de microorganismos a los alimentos con una finalidad probiótica o tecnológica son otros mecanismos potenciales que contribuyen al incremento y diseminación de la RAM en la industria alimentaria. En este sentido, es importante remarcar que, a nivel europeo, los microorganismos utilizados en la elaboración de alimentos y piensos han de ser evaluados por el Panel de Riesgos Biológicos de la EFSA, el cual incluye entre otros criterios la ausencia de genes de RAM (EFSA, 2018).

El riesgo de adquirir bacterias portadoras de genes de resistencia por vía alimentaria se asocia por un lado a la exposición de microorganismos causantes de zoonosis, y por otro, a la selección de esta condición en las poblaciones bacterianas comensales no patógenas y su consiguiente transferencia a la microbiota del intestino humano. De especial interés son las bacterias pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcaceae* como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, por ser patógenos nosocomiales multiresistentes que habitan en el intestino de forma natural pero que pueden causar infección sobre todo en personas inmunodeprimidas.

Enterococcus spp. y *E. coli* están presentes en los alimentos con bastante frecuencia y aunque no producen infecciones por consumo de éstos, a excepción de algunos serotipos de *E. coli*, tienen capacidad para adquirir y diseminar determinantes genéticos de resistencia actuando como vehículo de transmisión en la cadena alimentaria. Por otra parte, bacterias patógenas como *Salmonella*, *Campylobacter* o *Listeria monocytogenes*, son algunos ejemplos de microorganismos zoonóticos que pueden producir infecciones alimentarias. En caso de que estas bacterias hayan adquirido determinantes de RAM, las infecciones provocadas pueden comprometer la terapia antibiótica o hacer necesario el uso de antimicrobianos de segunda línea para su tratamiento (EFSA & ECDC, 2020).

Los alimentos de origen animal juegan un papel importante en la vehiculización de estos microorganismos y con ello las resistencias antimicrobianas adquiridas en su genoma especialmente aquellos que no se someten a un cocinado previo a su ingesta. De este modo, el consumo de este tipo de alimentos supone una vía de entrada de microorganismos resistentes en el intestino humano (Florez-Cuadrado et al., 2018).

1.6.2 Vigilancia Epidemiológica de RAM en la cadena alimentaria

La contribución de la cadena alimentaria al aumento de RAM, ha adquirido protagonismo en los últimos años, existiendo una preocupación creciente en relación a la diseminación de bacterias resistentes a través de los alimentos; debido a ello, desde 2013 la EFSA ha implantado procedimientos especializados y armonizados para su monitoreo. Desde entonces, la EFSA emite un informe anual notificando datos de RAM de un elevado número de Estados Miembros permitiendo un análisis de los patrones de resistencia a diferentes antimicrobianos seleccionados según su relevancia para el uso terapéutico en clínica humana. La vigilancia de la RAM se extiende a bacterias zoonóticas y comensales en animales de explotación y alimentos en base a los nuevos avances científicos y la necesidad de recopilar datos tal y como recoge la Decisión 2020/1729/UE. En dicha decisión se establecen normas armonizadas para la vigilancia y notificación de la RAM que deben llevar a cabo los Estados Miembros durante el periodo 2021-2027, implantándose combinaciones específicas de bacterias, sustancias antimicrobianas, animales productores de alimentos y carne fresca derivada de ellos. Además, se fija el diseño de muestreo y los métodos analíticos (EFSA & ECDC, 2021).

Para el seguimiento de RAM desde una perspectiva de salud pública se establece como prioritaria la exposición potencial a patógenos por consumo de alimentos. La campilobacteriosis y salmonelosis son las zoonosis de origen alimentario de mayor incidencia en Europa. Por ello, cada año se publica información sobre la RAM en cepas de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. de origen humano y animal, contemplando aves domésticas, porcino y vacuno, así como sus productos derivados. Dado que la prevalencia de salmonella ha disminuido en los últimos años debido a las medidas de control establecidas en Europa, la vigilancia de RAM se ha reforzado con el estudio de bacterias comensales indicadoras como *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. Estos microorganismos están presentes en la microbiota intestinal de mamíferos sanos por lo que el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana proporciona información acerca de los posibles reservorios de bacterias resistentes que pueden transferirse entre poblaciones animales, así como entre animales y humanos. Desde 2013, se recomienda el seguimiento de la RAM en aislados de *E. coli* y de *E. faecium* y *E. faecalis* analizándose aislados procedentes tanto de animales como de alimentos (EFSA & ECDC, 2021).

Cualquier otra información relevante de importancia clínica y que pueda suponer una amenaza para la salud pública también puede ser incluida, como es el caso de ***Staphylococcus aureus* resistente a meticilina** (SARM), un microorganismo patógeno causante de infecciones en humanos. Aunque se puede aislar en alimentos, ésta no es su principal vía de transmisión; sin embargo, su asociación con animales de producción lo convierte en un microorganismo de interés para el monitoreo de RAM en animales y sus productos (EFSA & ECDC, 2020).

El último informe de la EFSA publicado en 2021, revela cifras alentadoras en la reducción de la RAM en determinados microorganismos para algunos antibióticos, sin embargo, todavía se detectan aislados multirresistentes a antimicrobianos de importancia crítica, tanto en humanos como en animales. Hay que destacar que los niveles de RAM varían entre los diferentes Estados Miembros, seguramente debido a las diferencias en el uso de antibióticos en cada región (EFSA & ECDC, 2021).

1.7 GÉNERO *Enterococcus*

1.7.1 Características generales

El término enterococo fue establecido en 1899 para definir una bacteria gram positiva con forma cocoide aislada del intestino humano, siendo en 1903 cuando los investigadores Thiercelin y Jouhaud propusieron un nuevo género bacteriano denominado *Enterococcus*. Posteriormente, este género fue renombrado como *Streptococcus faecalis* y se clasificó en cuatro clases: *pyogenes*, *viridans*, *lactis* y *enterococcus*, siendo este último a su vez clasificado dentro del grupo de Estreptococos del grupo D basándose en resultados serológicos desarrollados por Lancefield (1933). En 1984, *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* fueron reclasificados como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, respectivamente (Zhong et al., 2017).

El género *Enterococcus* pertenece a un grupo de microorganismos conocido como bacterias ácido lácticas (BAL) con metabolismo homofermentativo, ya que reducen el piruvato únicamente a ácido láctico. A partir de una molécula de lactosa se producen cuatro de ácido láctico.

Las bacterias de este género son capaces de crecer en un rango de temperaturas entre 10 y 45 °C, aunque la temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. Pueden llegar a sobrevivir al menos 30 minutos a 60 °C, soportan un pH de hasta 9,6 en presencia de NaCl (6,5 %) y de sales biliares (40 %),

además de hidrolizar la esculina y la pirrolidonil-B-naftilamida (PYR). Son microorganismos catalasa negativos y en general son anaerobios aerotolerantes, poseen superóxido dismutasas y peroxidasas que destruyen el O₂ y el H₂O₂ respectivamente, que se generan en condiciones de aerobiosis (Li and Gu, 2019).

Actualmente, la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (siglas en alemán, DSMZ) describe hasta 79 especies, 12 de ellas incorporadas entre los años 2019 y 2022 (DSMZ, 2022). No todas las especies del G^o *Enterococcus* descritas poseen las mismas propiedades fisiológicas. Existen algunas especies que, a diferencia de los típicos enterococos, no poseen el antígeno específico de grupo D. Por otra parte, las diferencias observadas en la composición de la pared celular, así como el uso de pruebas bioquímicas han permitido hacer una primera distinción filogenética de especies o grupos de especies. La mayoría de los criterios fenotípicos permiten una clasificación correcta; no obstante, a día de hoy es necesario el uso de técnicas moleculares para poder diferenciar entre todas las especies (Zhong et al., 2017).

Los enterococos forman parte de la microbiota intestinal normal del hombre y de los animales de sangre caliente, donde se comportan como bacterias comensales. Debido a su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables y crecer en ambientes hostiles, estas especies son capaces de colonizar diversos hábitats una vez liberadas con las heces al medio ambiente. Una de las características más destacable de los enterococos es su ubicuidad ya que pueden ser encontrados en diversos ambientes como suelos, plantas, productos lácteos y otros alimentos, aunque su hábitat principal es el tracto intestinal de vertebrados (Dapkevicius et al., 2021).

Las especies aisladas más frecuentemente en el intestino humano son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans*, aunque la proporción de éstas varía dependiendo de la región geográfica, probablemente debido a la influencia de factores ambientales y de la dieta. *E. faecium* se aísla con frecuencia en pollos, cerdos y ganado lechero. Otras especies como *E. durans* se han encontrado en el hombre y también en aves; mientras que *E. gallinarum* se aísla preferentemente en aves y *E. avium* en mamíferos. Nuevas especies como *E. columbae* es específica de palomas o *E. asini* que sólo se ha detectado en asnos. Todos estos datos demuestran la existencia de una elevada especificidad de hospedador entre especies. Hasta 1992, la mayor parte de las especies de enterococos descritas habían sido relacionadas con infecciones en humanos (*E. faecalis*, *E. faecium*,

E. durans, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. hiraе*, *E. mundtii* y *E. raffinosus*) por ello, gran parte del interés en los enterococos se debe a su asociación con dichas infecciones (Zhong et al., 2017). La comparación de estas especies con aquellas aisladas a partir de otros ambientes aporta información interesante sobre las características básicas y los orígenes de este género.

1.7.2 Caracterización molecular

Desde el punto de vista clínico, alimentario y ambiental, se ha hecho necesaria la aplicación de técnicas moleculares y genéticas que permitan una identificación y caracterización más precisa de especies del G^o *Enterococcus*. La secuenciación del 16S ADNr así como el análisis de los perfiles de proteínas totales han sido técnicas muy utilizadas; sin embargo, el análisis de las secuencias del gen 16S ARNr no permite distinguir entre algunas especies como *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*, las cuales son 99,9 % idénticas. Por ello, técnicas como la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD PCR), la secuenciación del dominio V del ARNr 23S, la amplificación de los espaciadores intergénicos del ARNr o ARNt o la secuenciación de genes específicos (ligasa D-ala: D-ala (*ddl*), superóxido dismutasa, chaperonina 60) se han utilizado como métodos de rutina para la tipificación de *Enterococcus* (Lebreton et al., 2014). En los últimos años, la relación filogenética de las diferentes especies del género *Enterococcus* ha sido determinada mediante el Análisis de Polimorfismos de Nucleótidos Simples (*Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) de las secuencias del gen 16S ARNr. Otras técnicas moleculares como la Electroforesis en Campo Pulsado, (*Pulsed Field Electrophoresis*, PFGE) o la Tipificación Multilocus de Secuencias (*Multilocus Sequence Typing*, MLST) se han ido implementando con el tiempo para diferenciar cepas de enterococos. Para su estudio epidemiológico se emplea habitualmente la técnica MLST ya que provee datos precisos sobre la estructura poblacional especialmente de *E. faecalis* y *E. faecium*, determinando complejos clonales (Li and Gu, 2019).

El primer análisis MLST descrito por Homan et al. 2002, mostró que la mayoría de cepas *E. faecium* que causaban infecciones clínicas eran distintas de las cepas aisladas de otras fuentes como animales o individuos sanos. Probablemente esta diferenciación sea consecuencia de la presión selectiva resultado del uso de antibióticos en humanos y en agricultura dando lugar a islas de patogenicidad o plásmidos portadores de determinantes de resistencia y factores de virulencia. De hecho, la estructura poblacional de *E. faecium* se divide en diferentes clados: clado A, que incluye

las cepas asociadas a hospitales, diferenciando en subclado A1 que agrupan cepas aisladas de muestras clínicas humanas y A2 que incluye aquellas asociadas a aislados animales; el clado B agrupa cepas asociadas a la comunidad que están estrechamente relacionado con la especie *E. lactis*, por lo que algunos autores han sugerido la reasignación de *E. faecium* clado B como *E. lactis* (Belloso Daza et al., 2021).

Otros estudios han demostrado la continua evolución de distintos linajes de *E. faecium*, la cual comprende la adquisición de ciertos genes que permiten una adaptación al ambiente hospitalario. Esto ocurre de igual manera en otros nichos, como son los animales de producción, los alimentos, o el medio ambiente, dando lugar a diseminaciones en distintos entornos. Por lo que no todos los complejos clonales de alto riesgo son exclusivos de aislados clínicos, sino que también existen aislados de humanos sanos o animales que pertenecen a esos mismos complejos (Werner et al., 2013).

1.7.3 Resistencia antimicrobiana

Investigadores como Dapkevicius et al. (2021) y Zaheer et al. (2020) consideran que el género *Enterococcus* representa un desafío terapéutico debido a su resistencia intrínseca de carácter cromosómico y no transferible por vía horizontal, a varios antibióticos, incluyendo β -lactámicos (cefalosporinas y carbapenémicos), sulfonamidas y bajos niveles de lincosamidas y aminoglucósidos. Además, *E. faecium* es generalmente resistente a ampicilina, piperacilina e imipenem.

Por otro lado, este género bacteriano posee gran capacidad de adquisición de mecanismos de resistencia y de genes de virulencia, ya sea a través de plásmidos, trasposones conjugativos, intercambio cromosómico o mutaciones. De especial interés es la resistencia adquirida a β -lactámicos (penicilina y ampicilina) y gluco péptidos por ser el tratamiento de elección para tratar infecciones enterocócicas. También se consideran importantes las resistencias adquiridas a eritromicina, niveles elevados de clindamicina y aminoglucósidos, tetraciclina, fluoroquinolonas, oxazolidinones y cloranfenicol (Dapkevicius et al., 2021; Zaheer et al., 2020).

El fracaso terapéutico debido a esta RAM supone elevados costes económicos e importantes consecuencias sanitarias; además, es importante recalcar el papel que juegan los enterococos en el

ambiente extrahospitalario y el impacto relacionado con la aparición y diseminación de genes de RAM en otros ambientes. En los últimos años, se han aislado cepas de enterococos genéticamente relacionadas resistentes a antibióticos procedentes de animales, alimentos de origen animal y humanos (Torres et al., 2018).

La transferencia horizontal de genes de RAM tiene una gran repercusión en la constitución y composición genética del género *Enterococcus*, particularmente en *E. faecalis* y *E. faecium*. El análisis filogenético de estas dos especies demuestra la elevada tasa de recombinación y transferencia de genes y su papel como captadores y distribuidores de material genético a otras bacterias. Más del 38 % y del 25 % del genoma total de *E. faecium* y *E. faecalis* respectivamente, corresponde a elementos genéticos móviles, siendo los plásmidos los más comunes (Zhong et al., 2017).

Los enterococos resistentes de origen animal, ambiental o alimentario, se propagan al hombre muy frecuentemente a través de la cadena alimentaria y sobreviven en el tracto intestinal donde tiene lugar la mayor parte del intercambio genético. Pueden diseminarse a través de aguas residuales y llegar de nuevo al medio ambiente y alimentos arrastrando consigo nuevos genes de resistencia que contribuyen a sobrevivir ante la presencia de sustancias antimicrobianas (Stępień-Pyśniak et al., 2021).

Diversos estudios como los llevados a cabo por Torres et al. (2018) y Zaheer et al. (2020) han identificado cepas idénticas aisladas de diferentes fuentes como, ambiente de granjas, leche y derivados (queso), heces humanas o incluso aislados indistinguibles de ambiente hospitalario y granjas porcinas, sugiriendo que los alimentos son la ruta de transmisión. Además, este intercambio de material genético no solo tiene lugar entre especies de enterococos, sino que pueden participar otros géneros bacterianos. En el caso de los enterococos, la preocupación reside en si estos determinantes de RAM también están presentes en la cadena alimentaria, especialmente en alimentos fermentados donde cohabitan con otros microorganismos muy variados. Diferentes trabajos han demostrado la presencia de aislados procedentes de alimentos como el queso, productos cárnicos y vegetales portadores de determinantes de resistencia a eritromicina, tetraciclina, aminoglucósidos, penicilina, ciprofloxacino, quinupristina/dalfopristina (Q/D) o cloranfenicol (Torres et al., 2018; Zaheer et al., 2020).

A continuación, se exponen los principales mecanismos de resistencia antibiótica adquiridos en enterococos aislados tanto de humanos, como de animales y alimentos (**Cuadro 1**).

Resistencia a **β -lactámicos: Ampicilina y penicilina** son uno de los antibióticos más activos frente a los enterococos, principalmente cuando se administran en politerapia junto con aminoglucósidos. Estos antibióticos actúan uniéndose covalentemente a la célula bacteriana irrumpiendo el crecimiento normal de la pared celular y provocando en la mayoría de los casos muerte celular.

Todos los enterococos producen proteínas de unión a las penicilinas (PBP) de baja afinidad lo que da lugar a una unión débil a los antibióticos β -lactámicos. Como resultado, la cantidad mínima inhibitoria frente a penicilinas suele ser de 2-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. faecalis* y 8-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. faecium*, superior a otros microorganismos gram positivos. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de estos antibióticos se ha ido incrementado en enterococos a lo largo del tiempo, sobre todo en aislados clínicos humanos siendo menos descrita en aislados procedentes de animales o alimentos. Este aumento se debe principalmente a la hiperproducción de la PBP5 o a mutaciones en el gen *pbp* 5.

Otra forma de resistencia a ampicilina descrita tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium* es la mediada por una β -lactamasa que inactiva el antibiótico a través de la escisión del anillo de β -lactámico. La producción de estas β -lactamasas está codificada por plásmidos, aunque este mecanismo de resistencia no es muy frecuente (Lozano and Torres, 2017; Torres et al., 2018).

Resistencia a Aminoglucósidos: Los enterococos se caracterizan por poseer resistencia intrínseca de bajo nivel a los aminoglucósidos debido a la baja permeabilidad de la pared celular y consecuentemente una pobre captación del antibiótico. Es por ello que estos antibióticos no son eficaces frente a los enterococos en monoterapia y se requieren concentraciones más altas para promover su entrada al espacio intracelular. La combinación de un β -lactámico junto con un aminoglucósido es el tratamiento de elección frente a infecciones enterocócicas.

Por otra parte, los enterococos pueden adquirir genes que codifican la producción de enzimas inactivantes de aminoglucósidos disminuyendo su unión a la diana ribosomal. Las principales enzimas que dan lugar a una resistencia de alto nivel son la fosfotransferasas (APH), la acetiltransferasas (AAC) y la nucleotidiltransferasas (ANT) (Cercenado, 2011; Miller et al., 2014).

Resistencia a Glucopéptidos: Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana mediante su unión al terminal d-Ala – d-Ala del precursor, impidiendo la síntesis y unión de la cadena de peptidoglucanos y por tanto la síntesis de la pared celular. El principal mecanismo de resistencia, condicionado por la presencia de los genes *van*, se basa en alterar dicha unión modificando el lugar de anclaje del antibiótico, dando lugar a CMI's superiores. De esta manera, según el cambio en el aminoácido terminal del precursor se puede distinguir entre alta o baja resistencia.

Dentro de esta clase de antibióticos, **vancomicina** y **teicoplanina** son los más utilizados para el tratamiento de infecciones en humanos, mientras que la **avoparcina** ha sido usada en varios países durante muchos años como promotor de crecimiento en animales de producción. En 1990 en Europa y otros países se observó un incremento de cepas con genotipo *van A* en animales de producción, personas sanas, alimentos y ambiente, asociándose con el uso en los años 70 de avoparcina a concentraciones subterapéuticas (Torres et al., 2018).

Resistencia a la trimetoprima/sulfametoxazol: Los enterococos muestran susceptibilidad a estos antibióticos cuando se analizan *in vitro*; sin embargo, estos compuestos son ineficaces *in vivo* debido a su capacidad para utilizar fuentes exógenas de folato. Según el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (siglas en inglés EUCAST), no es posible predecir el resultado clínico, y categoriza a los enterococos salvajes (*wild type*) como intermedios a trimetoprima y la combinación trimetoprima/sulfometoxazol, permitiendo distinguir entre enterococos con y sin mecanismos de RAM adquiridos. Existen en la bibliografía mecanismos adquiridos, sin embargo no han sido descritos en enterococos (Eliopoulos and Huovinen, 2001; Miller et al., 2014; Wisell et al., 2008).

Resistencia a Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas: Estas tres clases de antibióticos tienen un mecanismo de acción similar denominándose complejo MLS. Los mecanismos de resistencia desarrollados, así como los determinantes genéticos que los codifican, en muchas ocasiones, son los mismos. Cabe destacar que todas las especies de enterococos son intrínsecamente resistentes a lincosamidas (clindamicina y lincomicina). Además, *E. faecalis* es resistente a la estreptogramina A debido a la presencia de un gen cromosómico *lsa* que codifica una proteína que confiere resistencia a lincosamida y estreptogramina A (Sirichoat et al., 2020).

Desde que se introdujo el uso de eritromicina en la clínica humana en 1952, la resistencia a antibióticos del grupo de los macrólidos se ha presentado con frecuencia en enterococos. La tilosina, la espiramicina y la virginiamicina son otros antibióticos que fueron ampliamente utilizadas como promotores del crecimiento en animales de producción antes de que la Unión Europea limitara su uso. Después de su prohibición, la resistencia a la eritromicina en cepas de *Enterococcus* disminuyó drásticamente, lo que demuestra el vínculo entre el consumo de antibióticos y el aumento de las tasas de resistencia en diferentes ambientes (Torres et al., 2018).

Resistencia a Tetraciclinas: Las tetraciclinas son la clase de antibióticos más utilizada en animales de producción, siendo la resistencia a tetraciclina la más difundida en enterococos aislados de animales. Se han identificado casi 60 genes de resistencia a este antibiótico. Los determinantes *tet L* y *tet M* son los más habituales independientemente del origen de la cepa, aunque se ha descrito también de manera ocasional la presencia de los genes *tet K*, *tet O* y *tet S* (Zaheer et al., 2020).

Resistencia a Quinolonas: Las fluoroquinolonas tienen una actividad antimicrobiana reducida contra los enterococos y la resistencia a estos antibióticos es relativamente frecuente en la clínica. Estos compuestos nunca se han utilizado como promotoras del crecimiento, aunque su uso en terapia veterinaria es común. La resistencia a ciprofloxacino se asocia a los aislados de mayor riesgo vinculados a brotes nosocomiales de *E. faecium*. Levofloxacina y moxifloxacino son algunos de los compuestos más activos, aunque las nuevas fluoroquinolonas, moxifloxacino y gatifloxacino tienen una actividad ligeramente superior. Las cepas resistentes a ciprofloxacino son también generalmente resistentes a moxifloxacino y gatifloxacino (Torres et al., 2018).

Resistencia a Oxazolidinonas y anfenicoles. La aparición generalizada de Enterococos Resistentes a Vancomicina (ERV) en muchos países ha hecho que sea necesario buscar otras opciones terapéuticas, siendo linezolid (oxazolidinona) una de ellas. Desde su aprobación en el año 2000 este antibiótico se ha convertido en una de las pocas opciones terapéuticas disponibles para tratar no sólo ERV, sino también otras bacterias gram positivas como *S. aureus* resistente a la meticilina. La resistencia a linezolid en enterococos está frecuentemente mediada por mutaciones cromosómicas en el dominio V de la subunidad 23 S del ARNr, aunque también puede asociarse a determinantes de resistencia adquiridos como *cfr*, *optr A* y *poxt A*, que a su vez proporcionan resistencia combinada a otros antibióticos de interés clínico (Moure et al., 2020).

Aunque la resistencia a linezolid sigue siendo inusual en enterococos, en los últimos años se ha incrementado tanto en aislados de humanos como animales. En 2010 se describieron los primeros aislados clínicos de enterococos portadores del gen *cfr*, (Osman et al., 2019) y en 2015 del gen *optr* A, tanto en aislados clínicos como animales (Moure et al., 2020).

Los anfenicoles, han sido comúnmente utilizados en la producción animal, siendo de gran relevancia la aparición de bacterias portadoras de determinante de resistencia a estos antibióticos en dicho entorno. En medicina humana, el cloranfenicol ha sido un fármaco a considerar en el caso de infecciones serias por ERV en humanos; sin embargo, existen pocos estudios al respecto (Bender et al., 2018).

Cuadro 1. Mecanismo y determinantes genéticos de resistencia a antibióticos descritos en aislados de enterococos.

Antibióticos afectados		Gen implicado	Mecanismo de RAM	Referencia bibliográfica
Clase	Antibiótico			
β -lactámicos	Penicilina y ampicilina	<i>pbp5</i> (más común en <i>E. faecium</i>)	Modificación de la permeabilidad: Proteínas de unión de baja afinidad	(Torres et al., 2018)
	RAN* a gentamicina y otros aminoglucósidos relacionados (excepto estreptomina)	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> -Ia		
Aminoglucósidos	RAN* a estreptomina	<i>ant(6)</i> -Ia y <i>ant(3'')</i> -Ia		
	RAN* a gentamicina, tobramicina, kanamicina y dibecacina,	<i>aph(2'')</i> -Ic	Enzimático: Disminución de la afinidad del antibiótico a la diana ribosomal	(Cercenado, 2011; Miller et al., 2014)
	RAN* a gentamicina, tobramicina, kanamicina, netilmicina y dibecacina	<i>aph(2'')</i> -Id, <i>aph(2'')</i> -Ie y <i>aph(2'')</i> -Ib		
	RAN* a kanamicina	<i>aph(3')</i> -IIIa		
	RAN* a tobramicina, Amicacina, Kanamicina y dibecacina	<i>ant(4')</i> -Ia		

Antibióticos afectados		Gen implicado	Mecanismo de RAM	Referencia bibliográfica
Clase	Antibióticos			
Aminoglucósidos	RAN* a estreptomicina	Mutación ribosómica	Modificación de la diana: Cambio en la subunidad 30S	(Cercenado, 2011; Miller et al., 2014)
Glucopéptidos	Vancomicina y teicoplanina	8 Operones <i>van</i> siendo <i>van A</i> y <i>van B</i> los más frecuentes * <i>van B</i> solo confiere resistencia a vancomicina	Modificación de la diana	(Ahmed and Baptiste, 2018)
	Resistencia intrínseca a glucopéptidos en <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> y <i>E. flavescens</i>	<i>van C</i>		
Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas	Macrólidos (eritromicina, azitroicina y claritromicina), lincosamidas, estreptograminas B	<i>erm</i>	Enzimático: Modificación de la subunidad 23S del ARN ribosomal	
	Macrólidos y estreptograminas B	<i>msr A</i>	Modificación de la permeabilidad: Bomba de eflujo	(Lozano and Torres, 2017; Miller et al., 2014; Torres et al., 2018)
	Resistencia de bajo nivel a eritromicina	<i>mef A</i>		
	Lincosamidas	<i>lnu B</i>	Enzimático: Modificación grupo hidroxilo del antibiótico	
	Estreptogramina A (dalfopristina)	<i>vat D</i> <i>vat E</i>	Enzimático*: Inactivación del antibiótico	
	Estreptogramina B (quinupristina)	<i>vgb A</i> <i>vgb B</i>	Escisión del anillo de la estructura del antibiótico	
Tetraciclinas	Tetraciclina	<i>tet K</i> <i>tet L</i>	Modificación de la permeabilidad: Bomba de eflujo	(Stępień-Pyśniak et al., 2021)
	Doxiciclina, minociclina, tetraciclina	<i>tet M</i> <i>tet O</i> <i>tet S</i>	Modificación de la diana: Protección Ribosomal	

Antibióticos afectados		Gen implicado	Mecanismo de RAM	Referencia bibliográfica
Clase	Antibióticos			
Quinolonas	Quinolonas (descrito únicamente en <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i>)	mutaciones en <i>gyr A</i> y <i>par C</i>	Modificación de la diana	(Torres et al., 2018)
	Quinolonas	<i>nor A</i>	Modificación de la permeabilidad: Bomba de eflujo	
	Quinolonas	<i>qnr</i>	Modificación de la diana: Protección de DNA girasa	
	Quinolonas (descrito únicamente en <i>E. faecalis</i>)	<i>eme A</i>	Modificación de la permeabilidad: Bomba de eflujo	
Oxazolidinonas y anfenicoles	Linezolid	Mutaciones en los genes que codifican el ARNr 23S	Modificación de la diana: Proteínas ribosomales	(Bender et al., 2018; Moure et al., 2020; Osman et al., 2019)
		<i>cfr</i>	Modificación de la diana: Proteínas ribosomales	
	Oxazolidinonas, anfenicoles	<i>optr A</i>	Modificación de la permeabilidad: Transportador ABC**	
	Oxazolidinonas, anfenicoles, tetraciclinas	<i>poxT A</i>		
	Cloranfenicol	<i>cat A</i>	Enzimático: Acetyltransferasa (CAT)	
	Cloranfenicol, florfenicol	<i>fex A</i> <i>fex B</i>	Modificación de la permeabilidad: Bomba de eflujo	

*RAN: Resistencia de alto nivel

** Transportador ABC: Transportador dependiente de Adenosín Trifosfato (ATP)

1.7.4 Importancia clínica

Los enterococos se han considerado microorganismos comensales inofensivos o con muy bajo potencial patógeno, aunque su capacidad para resistir a numerosos agentes antimicrobianos los convierte en patógenos oportunistas. En los últimos años han sido descritos como la tercera causa más frecuente de infección nosocomial en humanos, siendo la bacteria gram positiva causante de

infecciones nosocomiales de mayor interés, especialmente bacteriemias y otras infecciones invasivas (Markwart et al., 2021; Zaheer et al., 2020).

A diferencia de otros microorganismos patógenos, los enterococos no poseen factores de virulencia ni toxinas potentes; sin embargo, presentan rasgos estructurales y metabólicos que les permite colonizar el tejido del hospedador, resistir los mecanismos de defensa de éste, secretar sustancias tóxicas, y modificar la respuesta inmune del huésped. Tal y como afirman Ahmed y Baptiste (2018), el papel de los enterococos en infecciones del tracto urinario y en la endocarditis sugiere que estas bacterias son colonizadoras eficientes de ciertos tejidos.

La principal especie implicada es *E. faecalis*, la cual es responsable del 80-90 % de las infecciones, seguido de *E. faecium* (5-10 %) y otras especies como *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* y *E. hirae* (menos del 10 %). Si embargo, en los últimos años han aumentado las infecciones causadas por *E. faecium* en relación a *E. faecalis* debido principalmente al aumento de la diseminación de resistencias a antibióticos.

E. faecium es intrínsecamente resistente a más antibióticos que *E. faecalis*, y más de la mitad de los aislados de *E. faecium* causantes de infección expresan resistencia a vancomicina, ampicilina y altos niveles de aminoglucósidos, antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones enterocócicas. Según la OMS, *E. faecium* resistente a vancomicina es clasificado actualmente como uno de los patógenos prioritarios para los cuales es urgente encontrar nuevas alternativas terapéuticas ya que suponen un riesgo creciente para la salud humana (WHO, 2016b).

Las infecciones por *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* no se dan con elevada frecuencia, aunque son de especial interés debido a su resistencia intrínseca a vancomicina, un antibiótico utilizado para tratar las infecciones causadas por enterococos resistentes a aminoglucósidos que resultaron ser bastante problemáticas a mediados de los años 80 (Zaheer et al., 2020).

Todas estas especies descritas en algún momento como patógenas están implicadas en una amplia variedad de infecciones, entre las que se incluyen infecciones del tracto urinario, bacteriemias y septicemias, endocarditis, sepsis neonatal, infecciones del sistema nervioso central e infecciones mixtas de heridas pélvicas y abdominales. Al tratarse de patógenos oportunistas, pueden atravesar la barrera de la mucosa intestinal provocando infecciones sistémicas en personas con enfermedades subyacentes graves o inmunodeprimidos. La mortalidad causada por una bacteriemia de etiología

enterocócica es generalmente elevada, probablemente debido a factores subyacentes. Aunque frecuentemente, son las cepas adquiridas y no las cepas procedentes de la microbiota del hospedador las implicadas en los casos de infección (Ben Braïek and Smaoui, 2019; Franz et al., 1999).

Numerosos estudios epidemiológicos como el de Quiñones, Kobayashi y Nagashima (2018) han demostrado que el empleo de dispositivos como catéteres urinarios, sondas o dispositivos ortopédicos, están estrechamente relacionado con la vía de infección, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI) donde la presencia de aislados clonales en diferentes pacientes refleja la transmisión de persona a persona. Esta transmisión hospitalaria se ve favorecida por la resistencia ambiental de los enterococos.

Por otra parte, la administración de un amplio espectro de antibióticos en pacientes hospitalizados constituye otro factor importante para la adquisición de una infección intrahospitalaria por *Enterococcus*, motivada por una reducción de la población de bacterias gram negativas y sobrecrecimiento de enterococos que a menudo precede a una invasión de ERV en sangre (Lebreton et al., 2014).

Las infecciones nosocomiales junto con la RAM son dos fenómenos reforzados mutuamente que han convertido a este género bacteriano en un foco de atención en hospitales. La resistencia permite a los enterococos sobrevivir en el ambiente hospitalario mientras se usan antibióticos y los hospitales le proporcionan la oportunidad de diseminación (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020).

1.7.5 Importancia en alimentos

Como se ha citado anteriormente, los enterococos constituyen un grupo microbiano de interés dentro de las bacterias ácido-lácticas; sin embargo, su presencia en los alimentos es controvertida. Por un lado, destaca su papel en la conservación y desarrollo de las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados y su actividad como probióticos, y por otro lado, los enterococos tradicionalmente se han considerado microorganismos indicadores de contaminación fecal (İspirli et al., 2017).

Desde el punto de vista tecnológico poseen propiedades de interés en la producción de diversos alimentos fermentados por su actividad glucolítica, lipolítica y proteolítica, así como por la

producción de bacteriocinas. Además, dado su carácter ubicuitario y su capacidad de colonizar diversos hábitats incluidos los alimentos, se consideran parte importante de la microbiota en productos fermentados (Dapkevicius et al., 2021).

Su elevada tolerancia y capacidad de supervivencia en condiciones desfavorables durante los procesos de fabricación y maduración de ciertos alimentos, les confiere una ventaja selectiva frente a otras bacterias, pudiendo dominar en el perfil microbiano de muchos alimentos. Durante la fermentación de alimentos como el queso o productos cárnicos, emplean los azúcares y degradan los compuestos lipídicos desarrollando características organolépticas únicas que en muchos lugares se califican *delicatesen*. La presencia de enzimas proteolíticas también influye de forma importante en la textura, sabor y aroma como ocurre con la hidrólisis de la caseína y otras reacciones que dan lugar a péptidos libres. Esto hace que, en determinados alimentos fermentados, los enterococos sean añadidos durante el proceso de producción con la intención de contribuir en su perfil sensorial. En algunos quesos madurados producidos en Europa a partir de leche cruda o pasteurizada, han sido propuestos como parte de cultivos starter (İspirli et al., 2017).

Por otro lado, los enterococos producen pequeños péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) denominados enterocinas, capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*, así como de microorganismos alterantes.

Desde un punto de vista higiénico sanitario, esta exclusión competitiva se considera una ventaja, ya que permite aumentar la vida útil de los alimentos y garantizar su seguridad microbiológica. De hecho, las enterocinas han sido ampliamente estudiadas en modelos que analizan su actividad antimicrobiana frente a patógenos en el queso, carne (carne picada de cerdo, pechugas de pollo deshuesadas), diversos derivados cárnicos (jamón cocido o paté) y zumos de frutas (Hanchi et al., 2018; Rehaïem et al., 2016).

Aparte de estas propiedades tecnológicas, los enterococos aportan efectos beneficiosos para la salud actuando como probióticos en el tracto intestinal ya que contribuyen a restaurar y mantener la microbiota intestinal, previniendo trastornos gastrointestinales por lo que ciertas cepas se han usado en el pasado como aditivo alimentario tanto para uso en humanos como en animales (Hanchi et al., 2018).

Actualmente no existe una legislación específica que regule el uso de probióticos en alimentación humana, sin embargo, desde el año 2003, la EFSA ha implantado medidas que evalúan el riesgo del uso de microorganismos como aditivos en alimentos creando la lista QPS (*Qualified Presumption of Safety*) la cual incluye los agentes biológicos recomendados. Esta lista se actualiza periódicamente en base al conocimiento y la opinión científica proporcionada por el panel de riesgos biológicos (EFSA, 2019).

Actualmente el género *Enterococcus* no está incluido en la lista QPS ni se considera un microorganismo seguro (GRAS, *Generally Recognised As Safe*) según la FDA, principalmente por su implicación como patógenos nosocomial y su facilidad para adquirir y transferir islas de patogenicidad en las que se incluyen determinantes de RAM (Hanchi et al., 2018).

En alimentación animal varias cepas de *E. faecium* son comercializadas como aditivo en piensos destinados a diferentes animales de producción (aves, bovino y porcino). Su aprobación en Europa viene regulada por el Reglamento (CE) n° 1831/2003 el cual recoge entre otros aspectos los requisitos que han de cumplir los microorganismos destinados a ser incorporados a los piensos donde se incluye ausencia de factores de virulencia, así como susceptibilidad a ampicilina (Ben Braïek and Smaoui, 2019; EFSA, 2018).

Su origen fecal y la alta resistencia al calor y a condiciones ambientales adversas ha sugerido en diversas ocasiones el uso de los enterococos como indicadores de la calidad higiénica de los alimentos. Además de las heces, existen otras vías de contaminación indirecta como son los equipos empleados durante la producción de alimentos (ordeño, sacrificio, despiece...etc.). Algunos estudios han demostrado que más del 90 % de muestras de alimentos de origen animal en matadero están contaminadas con enterococos, principalmente *E. faecalis* seguido de *E. faecium* (Ben Braïek and Smaoui, 2019; Torres et al., 2018).

Este género, junto con las bacterias coliformes, ha sido considerado tradicionalmente como indicador de contaminación fecal de origen animal o humano en el medio ambiente y por lo tanto resultado de condiciones higiénicas inadecuadas durante el proceso de producción. Sin embargo, no todas las especies pertenecientes al género de *Enterococcus* tienen origen fecal, lo que ha reafirmado las dudas sobre la utilidad de este grupo como indicador de higiene en la industria alimentaria. La comparación de los genomas obtenidos a partir de enterococos aislados de fuentes ambientales, humanos y animales puede ayudar a solventar esta cuestión (Lebreton et al., 2014).

En algunos alimentos *Enterococcus* spp. se ha descrito como causante de la alteración de los mismos, sobre todo de productos cárnicos cocidos, ya que su termorresistencia permite soportar el tratamiento térmico en el interior del producto. La ausencia de otras bacterias competidoras hace que los enterococos lleguen a alcanzar recuentos elevados y por lo tanto alterar el alimento como consecuencia de su actividad glucolítica, proteolítica y lipolítica, en exceso indeseada. Asimismo, el alto contenido de tirosina existente en muchos productos fermentados, sumado a la acción descarboxilasa de los enterococos, puede provocar la producción de tiramina y por lo tanto ejercer efectos tóxicos para la salud humana (Abriouel et al., 2008).

1.7.6 Aspectos tecnológicos e higiénicos de enterococos aislados de productos lácteos fermentados

Los alimentos fermentados son aquellos en cuyo proceso de elaboración intervienen microorganismos como bacterias, mohos y/o levaduras. La transformación de la leche en queso comprende un proceso de fermentación y/o maduración en el cual tiene lugar la actividad de diferentes grupos microbianos. Desde las primeras fases, los cultivos iniciadores crecen rápidamente produciendo ácido en la leche, ello permite el desarrollo de otras bacterias ácido-tolerantes de tal manera que cohabitan múltiples microorganismos simultáneamente, optimizando cada uno la utilización de diferentes fuentes de carbono (Abriouel et al., 2008).

A lo largo del proceso de fermentación, se mantiene una composición fisicoquímica heterogénea del queso, aportando características nutritivas y organolépticas propias que diferencian cada tipo de queso.

En la industria láctea los microorganismos que se utilizan como cultivos iniciadores son principalmente BAL. A la hora de elegir dichos fermentos también se tienen en cuenta características como la resistencia a fagos y a condiciones extremas de acidez, o la capacidad de crecer en la leche sin necesidades nutritivas adicionales.

En la fermentación de la leche también contribuye la microbiota secundaria, constituida por bacterias ácido lácticas no-starter (NSLAB) que crecen internamente, así como otras bacterias, levaduras y mohos, que se desarrollan interna o externamente. Los microorganismos pertenecientes a este grupo suelen ser de mayor importancia en la maduración ya que son

específicos de las diferentes variedades de queso, sobre todo en aquellos elaborados con leche cruda. El principal origen de las NSLAB parece ser la propia leche, aunque la procedencia no está clara, ya que se encuentran tanto en quesos elaborados con leche cruda como en aquellos elaborados a partir de leche pasteurizada (Dapkevicius et al., 2021).

La leche es una fuente ideal para el crecimiento de *Enterococcus*, ya que pueden llegar ya sea por contaminación directa a partir de heces humanas o animales o indirecta a partir de fuentes de agua contaminadas, del exterior del animal o del equipo de ordeño y tanque de almacenamiento. También pueden estar presentes a través de la adición directa de cultivos starters de leche o suero de leche que se utilizan para la fabricación de quesos. Dado que pueden crecer durante la refrigeración de la leche y sobrevivir a procesos de pasteurización, se consideran una parte importante de la microbiota tanto en leche cruda como pasteurizada (Hanchi et al., 2018).

Las especies *E. faecalis* y *E. faecium* son las más frecuentes en productos lácteos y se consideran las de mayor importancia, seguido de *E. durans*, aunque otras especies de enterococos se pueden encontrar en este tipo de alimentos. Diversas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* se han aislado con frecuencia de cultivos starters naturales utilizados para la elaboración de quesos artesanales. La elevada concentración de sal así como otros componentes son un importante factor de selección para el crecimiento de enterococos tolerantes así como otras BAL. El alto contenido en nitrógeno soluble, aminoácidos libres totales, ácidos grasos libres volátiles, ácidos grasos libres de cadena larga, diacetilo y acetoina en quesos se relaciona en muchos casos con la presencia de enterococos (Ben Braïek and Smaoui, 2019).

En Europa, existen diversos quesos producidos a partir de BAL donde se incluyen *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans*, como el queso italiano de pasta semicocida, mozzarella de búfala, Feta, Venaco, Cebreiro o Fiori Sardo. Sin embargo, se ha observado que, con respecto a otras BAL, su actividad proteolítica y acidificante no es suficientemente elevada y en ocasiones este género tiene una importancia menor. Es por esto que el principal rol de las especies de enterococos en productos lácteos está asociado con sus funciones como NSLAB (Dapkevicius et al., 2021; İspirli et al., 2017).

En quesos artesanales elaborados a partir de leche de cabra, oveja, búfala o vaca los enterococos son seleccionados como cultivos adjuntos ya no solo para mejorar las cualidades organolépticas sino además con el fin de mejorar la seguridad de los productos lácteos. Son varios los estudios que han demostrado el efecto inhibitor de cepas de *E. faecium* o *E. faecalis* productoras de enterocinas

contra patógenos como *L. monocytogenes* y *S. aureus* en leche y quesos blandos (Hanchi et al., 2018).

Otro beneficio de la presencia de enterococos en el queso y productos lácteos es su actividad probiótica, siendo un reto en la tecnología de los probióticos en los últimos años, el uso de queso elaborado con cultivos funcionales como sistema de ingestión de cepas probióticas.

Ya sea como cultivo starter o como NSLAB, las cepas de enterococos pueden tener una influencia positiva en la producción y maduración de quesos tradicionales y comprenden una parte importante de la microbiota de la cuajada, siendo en algunos casos los microorganismos predominantes en el producto completamente madurado (Hanchi et al., 2018).

1.8 HERRAMIENTAS PARA LA TIPIFICACIÓN BACTERIANA Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

La mayor parte de los estudios poblacionales se realizan sobre cepas clínicas, lo cual puede llevar a un conocimiento parcial de la estructura poblacional y evolución microbiológica (Boers et al., 2012).

Los alimentos son una fuente de microorganismos muy variada, los cuales además pueden proceder de otros ambientes y estar estrechamente relacionados entre sí. El conocimiento de dicha microbiota, así como sus posibles interacciones en matrices alimentarias es crucial para garantizar una correcta caracterización de la RAM (Juste et al., 2008). En este sentido, la caracterización y tipificación molecular de aislados bacterianos permite determinar las cualidades o rasgos característicos y por tanto establecer una clasificación, por lo que son una herramienta fundamental para la vigilancia epidemiológica de la RAM (AEMPS, 2017).

Las técnicas de caracterización contribuyen a determinar la diversidad microbiana y comprender la evolución y la ecología de los microorganismos. La tipificación permite identificar cepas idénticas o estrechamente relacionadas, detectar fuentes de infección o localizar las vías de transmisión de microorganismos patógenos. El estudio de estos datos, junto con el análisis de los patrones fenotípicos y genotípicos de RAM, proporcionan información sobre el origen de la RAM y sus rutas de diseminación entre microorganismos incluso cuando proceden de diferentes entornos (Bottery et al., 2021).

La elección de la metodología de tipificación y caracterización molecular está influenciada por diversos factores tales como el poder discriminatorio, la reproducibilidad, facilidad de uso, coste, así como la capacidad y aplicabilidad para comparar los resultados entre laboratorios (Laupland and Valiquette, 2013). En el **Cuadro 2** aparecen representadas las principales ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares más empleadas para la tipificación y caracterización de patógenos transmitidos por alimentos. Estas técnicas se utilizan tanto para el estudio de microorganismos patógenos, como no patógenos aislados de diferentes orígenes (Adzitey et al., 2013).

Cuadro 2. Ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares disponibles para la tipificación de patógenos transmitidos por alimentos (Adzitey et al., 2013).

Método molecular	Ventajas	Desventajas
<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> , PFGE	Elevado poder discriminatorio, reproducibilidad y capacidad de tipificación	Requiere 3-5 días, coste relativamente alto comparado con otros métodos. Disponibilidad de la técnica limitada
<i>Multilocus Sequence Typing</i> , MLST	Bases de datos fácilmente disponibles. Resultados sencillos de comparar entre laboratorios. Buena capacidad de discriminación	Método caro. Requiere personal capacitado
<i>Random Amplified Polymorphism Deoxyribonucleic Acid</i> , RAPD	Económico, rápido, fácil de realizar y disponible	Reproducibilidad y poder discriminatorio medio (80 %)
DNA sequencing	Elevado poder de discriminación reproducibilidad y capacidad de tipificación	Requiere más de un día, metodología compleja y relativamente caro
Análisis del perfil plasmídico	Fácil de llevar a cabo y de interpretar los resultados	Los plásmidos son fácilmente móviles (se pueden perder o adquirir), modificando los perfiles de aislados genéticamente relacionados. Baja reproducibilidad, y poder discriminatorio
<i>Repetitive Extragenic Palindromic</i> , REP	Económico, fácil de llevar a cabo y aplicable a un elevado número de aislados.	Poder discriminatorio, reproducibilidad y capacidad de tipificación bajo en comparación con PFGE, MLST y DNA sequencing
<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> , ERIC	Rápido, coste efectivo. No requiere personal capacitado	Poder discriminatorio, reproducibilidad y capacidad de tipificación bajo en comparación con PFGE, MLST y DNA sequencing

Método molecular	Ventajas	Desventajas
Ribotyping	Poder de tipificación elevado (100 %), buena reproducibilidad y poder discriminatorio	Metodología compleja, requiere 3-4 días
<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , AFLP	Poder de tipificación elevado (100 %), buena reproducibilidad y poder discriminatorio.	Requiere 3-4 días y elevada inversión económica
<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , RFLP	Económico, elevada sensibilidad para la identificación y diferenciación de cepas	Metodología compleja y lenta. Puede llevar 1 mes en completarse

Algunas de estas técnicas se basan en el análisis de las secuencias de los genes amplificados por PCR como: RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphism Deoxyribonucleic Acid-PCR*), REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic-PCR*), ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*), MLST (*Multilocus Sequence Typing*) o WGS (*Whole-genome sequencing*). Estos métodos basados en la detección de ADN presentan una alta especificidad y permiten detectar genes o marcadores concretos, pudiendo diferenciar a nivel de especie o incluso distinguir entre serotipos, genotipos o patotipos.

Otras técnicas se basan en el análisis de los patrones de bandas generados por enzimas de restricción permitiendo comparar el genoma completo, siendo una estrategia muy útil para el seguimiento de las rutas de transmisión de microorganismos y la investigación de brotes de infecciones humanas, tales como PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), AFLP (*Adaptor Fragment Length Polymorphism*) o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

La **técnica RAPD PCR** está basada en la amplificación de regiones aleatorias del genoma generando un patrón de huellas en las que el número y localización de las regiones reconocidas por los cebadores varía para cepas de una misma especie bacteriana. Esta técnica tiene diversas aplicaciones entre las cuales se encuentra la tipificación de microorganismos patógenos, alterantes o de interés tecnológico en diferentes matrices alimentarias y medio ambiente, caracterización de biota en alimentos fermentados o heces de animales y humanos e identificación de la fuente de contaminación y las vías de difusión en estudios de brotes.

Es una técnica relativamente barata, rápida y fácil de implementar, sin embargo, es conocida por tener una baja reproducibilidad y un poder discriminatorio de aproximadamente 80 %. Ambas

características se pueden mejorar trabajando bajo condiciones cuidadosamente controladas (Adzitey et al., 2013).

La **técnica PFGE** ha sido considerada durante los últimos veinte años como el “*gold standard*” para la tipificación bacteriana, debido a su elevado poder discriminatorio. Los patrones de bandas obtenidos son específicos de una especie o cepa particular lo que permite confirmar clonalidad entre cepas y detectar cambios sutiles que ocurren con el tiempo. Existen protocolos estandarizados y bases de datos (*Pulse-Net* y *Food Net*) que permiten relacionar microorganismos aislados en diferentes partes del mundo y de diferentes fuentes. Sin embargo, la falta de bases de datos para ciertos microorganismos, ha hecho necesario el desarrollo de métodos más robustos basados en el análisis de secuencias (Palomino-Camargo and González-Muñoz, 2014).

El **método MLST**, se basa en la secuenciación de siete genes constitutivos (*housekeeping genes*) que posteriormente son analizados, asignando a cada uno de ellos un alelo. Estos genes conservados presentan suficiente variación como para obtener billones de perfiles alélicos o secuencias tipo diferentes. La existencia de bases de datos públicas permite comparar los perfiles alélicos y estudiar la relación filogenética entre distintos aislados permitiendo predecir las cepas únicas o identificar cepas clonales. Esta técnica aporta resultados muy reproducibles y de gran utilidad en el estudio de relaciones taxonómicas. El mayor inconveniente son los costes y el tiempo ya que requiere aislar el microorganismo, extraer su ADN y amplificar y secuenciar los siete genes (Werner et al., 2013).

Tanto la PFGE como MLST son dos técnicas complementarias que permiten un completo estudio epidemiológico molecular. La información proporcionada contribuye a una correcta detección y control de las RAM.

1.9 HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DE RAM

El estudio de la susceptibilidad antibiótica *in vitro* consiste en exponer un microorganismo frente a un antibiótico para observar su viabilidad en presencia de ese fármaco. Estas pruebas se realizan en un entorno clínico con el objetivo de conocer el comportamiento del agente causante de una infección y predecir la respuesta del paciente, así como la evolución de la infección lo antes posible. Fuera de un contexto clínico el estudio de la susceptibilidad tiene como objetivo detectar cualquier aparición de resistencia, así como el aumento en los niveles de ésta.

Existen diferentes metodologías para estudiar la sensibilidad *in vitro*, las cuales en su mayoría miden la susceptibilidad como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) o la Concentración Mínima Bactericida (CMB), es decir, la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo o que destruye el 99,9 % de éste, respectivamente. Sin embargo, muchas veces lo que se observa con estas metodologías no corresponde con lo observado *in vivo* cuando una bacteria está causando una infección, ya que pueden intervenir factores relacionados con la farmacocinética y la farmacodinámica (EUCAST, 2021; Kassim et al., 2016).

La mayoría de los resultados de estas pruebas se interpretan utilizando puntos de corte clínicos bien en valores de halos de inhibición o de CMI siendo:

- **Sensible (S):** cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.
- **Intermedio (I):** cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.
- **Resistente (R):** cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico.

Estas categorías están establecidas por normas y directrices como las propuestas por el EUCAST o el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (siglas en inglés CLSI) para guiar el tratamiento médico del paciente (Cantón, 2010).

Complementario a la categorización clínica, se utilizan valores de corte epidemiológicos, de tal manera que un microorganismo será clasificado como salvaje o "*wild type*" cuando carece o no expresa resistencia adquirida a un determinado antibiótico. En esos casos, el microorganismo presentará una CMI por debajo del punto de corte epidemiológico y, a diferencia de un supuesto clínico, este valor de corte no se verá alterado por otras circunstancias. Cuando el microorganismo presenta una CMI por encima del punto de corte epidemiológico, indica que presenta y expresa un mecanismo adquirido de resistencia y se define como no salvaje "*non-wild type*". En esos casos el microorganismo muestra resistencia microbiológica, no clínica (Kassim et al., 2016).

Los puntos de corte clínicos no necesariamente han de coincidir con los puntos de corte epidemiológicos, por ello para evitar discrepancias entre ambas categorizaciones, el EUCAST redefinió en 2019 los puntos de corte clínicos. Así, un microorganismo es definido como intermedio

cuando al incrementar la exposición del antibiótico, presenta sensibilidad. En estos casos, se ha de informar como "Sensible, cuando se incrementa la exposición". Esta nueva definición combina las categorías R e I, como no-sensible, logrando una estrecha correspondencia con el valor de corte epidemiológico "*non-wild type*". Por ello, al hacer comparaciones entre aislamientos de diferentes fuentes se requiere precaución a menos que esté claro que los métodos y criterios de interpretación corresponden (EUCAST, 2021; Kahlmeter and EUCAST, 2019).

Desde 2007, la EFSA ha publicado diferentes guías que incluyen las pautas para armonizar el seguimiento de RAM en aislados de animales y alimentos siendo la terminología usada la establecida por el EUCAST. A partir de entonces, en la Unión Europea se han implementado especificaciones técnicas que recomiendan el uso de puntos de cortes epidemiológicos para determinar si un microorganismo es o no microbiológicamente resistente, permitiendo acordar y obtener datos comparables de RAM entre los Estados Miembros. Recientemente, se han establecido planes de muestreo tal y como recoge la Decisión 2020/1729/UE donde se informan los métodos analíticos de detección y ensayo de sensibilidad a los antimicrobianos que deben incluirse en la vigilancia de RAM de *Salmonella* spp., *C. coli*, *C. jejuni*, y los indicadores comensales *E. coli*, *E. faecalis* y *E. faecium* (EFSA, 2008, 2007).

A continuación, se describen los métodos de referencia para realizar las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos.

1.9.1 Métodos fenotípicos

1.9.1.1 Difusión en disco

Esta técnica consiste en inocular una suspensión estandarizada del microorganismo en un medio de cultivo (Agar *Müller-Hinton*) en el que coloca un disco de papel impregnado con el antibiótico a una concentración conocida. Tras la incubación durante 18-24 horas, el antibiótico difunde radialmente a través del agar formando una zona de inhibición del crecimiento, denominada "halo de inhibición", la cual se expresa en milímetros (**Figura 12**). La lectura de esta zona se interpreta como S (sensible), I (intermedia) o R (resistente) según las categorías establecidas por diferentes estándares de referencia, los cuales establecen unos valores para cada antibiótico.

Este método se utiliza en muchos laboratorios debido a su sencillez, bajo coste y rentabilidad a la hora de evaluar diferentes antibióticos, sin embargo, en aquellos laboratorios con grandes volúmenes de muestras, no es posible su automatización lo que supone mucho tiempo para su ejecución. En la última década, se han comercializado diferentes sistemas que permiten analizar la zona de inhibición reduciendo el tiempo, así como variabilidad en los resultados.

Esta técnica está influenciada por factores fisicoquímicos como pH, solubilidad o evaporación que pueden repercutir en los resultados, además de que en el caso de bacterias “exigentes” o de lento crecimiento, tiene bajo rendimiento. Por ello, es necesario incorporar al análisis cepas control para verificar la fiabilidad del ensayo (Khan et al., 2019).

1.9.1.2 Método Epsilon

El fundamento de este método es similar al de difusión en disco, pero permite una determinación más precisa de la susceptibilidad. Este método utiliza tiras de celulosa recubiertas con concentraciones predefinidas de antibióticos, que se colocan en una placa de agar pre-inoculada y se incuba durante una noche. Las zonas de inhibición corresponden con la elipse que se forma alrededor de la tira, en la cual aparecen marcadas las concentraciones de antibiótico, permitiendo una interpretación cuantitativa de la susceptibilidad mediante la determinación de la CMI (**Figura 12**) (Khan et al., 2019).

1.9.1.3 Dilución en agar

Esta técnica consiste en la incorporación de diluciones seriadas de antibiótico en un medio de cultivo agarado, seguido de la inoculación con hisopo del microorganismo objeto de estudio sobre la superficie del mismo. Si tras la incubación, el microorganismo ha sido capaz de crecer en la superficie del medio de cultivo, se interpretará como resistente a la concentración de antibiótico incorporada en la placa. Aquellas placas en las que no haya crecimiento se interpretarán como sensible a esas concentraciones. Esta técnica permite cuantificar mediante la CMI, sin embargo, es laboriosa debido a la utilización de medios de cultivo con diferentes concentraciones de antibiótico, el material preparado tiene una vida útil corta por lo que requiere su utilización en un tiempo máximo de 7 días (según el antibiótico utilizado) (Balouiri et al., 2016).

1.9.1.4 Macrodilución y microdilución en caldo

Esta técnica se basa en el mismo fundamento que la anterior, pero la suspensión bacteriana a una concentración predeterminada se enfrenta a diferentes concentraciones de antibiótico (diluciones seriadas), pero en medio líquido (**Figura 12**).

En la macrodilución, las diluciones en caldo se realizan en tubos de ensayo, sin embargo, debido al tiempo que supone la preparación del material, este ensayo se ha miniaturizado y estandarizado utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos a las que se añade concentraciones decrecientes de antibiótico, por lo que se denomina método de microdilución.

La microdilución en caldo es el método de referencia para llevar a cabo el test de susceptibilidad antimicrobiana en determinados microorganismos (EUCAST, 2021). En esta técnica la dispensación del inóculo bacteriano en los pocillos, puede realizarse mediante dispensadores automáticos para evitar errores de pipeteo. Tras la incubación, el crecimiento bacteriano se detecta por espectrofotometría, siendo la CMI la concentración más baja en la que no hay crecimiento bacteriano. Se comercializan placas de microtitulación con el antibiótico liofilizado de tal manera que su uso minimiza la variación entre laboratorios e incluso dentro de un mismo laboratorio (Khan et al., 2019).

La automatización de esta técnica proporciona resultados cuantitativos más precisos y fiables siendo un sistema muy utilizado en los laboratorios de microbiología clínica. Los equipos automáticos más usados son: *MicroScan WalkAway*, *Vitek-2*, *BD Phoenix Automated System* y *Sensititre* (Syal et al., 2017).

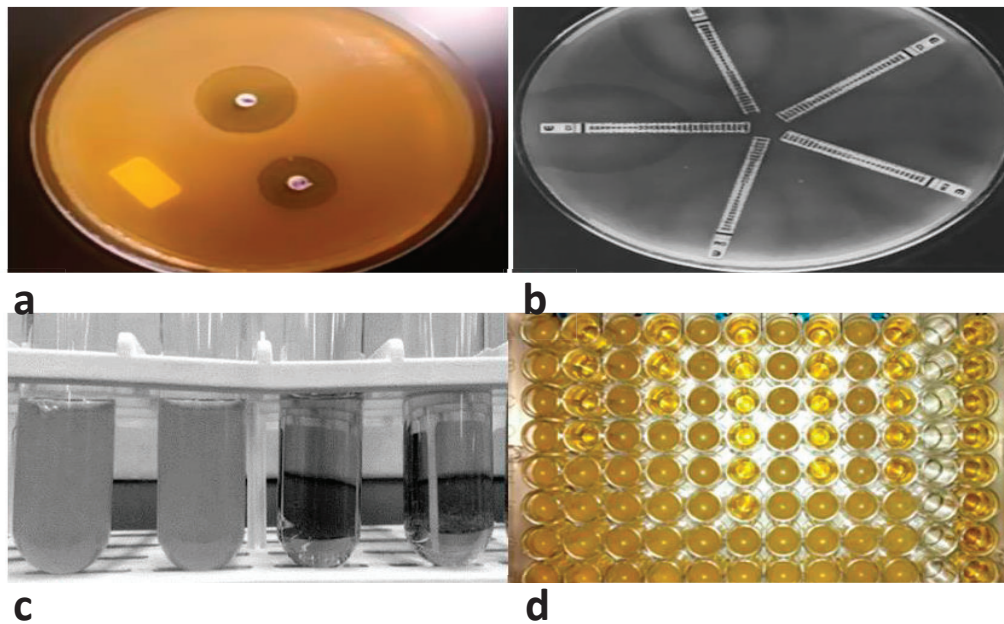


Figura 12. Presentación de varios métodos convencionales de prueba de susceptibilidad a antibióticos. a) Difusión en disco b) Epsilon test, c) macrodilución en caldo d) microdilución en caldo (Khan et al., 2019).

1.9.2 Métodos moleculares

El uso de técnicas de biología molecular permite detectar genes que codifican RAM permitiendo predecir el fenotipo de RAM de una manera rápida y precisa. Estas técnicas utilizan el ADN extraído del microorganismo, evitando metodologías laboriosas de microbiología, largos periodos de incubación, así como riesgos de contaminación bacteriana. Algunas de las técnicas que se han utilizado en las últimas décadas son: hibridación, microarrays, PCR (*Polimerase Chain Reaction*) o LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*). Estas técnicas son altamente sensibles y específicas por lo que actualmente están sustituyendo a los métodos tradicionales (Khan et al., 2019).

La PCR es una de las técnicas moleculares más rápidas, sensibles y eficientes que permiten detectar genes de RAM adquiridos, estudiar la frecuencia y distribución de éstos, así como detectar y caracterizar los elementos genéticos móviles involucrados en la transferencia horizontal de genes de RAM, como plásmidos, trasposones conjugativos o islas genómicas (Sweeney et al., 2018).

Tradicionalmente, el producto resultante de la reacción de amplificación era analizado por diferentes métodos basados en la separación electroforética, sin embargo; en los últimos años, esta técnica ha evolucionado permitiendo obtener resultados *in situ* mediante la incorporación de reactivos fluorescentes y sistemas ópticos que visualizan y monitorean en un termociclador los resultados en tiempo real (Matsuda, 2017).

La técnica PCR en tiempo real (siglas en inglés RT PCR) es altamente flexible ya que se pueden diseñar los cebadores y sondas específicas, permitiendo el análisis de los determinantes de RAM de mayor relevancia, así como el estudio de polimorfismos. (Matsuda, 2017). A día de hoy existen en el mercado multitud de soluciones listas para su uso, que facilitan la detección en tiempo real de diferentes dianas en una sola reacción sin manipulación de reactivos. Por todo ello, la RT-PCR se ha convertido en una técnica muy valiosa en los laboratorios de microbiología debido a su sencillez, bajo coste, sensibilidad, reproducibilidad y versatilidad (Wittwer, 2017).

Para la detección de numerosos marcadores de resistencia, la RT-PCR es una técnica robusta y fiable; sin embargo, en el caso de resistencias emergentes que no se han descrito con anterioridad, los métodos fenotípicos continúan siendo necesarios (Feldgarden et al., 2019). Cada vez son más las resistencias antimicrobianas descritas y conforme se van descubriendo y fabricando más antibióticos con mecanismos de acción diferentes, las bacterias se van adaptando y generando nuevas estrategias para evadir la acción antimicrobiana. Esto hace necesario el estudio y evaluación continua de los mecanismos de acción de los antimicrobianos, así como los sistemas de evasión que las bacterias utilizan para sobrevivir.

En este sentido, en los últimos años se ha introducido la secuenciación del genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS) como técnica para evaluar la totalidad de los genes de RAM. Esta herramienta permite identificar de una forma precisa los determinantes genéticos contenidos en el genoma, detectar mutaciones, así como descubrir nuevas variantes de RAM, sirviendo de base para predecir fenotipos de resistencia sin necesidad de pruebas fenotípicas; sin embargo, dado su elevado coste y la ausencia, hasta el momento, de bases de datos de genes de RAM completas y actualizadas, la secuenciación masiva sólo se ha integrado en entornos clínicos y de salud pública, como herramienta de ayuda para la identificación y seguimiento de brotes hospitalarios (Ellington et al., 2017; Tyson et al., 2017).

A pesar de que la CMI es el método de referencia para el estudio de RAM, la RT PCR o WGS se consideran técnicas prometedoras que puede sustituir los ensayos fenotípicos convencionales en un futuro (WHO, 2019b).

1.10 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en este trabajo se plantea profundizar en el conocimiento de la RAM asociada a microorganismos de interés tecnológico e higiénico presentes en alimentos de origen animal.

Enterococcus es uno de los géneros bacterianos que requiere mayor atención dado su importante papel en la producción de ciertos alimentos y su implicación en los últimos años como patógeno nosocomial. El G^o *Enterococcus* constituye un grupo microbiano de gran interés dentro de las BAL cuya presencia en alimentos fermentados está influenciada en muchas ocasiones por su capacidad de diseminación y su persistencia en el medio ambiente, formando parte importante de la microbiota secundaria de muchos alimentos.

Su elevada prevalencia en el intestino de humanos y animales, y disposición para resistir condiciones ambientales desfavorables, refuerza su carácter ubicuitario. Esto, sumado a su capacidad para transferir material genético lo convierte en un idóneo traficante de elementos genéticos móviles portadores de mecanismos de RAM. Además, *Enterococcus* es capaz de recibir y transferir genes de resistencias entre aislados de distintas especies, géneros o incluso familias que comparten nicho. Esto indica que existen altas probabilidades de que otros microorganismos presentes en los alimentos puedan adquirir nuevas RAM. De esta manera, el estudio de RAM en este género bacteriano proporciona información acerca de los posibles reservorios de bacterias resistentes considerándose un buen indicador tanto en medicina humana como veterinaria.

El queso, es un producto fermentado en cuyo proceso de maduración intervienen una gran variedad de géneros y especies microbianas. Se trata de un medio idóneo para el intercambio y adquisición de nuevos determinantes de RAM y como consecuencia, una ruta potencial de bacterias resistentes al hombre.

Por todo ello, en este trabajo se ha considerado el estudio de la RAM en aislados de *Enterococcus* utilizando como matriz alimentaria modelo el proceso de fabricación de una variedad de queso elaborado con leche cruda de oveja en la provincia de Teruel.

El **objetivo general** de la presente tesis doctoral es evaluar la cadena alimentaria como entorno favorable para la transmisión y diseminación de RAM, estudiando la prevalencia de resistencia en *Enterococcus* spp. de origen lácteo y caracterizando su perfil de resistencia antimicrobiana y

diversidad filogenética. Con ello, se pretende contribuir al seguimiento de la diseminación y/o emergencia de las resistencias antimicrobianas en el contexto de *Una Sola Salud*.

Para llevar a cabo este objetivo general, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar y correlacionar el patrón de susceptibilidad y el perfil genotípico de resistencia a antibióticos de uso común.
2. Caracterizar los mecanismos de resistencia transferibles.
3. Estudiar la relación clonal de los aislados de *Enterococcus* spp. detectados en las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso curado de leche cruda de oveja mediante diferentes marcadores moleculares.
4. Valorar la técnica molecular RAPD PCR como alternativa a la técnica PFGE para el seguimiento epidemiológico de la resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp.
5. Evaluar la importancia para la salud pública de la resistencia antimicrobiana asociada a *E. faecalis* y *E. faecium* el enfoque *Una Sola Salud*.
6. Analizar el entorno de producción de queso como modelo de fuente de microorganismos comensales portadores de resistencia antimicrobiana en la cadena alimentaria.



CAPÍTULO II

Material y métodos

2 CAPITULO II: MATERIAL Y MÉTODOS

El material empleado para llevar a cabo el presente estudio aparece reflejado en cada una de las metodologías que se detallan más adelante.

2.1 Revivificación de los aislados del G^o *Enterococcus*

Se seleccionaron un total de 80 aislados clasificados presuntivamente como pertenecientes al G^o *Enterococcus*, obtenidos de un trabajo previo a partir de diferentes tipos de muestras procedentes del proceso de fabricación de una variedad de queso elaborado con leche cruda de oveja (Blasco, 2013):

1. Leche cruda de oveja
2. Cuajada: producto de coagulación de la leche tras la adición del fermento
3. Queso obtenido en diferentes momentos del proceso de maduración: 3, 7, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días.

Las muestras pertenecían a dos centros de producción distintos situados en la provincia de Teruel (CP1 y CP2, respectivamente) y todas ellas correspondían al mismo lote de fabricación de cada uno de los centros.

En la **Tabla 1** aparece la distribución y número de aislados analizados en función del centro de producción y de la etapa del proceso de fabricación.

Tabla 1. Distribución y número de aislados de *Enterococcus* spp. estudiados en función del centro de producción y etapa del proceso de fabricación.

Centro de producción	Etapa del proceso										Total
	Leche	Cuajada	3 días	7 días	15 días	30 días	60 días	90 días	120 días	180 días	
CP1	4	1	6	5	2	5	3	4	7	6	43
CP2	6	3	5	4	5	2	2	3	3	4	37
Total	10	4	11	9	7	7	5	7	10	10	80

Todas las muestras (leche, cuajada y queso) habían sido obtenidas previamente de acuerdo a la norma ISO 707/IDF 50 para leche y productos lácteos. Los aislados procedían del medio KEA (Kanamicina, Esculina, Azida) previa incubación a 37 °C/24-48 horas. Se seleccionaron colonias de color gris-negro con un halo de color marrón-negruzco como consecuencia de la hidrólisis de la

esculina y formación de esculinato de hierro. Todos los aislados se mantuvieron en crioviales a -80 °C (*Vibakstore*, Nirco, Barcelona, España) hasta su posterior análisis.

Antes de los ensayos, cada uno de los aislados fue revivificado traspasando un anillo poroso de los crioviales a caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Merck, Darmstadt, Alemania). Tras la incubación a 37 °C/24 h, se realizó un pase a medio de cultivo sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*, Merck, Darmstadt, Alemania) incubándose a 37 °C durante 24 horas.

2.2 Identificación de *Enterococcus* spp. por MALDI-TOF

La identificación de los aislados se realizó mediante Espectrometría de masas MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), método basado en la detección y análisis de las proteínas ribosomales del ARNr 16S. El protocolo llevado a cabo fue el recomendado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (Oviaño et al., 2019) y se realizó en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) de Madrid.

2.3 Determinación *in vitro* del patrón de sensibilidad/resistencia a antibióticos

El estudio de susceptibilidad antibiótica se llevó a cabo con los 80 aislados del G^o *Enterococcus* identificados a nivel de especie mediante la técnica MALDI-TOF.

Se determinó de forma cualitativa la sensibilidad a 16 antibióticos pertenecientes a 10 clases distintas (**Tabla 2**) mediante el método de difusión en disco recomendado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI), (CLSI, 2011) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST), (Leclercq et al., 2013).

Preparación y estandarización del inóculo

A partir de cada uno de los 80 aislados se transfirió una colonia a un tubo con 10 mL de caldo BHI el cual se incubó a 37 °C durante una noche (14-16 horas). Posteriormente, se preparó una suspensión bacteriana en caldo BHI ajustada a una densidad de 0,5 Mc Farland, correspondiente a 1-2 x 10⁸ UFC/mL.

Método de difusión en disco

Cada uno de los inóculos se sembraron sobre la superficie de placas de agar Müller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) con ayuda de una torunda para obtener crecimiento en césped.

A continuación, se dispensaron los discos de antibiótico (*Biodisc*, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) sobre la superficie del agar con una separación aproximada de 1 cm entre ellos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Para comprobar el rendimiento de la prueba se empleó la cepa de referencia *S. aureus* CECT 435, cuyo halo de inhibición se encuentra estandarizado para los antibióticos estudiados a excepción de gentamicina y estreptomicina, para los cuales se empleó la cepa de referencia *E. faecalis* CECT 795 (CLSI, 2011).

Lectura e interpretación de resultados

Tras la incubación se midió el halo de inhibición obtenido para cada uno de los antibióticos utilizando un pie de rey que permite la medición en milímetros. En la **Tabla 2** se presentan los estándares utilizados para la interpretación de los resultados. Se emplearon los puntos de corte establecidos por el CLSI a excepción de los antibióticos ciprofloxacino, levofloxacino, teicoplanina, quinupritina/dalfopristina y trimetopina/sulfometoxazol, para los cuales se emplearon los puntos de corte establecidos por EUCAST (CLSI, 2011; EUCAST, 2020). En el caso de clindamicina, actualmente CLSI y EUCAST no establecen puntos de corte debido a que los enterococos son intrínsecamente resistentes a este antibiótico, sin embargo, pueden aparecer activos *in vitro*, por lo que se empleó el punto de corte establecido por el Comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (*Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie*, CASFM), (CA-SFM, 2013).

Tabla 2. Antibióticos ensayados, concentración y valores críticos de los diámetros (mm) de la zona de inhibición recomendados por CASFM (2013), CLSI (2014) y EUCAST (2020).

Clase de antibiótico	Antibiótico ensayado	Concentración	Halo de inhibición (mm)		
			Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)
Aminoglucósidos	Estreptomina**	300 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
	Gentamicina**	120 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
Betalactámicos	Ampicilina**	10 µg	< 16	-	≥ 17
	Penicilina**	10 U	< 14	-	≥ 15
Diaminopiridina/ Sulfonamidas	Trimetoprina- Sulfametoxazol*	25 µg	≤ 21	-	> 50
Estreptograminas	Quinupristina- Dalfopristina*	15 µg	< 22	-	≥ 20
Glucopéptidos	Teicoplanina*	30 µg	< 16	-	≥ 16
	Vancomicina**	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Lincosamidas	Clindamicina***	2 µg	< 15	-	≥ 15
Macrólidos	Eritromicina**	15 µg	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Oxazolidinonas	Linezolid**	30 µg	≤ 20	21 - 22	≥ 23
Quinolonas	Ciprofloxacino*	5 µg	< 15	-	≥ 15
	Levofloxacino*	5 µg	< 15	-	≥ 15
Tetraciclinas	Tetraciclina**	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
	Minociclina**	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19

*EUCAST 2020; **CLSI 2014; ***CASFM 2011

2.4 Análisis de los determinantes genéticos de resistencia por RT PCR

Todos los aislados de *Enterococcus* spp. fueron analizados para determinar el perfil genotípico de resistencia a antibióticos, mediante la técnica RT PCR por análisis de curvas *melting* o curvas de disociación, de acuerdo con la metodología que se describe a continuación.

2.4.1 Determinantes genéticos de resistencia y cepas dianas de referencia

Para el estudio genético de las resistencias antimicrobianas se eligieron como diana 19 determinantes genéticos. La elección de los genes de RAM a analizar se hizo de acuerdo a los antibióticos testados *in vitro* (Tabla 2).

Como controles positivos del análisis RT PCR se utilizaron 14 cepas bacterianas portadoras de los genes objeto de estudio. En la **Tabla 3** se recogen las cepas utilizadas, así como el gen portador y la resistencia antibiótica asociada. Todas las cepas de referencia fueron cedidas amablemente por la Dra. Carmen Torres perteneciente al área de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de la Rioja, a excepción de la cepa *Enterococcus faecium* CECT 5253 que procede de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Tabla 3. Cepas diana de referencia, genes y resistencia antibiótica asociada.

Cepa bacteriana	Gen	Resistencia antibiótica
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>mef A</i>	Macrólidos
	<i>tet M</i>	Tetraciclinas (Tetraciclina y minociclina)
<i>Staphylococcus aureus</i> C1923	<i>tet L</i>	Tetraciclinas (Tetraciclina y minociclina)
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	<i>erm A</i>	MLS _B *
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	<i>erm B</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	<i>msr A</i>	MS _B **
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	<i>lnu A</i>	Lincosamidas (Clindamicina)
<i>Staphylococcus aureus</i> C2944	<i>lnu B</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	<i>ant(6)-la</i>	Aminoglucósidos (Estreptomina)
	<i>van B</i>	Glucopéptidos (Vancomicina)
<i>Enterococcus faecalis</i> C3679	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-la</i>	Aminoglucósidos (Gentamicina)
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 5253	<i>van A</i>	Glucopéptidos (Vancomicina y teicoplanina)
-	<i>vat D</i>	Estreptograminas A
-	<i>vat E</i>	
<i>Enterococcus faecium</i> C1708	<i>cat A</i>	Anfenicoles (Cloranfenicol)
<i>Staphylococcus hominis</i> C5862	<i>cat_{PC194}</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> C4159	<i>cat_{PC221}</i>	
<i>Enterococcus faecium</i> C10004	<i>fex A</i>	
	<i>fex B</i>	

*MLS_B: Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B.

**MS_B: Macrólidos y Estreptograminas B.

Para el estudio de los genes *vat D* y *vat E*, que codifican resistencia a estreptograminas A no se emplearon cepas de referencia portadoras de dichos genes ya que no fue posible su adquisición.

2.4.2 Aislamiento de ácidos nucleicos

A continuación, se describen los métodos utilizados para la extracción de ADN genómico. Asimismo, se aisló el ADN plasmídico de aquellos aislados en los que se detectó al menos un gen de resistencia antibiótica con el fin de comprobar su ubicación plasmídica.

En todos los casos se evaluó la concentración y pureza del ADN extraído mediante espectrofotometría empleando un espectrofotómetro *NanoDrop™ 2000 UV-Vis* con la ayuda del programa informático asociado *Nanodrop 2000/2000c Versión 1.3.1*. Para ello se utilizó 1 µL de ADN extraído de cada una de los aislados analizados, con el equipo previamente calibrado con el blanco correspondiente.

La concentración de ADN se determinó en µg/mL y fue calculada teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm (absorbancia máxima del ADN) aplicando la siguiente fórmula:

$$[ADN] \mu\text{g/mL} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times FD$$

Donde:

A₂₆₀: absorbancia medida a 260 nm

FD: Factor Dilución

La pureza se evaluó a partir de la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} considerando que un ADN de pureza óptima tiene un valor comprendido entre 1,7-2,0. Valores por encima de 2,1 podrían deberse a la presencia de ARN, mientras que un ratio menor de 1,6 se relaciona con una posible contaminación por compuestos como fenoles y proteínas (Olson and Morrow, 2012).

2.4.2.1 Aislamiento del ADN total FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Mini Kit (Método 1)

Para la extracción de ADN, se utilizó el producto comercial *FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Mini Kit* (Blood/Cultured Cell), (FavorGen Biotech Corp®) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, descrito a continuación.

1) Lisis bacteriana. Este paso se realiza para inducir la lisis y promover la liberación del ADN al medio.

- Se incubó una colonia en 10 mL de caldo BHI a 37 °C durante 18-24 horas.
- Se transfirió 1 mL del cultivo a un eppendorf estéril de 1,5 mL, previa homogeneización y se centrifugó a 18 000 g durante 1 minuto en microcentrífuga (Microfuge® 18 Centifuge, Beckman Coulter™).
- Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de *Buffer de lisozima* (lisozima 20 mg/mL, 20 mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1 % Tritón X-100; pH 8) y se resuspendió el “pellet” con la micropipeta. Se mantuvo la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente, invirtiendo el eppendorf cada 2-3 minutos.
- Se agregaron 200 µL del buffer *FavorPrep Blood Genomic (FABG)* y se homogeneizó en vortex (Vortex-Genie™ 2, Scientific Industries™) durante 5 segundos.
- Se incubó a 70 °C durante 10 minutos en termoblock (Block Heater SBH130, Stuart®), invirtiendo el eppendorf cada 3 minutos.

2) Unión del ADN a la columna FABG

- Se adicionaron 200 µL de etanol (96-100 %) y se homogenizó en vortex durante 10 segundos.
- Se colocó la columna *FABG* en un tubo colector de 2 mL, y se transfirió la muestra problema a la columna. Después, se centrifugó a 18 000 g durante 5 minutos en microcentrífuga y se descartó el tubo inferior.

3) Lavado de la columna FABG

- Se dispuso un nuevo tubo colector de 2 mL, se añadieron 400 µL de buffer W1 y se centrifugó la columna junto con el tubo a 18 000 g durante 30 segundos y el eluido fue descartado.
- Se emplazó otro tubo colector y se lavó la columna con 600 µL de buffer de lavado (con etanol adicionado según especificaciones). Se centrifugó a 18 000 g durante 30 segundos y el eluido fue descartado.
- Se ubicó un nuevo tubo colector de 2 mL bajo la columna y se centrifugó a 18 000 g durante 3 minutos, con el objetivo de secar la columna.

4) Elución del ADN unido a la columna FABG

- Se colocó un eppendorf estéril de 1,5 mL bajo la columna *FABG* y se añadieron 100 μ L del buffer de elución, previamente precalentado a 70 °C en baño de agua, en el centro de la columna.
- Se mantuvo la columna en posición vertical durante 5 minutos, para asegurar la completa absorción del buffer por la membrana, y se centrifugó a 18 000 g durante 3 minutos en microcentrífuga para eluir el ADN extraído.

5) Conservación del ADN. El ADN aislado se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

En todos los casos el proceso de extracción de ADN se realizó por duplicado. Como control negativo de la extracción se utilizó 1 mL de caldo BHI estéril sometiéndolo al mismo proceso anterior.

2.4.2.2 Aislamiento de ADN total: Lisostafina y Proteinasa K (Método 2)

En los casos en los que el producto comercial (método 1) no fue lo suficientemente eficiente para romper la pared celular de las bacterias, se utilizó el método recomendado por la SEIMC para *Staphylococcus* spp. (Coll et al., 2005).

Para llevar a cabo este procedimiento, se utilizó Lisostafina a una concentración de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich®), Proteinasa K a una concentración de 2 mg/mL (Bioron®), Tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8 y Agua miliQ estéril.

- 1)** A partir de una colonia aislada en medio TSA, se resuspendió en un eppendorf estéril de 1,5 mL con 45 μ L de agua miliQ y 5 μ L de lisostafina y se homogenizó en vortex e incubó a 37 °C durante 10 minutos en un termoblock (Block Heater/SBH 130/Stuart®).
- 2)** Se añadieron 45 μ L de agua miliQ, 5 μ L de proteinasa K y 150 μ L de Tris-HCl. Se homogeneizó en vortex y se incubó a 60 °C durante 10 minutos y posteriormente a 100 °C durante 5 minutos en termoblock.
- 3)** Tras la incubación, se centrifugó a 13 300 g durante 3 minutos en un equipo Beckman coulter TM.
- 4)** Se recogió el sobrenadante, (aproximadamente 200 μ L) en un eppendorf estéril de 0,2 mL. Esta solución de ADN se conservó en congelación a -20 °C hasta su amplificación por PCR.

Al igual que en el método 1, todo el proceso se realizó por duplicado para todos los aislados y para el control de contaminación durante la extracción, se realizó el mismo procedimiento sin resuspender ninguna colonia en el primer paso.

2.4.2.3 Aislamiento de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se empleó el kit comercial *Plasmid MiniPrep Kit*[®], (Norgen Biotek Corp.), siguiendo las instrucciones del fabricante:

1) Lisis bacteriana

- Se incubó una colonia en 10 mL de caldo BHI a 37 °C durante 18-24 horas.
- Se transfirió 1 mL del cultivo a un eppendorf estéril de 1,5 mL, previa homogeneización y se centrifugó la muestra a 18 000 g durante 30 segundos utilizando el equipo Beckman Coulter™
- Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se añadieron 200 µL de resuspension buffer (con RNAsas).
- Se resuspendió el “pellet” con la micropipeta y se mantuvo 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionaron 250 µL de *Lysis solution* y se homogeneizó por inversión.
- Se agregaron 350 µL de *Binding buffer* y se mezcló por inversión, provocando la precipitación de proteínas y ADN genómico. Se centrifugó a 18 000 g durante 10 minutos en la microcentrífuga citada.

2) Unión del ADN plasmídico a la columna

- Se transfirió el sobrenadante a la columna y se centrifugó a 18 000 g durante 1 minuto en microcentrífuga. Se desechó el líquido eluído y el ADN plasmídico quedó unido a la membrana de la columna.

3) Lavado de la columna

- Se añadieron 600 µL de *Wash solution* a la columna y se centrifugó a 18 000 g durante 1 minuto. Se desechó el eluído y se centrifugó de nuevo la columna a 18 000 g durante 2 minutos con el objetivo de secarla.

4) Elución del ADN plasmídico

- Se colocó la columna sobre un eppendorf estéril de 1,5 mL y se añadieron 50 µL de *Elution buffer* en el centro de la columna.
- Se mantuvo la columna en posición vertical durante 1 minuto para asegurar la completa absorción del buffer por la membrana y se centrifugó a 18 000 g durante 2 minutos para eluir el ADN plasmídico extraído.

5) **Conservación del ADN plasmídico.** El ADN plasmídico obtenido se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

La extracción de cada uno de los aislados se realizó por duplicado. Al igual que en el caso del ADN total (método 1), como control de contaminación durante la extracción se utilizó 1 mL de caldo BHI estéril sometiéndolo al mismo proceso de extracción.

2.4.3 Amplificación por PCR en tiempo real

Para la detección de los determinantes genéticos de resistencia se ha utilizado la RT PCR, mediante el mecanismo de detección no específico basado en el agente intercalante fluorescente SYBR Green.

2.4.3.1 Cebadores

El ADN obtenido de cada uno de los aislados objeto de estudio se amplificó por RT PCR con los cebadores seleccionados de la bibliografía. En el **Cuadro 3** se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada uno de los genes de resistencia seleccionados, el mecanismo de resistencia asociado a cada uno de ellos, así como el tamaño del fragmento de amplificación correspondiente. Además, para los genes *vat D* y *vat E* se diseñaron cebadores específicos mediante la herramienta *Primer3 versión 4.1.0*, y se confirmó su adecuación mediante el software *SnapGene versión 4.3*.

Cuadro 3: Características de los cebadores utilizados para la amplificación de los diferentes genes de resistencia.

Gen de resistencia	Secuencia del cebador (5'-3')	Pares de bases (pb)	Fuente
mef A (<i>Macrolide Efflux</i>)	(F) AGTATCATTAACTACTAGTG (R) TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	345	(Morvan et al., 2010)
msr A (<i>Macrolide Streptogramin Resistance</i>)	(F) GCAAATGGTGTAGGTAAGACA (R) ATCATGTGATGTAACAAAAT	401	(Morvan et al., 2010)
erm A (<i>Erytromycin Ribosome Methylase</i>)	(F) CTTGATAGTTTATTAATATTAGT (R) TCTAAAAAGCATGTAAGAA	645	(Morvan et al., 2010)
erm B (<i>Erytromycin Ribosome Methylase</i>)	(F) GAAAAGGTAACAACAAATA (R) AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	636	(Morvan et al., 2010)
lnu A (<i>Lincomycin Nucleotidyl-Transferasa</i>)	(F) GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTA (R) GCTTCTTTGAAATACATGGTATTTTCGATC	323	(Lina et al., 1999)
lnu B (<i>Lincomycin Nucleotidyl-Transferasa</i>)	(F) CCTACCTATTGTTTGTGGAA (R) ATAACGTTACTCTCCTATTC	944	(Arana et al., 2014)
tet L (<i>Efflux Tetracycline</i>)	(F) CCACCTGCGAGTACAACTGG (R) TCGGCAGTACTAGCTGGTGA	739	(Morvan et al., 2010)
tet M (<i>Ribosomal Protection Tetracycline</i>)	(F) GTGGACAAAGGTACAACGAG (R) CGGTAAAGTTCGTACACAC	405	(Morvan et al., 2010)
ant(6)-la (<i>Nucleotidil Transferase</i>)	(F) ACTGGCTTAATCAATTTGGG (R) GCCTTTCCGCCACTCACCG	596	(Clark et al., 1999)
aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia (<i>2'- Fosfotransferase-6'- Acetiltransferase</i>)	(F) CCAAGAGCAATAAGGGCATA (R) CACTATCATAACCACTACCG	219	(Van de Klundert and Vliegthart, 1993)
van A (<i>Vancomycin A type</i>)	(F) GGGAAAACGACAATTGC (R) GTACAATGCGCCGTTA	732	(Dutka-Malen et al., 1995)
van B (<i>Vancomycin B type</i>)	(F) CAAAGCTCCGAGCTTGCATG (R) TGCATCCAAGCACCCGATATAC	484	(Dahl et al., 1999)
vat D (<i>Virginiamycin Acetyltransferases</i>)	(F) GCTCAATAGGACCAGGTGTA (R) TCCAGCTAACATGTATGGCG	272	(Soltani et al., 2000)
	(F) CATAGAATGGATGGCTCAACA (R) CCGATTTTACTCCTGGCATA	161	Diseño propio

Gen de resistencia	Secuencia del cebador (5´-3´)	Gen de resistencia	Fuente
vat E (<i>Virginiamycin Acetyltransferases</i>)	(F) ACTATACCTGACGCAAATGC (R) GGTCAAATCTTGGTCCG	512	(Soltani et al., 2000)
	(F) TGA CTGATTTGCCGTTGAAA (R) GGTCCGATGAGTTGAATTGG	184	Diseño propio
cat A (<i>Cloranfenicol Acetil Transferase</i>)	(F) GGATATGAAATTTATCCCTC (R) CAATCATCTACCCTATGAAT	486	(Aarestrup et al., 2000)
cat_{pc194} (<i>Cloranfenicol Acetil Transferase Plasmide</i>)	(F) CGACTTTTAGTATAACCACAGA (R) GCCAGTCATTAGGCTAT	570	(Schnellmann et al., 2006)
cat_{pc221} (<i>Cloranfenicol Acetil Transferase Plasmide</i>)	(F) ATTTATGCAATTATGGAAGTTG (R) TGAAGCATGGTAACCATCAC	434	(Schnellmann et al., 2006)
fex A (<i>Exporter Florfenicol Efflux</i>)	(F)GCGATTGGAGTTCGATT (R) GCCAACGAAGGGAGATAAGAT	795	(Osman et al., 2019)
fex B (<i>Exporter Florfenicol Efflux</i>)	(F) GCAAGTTAGTTGGGTCGTAAG (R) AAGCGATACCTATCCCTAAC	974	(Osman et al., 2019)

2.4.3.2 Reacción de amplificación por RT PCR

Para llevar a cabo la RT PCR se utilizó el fluoróforo *SYBR Green* que se excita a 497 nm y emite a 520 nm. La reacción de amplificación se llevó a cabo en tiras de 8 pocillos de 0,2 mL con tapa óptica (0,2 mL 8-Tube PCR Strips, Bio-Rad) empleando un Termociclador (*Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System*, Bio-Rad).

Las reacciones de amplificación se prepararon empleando indistintamente dos mastermix: *FastStart SYBR Green Master* (Roche Applied Science) o *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad).

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µL teniendo en cuenta las indicaciones de los fabricantes (**Tabla 4**).

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación por RT PCR de los determinantes de resistencia antibiótica.

Componentes	Volumen (μL)
<i>FastStart SYBR Green Master (Roche Applied Science) *</i>	12,5
Cebador (<i>Forward</i>)	0,5
Cebador (<i>Reverse</i>)	0,5
Agua milliQ estéril	9
Solución ADN diana	2,5

* Indistintamente se empleó *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)*

La concentración de ADN diana utilizada en la reacción se estableció en base al intervalo dinámico calculado de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.4.4.2. Para el análisis de ADN total fue de 20 ng/μL, y entre 2 y 10 ng/μL cuando se analizó ADN plasmídico. Asimismo, en todos los ensayos se utilizó ADN de la cepa diana de referencia como control positivo y agua milliQ estéril libre de nucleasas como control negativo de contaminación (*No Template Control, NTC*).

La concentración de cada pareja de cebadores empleados en la reacción fue optimizada experimentalmente, tal y como se expone en el apartado 2.4.4.1 y como aparece mostrado en la **Tabla 5**. Para la amplificación de los genes *vat D* y *vat E* se emplearon las condiciones recomendadas por el fabricante de la mastermix con la que se realizaron estos experimentos (*iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad*).

Tabla 5. Concentración de cebadores empleada en la mezcla PCR para la amplificación de cada uno de los determinantes de resistencia antibiótica.

Genes de resistencia	Concentración de cebadores (μM)
<i>aac (6')-Ie-aph (2''), van A, van B</i>	0,2
<i>mef A, msr A, erm B, lnu A, tet L, tet M, ant (6)-Ia, vat D, vat E, cat A, cat_{pC194}, cat_{pC221}</i>	0,4
<i>erm A, lnu B, fex A, fex B</i>	1

El programa seleccionado para la amplificación del ADN se basó en los ciclos y temperaturas recomendadas por el fabricante de la Master mix (Biorad y Roche) (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Protocolo térmico empleado para la amplificación en tiempo real de los determinantes de resistencia antibiótica.

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación <i>Hot Start</i>	5 minutos	94 °C
	Desnaturalización	1 minutos	94 °C
30	Hibridación	60 segundos	Ensayada experimentalmente*
	Elongación (Lectura de fluorescencia)	2 minutos	72 °C
1	Extensión final	10 minutos	72 °C
1	Curva de fusión	Lectura de fluorescencia cada 0,5 °C durante 2 segundos	Aumento de temperatura de 50 a 95 °C

*La temperatura de hibridación fue optimizada experimentalmente junto con la concentración de cebadores tal y como se expone en el apartado 2.4.4, mostrando la temperatura final aplicada para cada juego de cebadores en la Tabla 6. Para la amplificación de los genes *vat D* y *vat E* se emplearon las condiciones recomendadas por el fabricante de la master mix con la que se realizaron estos experimentos (*iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix*, Bio-Rad).

Tabla 6. Temperatura de hibridación para la amplificación de cada uno de los determinantes de resistencia antibiótica mediante la reacción de RT PCR.

Temperatura de hibridación (°C)	Genes de resistencia
51	<i>erm A</i>
54	<i>msr A, erm B, lnu B, ant (6)-Ia</i>
58	<i>mef A, tet M, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, van A</i>
59	<i>lnu A</i>
60	<i>van B, vat D, vat E, cat A, cat_{pC194} y cat_{pC221}, fex A, fex B</i>
61	<i>tet L</i>

La especificidad de los cebadores seleccionados se evaluó a partir de la curva de fusión. Esta curva refleja la temperatura de fusión (T_m) a la cual el 50 % de la molécula de ADN está desnaturalizada. Este valor es característico para cada secuencia ya que depende de la composición y el tamaño de la molécula y fue utilizado para verificar la amplificación específica del gen de resistencia objeto de estudio.

Se consideró presencia del gen cuando el producto amplificado presentó una T_m equivalente al valor obtenido para el control positivo $\pm 0,5$ °C.

En la **Tabla 7** se recoge la T_m correspondiente a la amplificación de cada uno de los genes de resistencia antimicrobiana obtenida a partir del análisis de las cepas de referencia.

Tabla 7. Temperatura de fusión (T_m) de cada uno de los genes de resistencia portados por las cepas de referencia.

Cepa diana de referencia	Gen de resistencia	T_m (°C)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>mef A</i>	77,5
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	<i>msr A</i>	74,5
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	<i>erm A</i>	75
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	<i>erm B</i>	78
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	<i>lnu A</i>	74
<i>Staphylococcus aureus</i> C2944	<i>lnu B</i>	74
<i>Staphylococcus aureus</i> C 1923	<i>tet L</i>	78
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>tet M</i>	75
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	<i>ant(6)-Ia</i>	82,5
<i>Enterococcus faecalis</i> C3679	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	78,5
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 5253	<i>van A</i>	88
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	<i>van B</i>	87
<i>Enterococcus faecium</i> C1708	<i>cat A</i>	75,5
<i>Staphylococcus hominis</i> C5862	<i>cat_{pC194}</i>	78
<i>Staphylococcus aureus</i> C4159	<i>cat_{pC221}</i>	75
<i>Enterococcus faecium</i> C10004	<i>fex A</i>	81,5
	<i>fex B</i>	79

2.4.3.3 Confirmación del producto amplificado por secuenciación

La identidad de cada uno de los determinantes de resistencia detectados se confirmó mediante secuenciación siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

1) Amplificación por PCR convencional

Se utilizó la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación establecidas experimentalmente, tal y como se describe en el apartado 2.4.3. Igualmente, en cada ensayo se incluyó agua milliQ estéril libre de nucleasas como control negativo de contaminación de PCR.

2) Electroforesis Horizontal en gel de agarosa

La amplificación de los productos de PCR y el tamaño de los mismos se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa empleando una cubeta de electroforesis (*Wide-mini Subcell GT base*, Bio-Rad) provista de fuente de alimentación (*PowerPac Basic Power Supply 100-120/220V*, Bio-Rad). El gel se preparó con agarosa (*Molecular Biology Grade*, Bioron), a una concentración de 1-1,5 % peso/volumen (mayor porcentaje cuanto menor es el tamaño de las bandas esperadas) en tampón TBE 1X (Tampón Tris Borato EDTA 10X diluido, Bio-Rad). Para visualizar los fragmentos de ADN se añadieron 5 μ L del tinte *Midori Green Advance DNA stain* (Nippon Genetics).

En cada pocillo del gel se cargaron 5 μ L del producto de PCR y 1 μ L de tampón de carga (*Gel Loading Buffer II 2x*, Bioron). Se utilizó como control un marcador de peso molecular de separación de hasta 1500 pares de bases (100 bp *DNA Ladder*, Bioron) para determinar el tamaño de los amplicones de ADN entre 100 y 1000 bp. La electroforesis se llevó a cabo en un campo eléctrico de 90 V de acuerdo al peso molecular de los amplicones (entre 200 y 900 pb) durante 30-40 minutos.

3) Purificación y secuenciación del ADN amplificado

Los productos de PCR confirmados en gel de agarosa se purificaron para su secuenciación empleando el kit comercial *Dye Cleanup IBIAN*[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante:

- 1) Se añadieron 250 μ L de *Buffer Binding* y 20 μ L del producto amplificado en un tubo eppendorf estéril de 1,5mL y se homogenizaron con micropipeta o vortex.
- 2) Se colocaron los filtros que incluye el kit, en tubos Eppendorf de 2 ml y se transfirió la mezcla, para centrifugarse a 13 300 g durante 3 minutos.
- 3) Una vez centrifugado, se sacó el filtro y se colocó sin invertir en un nuevo Eppendorf de 1,5 mL.
- 4) Se añadieron 20 μ L de *Buffer de elución* directamente en el centro del filtro, y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente.
- 5) Posteriormente se centrifugó a 13 300 g durante 1 minuto. El sobrenadante obtenido contiene la suspensión de ADN purificado.

Para confirmar la pureza del ADN obtenido, se realizó la lectura espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm empleando el mismo protocolo descrito en el apartado 2.4.2. Igualmente se comprobó la integridad del ADN purificado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 %.

El producto purificado, se almacenó en congelación a -20 °C hasta su secuenciación. La secuenciación de todos los amplicones se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Sanger STAB VIDA de la Universidad Nova de Lisboa (Portugal) empleando un secuenciador de ADN automático modelo ABI PRISM-3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las muestras se enviaron preparando previamente una mezcla constituida por 10 µL del ADN purificado a una concentración ≥ 20 ng/µL y 3 µL del primer Forward correspondiente, a una concentración de 10 pmol/µL.

Los resultados obtenidos se contrastaron en la base de datos *on line* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

2.4.4 Optimización de la RT PCR para la detección de resistencias antibióticas

La técnica PCR en Tiempo Real por análisis de curvas *melting* fue estandarizada para la detección de genes específicos que codifican resistencia a antibióticos en *Enterococcus* spp.

2.4.4.1 Concentración de cebadores y temperatura de hibridación

La reacción de amplificación PCR se optimizó para cada pareja de cebadores con el objetivo de determinar la concentración de cebadores y temperatura de hibridación más adecuadas.

Para ello, se diseñó un ensayo combinando 3 concentraciones diferentes de cebadores en la reacción: 0,2 µM, 0,5 µM y 1 µM. Las temperaturas de hibridación ensayadas estuvieron comprendidas entre 50 y 61 °C (**Figura 13**) y se fijaron con la herramienta *Gradient calculator* del programa Supports Opticon Monitor TM Version 3.1.

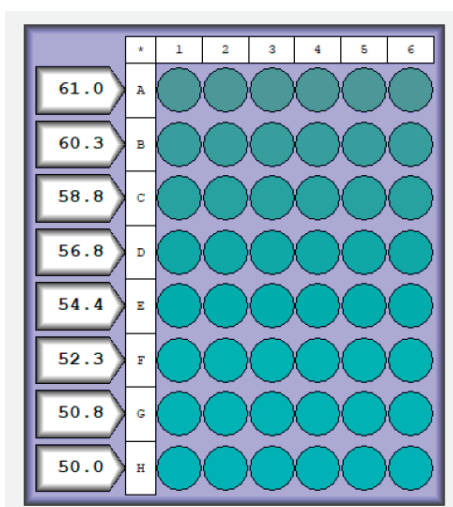


Figura 13. Temperaturas de hibridación ensayadas.

El criterio de selección seguido para determinar la concentración de cebadores y la temperatura de hibridación fue aquel que proporcionó el mayor valor de punto final (*end point*), menor valor de Ct (*threshold cycle*) y ausencia de productos inespecíficos en la curva de fusión (*melting curve*).

El programa seleccionado para la amplificación del ADN fue el recomendado por el fabricante de la máster mix (Biorad y Roche) tal y como se ha descrito en el apartado anterior (2.4.3.2). En todos los ensayos la concentración de ADN diana en la reacción de PCR fue de 20 ng/μL.

Se empleó como control positivo ADN total de las cepas diana portadoras de cada uno de los genes de resistencia y todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.4.4.2 Optimización de la concentración de ADN molde en la reacción de amplificación

Se calcularon las eficiencias de las reacciones de amplificación a partir de la pendiente de la curva estándar obtenida después de realizar diluciones seriadas 1:2 del ADN molde, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = 10^{\{-1/pendiente\}} - 1$$

De esta manera, se evaluó el intervalo dinámico y el coeficiente de determinación lineal r^2 de la curva estándar obtenida tanto con ADN total como ADN plasmídico de cada una de las cepas diana de referencia. Los criterios utilizados para determinar el rango dinámico de ADN en la reacción fueron: Eficiencia \geq 80-100 % y $r^2 \geq$ 0,95 (Bustin et al., 2009).

Mediante el análisis de las curvas de fusión se verificó la presencia de un único producto de amplificación y la ausencia de productos inespecíficos como la formación de dímeros de cebadores. La identidad de cada gen de resistencia se confirmó mediante secuenciación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.3.3.

2.5 Tipado molecular de *Enterococcus* spp.

La estructura poblacional de los aislados de *Enterococcus* spp. utilizados en este estudio se estableció mediante tres herramientas moleculares distintas, RAPD PCR (*Random Amplified Polymorphism Deoxyribonucleic Acid-PCR*), PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) y MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

2.5.1 Técnica RAPD PCR

Con el fin de tipificar genéticamente los diferentes aislados bacterianos se aplicó la técnica de Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD PCR) descrita por Williams et al. (1990). Esta técnica permite generar un patrón de bandas característico de cada cepa y por tanto la tipificación de los microorganismos. Para ello, se analizaron todos los aislados del G^o *Enterococcus* (n=80) empleando una única réplica por aislado y como control positivo, el ADN de la cepa *E. faecalis* CECT 795. El ensayo se consideró satisfactorio cuando, a partir del ADN control, se obtenía el patrón de amplificación característico de dicha cepa.

1) Aislamiento del ADN bacteriano FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Mini Kit (Método 1)

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo tal y como se ha descrito en el apartado 2.4.2.

2) Amplificación de ADN bacteriano

Con el objetivo de incrementar el poder de discriminación entre cepas, el ADN obtenido se amplificó por PCR con dos cebadores distintos (M13 y D8635) cuyas secuencias se recogen en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Secuencias de los cebadores seleccionados para la técnica RAPD PCR.

Cebador	Secuencia	Referencia
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	(Huey and Hall, 1989)
D8635	5'-CGGCCAAAGGGAGCAGAC-3'	(Akopyanz et al., 1992)

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador de ADN con el kit *Hot taq master mix/Universal Master Mix* (IBIAN/BIORON). Se prepararon mezclas de reacción en un volumen final de 25 μ L siguiendo recomendación del fabricante.

- 12,5 μ L de Hot taq master mix/Universal Master Mix
- 1 μ L de cebador a una concentración de 1 μ M
- 9 μ L de agua milliQ estéril
- 2,5 μ L de solución de ADN diana

Para el ensayo se estableció una concentración de ADN en la reacción de 10 μ g/ μ L. Todos los ensayos incluyeron un control negativo de extracción (caldo BHI) y de PCR (agua milliQ estéril). Las condiciones térmicas, que fueron optimizadas previamente tal y como se describe en el apartado 2.5.1.1, se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Condiciones térmicas ensayadas para la técnica RAPD PCR.

Etapas	Cebador	
	M13	D8635
Desnaturalización inicial	94 °C/5min	94 °C/5min
Preciclo	40 °C/5min	40 °C/5min
	72 °C/5min	72 °C/5min
Desnaturalización	94 °C/1min	94 °C/1min
Hibridación	55 °C/1min	52 °C/1min
Extensión	72 °C/2min	72 °C/2min
(nº ciclos)	30	35
Extensión final	-	72 °C/10min

3) Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Las condiciones de electroforesis fueron optimizadas tal y como se describe en el apartado 2.5.1.1, siendo las aplicadas en el estudio: 120 V durante 65 minutos.

4) Análisis estadístico

El perfil de bandas obtenido con cada uno de los cebadores (M13 y D8635) se analizó con el equipo de tratamiento de imágenes *Gel Doc 2000 (QuantityOne v.4.6.3. Manager, BIO-RAD)* de tal manera que se obtuvo un único rastro densitométrico o patrón de bandas para cada aislado.

La similitud entre los diferentes patrones de bandas se analizó mediante el coeficiente de Dice el cual expresa la probabilidad de que una banda en un perfil coincida con otra que esté en otro perfil mediante la siguiente fórmula:

$$S_{n_{xy}} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$$

Donde:

$S_{n_{xy}}$ es la similitud entre las cepas x e y

n_{xy} es el número de bandas en común en los dos perfiles de ADN

n_x y n_y son los números de bandas exhibidas por las cepas x e y, respectivamente.

Dicho cálculo se realizó empleando el software *GelCompar II 6.5® (AppliedMaths, Belgium)* el cual a su vez permitió obtener un dendograma mediante el algoritmo de agrupamiento de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*).

El punto de corte empleado para discriminar entre los genotipos fue 90 % obtenido en el estudio de reproducibilidad descrito en el apartado 2.5.1.2. Los aislados con nivel de similitud por encima de este valor se consideraron del mismo genotipo o grupo genómico, mientras que cepas por debajo se consideraron genotipos diferentes.

2.5.1.1 Optimización del análisis RAPD PCR

El análisis del perfil de bandas y la reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante la técnica RAPD PCR dependen de las condiciones de extracción de ADN bacteriano, de las condiciones de amplificación y componentes de la mezcla de amplificación y de las condiciones del análisis electroforético, por lo que fue necesario llevar a cabo un proceso previo de optimización de la técnica en el laboratorio de análisis.

1) Cepas de referencia

Para la optimización del análisis RAPD PCR se utilizaron 7 cepas del género *Enterococcus* pertenecientes a la CECT que comprenden 4 especies diferentes:

- E. faecalis* CECT 795 y CECT 481
- E. faecium* CECT 410 y CECT 5253
- E. durans* CECT 411
- E. hirae* CECT 5764 y CECT 279

Se aisló el ADN de cada una de las cepas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.2.

2) Condiciones de amplificación y electroforesis horizontal en gel de agarosa

Para optimizar la reacción de amplificación, se ensayaron tres protocolos de hibridación diferentes para cada cebador sugeridos en la bibliografía científica. Para el cebador M13 se ensayaron los protocolos 1, 3 y 4, mientras que para el cebador D8635 fueron los protocolos 2, 3 y 4 (**Cuadro 6**).

Todos los ensayos incluyeron un control negativo de extracción (caldo BHI) y de PCR (agua milliQ estéril).

Cuadro 6. Condiciones térmicas ensayadas para la reacción RAPD PCR.

	PROTOCOLO 1 (Rossetti and Giraffa, 2005)	PROTOCOLO 2 (Christian Andrighetto et al., 2001)	PROTOCOLO 3 (Akopyanz et al., 1992)	PROTOCOLO 4 (Martín-Platero et al., 2009)
Desnaturalización inicial	94 °C/2min	94 °C/5min	94 °C/5min	94 °C/2min
Preciclo	-	40 °C/5min 72 °C/5min	40 °C/5min 72 °C/5min	-
Desnaturalización	94 °C/1min	94 °C/1min	94 °C/1min	94 °C/1min 40 °C/0,20sg
Hibridación	40 °C/0,20sg	52 °C/1min	55 °C/1min	(rampa a 0,6 °C/sg)
Extensión	72 °C/2min	72 °C/2min	72 °C/2min	72 °C/1,2min
nº ciclos	40	35	30	35
Extensión final	72 °C/10min	72 °C/10min	-	72 °C/5min

La electroforesis se realizó en geles de agarosa siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.3.3. Se ensayaron 2 condiciones de electroforesis distintas descritas en la literatura científica:

- 30 V durante 330 minutos (Martín-Platero et al., 2009).
- 120 V durante 65 minutos (de Candia et al., 2007).

El análisis de los patrones de bandas se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 2.5.1. El criterio utilizado para la selección del protocolo térmico y las condiciones electroforéticas se basó en el número de bandas e intensidad y resolución de las mismas.

2.5.1.2 Estudio de reproducibilidad

Adicionalmente se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad de la técnica empleando las 7 cepas de referencia utilizadas previamente para la optimización.

Para cada una de las cepas se procedió a la extracción de ADN en dos días diferentes (ADN 1 y ADN 2) siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente en el apartado 2.4.2. Asimismo, cada extracto de ADN se amplificó en dos días diferentes (PCR A y PCR B) utilizando las condiciones optimizadas previamente para cada uno de los cebadores. En total se obtuvieron cuatro patrones (1A, 2A, 1B y 2B) para cada cepa analizada y con cada uno de los cebadores.

En la **Figura 14** se muestra el diseño del estudio de reproducibilidad llevado a cabo con las 7 cepas de referencia empleando un único cebador.

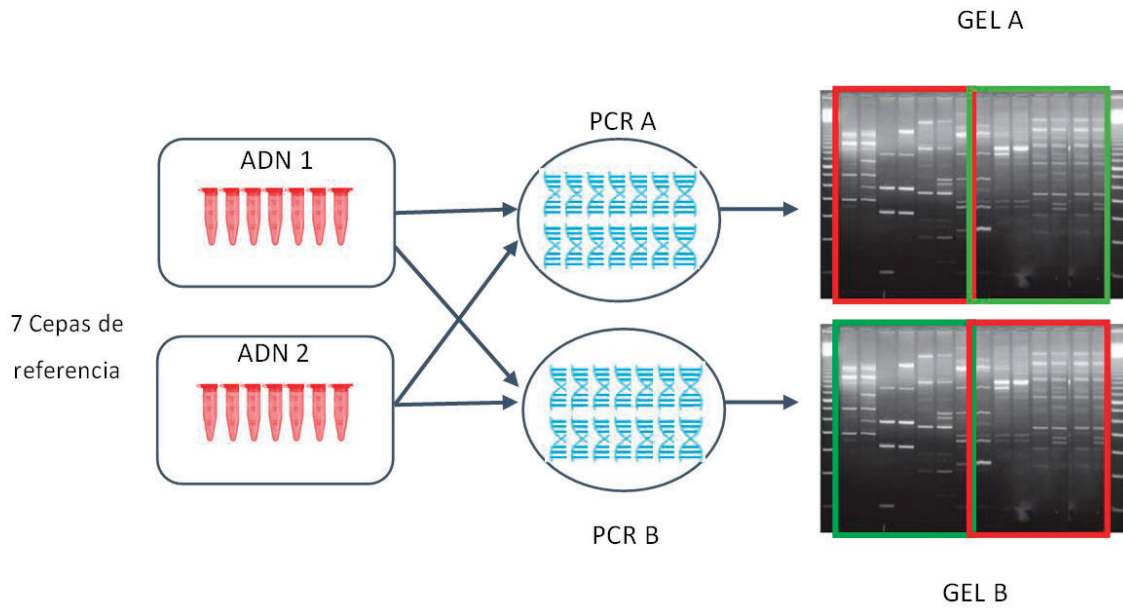


Figura 14. Esquema del diseño experimental para el estudio de reproducibilidad del método RAPD PCR con un cebador.

El tratamiento de las imágenes y el análisis estadístico se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el 2.5.1. Se obtuvieron un total de 8 perfiles RAPDs por cepa (4 M13 y 4 D8635) tal y como se muestra en la **Figura 15**. De esta manera, para cada cepa se obtuvieron 4 patrones RAPD.

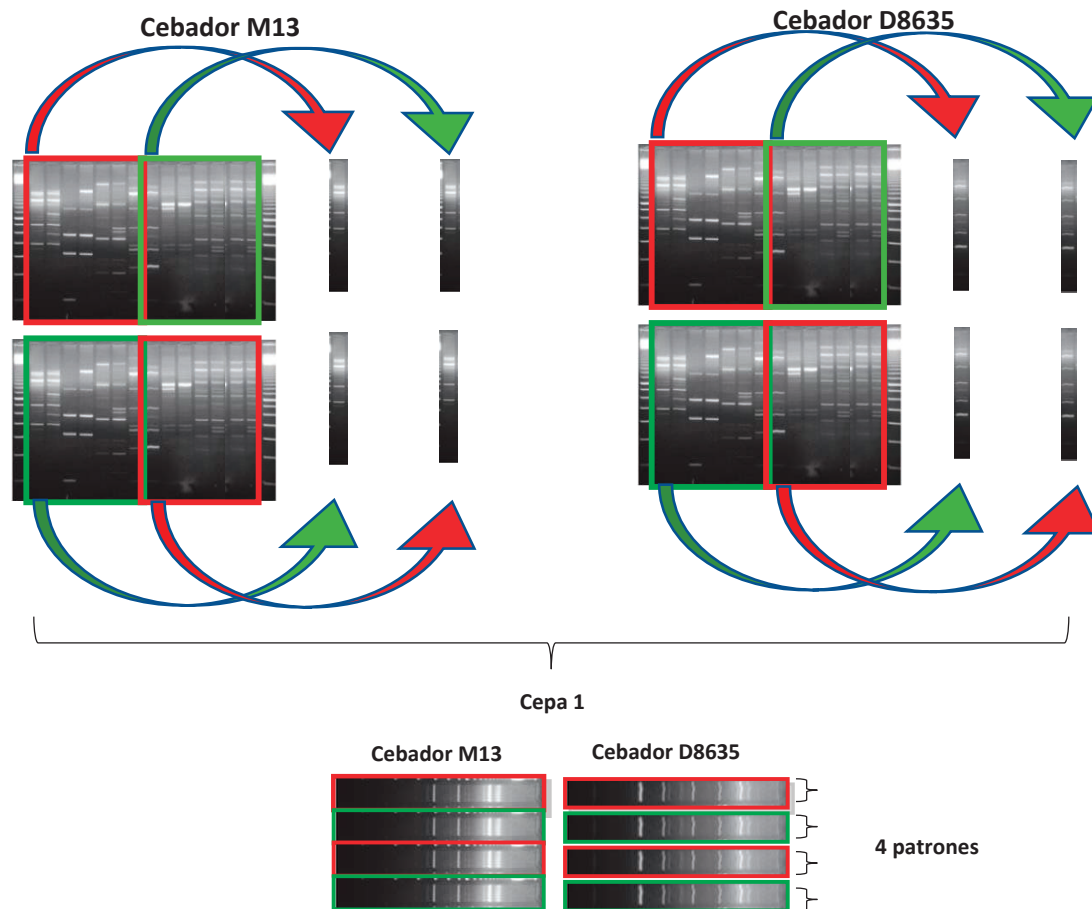


Figura 15. Esquema del análisis de los perfiles RAPD PCR para cada una de las cepas y con cada uno de los cebadores, así como patrones obtenidos para una única cepa tras normalizar los perfiles.

Las cepas fueron agrupadas y se construyó un dendograma mediante el algoritmo de UPGMA con el fin de evaluar el poder discriminatorio de la técnica RAPD PCR.

2.5.2 Técnica PFGE: Tipado molecular de *E. faecalis* y *E. faecium*

La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) se basa en la lisis celular y restricción con exonucleasas del ADN cromosómico bacteriano, que se encuentra inmovilizado en moldes de agarosa y la posterior separación de estos fragmentos mediante la

aplicación de pulsos eléctricos con distintas orientaciones. Estos pulsos permiten la reorientación y migración de los fragmentos de ADN en el gel, en función de su peso molecular.

Para determinar la relación clonal existente entre las distintas cepas se llevó a cabo la PFGE siguiendo el protocolo descrito por Coque et al. 1998. Este análisis se realizó con todos los aislados pertenecientes a las especies *E. faecalis* (n= 34) y *E. faecium* (n=20) y se llevó a cabo en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) de Madrid.

1) Extracción del ADN en bloques de agarosa

Preparación de la suspensión bacteriana

La suspensión bacteriana se preparó a partir de cultivos puros recientes de cada uno de los aislados incubados 24 horas en placas de agar TSA, inoculando una colonia en 1 mL de caldo BHI e incubando a 37 °C durante 24 horas. De este cultivo se recogieron 200 µL que se transfirieron a un tubo eppendorf y se centrifugaron. Posteriormente, 200 µL de la suspensión bacteriana se transfirieron a tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugó a 5 900 g durante 5 minutos eliminando el sobrenadante. El sedimento que contiene todas las células bacterianas se resuspendió con buffer TE (Tris-HCL 10 Mm pH=7,6; EDTA 1mM pH=8) y se centrifugó de nuevo a 5 900 g durante 5 minutos. Este proceso de lavado se repitió una vez más. Finalmente se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió y homogenizó en 300 µL de buffer TE.

Preparación y lavado de bloques de agarosa

Posteriormente, se añadieron 300 µL de una solución de agarosa al 2 % disuelta en TBE 0,5x (45 mM Tris-base, 45 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA) mantenida a temperatura de 55 °C. La mezcla se homogenizó suavemente con la punta de micropipeta varias veces y se dejó enfriar en bloques adecuados (Pkg of 1, 10 plug mold 1703622, *Biorad*) a 4 °C durante 10 minutos. Tras solidificar, los bloques de agarosa se transfirieron a tubos Falcon de 5 mL que contenían 1 mL de buffer de lisis EC (Tris-HCl 6 mM; NaCl 1 M; Brij-58 0,5 %; Deoxicolato 2 %; Sarkosil 0,5 %; RNAsa; Lisozima 1 mg/mL) incubándose a 37 °C en baño termostático con agitación (GFL, modelo 1083, Thermolab®) al menos 18 horas.

Una vez finalizada la lisis, se eliminó el buffer EC y se añadió 1 mL de buffer EPS (EDTA 0,5 M; proteinasa K 50 µg/ml; Sarkosil 1 %) incubando a 56 °C en agitación durante 18 horas. Tras eliminar el buffer EPS, se realizaron dos lavados con 1 mL de TE durante 10 minutos a 56 °C en tubos Falcon y después dos fases de lavado más durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Tras el último lavado se añadió de nuevo 1 mL de buffer TE y se mantuvieron en esta solución a 4 °C hasta su uso.

2) Digestión del ADN con la enzima de restricción

Cada uno de los bloques se dividió en tres partes con la ayuda de un bisturí estéril. Un tercio de cada bloque de agarosa se incubó con 300 µL de la solución de digestión (New England BioLabs Inc, EE. UU) compuesta por 175 µL de agua MiliQ estéril, 20 µL Tampón 10 x, 2 µL BSA y 3 µL *Sma*-I (30 U/µL *Sma*-I), en un tubo estéril de 1,5 mL durante 18 h a 30 °C en baño termostatzado.

3) Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

Se preparó un gel de agarosa al 1,2 % (D5 Pronadisa) y se vertió en el molde del gel; se dispuso un peine para crear los pocillos y se dejó solidificar durante 30 min a temperatura ambiente. Se introdujeron los bloques en los carriles del gel dejando al menos dos de ellos para el marcador de peso molecular que incluye 50 bandas diferentes en un rango desde 48,5 Kb hasta 1.018 Kb (Lambda Ladder PFGE Marker, New England BioLabs Inc) para normalizar y comparar los perfiles PFGE.

Los pocillos se sellaron con agarosa fundida evitando la formación de burbujas y se dejó solidificar a temperatura ambiente. La electroforesis se realizó en un equipo CHEF-DRIII (BioRad, Francia) Previamente a la introducción del gel, se añadieron 2,4 L de buffer 0,5X TBE y se seleccionó 1 L/min de flujo en la bomba y una temperatura de 14°C. El gel fue desmoldado y se introdujo en la cubeta del equipo, donde permaneció 10 min antes de iniciar el programa de electroforesis.

Las condiciones electroforéticas seleccionadas en el equipo fueron las siguientes:

- Tiempo de cambio inicial y final de 0,5 y 40 seg, respectivamente.
- Voltaje de 6 V/cm²
- Temperatura 14 °C
- Tiempo 23 horas

4) Visualización de los fragmentos de ADN separados

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución compuesta por un litro de agua destilada y 250 µL de un agente intercalante (Bromuro de Etidio ó GelRed 3x, Biotium, California, EE. UU.) durante 30-60 minutos. Los geles se visualizaron con luz UV en un transiluminador (Chemidoc MP Imaging System, BioRad). Para su posterior interpretación, se digitalizó la imagen usando el equipo Gel Logic 100 imaging System (Carestream Health Inc, Rochester, NY, EE. UU.).

5) Análisis del patrón de bandas

La interpretación de los perfiles electroforéticos resultantes se llevó a cabo mediante el programa informático *BioNumerics v6.1* (Applied Maths NV, Disponible en: <http://www.applied-maths.com>). El análisis estadístico se realizó calculando el índice de Similitud de Dice y se utilizó el método de agrupamiento UPGMA para generar un dendograma tal y como se ha descrito en el apartado 2.5.1. Para definir las distintas categorías de relación genética se optó por seguir las recomendaciones de Tenover et al (1995) tanto en el análisis visual como en el análisis informático con el programa *Bionumerics*. Estas recomendaciones se basan en que dos aislados con ancestro común pueden presentar hasta un máximo de tres bandas diferentes debido a la evolución de cada uno. De esta manera se establecieron las siguientes categorías:

a) Análisis visual

- Idénticos o indistinguibles, aquellos aislados que presentan el mismo número de bandas.
- Altamente o estrechamente relacionados, cuando difieren un máximo de tres bandas.
- Posiblemente relacionados, cuando presentan 4-6 bandas diferentes como máximo.
- No relacionados, cuando el patrón difiere en 7 o más bandas.

b) Análisis estadístico

- Pertenecientes al mismo clon o pulsotipo de PFGE: aquellos aislados que presentaron un coeficiente de Dice $\geq 0,9$.
- Estrechamente relacionados: valores entre 0,8 y 0,9.
- Posiblemente relacionados: valores en el intervalo 0,7-0,8.
- No relacionados genéticamente: por debajo de 0,7.

2.5.3 Técnica MLST: Tipado molecular de *E. faecalis* y *E. faecium*

Esta técnica se basa en la amplificación y secuenciación de fragmentos internos de siete genes conservados, con funciones relacionadas con el mantenimiento celular (*housekeeping*), y su comparación con aquellos existentes en una base de datos (<https://pubmlst.org/databases/>). A cada uno de los alelos de la cepa estudiada se le asigna un número y de la combinación resultante de los siete genes se obtiene un número denominado secuencia tipo (ST).

Para llevar a cabo la caracterización por MLST se seleccionó una cepa de cada pulsotipo de las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (aislados considerados no idénticos ni altamente relacionados). Para los aislados de *E. faecalis* se llevó a cabo el protocolo descrito por Ruiz-Garbajosa et al. (2006) y para

los aislados de *E. faecium* el protocolo descrito por Homan et al. (2002), siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

1) Aislamiento del ADN bacteriano

El ADN genómico ensayado de cada una de las cepas seleccionadas fue el mismo empleado para la amplificación RAPD PCR, extraído previamente de los aislados mediante el protocolo descrito en el apartado 2.4.2.

2) Amplificación de genes *housekeeping* por PCR

En el **Cuadro 7** y el **Cuadro 8**, se muestran los cebadores utilizados para la amplificación de los 7 genes *housekeeping* en el análisis de *E. faecium* y *E. faecalis*, respectivamente.

Cuadro 7. Cebadores seleccionados para el análisis de *E. faecium* mediante la técnica MLST.

Gen	Cebador	Secuencias (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>gdh</i> glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa	gdh1	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
	gdh2	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i> gliceraldehído-3-fosfatoP- DHG	gyd1	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC	395
	gyd2	CATTTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>pstS</i> transportador de unión a la ATP-fosfatasa	pstS1	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG	583
	pstS2	CGTGATCACGTTCTACTTCC	
<i>gki</i> glucocinasa	gki1	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
	gki2	ACCATTAAGCAAAATGATCGC	
<i>aro</i> Shikimato deshidrogenasa	aroE1	TGGAAAACCTTACGGAGACAGC	459
	aroE2	GTCCTGTCCATTGTTCAAAGC	
<i>xpt</i> Xantia fosforibosiltransferasa	xpt1	AAAATGATGGCCGTGATTAGG	456
	xpt2	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yiq L</i> acetil-CoA acetiltransferasa	yiql1	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
	yiql2	GAATATCCCTTCTGCTTGCT	

Cuadro 8. Cebadores seleccionados para el análisis de *E. faecium* mediante la técnica MLST.

Gen	Cebador	Secuencias (5'-3')	Tamaño (pb)
adk adenilato kinasa	adk1	TATGAACCTCATTTTAATGGG	437
	adk2	GTTGACTGCCAAACGATTTT	
atpA Subunidad alfa, ATP sintasa	atpA1	CGGTTCCATACGGAATGGCACA	556
	atpA2	AAGTTCACGATAAGCCACGG	
ddl D-alanina: D-alanina ligasa	ddl1	GAGACATTGAATATGCCTTATG	465
	ddl2	AAAAAGAAATCGCACCG	
gdh glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa	gdh1	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
	gdh2	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
gyd gliceraldehído-3-fosfatoP-DHG	gyd1	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC	395
	gyd2	CATTTCTGTGCATACCAAGC	
purK subunidad de la ATPasa, fosforribosil aminoimidazol carboxilasa	purK1	GCAGATTGGCACATTGAAAGT	492
	purK2	TACATAAATCCCGCTGTTC/T	
pstS transportador de unión a la ATP-fosfatasa	pstS1	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG	583
	pstS2	CGTGATCACGTTCTACTTCC	

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador de ADN empleando el producto comercial *master mix comercial VIASURE® Master mix kit* (Certest Biotec), el cual incluye en formato liofilizado todos los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción PCR en cada pocillo.

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 µL, tal y como recomienda el fabricante. Esta mezcla consta de 10 µL de buffer de rehidratación, cebadores forward y reverse a una concentración de final de 0,5 µM, agua miliQ hasta ajustar a 15 µL, así como 5 µL del DNA diana de cada una de las cepas objeto de estudio.

En la **Tabla 9** se recoge el protocolo térmico empleado recomendado por el fabricante.

Tabla 9. Protocolo térmico para la amplificación de los genes *housekeeping*.

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 minutos	95 °C
45	Desnaturalización	10 segundos	95 °C
	Hibridación/Elongación	50 segundos	60 °C

3) Electroforesis horizontal en gel de agarosa

La amplificación de los productos de PCR y el tamaño de los mismos se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.3.3.

4) Purificación y secuenciación del ADN amplificado

La purificación y secuenciación de los productos de PCR confirmados en gel de agarosa se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.3.3.

5) Análisis de las secuencias Tipo (ST)

Las secuencias obtenidas de cada uno de los genes *housekeeping* de cada cepa se introdujeron en la base de datos del MLST (<https://pubmlst.org/efaecalis/> y <https://pubmlst.org/efaecium/>) para su comparación con los alelos ya descritos (Tedim et al., 2015). La combinación de estos 7 alelos generó un perfil alélico al que se le asignó una Secuencia Tipo (*Sequence Type*, ST) la cual fue comparada con las STs depositadas en la base de datos.

Se analizaron las variaciones genéticas y la relación evolutiva entre las STs obtenidas y se determinaron los complejos clonales (CC) mediante el programa bioinformático *PhyloViz 2.0* y el análisis por *eBURST v3*, considerando CC aquellos grupos de STs relacionadas entre sí que comparten al menos cinco de los siete alelos analizados (Feil et al., 2004).



CAPÍTULO III

Resultados y discusión

3 CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral ha sido evaluar la importancia de la cadena alimentaria como fuente potencial de RAM transmisibles y su repercusión para la salud pública. Para ello, se ha empleado como modelo de matriz alimentaria una variedad de queso curado de leche cruda de oveja elaborado en la provincia de Teruel y el G^o *Enterococcus* como grupo microbiano indicador de la transmisión de RAM a través del consumo de alimentos.

Con este propósito se ha llevado a cabo el estudio del perfil de RAM en aislados de *Enterococcus* spp., los cuales se han caracterizado fenotípicamente mediante el test *in vitro* de difusión en disco y genotípicamente empleando la técnica molecular RT PCR mediante el análisis de curvas de fusión, previamente optimizada. Los resultados obtenidos han permitido relacionar los perfiles fenotípicos de RAM con sus mecanismos de resistencia.

Asimismo, se ha realizado la identificación, caracterización y tipificación de los aislados de *Enterococcus* spp. mediante el uso de técnicas proteómicas y genéticas, tales como MALDI-TOF, RAPD PCR, PFGE y MLST, y se ha realizado un estudio comparativo con el fin de valorar la técnica RAPD PCR como alternativa más rápida y sencilla que la PFGE (*gold standard*) para el seguimiento epidemiológico de la RAM.

La información obtenida ha permitido determinar la diversidad clonal y distribución de los genotipos de RAM asociados a enterococos en el proceso de elaboración de queso curado y en el producto final. Además, se ha podido establecer la relación filogenética con aislamientos de otros orígenes, humano, animal, ambiental y alimentario, con la finalidad de evaluar la importancia para la salud pública de la RAM asociada a enterococos de origen alimentario.

Para detener la progresión y mitigar el impacto de la RAM, la OMS reconoce la necesidad de aplicar un enfoque integrado basado en el principio de *Una sola salud*. En este contexto, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral son de gran importancia para el control de la diseminación de RAM e identificación de la emergencia de nuevos clones resistentes, que pueden poner en riesgo la utilidad clínica de los antibióticos sobre la salud humana y animal.

A continuación, se presentan los resultados y discusión que dan respuesta a cada uno de los objetivos planteados.

3.1 Caracterización fenotípica y genotípica de RAM en *Enterococcus* spp. de origen lácteo

El estudio se ha llevado a cabo con 80 aislados de *Enterococcus* spp. obtenidos del proceso de elaboración de una variedad de queso curado de leche cruda de oveja, producido en dos centros queseros distintos ubicados en la provincia de Teruel. Todos los aislados fueron identificados a nivel de especie por MALDI-TOF. Para obtener el patrón fenotípico y genotípico de RAM se ha evaluado la susceptibilidad *in vitro* a 16 antibióticos y se han analizado 19 determinantes genéticos de RAM, respectivamente.

3.1.1 Identificación de especies de *Enterococcus* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Como paso previo se procedió a la confirmación de los aislados del G^o *Enterococcus* e identificación de especies mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los 80 aislados fueron confirmados como *Enterococcus* spp., identificándose 5 especies diferentes: *E. faecalis* (42,5 %), *E. faecium* (25 %), *E. hirae* (18,8 %), *E. durans* (7,5 %) y *E. casseliflavus* (6,3 %) **(Figura 16)**.

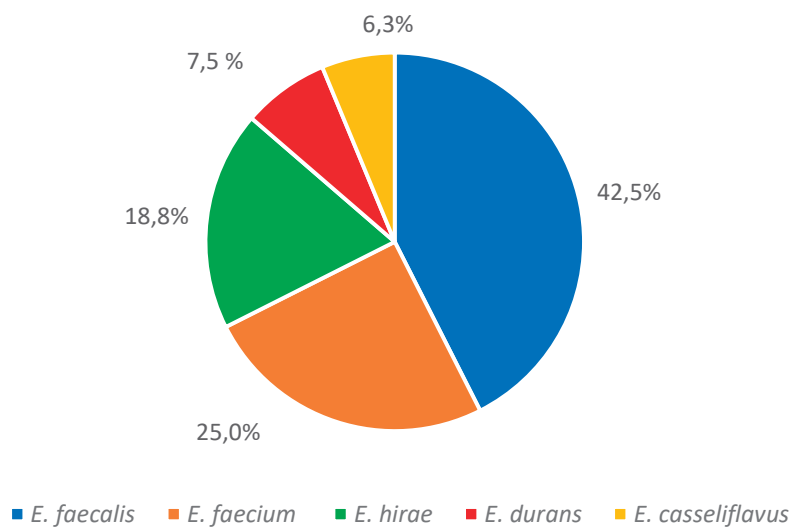


Figura 16. Distribución de las especies de enterococos identificadas en el proceso de elaboración de queso curado de leche cruda de oveja.

En la **Tabla 10** se muestra la distribución de cada especie en función del tipo de muestra, etapa del proceso de fabricación del queso y centro de producción.

Tabla 10. Distribución de especies de enterococos en el proceso de elaboración de queso curado de leche cruda en dos centros de producción.

Etapa de elaboración	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. durans</i>		<i>E. casseliflavus</i>		Total
	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	
Leche	N.I.	2	N.I.	N.I.	4	1	N.I.	N.I.	N.I.	3	10
Cuajada	1	1	N.I.	N.I.	N.I.	1	N.I.	N.I.	N.I.	1	4
3 días	1	3	3	N.I.	1	N.I.	N.I.	2	1	N.I.	11
7 días	1	2	3	N.I.	1	1	N.I.	1	N.I.	N.I.	9
15 días	1	3	N.I.	N.I.	N.I.	2	N.I.	1	N.I.	N.I.	7
30 días	3	N.I.	1	N.I.	1	2	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	7
60 días	1	1	2	N.I.	N.I.	1	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	5
90 días	2	3	2	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	7
120 días	2	2	5	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	1	N.I.	N.I.	10
180 días	2	3	4	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	1	N.I.	N.I.	10
Total	14	20	20	N.I.	7	8	N.I.	6	1	4	80 (100%)
	34		20		15		6		5		
	(42,5 %)		(25 %)		(18,8 %)		(7,5 %)		(6,3%)		

CP1: Centro de producción 1; CP2: Centro de producción 2; N.I.: No identificado

En la **Figura 17** se observa gráficamente la distribución de cada una de las especies identificadas en cada centro de producción de queso, a lo largo de su proceso de elaboración.

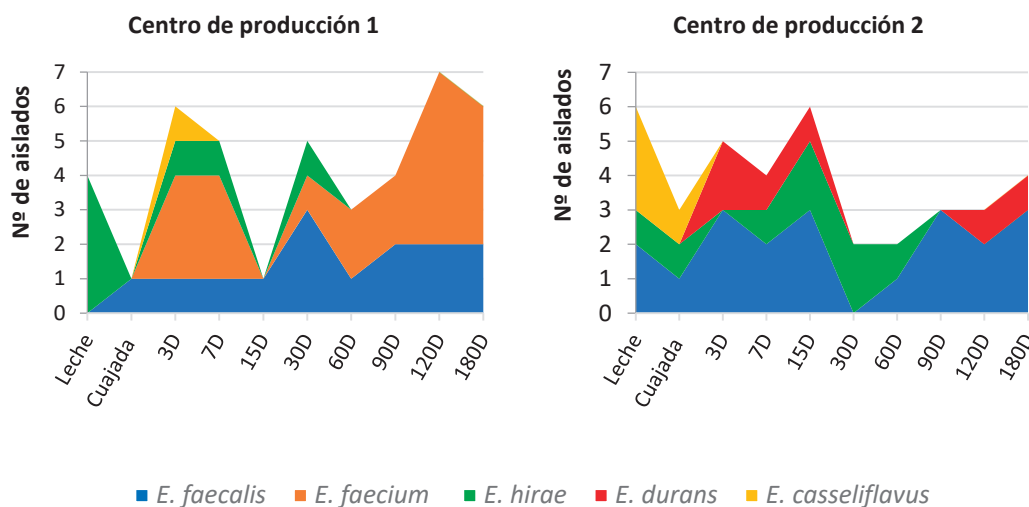


Figura 17. Distribución de especies de enterococos identificadas en dos centros de producción a lo largo del proceso de elaboración del queso.

3D: 3 días; 7D: 7 días; 15D: 15 días; 30 D: 30 días; 60D: 60 días; 90D: 90 días; 120D: 120 días; 180D: 180 días.

La distribución de especies fue desigual entre centros; las especies *E. faecalis*, *E. hirae* y *E. casseliflavus* fueron identificadas en ambos centros de producción, mientras que *E. durans* y *E. faecium* no fueron detectadas en el centro de producción CP1 y CP2, respectivamente. *E. faecalis* fue la especie aislada más frecuentemente en el centro de producción 2, mientras que *E. faecium* lo fue en el Centro 1. Ambas especies han sido identificadas en todos los tipos de muestras excepto *E. faecium*, la cual no se aisló en muestras de leche y de cuajada.

Tal y como señala Ben Braïek and Smaoui (2019), *E. faecium* y *E. faecalis* son las especies identificadas más frecuentemente en productos lácteos y son consideradas las de mayor importancia. En el queso analizado en el presente trabajo, ambas especies son las predominantes, sin embargo *E. hirae* parece contribuir de igual manera en las primeras etapas de fabricación hasta el día 60, ya que fue detectada principalmente en leche y menos frecuentemente en las primeras etapas de la fermentación, desapareciendo a partir del día 60 de maduración, mostrando una distribución similar en ambos centros de producción.

Existen pocos estudios publicados que hayan identificado *E. hirae* como una de las principales especies de enterococos en queso curado. Algunos de ellos, como el realizado por Ortigosa et al. (2008) mostró un predominio de esta especie en el queso Idiazabal elaborado con leche cruda de

oveja en la zona norte de España (Navarra y País Vasco), confirmando posteriormente que la principal fuente eran las heces de las ovejas. Feutry et al. (2012), en queso artesano de leche cruda de oveja Ossau-Iraty elaborado en la zona sur de Francia, identificaron *E. hirae* en todas las muestras de leche y queso analizadas. Coincidiendo con nuestros resultados, otros estudios sobre diversidad de enterococos en quesos tradicionales demostraron que esta especie rara vez está presente en el proceso de maduración de productos lácteos, o está en proporciones bajas en las etapas iniciales de la fermentación, tendiendo a desaparecer gradualmente (Christian Andrighetto et al., 2001; Martín-Platero et al., 2009; Suzzi et al., 2000).

E. durans y *E. casseliflavus* fueron las dos especies con menos representación, identificándose sólo 6 y 5 aislados, respectivamente. *E. durans* fue detectado esporádicamente en el CP2, mientras que *E. casseliflavus* se identificó en ambos centros de producción, pero únicamente durante los 3 primeros días del proceso de elaboración. Tal y como describe Hanchi et al. (2018) *E. durans* es una de las especies más frecuentes en muchos quesos elaborados en el área del mediterráneo junto con *E. faecalis* y *E. faecium*; sin embargo, en el queso de Teruel estudiado, esta especie no parece formar parte de la biota enterocócica principal, si bien su detección en el CP2, durante los primeros días de maduración, así como en las dos etapas finales, demuestra que puede tener un papel secundario en el proceso de maduración.

Por el contrario, *E. casseliflavus* ha sido detectado puntualmente durante los primeros días y como han descrito los trabajos publicados por Di Grigoli et al. (2015), Foulquié Moreno et al. (2006), Giraffa (2007), Micallef et al. (2013), Ogier and Serror (2008) y Rahaiem et al. (2016), es una especie que puede aparecer de forma ocasional en diversos productos lácteos fermentados. Ello es debido a que esta especie bacteriana se asocia, con mayor frecuencia, a productos vegetales debido a su tendencia a habitar en plantas o suelo.

Los estudios llevados a cabo por Giraffa (2003) e Ispirli et al. (2017), sostienen que los equipos, utensilios, el ambiente o incluso el personal pueden influir en la diversidad de especies de enterococos, por lo que las condiciones higiénicas de cada centro de producción podrían jugar un papel importante en el origen de *E. casseliflavus* y *E. hirae* en la leche y el queso en sus primeros días de maduración. Por el contrario, Hanchi et al. (2018) han demostrado que no existe relación

entre las especies de enterococos aisladas de heces de los animales y las identificadas en la leche y el queso.

Los productos lácteos fermentados y en concreto, aquellos elaborados con leche cruda, son ecosistemas alimentarios complejos, en los cuales subsiste una gran diversidad de poblaciones microbianas. Los resultados obtenidos corroboran la presencia de *Enterococcus* spp. en el proceso de fabricación de queso, representando parte importante de la biota ácido láctica no starter, tal y como afirman diversos autores (Hanchi et al., 2018; Íspirli et al., 2017; Ortigosa et al., 2008).

En este trabajo las especies predominantes a lo largo del proceso de elaboración de queso fueron *E. faecalis* y *E. faecium*, destacado su presencia en el producto final. Ambas especies constituyen, respectivamente, la tercera y cuarta etiología más frecuente de infección nosocomial, siendo dos de los principales agentes patógenos de interés clínico resistentes a los antibióticos (Alonso et al., 2017).

Este hecho justifica la importancia de estudiar el curso y la naturaleza de la adquisición y diseminación de resistencia a antibióticos en enterococos de origen alimentario, prestando particular atención a estas especies por su implicación en la salud pública.

3.1.2 Caracterización fenotípica de RAM en *Enterococcus* spp. de origen lácteo

El propósito de este estudio fue establecer el perfil fenotípico de RAM de 80 aislados de *Enterococcus* spp. procedentes de muestras obtenidas durante el proceso de elaboración de queso curado de leche cruda de oveja.

La **Tabla 11** muestra los resultados obtenidos en el estudio de sensibilidad a 16 antibióticos mediante el test de difusión en disco.

Tabla 11. Frecuencia de la susceptibilidad de 80 aislados de *Enterococcus* spp. de origen lácteo a 16 antibióticos.

Antibiótico	Susceptibilidad		S		I		R	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Clindamicina	20	25	-	-	60	75		
Tetraciclina	40	50	2	2,5	38	47,5		
Minociclina	40	50	6	7,5	34	42,5		
Quinupristina/dalfopristina	50	62,5	-	-	30	37,5		
Eritromicina	40	50	20	25	20	25		
Estreptomicina	60	75	-	-	20	25		
Cloranfenicol	69	86,2	-	-	11	13,8		
Vancomicina	73	91,2	4	5	3	3,8 *		
Trimetoprima/Sulfometoxazol	76	95	-	-	4	5		
Gentamicina	77	96,2	-	-	3	3,8		
Ampicilina	80	100	-	-	-	-		
Ciprofloxacino	80	100	-	-	-	-		
Levofloxacino	80	100	-	-	-	-		
Linezolid	80	100	-	-	-	-		
Penicilina	80	100	-	-	-	-		
Teicoplanina	80	100	-	-	-	-		

S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente; *Crecimiento de colonias en el interior del halo de inhibición

Para la interpretación de los resultados de susceptibilidad a vancomicina es importante resaltar que 3 aislados mostraron crecimiento de colonias en el interior del halo de inhibición. El análisis se realizó considerando el diámetro del halo de inhibición de esos aislados resistentes tal y como recomienda la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC, 2011). No obstante, dichos aislados pertenecían a la especie *E. casseliflavus*, la cual se caracteriza por presentar resistencia intrínseca a bajos niveles de este antibiótico.

La **Figura 18** muestra gráficamente los resultados del test de sensibilidad *in vitro* a los 16 antibióticos testados.

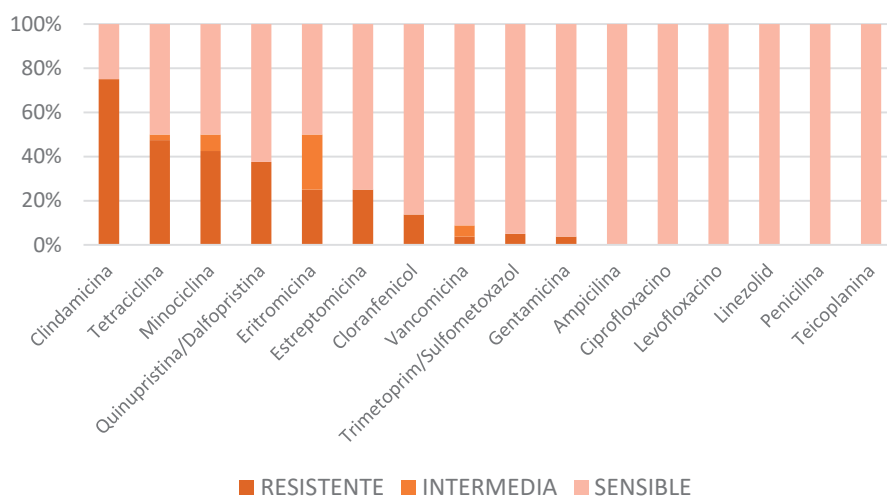


Figura 18. Representación gráfica del perfil de sensibilidad de *Enterococcus* spp. de origen lácteo a 16 antibióticos

El porcentaje de RAM más elevado (75 %) se asoció a clindamicina, debido principalmente a que los enterococos son intrínsecamente resistentes a este agente antimicrobiano. La clindamicina no es clínicamente efectiva, aunque puede aparecer activa *in vitro* como ha ocurrido en el 25 % de los aislados debido a que los métodos *in vitro* aportan una aproximación al escenario real; sin embargo, no siempre se reflejan las propiedades farmacocinéticas de cada antibiótico (SEIMC, 2020).

Algo similar a lo sucedido con clindamicina ocurre con la combinación quinupristina/dalfopristina (Q/D). El 37,5 % de los aislados fueron resistentes a Q/D. *E. faecalis* es intrínsecamente resistente a las estreptograminas A y por ello gran parte de los aislados de esta especie mostraron resistencia *in vitro* a esta combinación antibiótica (CLSI, 2011).

La resistencia intrínseca a clindamicina y Q/D se asocia a la presencia del gen *housekeeping Isa* el cual codifica una proteína perteneciente a la superfamilia ABC (del inglés *ATP-binding cassette*) que facilita la expulsión del antibiótico al exterior celular. La susceptibilidad a ambos antibióticos observada en un porcentaje minoritario de los aislados puede ser debida a la producción de proteínas no funcionales consecuencia de la aparición de mutaciones en dicho gen, tal y como describen (Sirichoat et al., 2020).

Al margen de las resistencias intrínsecas, destaca la susceptibilidad reducida a tetraciclina en un 50 % de los aislados (47,5 % resistentes y 2,5 % intermedios), así como a minociclina (42,5 % resistentes

y 7,5 intermedios). Por otra parte, el 50 % también presentó susceptibilidad reducida a eritromicina (25 % resistentes y 25 % intermedios) y el 25 % mostró resistencia a estreptomina. Las resistencias con menor prevalencia fueron a sulfonamidas (SXT) en cuatro aislados (5 %), a vancomicina en siete aislados (5 % resistentes y 3,8 % intermedios) y a gentamicina en tres aislados (3,8 %).

Todos los aislados mostraron sensibilidad a 6 de los antibióticos testados: ampicilina, ciprofloxacino, levofloxacino, linezolid, penicilina y teicoplanina, y solamente 8 de los 80 aislados analizados fueron sensibles a los 16 antibióticos. Sin embargo, si no se tiene en cuenta la resistencia intrínseca a clindamicina en el género *Enterococcus* y a Q/D en *E. faecalis*, 23 aislados (28,8 %) mostraron susceptibilidad al resto de antibióticos.

En la **Figura 19** se presentan los resultados de RAM en función de su importancia para la salud humana establecida por la OMS en su sexta revisión (WHO, 2019a). Hay que destacar que ninguno de los aislados de origen lácteo mostró resistencia a penicilina, ampicilina, teicoplanina y linezolid, todos ellos considerados antibióticos de importancia crítica (AIC) en el ámbito de la medicina humana. Sin embargo, se detectaron resistencias a otros AIC considerados, además, como primera opción terapéutica para el tratamiento de infecciones enterocócicas, tales como estreptomina, gentamicina y vancomicina, este último constituye la principal alternativa terapéutica en caso de alergias o de resistencia a los β -lactámicos. En este sentido cabe destacar que el porcentaje detectado de resistencia intermedia a eritromicina y vancomicina puede ser señal de alerta en relación al surgimiento de cepas de enterococos resistentes. Según Kahlmeter and EUCAST, (2019), la clasificación como intermedio mediante el uso de puntos de corte clínicos se asocia con una actividad antimicrobiana con efectos terapéuticos inciertos, señal de una posible evolución de un microorganismo *wild type* a *non-wild type*, debido a la adquisición de mecanismos de resistencia.

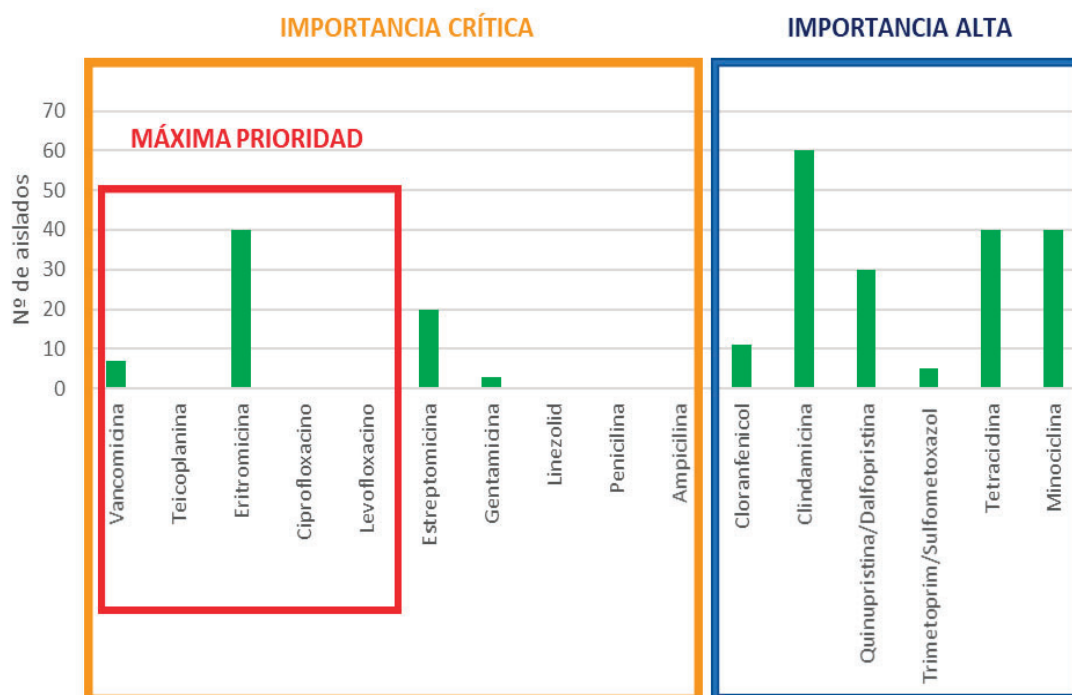


Figura 19. Número de aislados que mostraron susceptibilidad reducida a los 16 antibióticos analizados mostrados en función de la importancia para la medicina humana.

Asimismo, la emergencia de aislados de *Enterococcus* spp. multirresistentes es un problema grave con implicaciones serias en el control de la infección, ya que se reducen considerablemente las opciones terapéuticas, principalmente si los antibióticos implicados son los empleados como primera línea de tratamiento.

En este estudio, 57 aislados (72 %) mostraron susceptibilidad reducida al menos a una clase de antibióticos, y 23 aislados (29 %) mostraron resistencia a tres o más clases (**Figura 20**).

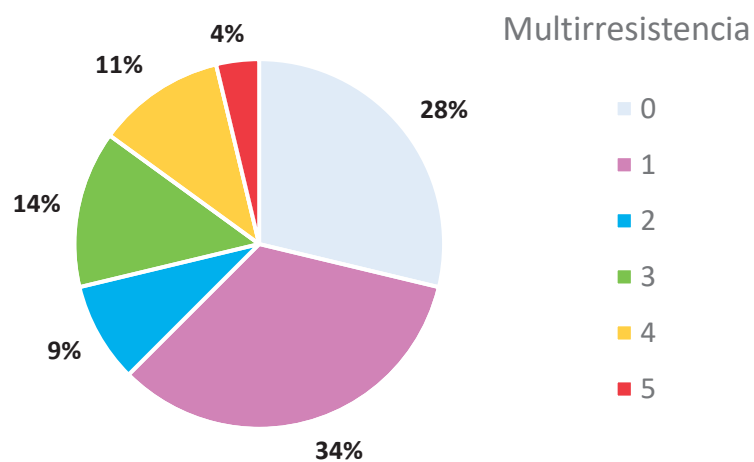


Figura 20. Representación gráfica de multiresistencia a antibióticos en *Enterococcus* spp. de origen lácteo.

En la **Figura 21** se presenta gráficamente el perfil de RAM para cada una de las especies de enterococos identificadas, en la figura no se incluyen los antibióticos que mostraron una sensibilidad en el 100 % de los aislados (ampicilina, ciprofloxacino, levofloxacino, linezolid, penicilina y teicoplanina).



Figura 21: Perfil de resistencia a los antibióticos en especies de *Enterococcus* spp. de origen lácteo. CLI: Clindamicina; TE: Tetraciclina; MIN: Minociclina; Q/D: Quinupristina/Dalfopristina; E: Eritromicina; S: Estreptomicina; CLO: Cloranfenicol; VAN: Vancomicina; SXT: Trimetopina/Sulfametoxazol; GEN: Gentamicina

En la **Figura 22** se representa gráficamente el perfil de multiresistencia a antibióticos en las especies de *Enterococcus* spp. de origen lácteo identificadas. Para dicho análisis se tuvieron en cuenta todos

los aislados que presentaron susceptibilidad reducida (fenotipo resistente e intermedio) a cada una de las 10 clases de antibióticos testadas, excluyendo la susceptibilidad *in vitro* a clindamicina para todos los aislados, así como a Q/D para *E. faecalis* y vancomicina para *E. casseliflavus*, por su naturaleza de resistencia intrínseca.

E. faecalis fue la especie que presentó las mayores tasas de resistencia antibiótica y la frecuencia más alta de multiresistencia. Todos los aislados fueron resistentes al menos a un antibiótico y exceptuando la resistencia intrínseca a clindamicina y Q/D, las frecuencias más altas de resistencia se presentaron a tetraciclina (82,4 %), seguido por minociclina (76,5 % resistente y 5,9 % intermedio), estreptomina (61,8 %), y eritromicina (55,9 % resistente y 35,3 %). Hay que destacar que el 32,4 % de los aislados fueron resistentes a cloranfenicol y alrededor del 10 % a gentamicina y SXT e intermedios a vancomicina.

La bibliografía científica destaca la preocupación relacionada con la diseminación de *E. faecalis* resistente a diferentes antibióticos a través de la cadena alimentaria y sus potenciales efectos para la salud humana. Esta especie tiene gran habilidad para adquirir nuevos mecanismos de RAM e igualmente para transferirlos a otras bacterias por conjugación. Este hecho genera aún más interés en alimentos fermentados donde hay un continuo dinamismo entre las comunidades microbianas (Abd El-Tawab et al., 2019). Por todo ello, la frecuencia y perfil de resistencia encontrada en este trabajo para esta especie microbiana de origen alimentario debe ser considerada como señal de alerta en relación a una potencial diseminación de RAM a microorganismos de importancia clínica.

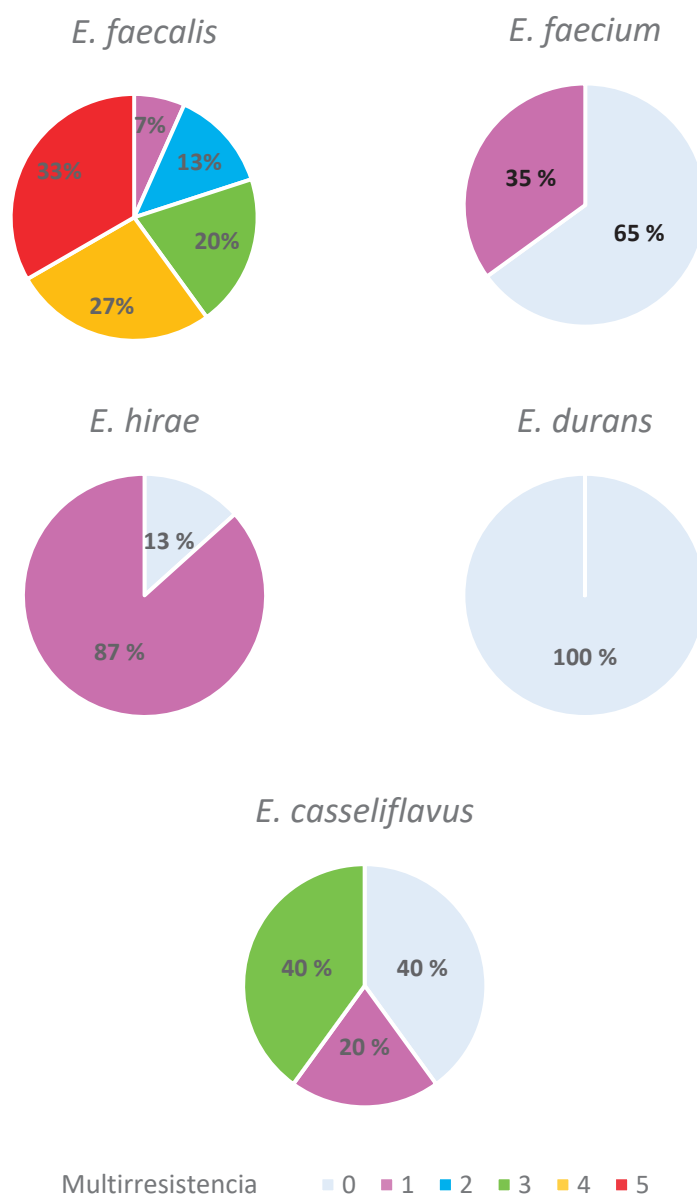


Figura 22. Representación gráfica del perfil de multirresistencia a antibióticos en especies de *Enterococcus* de origen lácteo.

E. faecium únicamente mostró susceptibilidad reducida a eritromicina (30 %) y Q/D (5 %), destacando la resistencia intermedia encontrada a eritromicina, además de resistencia elevada a clindamicina debido a su capacidad intrínseca de evadir su actividad antimicrobiana.

Las especies *E. casseliflavus* y *E. hiraе* mostraron resistencia a cuatro antibióticos (tetraciclina, minociclina, Q/D, eritromicina) además de resistencia a clindamicina de naturaleza intrínseca. En *E. hiraе* predomina la resistencia a tetraciclina y minociclina (66 %) seguido de Q/D (13 %) y eritromicina (6 %). En *E. casseliflavus* se observó resistencia a tetraciclina y Q/D (60 %) y a minociclina y eritromicina (40 %). Dado el carácter intrínseco de resistencia a vancomicina de *E. casseliflavus*, tres de los cinco aislados analizados, presentaron resistencia *in vitro* a este antibiótico. Ambas especies rara vez se han descrito como causa de infección nosocomial en humanos, sin embargo, podrían actuar como vehículo de determinantes de resistencia antimicrobiana a través de la cadena alimentaria (Rehaïem et al., 2016).

Por último, ninguno de los 6 aislados de *E. durans* analizados presentaron resistencia a ninguno de los 16 antibióticos ensayados.

En general, los resultados obtenidos son similares a los descritos por Guerrero-Ramos et al. (2016), Micallef et al. (2013) y Pesavento et al. (2014) en diversos estudios con aislados de origen alimentario, los cuales destacan la elevada capacidad de adquirir mecanismos de resistencia en *E. faecalis*, mientras que *E. faecium* y *E. durans* tienden a mostrar mayor susceptibilidad antibiótica. Este patrón es diferente al observado en el entorno hospitalario donde se viene informando de un incremento continuo de la prevalencia de *E. faecium* con resistencia adquirida, debido a su capacidad de adaptación y resistencia ante la elevada presión ejercida por el uso de sustancias antimicrobianas (Davis et al., 2020).

En cuanto a los patrones fenotípicos de resistencia, se pudieron identificar 17 perfiles diferentes, de los cuales 12 incluían resistencia a 3, 4 y 5 clases de antibióticos tal y como se observa en la **Tabla 12**. Igualmente, en este análisis no se incluye la resistencia a clindamicina para ninguno de los aislados, así como la resistencia a Q/D para *E. faecalis* y a vancomicina para *E. casseliflavus*.

Tabla 12. Patrones fenotípicos de multiresistencia antibiótica adquirida identificados en enterococos de origen lácteo.

Nº clases de antibióticos	Fenotipo de RAM	Especies de <i>Enterococcus</i> spp.	Nº aislados	Total aislados	
1		<i>E. faecalis</i>	6	27	
		E	<i>E. faecium</i>		6
			<i>E. hirae</i>		1
		Q/D	<i>E. faecium</i>		1
			<i>E. hirae</i>		2
			<i>E. casseliflavus</i>		1
	TE + MIN	<i>E. hirae</i>	10		
2	TE + MIN + E	<i>E. faecalis</i>	6	7	
	TE + MIN + S	<i>E. faecalis</i>	1		
3	TE + MIN + E + VAN	<i>E. faecalis</i>	1	11	
	TE + MIN + S + VAN	<i>E. faecalis</i>	1		
	TE + MIN + E + S	<i>E. faecalis</i>	2		
	TE + MIN + E + Q/D	<i>E. casseliflavus</i>	2		
	TE + MIN + E + S	<i>E. faecalis</i>	5		
4	TE + MIN + E + S + VAN	<i>E. faecalis</i>	2	9	
	TE + MIN + E + S + CLO	<i>E. faecalis</i>	5		
	TE + MIN + E + S + GEN + STX	<i>E. faecalis</i>	1		
	TE + MIN + S + GEN + CLO + STX	<i>E. faecalis</i>	1		
5	TE + MIN + E + S + GEN + CLO + STX	<i>E. faecalis</i>	1	3	
	TE + MIN + E + S + CLO + VAN	<i>E. faecalis</i>	1		
	TE + MIN + E + S + CLO + STX	<i>E. faecalis</i>	1		

TE: tetraciclina; MIN: minociclina; E: eritromicina; S: estreptomina; VAN: vancomicina; Q/D: quinupristina/dalfopristina; CLO: cloranfenicol; GEN: gentamicina; STX: trimetoprina/Sulfometoxazol. Los antibióticos que pertenecen a la misma clase aparecen representados del mismo color.

Tal y como se ha visto reflejado en la **Figura 20** y **Figura 22**, el 29 % de los aislados mostraron resistencia a más de 3 clases de antibióticos, entre ellos tetraciclinas (tetraciclina y minociclina), macrólidos (eritromicina) y aminoglucósidos (estreptomina), siendo todos ellos identificados en *E. faecalis*, a excepción de 1 aislado de *E. casseliflavus*.

Los patrones de multiresistencia más frecuentes fueron TE + MIN + E + S y TE + MIN + E + S + CLO, los cuales se identificaron en 5 aislados de la especie *E. faecalis*, respectivamente. En esta especie cabe destacar la identificación de un patrón distinto de multiresistencia a 5 clases de antibióticos en 3 aislados, respectivamente. La mayoría de los perfiles en esta especie incluían resistencia a tetraciclinas, eritromicina y estreptomina.

En *E. casseliflavus* el patrón incluía resistencia a tres clases de antibióticos (tetraciclinas, estreptograminas y macrólidos), mientras que en *E. hirae* y *E. faecium* únicamente a una (tetraciclinas, estreptograminas o macrólidos).

Comparando estos resultados con lo publicado en la literatura científica, podemos concluir que los perfiles de multirresistencia observados en la presente investigación son muy similares a los observados en aislados procedentes de alimentos de origen animal, destacando la resistencia a tetraciclinas y macrólidos (Abd El-Tawab et al., 2019; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Choi and Woo, 2013; Chotinantakul et al., 2018a; Jamet et al., 2012; Micallef et al., 2013; Pesavento et al., 2014; Rehaïem et al., 2016; Zaheer et al., 2020). En la última década se han observado incrementos en los niveles de resistencias a antimicrobianos de interés para la salud humana como aminoglucósidos, glucopéptidos o β -lactámicos, si bien estas resistencias se describen con mayor frecuencia en aislados de carne de cerdo, de pollo o de pavo. En aislados procedentes de animales los patrones son semejantes, aunque en los últimos años se han identificado perfiles fenotípicos que incluyen, además, resistencia a anfenicoles (cloranfenicol y florfenicol) y quinolonas (ciprofloxacino y norfloxacino) (Guerrero-Ramos et al., 2016a; Kim et al., 2021; Osman et al., 2019). En general, los mayores ratios de multirresistencia se localizan en el ambiente hospitalario, observándose patrones que incluyen antibióticos de interés clínico empleados para el tratamiento de infecciones invasivas provocadas por enterococos resistentes a vancomicina (ERV) como linezolid, daftomicina o tigeciclina (Moure et al., 2020; Zaheer et al., 2020).

La emergencia de patrones de multirresistencia ha surgido de forma paralela a la incorporación de sustancias antimicrobianas en diferentes ambientes y localizaciones geográficas y se ha visto favorecida por la diseminación de aislados multirresistentes entre el ser humano, los animales y el medio ambiente, donde los alimentos juegan un papel importante como ruta de transmisión (McEwen and Collignon, 2018; Torres et al., 2018). La implantación de técnicas moleculares para el análisis de la RAM puede servir de base para identificar los determinantes genéticos que codifican la RAM adquirida y los mecanismos de acción asociados, contribuyendo así a una mejor comprensión de los fenómenos de diseminación de la RAM.

3.1.3 Caracterización genotípica de RAM en *Enterococcus* spp. de origen lácteo

El objetivo de este estudio fue determinar el perfil genotípico de resistencia con el fin de caracterizar los mecanismos de RAM en especies de enterococos de origen lácteo y estudiar su concordancia con el perfil de susceptibilidad. El estudio incluyó el análisis de 19 determinantes genéticos de RAM, tanto en ADN genómico como plasmídico.

Para la detección de los genes de resistencia se utilizó la técnica RT PCR, la cual se ha convertido en una herramienta diagnóstica muy eficaz que permite detectar e identificar en tiempo real cantidades mínimas de ácido nucleico. El rendimiento de la técnica depende de una correcta optimización de variables como el diseño de los cebadores, la temperatura de hibridación, la concentración de los componentes empleados en la reacción, así como de la pureza del ácido nucleico obtenido. Por ello, utilizando 14 cepas diana de referencia se evaluó el método de extracción de ADN y se optimizó la concentración de cebadores y la temperatura de hibridación de la reacción, tal y como se ha expuesto en el apartado 2.4.4 de material y métodos y cuyos resultados se describen en el **Anexo I**.

A continuación, se presentan los resultados de caracterización de los mecanismos de resistencia en aislados de *Enterococcus* spp. de origen lácteo.

Se analizaron 19 determinantes genéticos de RAM en 80 aislados de *Enterococcus* spp. de origen lácteo, independientemente de la susceptibilidad antimicrobiana mostrada *in vitro* (**Figura 23**). En ninguno de los aislados de enterococos se detectó la presencia de los genes *msr A*, *mef A*, *van A*, *van B*, *erm A*, *Inu A*, *cat_{PC194}*, *fex A* y *fex B* en ADN genómico y/o plasmídico. Por el contrario, el análisis global de los resultados mostró la detección de 10 genes de RAM distintos: *tet M*, *erm B*, *ant(6)-Ia*, *cat A*, *cat_{PC221}*, *vat D*, *vat E*, *tet L*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* y *Inu B*, con una frecuencia que osciló entre el 3,4 % (*Inu B*) y el 50 % (*tet M*). Cabe destacar que todos los genes identificados se detectaron tanto en el ADN genómico como en el ADN plasmídico del mismo aislado, confirmando su ubicación en ADN extracromosómico adquirido.

Los genes de mayor prevalencia en el estudio fueron *tet M*, *erm B* y *ant(6)-Ia*, identificados en el 50, 30 y 25 % de los aislados de *Enterococcus* spp., respectivamente.

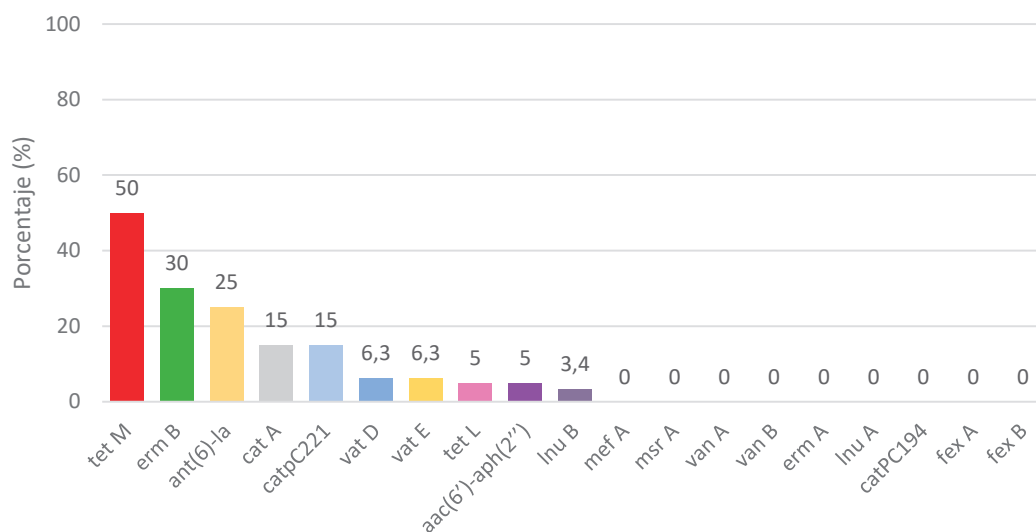


Figura 23. Frecuencia de detección de genes RAM en 80 aislados de *Enterococcus* spp. de origen lácteo

Como era previsible, el análisis de la distribución de los determinantes genéticos de RAM según la especie bacteriana determinó que la mayor parte de los genes se detectaron en *E. faecalis* (Figura 24). En concreto, seis de los diez genes identificados (*ant(6)-Ia*, *cat A*, *cat_{pC221}*, *tet L*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia y *lnu B*), solo se detectaron en esta especie. Asimismo, el 91,7 % y el 70 % de los aislados portadores de los genes *erm B* y *tet M*, respectivamente, se correspondieron con *E. faecalis*.

En *E. hirae* y *E. casseliflavus* cabe destacar la detección de los genes *tet M*, *vat D* y *vat E* en porcentajes inferiores al 30 % y del gen *erm B* en el 8,3 % de *E. casseliflavus*.

Por último, ningún aislado de *E. faecium* y de *E. durans* presentó los determinantes genéticos de RAM objeto de estudio.

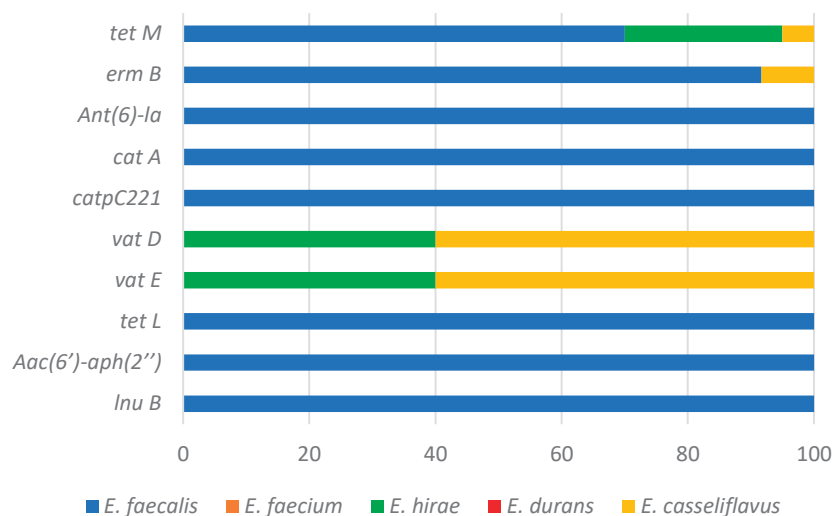


Figura 24. Distribución de los determinantes genéticos de resistencia detectados, en especies de enterococos de origen lácteo.

En general, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio fenotípico de RAM donde la mayor parte de los aislados que mostraron resistencia *in vitro* pertenecían a la especie *E. faecalis*. En segundo lugar, *E. hirae* y *E. casseliflavus* también han mostrado resistencia tanto a nivel fenotípico como genotípico, aunque a menos antibióticos y en porcentajes inferiores. En gran medida, la distribución de determinantes genéticos de RAM observada en las distintas especies de enterococos de origen lácteo es muy similar a la descrita por investigadores como Chajęcka-Wierzchowska et al. (2020), Guerrero-Ramos et al. (2016b), Hammad et al. (2015), Kurekci et al. (2016), Micallef et al. (2013) y Pesavento et al. (2014).

En la **Tabla 13**, se muestran los patrones genotípicos de RAM observados en los aislados de enterococos analizados. Se identificaron un total de 14 perfiles que comprendían de 1 a 6 genes de RAM. El patrón genotípico más frecuente estuvo representado por el gen *tet M* presente en 13 aislados (4 de *E. faecalis* y 10 de *E. hirae*). Seis aislados de *E. faecalis* presentaron la combinación de genes, *tet M* + *erm B* + *cat A* + *catpC221* + *ant (6)*-Ia y el resto de los patrones genotípicos estaban constituidos por la combinación de diferentes determinantes genéticos, destacando la presencia de los genes *tet M* y *erm B* en la mayoría de ellos, coincidiendo una vez más con lo mostrado a nivel fenotípico.

Tabla 13. Perfil genotípico de resistencia antibiótica identificado en 80 aislados de enterococos de origen lácteo.

Nº genes	Genotipo de RAM	Especies de <i>Enterococcus</i> spp.	Nº aislados	Total aislados
0	n.d.	<i>E. faecalis</i>	3	34
		<i>E. faecium</i>	20	
		<i>E. hirae</i>	3	
		<i>E. durans</i>	6	
		<i>E. casseliflavus</i>	2	
1	tet M	<i>E. hirae</i>	10	20
		<i>E. faecalis</i>	4	
	erm B	<i>E. faecalis</i>	3	
	vat D + vat E	<i>E. hirae</i>	1	
<i>E. casseliflavus</i>		2		
2	tet M + erm B	<i>E. faecalis</i>	3	6
	tet M + ant(6)-Ia	<i>E. faecalis</i>	3	
3	tet M + erm B + ant(6)-Ia	<i>E. faecalis</i>	4	7
	tet M + tet L + ant(6)-Ia	<i>E. faecalis</i>	2	
	tet M + erm B + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	<i>E. faecalis</i>	1	
4	tet M + erm B + vat D + vat E	<i>E. casseliflavus</i>	2	2
5	tet M + erm B + cat A + cat _{pC221} + ant(6)-Ia	<i>E. faecalis</i>	6	6
6	tet M + tet L + erm B + cat A + cat _{pC221} + ant(6)-Ia	<i>E. faecalis</i>	2	5
	tet M + erm B + cat A + cat _{pC221} + ant(6)-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	<i>E. faecalis</i>	1	
	Inu B + tet M + erm B + cat A + cat _{pC221} + ant(6)-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	<i>E. faecalis</i>	2	

n.d.= no detectado

Estos perfiles son muy semejantes a los descritos en aislados procedentes de alimentos de origen animal y otros entornos; sin embargo, en el ambiente hospitalario predominan, además, otros determinantes genéticos que confieren resistencia a antibióticos de máxima prioridad en medicina humana, y que son empleados para el tratamiento de infecciones causadas por enterococos resistentes como, *van A*, *van B*, *cfr*, *optr A* o *poxt A*. No obstante, estos genes también han sido descritos por Chotinantakul et al. (2018), Elghaieb et al. (2019), Markwart et al. (2021), Moure et al. (2020), Stępień-Pyśniak et al. (2021) y Torres et al. (2018) en aislados de alimentos o animales, aunque su diseminación es todavía limitada.

A excepción de escasas discrepancias, el análisis RT PCR ha permitido asociar cada una de las resistencias observadas *in vitro* a un mecanismo de resistencia concreto tal y como se observa en la **Figura 25** y se describe a continuación.

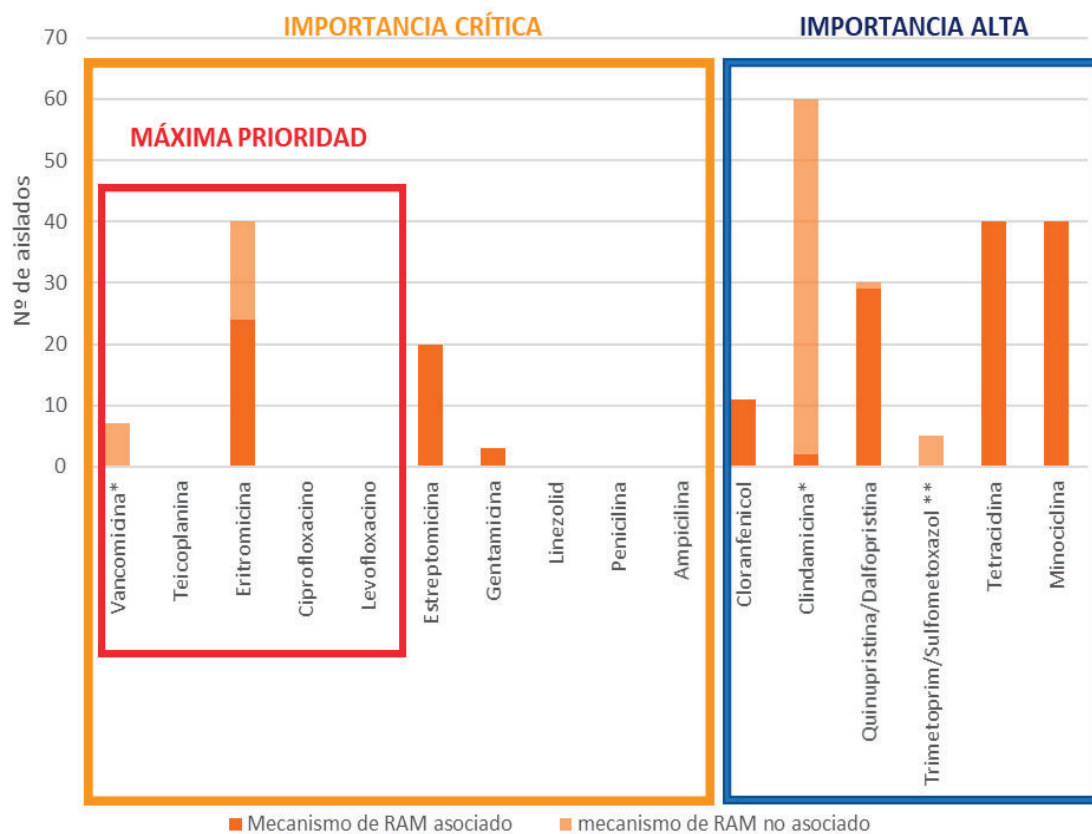


Figura 25. Número de aislados que mostraron susceptibilidad reducida a los 16 antibióticos analizados en función de la importancia para la medicina humana y su asociación a al menos un mecanismo de resistencia. * Resistencia intrínseca asociada. **No se analizaron determinantes de resistencia

3.1.3.1 Resistencia a Antibióticos de importancia crítica

La lista de la OMS de AIC categoriza la totalidad de los fármacos antibacterianos utilizados en el ser humano en tres grupos en función de su importancia para la medicina humana. El objetivo de esta lista es contribuir a gestionar la resistencia a los antimicrobianos y garantizar que éstos se utilicen de forma prudente en la medicina tanto humana como veterinaria.

3.1.3.1.1 Resistencia a antibióticos de máxima prioridad

Resistencia a Glucopéptidos (Vancomicina y teicoplanina)

Los glucopéptidos son una de las pocas opciones terapéuticas disponibles frente a infecciones provocadas por *S. aureus* y *Enterococcus* spp. multirresistentes. Además, se ha demostrado la transmisión a las personas de *Enterococcus* spp. resistentes a la vancomina y SARM a partir de fuentes no humanas. Por todo ello, esta clase de antimicrobianos es categorizada por la OMS como máxima prioridad (WHO, 2019a).

Vancomicina y teicoplanina son dos de los antibióticos más importantes dentro de este grupo. Ambos antimicrobianos se administran frecuentemente para tratar infecciones severas en humanos, y son la principal alternativa ante una infección enterocócica causada por una cepa resistente a penicilinas y/o aminoglucósidos (Bortolaia and Guardabassi, 2015). La avoparcina es otro antibiótico de esta clase que ha sido ampliamente usado en el pasado como promotor del crecimiento en animales de producción, dicha actividad se ha relacionado con el incremento de resistencia a glucopéptidos en diversas partes del mundo (Torres et al., 2018).

Las primeras cepas descritas de enterococos con resistencia adquirida a glucopéptidos fueron de la especie *E. faecium* aisladas de muestras clínicas humanas en Francia y Reino Unido en 1980 (Torres et al., 2018). Investigadores como Dapkevicius et al. (2021) describen un aumento de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) durante los años 90 en pacientes de UCI en hospitales de EE. UU. y Europa, así como en aislados de animales de producción, personas sanas, alimentos y ambiente.

Según datos publicados en 2019 por el ECDC, el porcentaje medio de resistencia a la vancomicina en *E. faecalis* de origen clínico en Europa fue del 26,6 %, lo que representó una ligera disminución desde 2015 (31,9 %). Sin embargo, la resistencia a vancomicina en *E. faecium* aumentó

significativamente en la mayoría de los países del 10,5 % al 18,3 % en el mismo periodo de tiempo (ECDC, 2020).

Estos cambios en la epidemiología de las infecciones causadas por ERV también se relacionan con estancias hospitalarias prolongadas, aumento de la población inmunodeprimida, adquisición de factores de virulencia, así como su fácil diseminación en el ambiente hospitalario, causando un gran impacto sanitario y económico. ERV se considera uno de los patógenos nosocomiales más importantes y cada vez quedan menos alternativas para tratarlo exitosamente (Zhou et al., 2020). Actualmente la mayor parte de los aislamientos de ERV se atribuyen a aislados clínicos de *E. faecium*, no obstante, es importante analizar la prevalencia de esta resistencia en todas las especies de enterococos aisladas de cualquier fuente, por el papel que pudieran tener como donantes genéticos de resistencia a glucopeptidos.

Como ya se ha citado, el mecanismo de acción de vancomicina y teicoplanina se basa en la **inhibición de la síntesis de la pared celular**. La resistencia de los enterococos a estos antibióticos consiste en modificar el lugar de anclaje del antibiótico reemplazando el aminoácido terminal y en consecuencia evitando que actúe a nivel de la pared bacteriana. Existen diferentes determinantes genéticos asociados a la resistencia a aminoglucosidos, denominados *van*. En este trabajo, se estudiaron los determinantes genéticos ***van A*** y ***van B*** por ser los más frecuentes, aunque la estructura de ambos genes es muy similar, *van B* confiere únicamente resistencia a vancomicina y no a teicoplanina, mientras que *van A* confiere resistencia a ambos antibióticos (Zaheer et al., 2020).

La **Figura 26** representa gráficamente la distribución de los determinantes genéticos de resistencia *van A* y *van B* en los aislados analizados según la especie bacteriana y la susceptibilidad mostrada *in vitro* a los antibióticos vancomicina y teicoplanina.

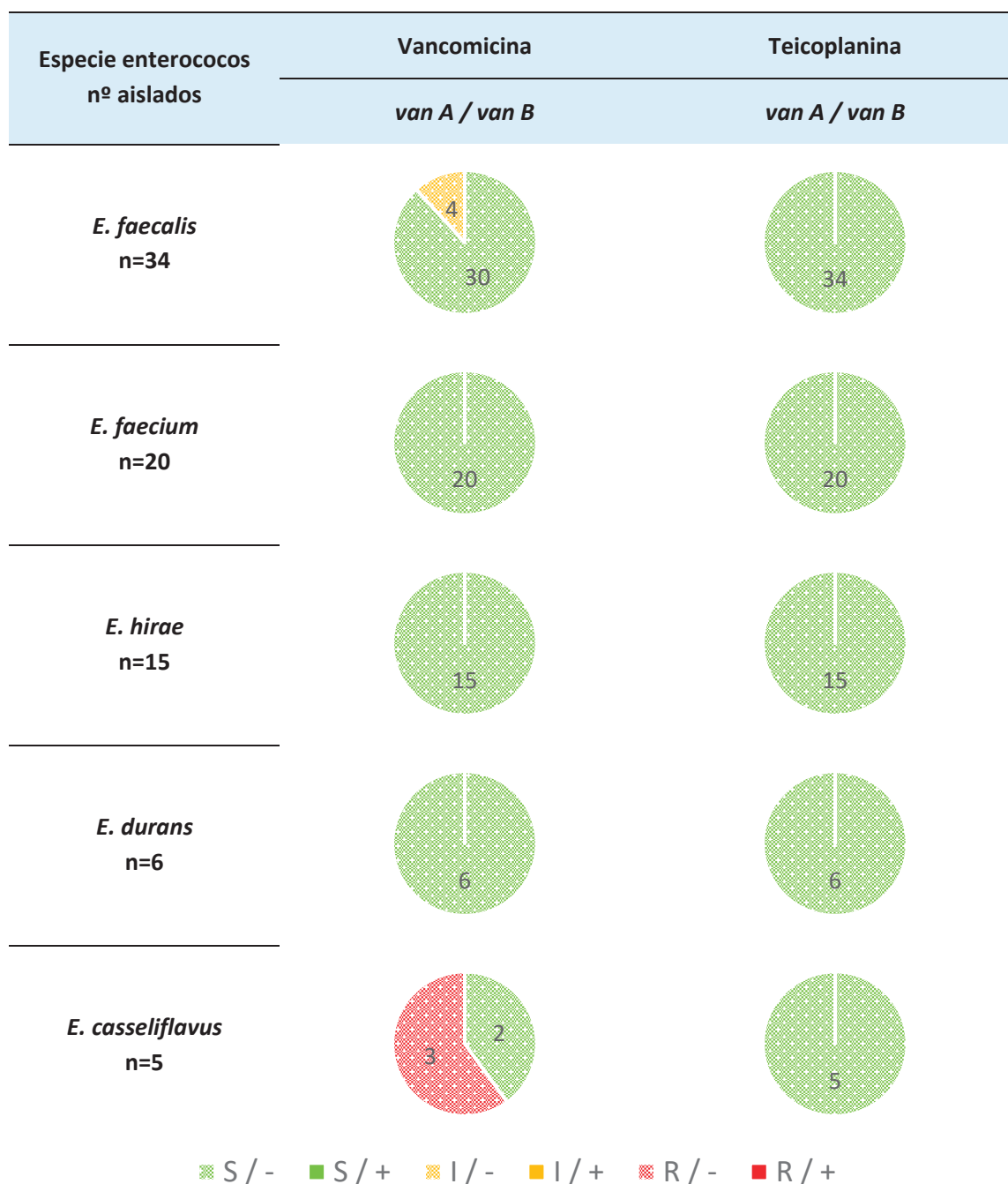


Figura 26. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a vancomicina y teicoplanina en especies de enterococos de origen lácteo.

S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

En este trabajo, únicamente 3 aislados de *E. casseliflavus* presentaron fenotipo de resistencia a vancomicina; además, 4 aislados de *E. faecalis* presentaron susceptibilidad intermedia, y ninguno presentó sensibilidad reducida a teicoplanina. En ningún caso se detectaron los genes investigados.

E. casseliflavus es conocido por mostrar resistencia intrínseca a bajos niveles de este antibiótico (Rehaiem et al., 2016). En el caso de *E. faecalis* cabe destacar que los diámetros del halo de inhibición mostrados en los aislados con fenotipo intermedio (15-16 mm), estuvieron muy próximos al punto de corte (17 mm), lo que sugiere que podrían considerarse aislados con fenotipo sensible.

La técnica de difusión en disco puede conducir a cierta subjetividad y en ciertos casos a clasificar erróneamente el grado de susceptibilidad cuando el halo de inhibición se encuentra cerca del punto de corte. Factores como la luz ambiental, el ángulo de visión o la diferencia temporal de las mediciones, puede dar lugar a variaciones en la reproducibilidad (Liu et al., 2016). Este hecho ha sido descrito por Bertelloni et al. (2015) y Stępień-Pyśniak et al. (2021), los cuales recomiendan confirmar los resultados del método de difusión en disco para vancomicina con otras técnicas *in vitro* como la microdilución en caldo. No obstante, no debemos descartar que otros determinantes genéticos distintos a los estudiados, o mutaciones, podrían estar implicados en la disminución de la susceptibilidad observada en los aislados *E. faecalis*.

La bibliografía muestra variaciones temporales y geográficas importantes en la prevalencia de enterococos con resistencia a glucopéptidos. Numerosos estudios obtienen porcentajes de resistencia a glucopéptidos muy similares o incluso inferiores al 5 %, en aislados de diferentes alimentos lácteos fermentados. En la mayoría de los casos, el fenotipo de resistencia está asociado a la presencia del gen *van A* y en menor proporción al gen *van B* (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; de Fátima Silva Lopes et al., 2005; Hammad et al., 2015; Nieto-Arribas et al., 2011; Rehaiem et al., 2016; Russo et al., 2018; Templer and Baumgartner, 2007).

La baja prevalencia de ERV en alimentos lácteos puede estar atribuida a la prohibición del uso de avorparcina en alimentación animal durante los años 90 en muchos países, sumado al escaso uso de este antibiótico en animales productores de leche como vacuno, ovino o caprino en el pasado.

En países latinoamericanos se detectan porcentajes de resistencia mucho más elevados. Delpech et al. (2012) detectaron resistencia a vancomicina en el 31,9 % de los aislados de *E. faecium* procedentes de alimentos cárnicos y lácteos artesanos elaborados en Argentina, y Furlaneto et al. (2014) entre el 14,3% y el 20 % en queso elaborado en Brasil, portando el gen *van A*. Fernandes et al. (2015), identificaron el gen *van B* en el 23,5 % de los aislados de enterococos presentes en el proceso de elaboración de ricota en Brasil. En el ambiente hospitalario Delpech et al. (2012)

detectaron resistencia a vancomicina en el 80 % de los aislados clínicos de *E. faecium* en América del Sur, lo que demuestra que ya no solo es la política del uso de los antibióticos en alimentación animal de cada región geográfica la que ha inducido este aumento de ERV, sino que la misma presión ejercida en el ambiente hospitalario también ha podido verse reflejada en otros ambientes (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Hammad et al., 2021).

En EE. UU. nunca se ha permitido el uso de avoparcina en producción animal y la elevada prevalencia de ERV se ha identificado principalmente en aislados clínicos debido al extendido uso de vancomicina en medicina humana, aunque en general, los porcentajes de ERV descritos en EE. UU. siempre se han mantenido inferiores a los reflejados en Latinoamérica (CDC, 2019; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Davis et al., 2020; Delpech et al., 2012; Donabedian et al., 2006).

En Europa, el sector de producción avícola y porcina describe porcentajes de resistencia elevados, aunque estas cifras han disminuido en las últimas décadas tras prohibir el uso de avoparcina en animales en 1996 (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2013).

La diseminación de esta resistencia se ha asociado a la circulación mundial de clones multirresistentes, así como a la transmisión entre bacterias de elementos genéticos móviles portadores de los genes *van* que se han transmitido y continúan haciéndolo, en granjas localizadas en diferentes países como España, Portugal, Dinamarca o Suiza (Jamet et al., 2012; Pesavento et al., 2014; Torres et al., 2018). Recientemente Harada et al. (2020) han detectado aislados de otras especies de enterococos diferentes de *E. faecium* y *E. faecalis* en carne de pollo en países asiáticos, portadores de genes *van A* asociados a plásmidos conjugativos.

La trascendencia clínica de las infecciones producidas por ERV son las limitadas opciones terapéuticas, por lo que es importante conocer la epidemiología y la estructura poblacional de *Enterococcus* spp. en diferentes ecosistemas con el objetivo de detectar y prevenir la transmisión de cepas resistentes y la diseminación de los genes *van*.

Resistencia a Macrólidos (Eritromicina)

Los macrólidos son antibióticos declarados por la OMS de máxima prioridad para la salud humana por constituir uno de los pocos tratamientos disponibles para infecciones provocadas por *Legionella* spp., *Campylobacter* spp. (sobre todo en niños, en los que no se recomienda el tratamiento con quinolonas), *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. multirresistentes. Además, la resistencia a esta clase de antibióticos puede resultar de la transmisión de *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. a partir de fuentes no humanas (WHO, 2019a).

En Europa los macrólidos son la tercera clase de antibióticos más vendida en medicina humana y veterinaria (ECDC, EFSA & EMA, 2021a). En EE. UU. su uso está también autorizado como profiláctico, especialmente en ganado vacuno lo que supone la administración de dosis subterapéuticas aumentando el riesgo de aparición y diseminación de RAM (FDA, 2018). La resistencia a **eritromicina** es una de las RAM más frecuentemente detectadas en enterococos de diferentes fuentes (humanos, animales, alimentos o medio ambiente), hecho que se asocia al uso de este antibiótico tanto en humanos como en animales (Zaheer et al., 2020). Investigadores como Makovec and Ruegg (2003) destacan un aumento significativo de la resistencia a eritromicina del 24 % al 47 % en enterococos aislados de leche de vaca procedentes de granjas de EE. UU. y Canadá, motivado por el uso de macrólidos para el tratamiento de mastitis en el ganado bovino.

El mecanismo de resistencia a los macrólidos más frecuente en enterococos es la producción de una **enzima que metila un residuo de adenina en la subunidad 23S del ARNr**, mediado generalmente por el gen *erm B* y en menos ocasiones por el gen *erm A*. El gen *erm B* es el más diseminado a nivel mundial en distintos géneros bacterianos aislados de alimentos, animales, humanos y medio ambiente (Torres et al., 2018; Zaheer et al., 2020).

Con menor frecuencia, en enterococos aislados de diversas fuentes se ha descrito el mecanismo de **expulsión activa del antibiótico** codificado por genes *msr* y *mef*, que conduce a una resistencia de bajo nivel a la eritromicina y a otros macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono.

En este trabajo se estudió la presencia de los genes *erm A*, *erm B*, *msr A* y *mef A* y su relación con el fenotipo de resistencia a eritromicina. En la **Figura 27** se representan gráficamente la distribución

de los 4 determinantes genéticos de resistencia estudiados en función de la especie de enterococos y la concordancia con el fenotipo de resistencia a eritromicina.

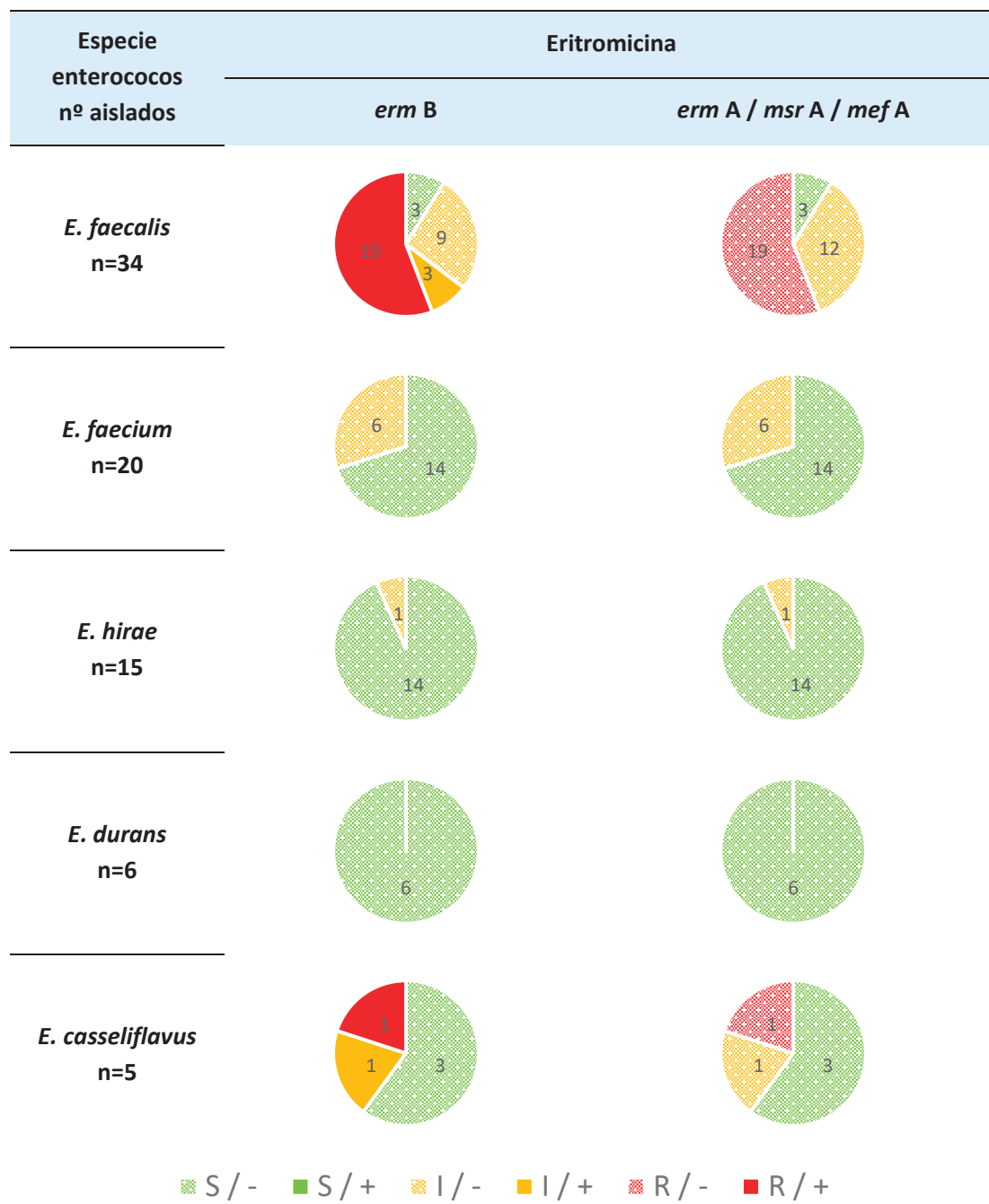


Figura 27. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a eritromicina en enterococos de origen lácteo.

S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

En este trabajo, el 50 % de los aislados de enterococos (n=40) presentaron susceptibilidad reducida a eritromicina (25 % resistentes y 25 % intermedios), dicha resistencia se asoció al gen *erm B*, ya que en ninguno de los aislados analizados se detectaron los genes *erm A*, *msr A* y *mef A*.

En *E. faecalis*, los 19 aislados que mostraron fenotipo resistente a eritromicina, así como 3 de los 12 aislados con fenotipo intermedio, presentaron el genotipo *erm B*. También se detectó este gen en los dos aislados de *E. casseliflavus* que presentaron fenotipo resistente o intermedio a este antibiótico.

Por el contrario, en *E. faecium* y *E. hirae* los fenotipos de susceptibilidad intermedia a eritromicina no se asociaron a los genes analizados. Cabe destacar que los diámetros del halo de inhibición del test *in vitro* para estos aislados clasificados como intermedios, se encontraban muy próximos al punto de corte establecido entre categoría intermedia y sensible (18-22 mm), por lo que tal y como se ha mencionado anteriormente, es posible que al tratarse de un método cuya medida puede conducir a cierta subjetividad, estos aislados pudieran realmente considerarse sensibles.

En el **Cuadro 9** se resumen los datos de prevalencia de resistencia a eritromicina y los determinantes genéticos detectados en enterococos aislados de alimentos lácteos.

Cuadro 9. Estudios publicados en enterococos de origen lácteo con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a eritromicina asociados.

Alimento	País	Fenotipo	% aislados	Genotipo	+gen/E ^R *	Referencia
Leche cruda BO	EE. UU.	E	24-47	-	-	(Makovec and Ruegg, 2003)
Queso leche cruda OV (Manchego)	España	E	20	-	-	(Nieto-Arribas et al., 2011)
Queso artesano leche BO y CA	Argentina	E	9	-	-	(Delpech et al., 2012)
Queso leche cruda BO, OV y CA			52			
Queso leche pasterizada BO, OV y CA	Francia	E	12	<i>erm B</i>	46/48	(Jamet et al., 2012)

Alimento	País	Fenotipo	% aislados	Genotipo	+gen/E ^R *	Referencia
Queso fresco	Brasil	E	19,4	-	-	(Furlaneto-Maia et al., 2014)
Queso fresco leche cruda BO	Italia	E	36,3	-	-	(Pesavento et al., 2014)
Queso fresco (mozzarella)			13,5			
Planta de procesado de queso fresco (Ricota)	Brasil	E	9,3	-	-	(Fernandes et al., 2015)
Queso leche cruda BO	Egipto	E	40	<i>erm B</i> <i>erm B +</i> Tn916	1/48 1/48	(Hammad et al., 2015)
Leche fermentada BO Queso fresco artesano	Túnez	E	0	-	-	(Rehaiem et al., 2016)
Queso leche cruda OV 90 y 180 días maduración (Ragusano y Pecorino siciliano)	Italia	E	81	-	-	(Russo et al., 2018)

Alimento	País	Fenotipo	% aislados	Genotipo	+gen/E ^R *	Referencia
Productos lácteos LPC	Polonia	E	14,3	<i>erm A</i>	3/27	(Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020)
				<i>erm B</i>	3/27	
				<i>erm A + erm B</i>	4/27	
				<i>erm B + erm C</i>	1/27	
				<i>erm B + mef A/E</i>	2/27	
				<i>erm A + erm B + msr C +</i>	3/27	
Queso fresco, semi curado, curado	Turquía	E	11,5	<i>erm B</i>	6/16	(Kurekci et al., 2016)

*+gen/ E^R: n° aislados portadores del gen/n° de aislados con fenotipo resistente a eritromicina; -: No analizado; BO: Bovino; OV: Ovino; CA: Caprino; LPC: listo para el consumo

Los resultados obtenidos son muy similares a los observados por otros autores en productos lácteos, aunque existen algunas diferencias dependiendo del origen geográfico, del proceso de elaboración o del tipo de leche. La mayoría de los trabajos describen prevalencias de resistencia a eritromicina en torno al 15-20 %, si bien en algunas ocasiones los porcentajes son superiores llegando a alcanzar prevalencias del 80 %. Por el contrario, la investigación de Rehaïem et al. (2016) destaca un 100 % de susceptibilidad a eritromicina en todos los aislados estudiados procedentes de leche de vaca fermentada y queso fresco en Túnez.

De los trabajos recopilados, únicamente cuatro estudiaron la presencia de los genes *erm* en aislados de enterococos y todos ellos mostraron tendencias muy similares, demostrando que el gen *erm B* fue el más común, mientras que el resto de los genes se detectaron puntualmente en aislados resistentes y en muchas ocasiones, en combinación con el gen *erm B*.

En general los enterococos de origen animal presentan ratios elevados de resistencia a eritromicina, principalmente aislados de animales productores de alimentos, seguido de animales domésticos, lo que demuestra la repercusión del uso de antibióticos en la prevalencia de RAM. En fauna salvaje las

cifras no son elevadas, sin embargo, los datos publicados por diversos autores ponen de manifiesto el fenómeno de diseminación de RAM en el entorno animal de vida libre. Los resultados publicados en aislados procedentes de otros alimentos de origen animal, así como de humanos y animales demuestran la naturaleza ubicua del gen *erm B* en *E. faecalis* (Torres et al., 2018).

El gen *erm B* se encuentra a menudo asociado a la presencia del gen *tet M* debido a la existencia del trasposón Tn 1545, lo que probablemente favorezca la diseminación horizontal de ambos genes (Zaheer et al., 2020). En este trabajo, los 20 aislados resistentes a eritromicina portadores del gen *erm B*, también presentaron el gen *tet M*, lo que sugiere que la diseminación del determinante de resistencia *erm B* en estos aislados, ha podido tener lugar por medio de elementos genéticos móviles o transposones que contienen ambos genes. Este hecho también es observado en uno de los 4 aislados con susceptibilidad intermedia a eritromicina portando ambos genes (*erm B* y *tet M*).

Los macrólidos, junto con las lincosamidas y las estreptograminas (complejo MLS) son tres grupos de antimicrobianos de estructuras químicas diferentes, pero con mecanismos de acción similares. Este hecho hace que existan mecanismos de resistencia que reducen indistintamente la actividad de las 3 clases de antibióticos, lo que se traduce en la aparición de resistencias cruzadas.

El uso extensivo de macrólidos y lincosamidas para el tratamiento de infecciones de grandes grupos de animales y como promotores del crecimiento animal en décadas anteriores, dió lugar a un aumento de enterococos resistentes a los antibióticos del complejo MLS. Incluso cuando se prohibió esta práctica, en ganadería avícola y porcina se ha continuado administrando antibióticos del grupo de los macrólidos como tratamiento preventivo, empleando bajas dosis durante tiempos prolongados. Aunque los porcentajes de resistencia al complejo antibiótico MLS han ido disminuyendo debido a las acciones llevadas a cabo en la última década, existen zonas geográficas y sectores que todavía siguen mostrando porcentajes elevados de resistencia (EMA, 2011).

Se ha documentado que los genes *erm* disminuyen la unión al ribosoma, no solo de los macrólidos sino también de las lincosamidas y estreptograminas B, dando lugar al fenotipo de resistencia combinada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B) mientras que el gen *msr A* está implicado en el fenotipo macrólidos y estreptograminas B (MS_B). En este trabajo se estudió la presencia de los genes *erm A* y *erm B* como determinante implicado en la susceptibilidad reducida

al complejo MLS_B y el gen *msr A* al complejo MS_B en cada una de las especies de enterococos analizadas (Figura 28).

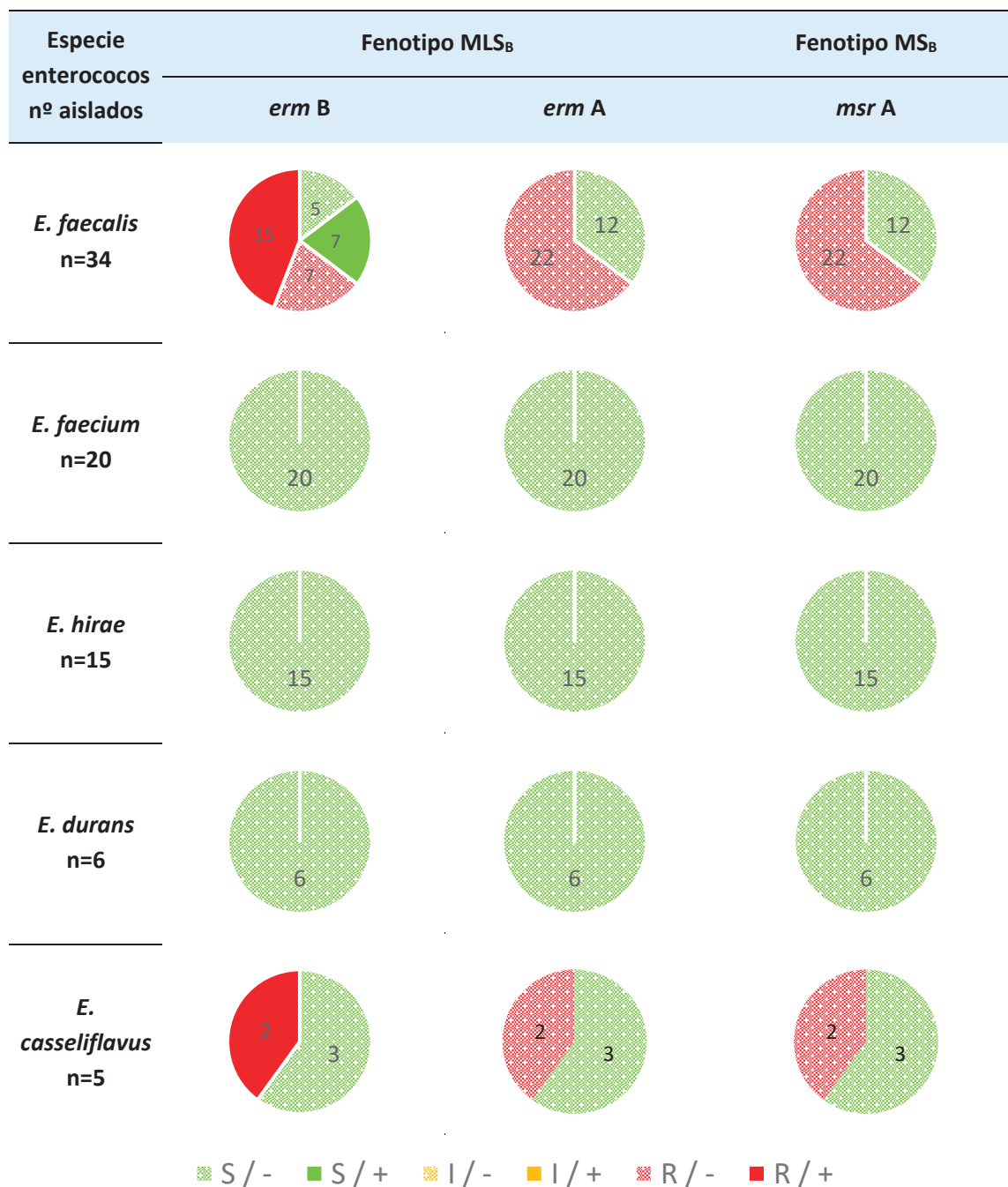


Figura 28. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a eritromicina en enterococos de origen lácteo.

S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

El gen *erm B* se asoció con el fenotipo de resistencia MLS_B en 17 de los 24 aislados que mostraron susceptibilidad reducida a esta combinación, lo que podría indicar que el mecanismo implicado en dicha resistencia es la protección ribosomal y en consecuencia la reducción de la unión de estos antibióticos al ribosoma. En 7 aislados de *E. faecalis* con fenotipo MLS_B no se detectaron los genes *erm*, y a la inversa, 7 de 12 aislados *E. faecalis* que presentaron el gen *erm B* fueron sensibles a los tres antibióticos MLS_B.

El fenotipo de resistencia MS_B no se correspondió con la detección del gen *msr A* por lo que no pudo establecerse la relación con el mecanismo de bomba eflujo codificado por dicho gen. No obstante, dada la resistencia intrínseca de los enterococos a clindamicina, así como de *E. faecalis* a Q/D, es difícil determinar el mecanismo por el cual estos aislados presentan susceptibilidad reducida a ambos complejos.

En este estudio, la detección del gen *erm B* en el 63 % (25/40) de cepas fenotípicamente resistentes a macrólidos permite concluir que la metilación ribosomal (subunidad 23S ARNr) es el principal mecanismo de resistencia en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas en el proceso de elaboración de queso y demuestra la posible circulación de este gen en el ambiente quesero. No obstante, los resultados obtenidos sugieren que el fenotipo de resistencia a eritromicina también puede estar mediado por otros genes o mutaciones que deben ser objeto de estudio.

Aunque los macrólidos no se integran en la terapia habitual para el tratamiento de infecciones enterocócicas por la elevada resistencia asociada a clones de interés clínico, la detección del gen *erm B* en el ambiente quesero constituye un problema de seguridad alimentaria asociado a la capacidad que posee el género *Enterococcus* para transferir componentes genéticos de resistencia a otros microorganismos de interés sanitario que comparten el mismo ambiente.

En conclusión, la elevada resistencia fenotípica de *E. faecalis* a eritromicina, atribuida principalmente a la presencia del gen *erm B*, sugiere la necesidad de evaluar el uso de macrólidos en el sistema de producción de leche y vigilar la evolución de la resistencia antimicrobiana en el sector lácteo.

Resistencia a Fluoroquinolonas (Levofloxacino y ciprofloxacino)

Las fluoroquinolonas son un grupo de antimicrobianos derivados de las quinolonas, categorizados por la OMS como de máxima prioridad para la salud humana por constituir uno de los pocos tratamientos disponibles para *Campylobacter* spp., enfermedad invasiva por *Salmonella* spp., infecciones por *Shigella* spp. multirresistentes e infecciones graves por *E. coli*. Dada la gran incidencia de enfermedades humanas por *Salmonella* spp. y *E. coli*, el número absoluto de casos graves es considerable. Asimismo, la resistencia a esta clase de antibióticos puede resultar de la transmisión de *Campylobacter* spp. y enterobacterias (entre ellas *E. coli* y *Salmonella* spp.) a partir de fuentes no humanas (WHO, 2019a).

Los antibióticos **levofloxacino** y **ciprofloxacino** son los más activos frente a enterococos. Estos antibióticos no se han usado como promotores del crecimiento animal, aunque actualmente se emplean con frecuencia en medicina veterinaria y humana. El principal problema de la resistencia a estos antibióticos se localiza en el ambiente hospitalario, donde se han descrito elevados porcentajes de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes (Kim et al., 2018). En un estudio reciente Zaheer et al. (2018) demostraron que el 70 % de los aislados clínicos humanos de *E. faecium* fueron resistentes a quinolonas, frente al 3 % de aislados procedentes de granja de vacuno de engorde. Asimismo, demostraron que la resistencia a tetraciclina y eritromicina en *E. faecium* procedentes de granjas libres de antibióticos era mucho mayor (45 % y 29 %) que la resistencia a fluoroquinolonas (8 %), debido principalmente a que las quinolonas no han sido empleadas en el sector de la producción animal tanto como tetraciclinas o eritromicina.

Al igual que otros muchos trabajos llevados a cabo por Chajęcka-Wierzchowska et al. (2020), Fernandes et al. (2015), Furlaneto-Maia et al. (2014), Kurekci et al. (2016) y Nieto-Arribas et al. (2011), en este estudio ningún aislado presentó resistencia a ciprofloxacino y/o levofloxacino, corroborando la baja resistencia a quinolonas observada en aislados de origen alimentario.

En ciertas áreas geográficas, esta RAM puede ser elevada como consecuencia de la administración autorizada de fluoroquinolonas en animales de producción si bien, el uso excesivo de esta clase de antibióticos en medicina humana y veterinaria también ha podido influir en la diseminación masiva

de esta RAM en aislados de animales y sus productos (Abd El-Tawab et al., 2019; Barbosa et al., 2009; Choi and Woo, 2013; Chotinantakul et al., 2018a; Delpech et al., 2012; Kim et al., 2018).

La resistencia adquirida a estos antibióticos en enterococos es consecuencia de una **mutación** en los genes **gyr A** y **par C**, en general, la mayoría de las cepas resistentes presenta mutaciones en los 2 genes. Esta resistencia también puede ser debida a la adquisición de los genes **qnr** y con menor frecuencia a la existencia de la **bomba de eflujo** codificada por el gen **eme A** en *E. faecalis* y **norA-like** en *E. faecium*. Existen evidencias de la diseminación de cepas de enterococos portadoras de alguno de estos determinantes en un mismo hospital o incluso entre hospitales, en muchos casos asociadas a resistencias a otros antibióticos como glucopéptidos (Kim et al., 2018; Miller et al., 2014; Torres et al., 2018).

3.1.3.1.2 Resistencia a antibióticos de gran prioridad

Resistencia a Aminoglucósidos (Estreptomina y gentamicina)

Los aminoglucósidos están considerados por la OMS antimicrobianos de importancia crítica para la salud humana. Constituyen el único o uno de los pocos tratamientos disponibles para la endocarditis enterocócica, la tuberculosis multirresistente y las infecciones causadas por enterobacterias multirresistentes. La resistencia a esta clase de antibióticos en humanos puede resultar de la transmisión de *Enterococcus* spp., enterobacterias (entre ellas *E. coli*) y *Mycobacterium* spp. a partir de fuentes no humanas (WHO, 2019a).

Dentro de este grupo, la **estreptomina** y la **gentamicina** constituyen una de las primeras alternativas, por lo que el aumento de la resistencia a estos antibióticos tiene una elevada repercusión en medicina humana. Los enterococos presentan resistencia intrínseca de bajo nivel a los aminoglucósidos, debido a la baja permeabilidad de la pared celular; sin embargo, la adquisición de genes que codifican la producción de enzimas inactivantes dan lugar a una resistencia de alto nivel a esta clase de antimicrobianos (Bortolaia and Guardabassi, 2015; Miller et al., 2014).

En 2019, el porcentaje medio de resistencia a gentamicina de *E. faecalis* en aislados clínicos obtenidos en la población europea fue del 26,6 %, lo que representó una disminución significativa desde 2015, donde fue del 31,9 %. Sin embargo, los porcentajes de resistencia a gentamicina de *E.*

faecium aumentaron significativamente de un 10,5 % a un 18,3 % en el mismo periodo de tiempo (ECDC, 2020).

Son muchos los trabajos científicos publicados sobre la susceptibilidad a estos antibióticos en aislados clínicos de *E. faecalis* y *E. faecium* debido a la elevada presión ejercida por el uso de estos antimicrobianos en el ambiente hospitalario. Además, dada la importancia clínica de esta resistencia, se requiere ampliar el estudio de RAM a otras especies de enterococos que puedan estar presentes en otros ecosistemas como el medio ambiente o la cadena alimentaria.

El mecanismo de resistencia a **gentamicina** adquirido más frecuente es la disminución de la afinidad del antibiótico a la diana ribosomal mediada por las **enzimas acetiltransferasa (aac)** y **fosfotransferasa (aph)**, codificada por el gen ***aac(6')-Ie-aph(2'')***-Ia. La resistencia de alto nivel a **estreptomicina** es causada comúnmente por mutaciones puntuales o adquisiciones de los **genes *ant(3'')***-Ia y ***ant(6')***-Ia que provocan el mismo efecto, es decir, la **modificación enzimática** y subsecuente reducción de la afinidad entre la bacteria y el antibiótico. La resistencia de alto nivel de estreptomicina implica resistencia solamente a este antimicrobiano, mientras que la resistencia de alto nivel a gentamicina implica resistencia al resto de los aminoglucósidos con la excepción de la estreptomicina. Aunque existen otros muchos genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, no es frecuente detectar tres o más de éstos en el mismo aislado (Torres et al., 2018).

En este trabajo, se analizó la presencia del gen ***ant (6)***-Ia y del gen ***aac(6')-Ie-aph(2'')***-Ia en todos los aislados de enterococos de origen lácteo. En la **Figura 29** se muestra gráficamente la concordancia entre el fenotipo y el genotipo de resistencia a aminoglucósidos.

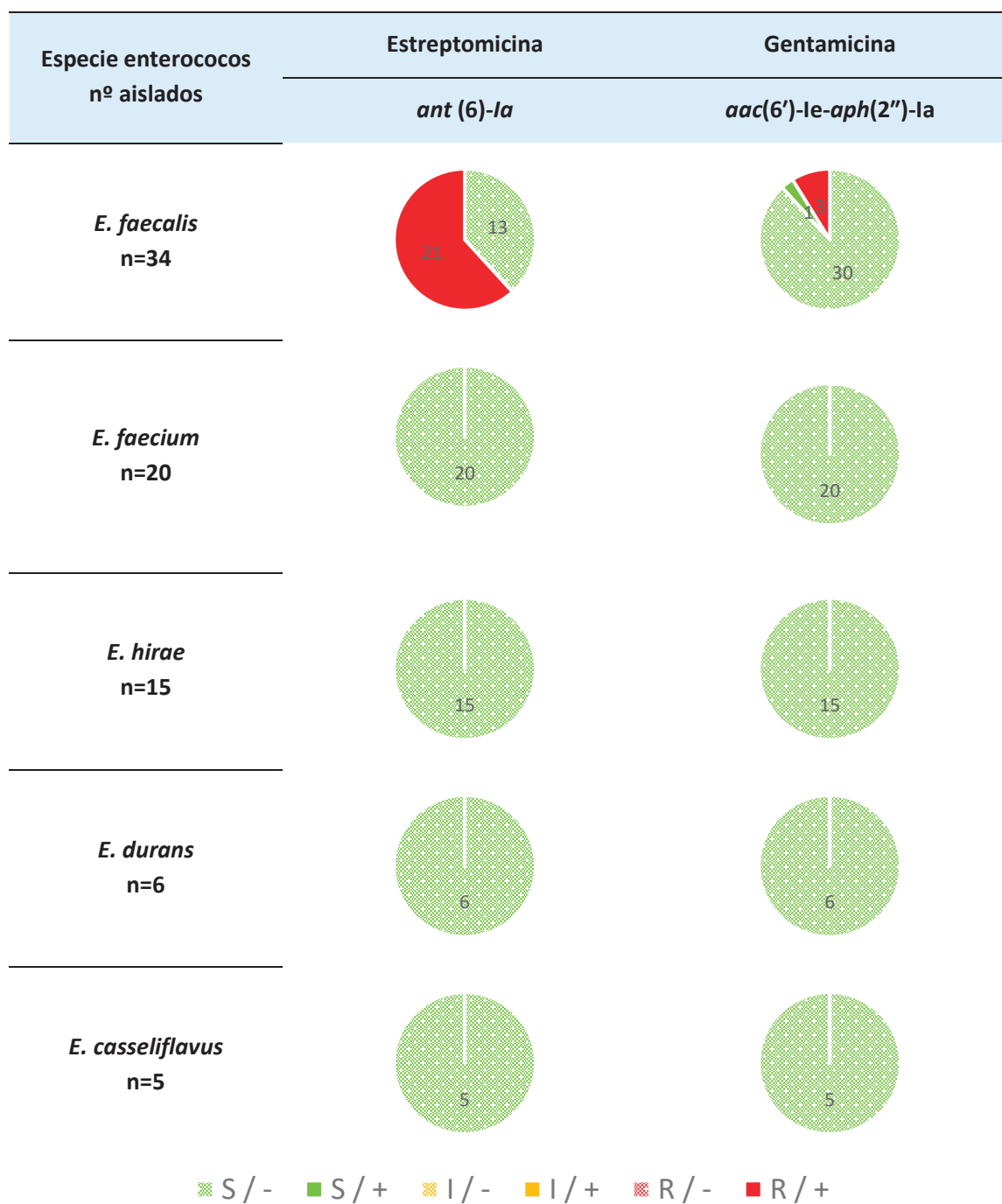


Figura 29. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a estreptomicina y gentamicina en enterococos de origen lácteo. S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

El 25 % de los aislados estudiados presentaron resistencia de alto nivel a estreptomicina y el 3,8 % lo fueron a gentamicina, todos ellos pertenecientes a la especie *E. faecalis*. Todos los aislados con

fenotipo resistente a estreptomicina presentaron el gen **ant (6)-Ia** en su genoma, mientras que ningún aislado sensible mostró amplificación de este gen. Asimismo, en todos los aislados con fenotipo resistente a gentamicina se detectó el gen **aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia**; además, se detectó en un aislado de *E. faecalis* susceptible a este antibiótico. Cabe destacar, que este aislado presentó un diámetro de inhibición de 10 mm, medida muy próxima al punto de corte (9 mm). Este hecho puede explicarse por la presencia de un gen no funcional o una expresión insuficiente de éste, dando lugar a un fenotipo sensible, aun cuando el gen está presente en el genoma de la bacteria. Hay que tener en cuenta que técnicas como la RT PCR permiten detectar la RAM a un nivel molecular, pero a pesar de ello, la presencia de un gen no siempre predice el comportamiento de un organismo expuesto a diferentes niveles de un antimicrobiano (Kime et al., 2019; Yang et al., 2019). Este hecho ha sido descrito anteriormente por investigadores como Choi and Woo (2013), Chotinantakul et al. (2018) y Sirichoat et al. (2020) en aislados de enterococos portadores de los genes *aacA-aphD*, *aadE*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, y *ant (6)-Ia*, *aph(3')-IIIa* o *aph(E)* pero sensibles mediante test *in vitro* a altos niveles de aminoglucósidos.

En el **Cuadro 10** se muestran datos publicados de prevalencia de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y los determinantes genéticos asociados detectados en enterococos aislados de alimentos lácteos.

Cuadro 10. Estudios publicados en enterococos de origen lácteo con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a aminoglucósidos asociados.

Origen	País	Fenotipo	%	+gen/ S ^R -G ^R *		Referencia
Queso leche cruda OV (Manchego)	España	S	4			(Nieto-Arribas et al., 2011)
		G	0			
Queso leche cruda BO, OV y CA	Francia	G	7	<i>aac(6')</i> -le- <i>aph(2'')</i> -la	3/4*	(Jamet et al., 2012)
Queso fresco leche cruda BO	Italia	G	21			(Pesavento et al., 2014)
Queso fresco (mozzarella)			2,7			
Planta de procesado de Queso fresco (Ricota)	Brasil	S	1,9			(Fernandes et al., 2015)
Queso leche cruda BO	Egipto	S	0			(Hammad et al., 2015)
		G	0,8			
Queso leche cruda OV 90 y 180 días maduración (Ragusano y Pecorino siciliano)	Italia	S	19,3			(Russo et al., 2018)
		G	2			
Productos lácteos LPC	Polonia	S	29,1	<i>ant(6')</i> -la	38/54*	(Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020)
				<i>aac(6')</i> -le- <i>aph(2'')</i> -la	7/54*	
				<i>aac(6')</i> -le- <i>aph(2'')</i> -la + <i>ant(6')</i> -la	7/54*	
Queso fresco, semi curado, curado	Turquía	S	5,8	<i>aac(6')</i> -le- <i>aph(2'')</i> -la	1/3*	(Kurekci et al., 2016)
		G	2,2			

*+gen/ S^R-G^R: nº aislados portadores del gen/nº de aislados con fenotipo resistente a aminoglucósidos; -: No analizado; S: Estreptomina; G: Gentamicina; BO: Bovino; OV: Ovino; CA: Caprino; LPC: listo para el consumo; LPC: listo para el consumo

Los porcentajes de resistencia a aminoglucósidos obtenidos en este trabajo son algo superiores a los descritos por investigadores como Fernandes et al. (2015), Hammad et al. (2015), Kurekci et al. (2016); Nieto-Arribas et al. (2011) en aislados procedentes de productos lácteos, donde se describen

cifras de resistencia inferiores al 6 % para ambos antibióticos; aunque, algunos de los estudios más recientes realizados en quesos producidos o comercializados en Europa, señalan resultados muy similares a los encontrados en este trabajo, lo que podría indicar una tendencia ascendente de esta resistencia (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Russo et al., 2018). Estos datos dan una perspectiva de la situación global; la resistencia a aminoglucósidos en productos lácteos no es tan elevada como en otros ambientes donde sí ha tenido lugar un uso desproporcionado de estos antibióticos como es en el sector de producción animal avícola y porcino, donde se han empleado aminoglucósidos para optimizar la producción de alimentos. En otras especies como vacuno, ovino, en el sector de la acuicultura o en animales salvajes, esta resistencia todavía se mantiene con porcentajes similares a los mostrados en este trabajo mientras que en animales domésticos, los porcentajes también son elevados, seguramente debido al uso de estos antibióticos en medicina veterinaria (Jamet et al., 2012; Klibi et al., 2013; Torres et al., 2018).

Los resultados del estudio molecular coinciden con lo publicado en la bibliografía en cuanto a la presencia generalizada de los genes *ant(6)-Ia* y *aac(6)-Ie-aph(2'')*-Ia responsables de la disminución de la afinidad entre el antibiótico y la diana ribosomal, independientemente del origen del aislado. Además, estos determinantes genéticos tienden a localizarse en la misma estructura genética que otros genes RAM, por lo que en muchas ocasiones se detectan en combinación con otros determinantes (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Chotinantakul et al., 2018a; Klibi et al., 2013; Kurekci et al., 2016).

En este trabajo, los determinantes ***ant(6)-Ia*** y ***aac(6)-Ie-aph(2'')***-Ia se detectaron en 3 aislados que a su vez contenían los genes ***tet M*** y ***erm B***. Esto sugiere que, aunque la resistencia a aminoglucósidos no alcance niveles tan elevados como la resistencia a tetraciclina o eritromicina, estos mecanismos de RAM pueden transferirse horizontalmente mediante elementos genéticos móviles entre diferentes aislados.

Resistencia a Oxazolidinonas (Linezolid)

De acuerdo con los criterios establecidos por la OMS, las oxazolidinonas son antimicrobianos de importancia crítica para la salud humana. Son uno de los pocos tratamientos disponibles para infecciones por SARM multirresistentes y *Enterococcus* spp. multirresistentes y puede resultar de la transmisión de *Enterococcus* spp. y SARM a partir de fuentes no humanas (WHO, 2019a).

El **linezolid** es el primer representante comercializado de este grupo que se introdujo entre los años 2000-2001 en la práctica clínica en EE. UU. y Europa como alternativa importante para el tratamiento de bacterias gram positivas como VRE o SARM. Desafortunadamente, la resistencia a linezolid se viene observando en bacterias gram positivas desde poco después de su introducción y aunque su frecuencia continúa siendo baja, este hallazgo constituye un reto terapéutico frente a ERV (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2013).

La resistencia a este antibiótico es debida a una **mutación del gen 23S del ARNr** que en muchas ocasiones se origina durante el tratamiento antibiótico (Torres et al., 2018). Existen otros mecanismos de resistencia a linezolid asociados al **gen *cfr*** o al **gen *optr A***, los cuales a su vez confieren resistencia a otros antibióticos y tienen la capacidad de diseminarse de unas bacterias a otras. En muchas ocasiones el gen *optrA* se asocia a la presencia de elementos genéticos móviles portadores de otros genes RAM lo que supone la existencia de un fenómeno de resistencia cruzada de bacterias multirresistentes, es decir, una bacteria puede adquirir un gen de resistencia que codifica un mecanismo de resistencia común a varios antibióticos, sin necesidad de que exista una presión selectiva de todos ellos (Cavaco et al., 2017; Lozano and Torres, 2017).

Aunque el linezolid no se emplea en producción animal, en los últimos años se ha observado un aumento de resistencia a este antibiótico en aislados procedentes de animales y alimentos de origen animal en diferentes partes del mundo, especialmente en aves y en porcino y sus productos, representando una causa importante de preocupación en la comunidad médica. Esta resistencia se asocia en la mayoría de los casos a la presencia de los genes *cfr* y *optrA* (Rehaiem et al., 2016; Torres et al., 2018). El gen *cfr* fue identificado por primera vez en enterococos en 2011, en aislados de *E. faecalis* procedentes de una granja de vacuno lechero en China. Posteriormente, este gen se ha detectado en aislados clínicos y en ganado porcino en diferentes países. Se ha descrito una segunda variante de este gen (*cfr B*), sin embargo, solo se ha identificado en aislados clínicos de *E. faecium*. El gen *optr A* se ha detectado en ADN cromosómico y en ADN plasmídico de aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* pertenecientes a diferentes secuencias tipo de origen humano y de animales de producción y esporádicamente en aislados de *E. gallinarum*. En España, más del 80 % de los aislados clínicos humanos son portadores del gen *optr A*. Generalmente este gen confiere bajos niveles de resistencia a linezolid, y en muchas ocasiones se localiza próximo a otros genes de resistencia contenidos en plásmidos como el gen *fex A* y el gen *erm A* (Moure et al., 2020; Ruiz Ripa, 2020).

En este trabajo ninguno de los aislados presentó resistencia a linezolid coincidiendo con lo descrito en otros estudios llevados a cabo por Chajęcka-Wierzchowska et al. (2020), Delpech et al. (2012), Hammad et al. (2015), Kurekci et al. (2016) y Pesavento et al. (2014) los cuales notifican porcentajes inferiores al 15 % en aislados procedentes de alimentos lácteos.

Dada la emergencia actual de resistencias a antibióticos como el linezolid que pueden ser empleados como alternativas terapéuticas a la vancomicina frente a ERV, conviene mantener la vigilancia de la resistencia adquirida a este antibiótico en ambientes distintos al hospitalario, con el fin de identificar posibles fuentes de diseminación de RAM; sobre todo considerando que los alimentos como el queso elaborado con leche cruda de oveja son un vehículo de propagación directa de bacterias resistentes del animal al hombre (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Hammad et al., 2021).

Resistencia a β -lactámicos (Ampicilina y penicilina)

Los β -lactámicos se consideran antibióticos de importancia crítica para la salud humana por ser uno de los pocos tratamientos disponibles frente a *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus* spp. La resistencia a esta clase de antibióticos puede resultar de la transmisión de *Enterococcus* spp. y enterobacterias (entre ellas *E. coli*) a partir de fuentes no humanas (WHO, 2019a).

La **ampicilina** y la **penicilina** son dos de los antibióticos β -lactámicos más activos frente a las infecciones enterocócicas siendo la combinación penicilina o ampicilina con un aminoglucósido la principal opción terapéutica, generalmente ampicilina y gentamicina (Furlaneto-Maia et al., 2014; Miller et al., 2014).

La resistencia adquirida a β -lactámicos (ampicilina o penicilina) se ha detectado con frecuencia en aislados clínicos de *E. faecium*, siendo infrecuente en *E. faecalis*. Los primeros aislados *E. faecium* resistentes a β -lactámicos se describieron en EE. UU. a finales de los años 80, mientras que Europa este aumento se comenzó a observar una década después. En la actualidad, el porcentaje de *E. faecium* resistente a la ampicilina en ambiente hospitalario supera el 80 % en muchos países europeos, entre ellos España (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2013; Dapkevicius et al., 2021).

En aislados procedentes de animales de producción, domésticos o salvajes, así como alimentos de origen animal, los porcentajes de resistencia a esta clase de antibióticos varían según el país y la

especie animal, mostrando en general ratios muy por debajo de lo encontrado en aislados humanos. En el caso de *E. faecalis* de origen animal y alimentario, al igual que ocurre en aislados clínicos, esta resistencia rara vez se ha identificado (Klibi et al., 2013; Torres et al., 2018).

En este trabajo ningún aislado presentó resistencia a ampicilina y penicilina, cifras que coinciden con lo descrito en la bibliografía donde en pocas ocasiones se han detectado resistencias por encima del 2 % en enterococos de origen lácteo (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Delpech et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Furlaneto-Maia et al., 2014; Hammad et al., 2015; Jamet et al., 2012; Kurekci et al., 2016; Nieto-Arribas et al., 2011; Pesavento et al., 2014; Rehaïem et al., 2016; Russo et al., 2018; Sánchez Valenzuela et al., 2009).

La resistencia que desarrollan las bacterias frente a los β -lactámicos representa un grave problema de salud pública, pues es probablemente el grupo de antibióticos más utilizado en medicina humana y veterinaria. A pesar de no haber detectado resistencia a esta clase de antibióticos en enterococos de origen lácteo, sería recomendable la vigilancia de la resistencia adquirida en fuentes no humanas, por la posible repercusión que pueda tener en procesos infecciosos en humanos o animales.

3.1.3.2 Resistencia a antibióticos de importancia alta

Resistencia a Lincosamidas (Clindamicina)

De acuerdo con los criterios de la OMS las lincosamidas son antimicrobianos de importancia alta para la salud humana. Todas las especies de enterococos son intrínsecamente resistentes a clindamicina debido a la impermeabilidad de su pared a este antimicrobiano. Este hecho hace que todos los aislados de origen clínico sean reportados como resistentes a este antibiótico (Stahl, 2017; Torres and Cercenado, 2010). Al tratarse de una resistencia que no se transmite horizontalmente a otros microorganismos, su estudio carece de interés epidemiológico y por ello la información acerca de la resistencia a este antibiótico en aislados de enterococos en entornos no clínicos es muy limitada.

Sin embargo, no se excluye que una bacteria intrínsecamente resistente a un antibiótico pueda adquirir uno o varios determinantes genéticos que codifiquen resistencia a ese mismo antibiótico, los cuales pueden ser transferidos horizontalmente, aunque dicha adquisición no le proporcione ninguna ventaja selectiva.

La resistencia adquirida a lincosamidas (**lincomicina y clindamicina**) se debe a la expresión de los genes *Inu*, al producir una nucleotidiltransferasa que adenila un grupo hidróxilo en estos antibióticos. Desde que se describió en 1988 este fenotipo inusual (lincosamida resistente, *Inu A*) en bacterias gram positivas, se han descrito varios genes *Inu* en diversas bacterias de origen humano y animal, incluyendo *Inu B*, *Inu C*, *Inu D*, *Inu E*, *Inu F* y *Inu P*. En enterococos, esta resistencia adquirida fue descrita por primera vez por Bozdogan et al. (1999), en aislados clínicos de *E. faecium* portadores del gen *Inu B*. Posteriormente, se ha detectado este gen en aislados de enterococos procedentes de otras fuentes como animales y alimentos y en muchas ocasiones se asocia con la presencia de plásmidos y/o trasposones que contienen otros genes de RAM (Cercenado, 2011; Thumu and Halami, 2014; Torres et al., 2018). Zhu et al. (2016) describieron el gen *Inu G* en *E. faecalis* aislado de cerdo, asociado al elemento móvil Tn 6260.

En este trabajo, se ha analizado la presencia de los genes ***Inu A* y *Inu B*** en todos los aislados por ser los determinantes *Inu* más frecuentemente detectados en bacterias gram positivas de origen humano y animal (Lozano and Torres, 2017).

En la **Figura 30** se representa gráficamente la concordancia entre el fenotipo y genotipo de resistencia a clindamicina mediado por los genes *Inu*.

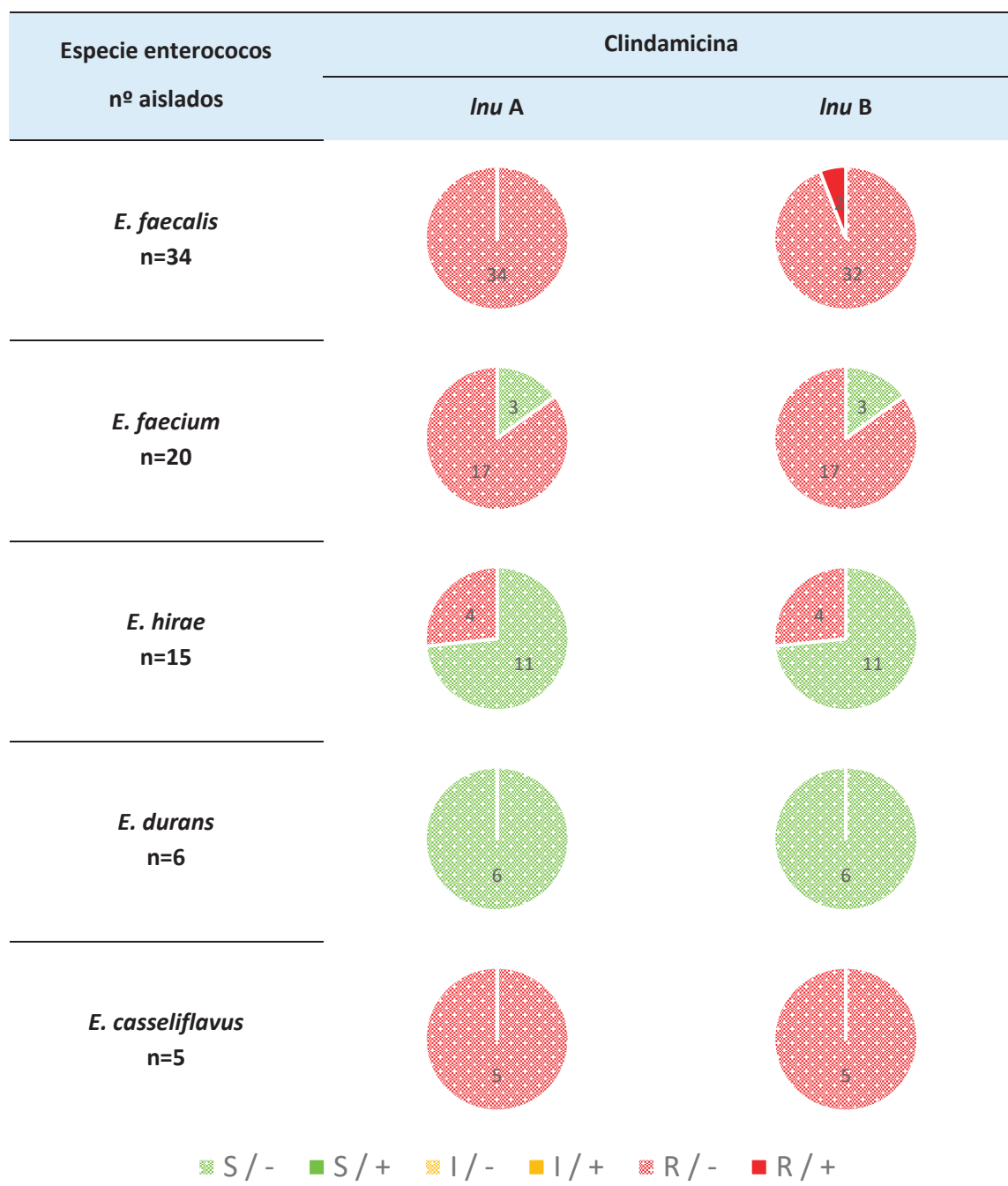


Figura 30. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a clindamicina en enterococos de origen lácteo.

S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

En ningún caso se identificó el gen *Inu A*, y solamente el 3,6 % (2/60) de los fenotipos resistentes a clindamicina mostraron el gen *Inu B*, concretamente en *E. faecalis*.

El hecho de adquirir un mecanismo de resistencia a un antibiótico al que este género bacteriano ya es resistente intrínsecamente, no le otorga ninguna ventaja ni condiciona la resistencia intrínseca, sin embargo, la presencia del gen *Inu B* en ADN plasmídico en aislados de *E. faecalis* es de suma importancia, ya que sugiere que los enterococos de origen lácteo pueden adquirir determinantes genéticos de resistencia a clindamicina y en consecuencia diseminar dichos genes por vía horizontal a otras bacterias.

Resistencia a Estreptograminas (quinupristina y dalfopristina)

Las estreptograminas son antimicrobianos categorizados por la OMS de importancia alta. **Quinupristina/dalfopristina** son dos antibióticos del grupo de las estreptograminas tipo B y tipo A, respectivamente, que se usan en ocasiones combinadas para el tratamiento de infecciones producidas por enterococos multirresistentes. *E. faecalis* es intrínsecamente resistente a las estreptograminas A y por tanto el uso de esta combinación se aplica ante infecciones provocadas por *E. faecium* (Bortolaia and Guardabassi, 2015; Cercenado, 2011). Tal y como se ha indicado anteriormente, la resistencia intrínseca a las estreptograminas A se asocia a la presencia de una estructura protéica que participa en el **transporte del fármaco al exterior** celular codificada por el gen cromosómico *lsa* (Sirichoat et al., 2020).

La resistencia adquirida a la combinación de estreptogramina de tipo A y B puede ser debida a la presencia de genes que median la resistencia a la estreptogramina A, como los genes ***vat A*, *vat D* y *vat E***, y genes que median resistencia a la estreptogramina B, como los genes ***vga* y *vgb***.

En este trabajo se analizaron los genes ***vat D* y *vat E***, cuya distribución por especies se representa gráficamente en la **Figura 31**.



Figura 31. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a Q/D en enterococos de origen lácteo. S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

Como era previsible, el 70,1 % de los aislados de *E. faecalis* mostraron el fenotipo de resistencia Q/D. En el resto de las especies de enterococos se observó una baja prevalencia de este fenotipo de resistencia (3 *E. casseliflavus*, 2 *E. hirae*, 1 *E. faecium*).

E. faecalis es intrínsecamente resistente a las estreptograminas A por lo que no podemos afirmar que la resistencia observada a nivel fenotípico en los aislados de esta especie se deba a la presencia de un mecanismo adquirido (Torres and Cercenado, 2010).

Todos los aislados de *E. hirae* y *E. casseliflavus* con fenotipo Q/D resistente mostraron la combinación de ambos genes, demostrando así que el mecanismo de resistencia a Q/D estaba asociado a la presencia de la **enzima acetiltransferasa**. Por el contrario, estos genes no se detectaron en el fenotipo Q/D resistente de *E. faecium*, por lo que se puede considerar que dicho fenotipo puede estar relacionado con otro mecanismo de resistencia como mutaciones en las proteínas ribosomales que participan en la unión al antibiótico o con la presencia de plásmidos que contienen los genes **vga** y **vgb**, los cuales codifican mecanismos de resistencia tales como la escisión de la estructura del antibiótico. El **Cuadro 11** resume algunos de los trabajos publicados relacionados con la prevalencia de resistencia a Q/D y los determinantes genéticos asociados a ésta, detectados en enterococos aislados de diversas fuentes (alimentos de origen animal y animales de producción).

Cuadro 11. Estudios publicados en enterococos (*no E. faecalis*) de animales y alimentos de origen animal con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a Q/D asociados.

Origen	País	Fenotipo Q/D (%)	Genotipo	+ gen/n Q/D ^{R*}	Referencia
Pavo		87,6		37/92	
Pollo		100		16/62	
Cerdo		32,3		0/20	
Vacuno lechero	EE. UU.	17,6	Vat E	0/9	(Donabedian et al., 2006)
Vacuno carne		0		0/0	
Carne de pollo		81		0/17	
Carne de cerdo		33,3		0/1	
Cerdo	Bélgica	34	vat E/ vat D	0/27	(De Graef et al., 2007)
Pollo		15	vat D vat E	0/27 3/7	
Vegetales	España	13,6			(Klibi et al., 2013)
Agua		35			
Queso	España	35			(Sánchez Valenzuela et al., 2009)
Pescado		20			

Origen	País	Fenotipo Q/D (%)	Genotipo	+ gen/n Q/D ^R *	Referencia
Pollo	Korea	30,3	vat D	0/10	(Hwang et al., 2010)
			vat E	4/10	
Cerdo		4,8	vat D	0/1	
			vat E	1/1	
Vacuno lechero	Estados Unidos	<4	-		(Jackson et al., 2011)
Cultivo de tomates (tomates, hojas, suelo y agua)	Estados Unidos	>60	-		(Micallef et al., 2013)
Carne de pollo, ovino y vacuno	Tunez	4,2	-		(Klibi et al., 2013)
Productos cárnicos (pollo, cerdo y vacuno)	España	89,5	vat D	1/34	(Guerrero-Ramos et al., 2016b)
			vat E	2/34	
Carne de caza silvestre	España	80	-		(Guerrero-Ramos et al., 2016a)
Alimentos cárnicos LPC	Polonia	11,6	-		(Chajęcka-Wierzchowska et al., 2016)
Productos lácteos LPC (Queso fresco, semi curado, curado, leche agria, nata agria, leche en polvo, mantequilla)	Polonia	2,1	-		(Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020)
Queso fresco, semi curado, curado	Turquía	2,9	-		(Kurekci et al., 2016)

*+gen/n^o Q/D^R: n^o aislados portadores del gen/n^o de aislados con fenotipo resistente a estreptograminas; -: No analizado; LPC: listo para el consumo.

Según datos publicados, la prevalencia de resistencia Q/D en productos lácteos parece mantenerse por debajo del 35 % siendo en algunos casos inferior al 3 %. En la última década se ha observado un aumento de la prevalencia de resistencia a esta combinación antibiótica, principalmente en granjas de aves y porcino. Según el informe publicado por la EFSA y el ECDC en 2013, entre el 64,1 % y el 86,5 % de los aislados de *E. faecium* procedentes de aves de corral, cerdos y vacuno, mostraron

resistencia a Q/D (EFSA & ECDC, 2015). El aumento de resistencia en estas especies animales se asocia al uso en el pasado de estreptograminas, en concreto de virginamicina, como promotores del crecimiento (Torres et al., 2018).

Investigadores como Jackson et al. (2010) obtuvieron porcentajes de RAM inferiores en aislados procedentes de ganado vacuno lechero, en diferentes puntos geográficos de los Estados Unidos, asociándose al hecho de que las estreptograminas no son el antibiótico de elección para el secado de las ubres o la prevención de mastitis. Estos datos demuestran una gran variabilidad de resistencia a Q/D dependiendo del ambiente y el origen geográfico, estando en la mayoría de los casos condicionada por la presión antibiótica ejercida en las últimas décadas.

Los genes **vat** se han descrito en numerosas ocasiones en aislados de *E. faecium* procedentes de carne de cerdo, pollo, estiércol, así como agua superficial y subterránea (Torres et al., 2018). Investigadores como De Graef et al., (2007), Donabedian et al. (2006) y Hwang et al. (2010) detectaron el gen *vat E* en aislados de *E. faecium* procedentes de granjas de pollos, pavos y/o cerdos destinados a producción de alimentos, donde en algunos casos se conocía el uso de estreptograminas como promotores del crecimiento. Guerrero-Ramos et al. (2016b) detectaron los genes *vat E* y *vat D* en un porcentaje minoritario de aislados procedentes de productos cárnicos elaborados con carne de pollo y cerdo. Por el contrario, hay muy pocos trabajos en la literatura que aporten datos de estos genes en enterococos no clínicos y a su vez no relacionados con producción avícola y porcina.

A la vista de los resultados, podemos concluir que el mecanismo implicado en la resistencia a Q/D ha sido la inactivación enzimática mediada por la enzima acetiltransferasa e inducida por la presencia de los genes **vat D y vat E**.

Por otra parte, la ausencia de genes *vat D* y *vat E* en un aislado de *E. faecium* resistente a Q/D sugiere que esta resistencia puede estar mediada por otros mecanismos genéticos diferentes a los estudiados en este trabajo o por mutaciones en el genoma. La expulsión de las estreptograminas A por bomba eflujo codificada por los genes *vga* o la intervención de la proteína ABC transportadora vinculada a la presencia del gen *eat A* son algunos mecanismos que se han descrito en enterococos aislados de animales (Bozdogan et al., 1999; Torres et al., 2018; Zaheer et al., 2020).

La información obtenida en este trabajo concuerda con lo observado en la literatura científica. Los porcentajes de resistencia a Q/D en leche y lácteos no son elevados, quizás porque el ganado ovino y bovino ha estado menos expuesto a antimicrobianos del grupo de las estreptograminas que las aves y el porcino.

Resistencia a anfenicoles (Cloranfenicol)

Los anfenicoles han sido categorizados por la OMS como antimicrobianos muy importantes. En algunas zonas geográficas puede ser uno de los pocos tratamientos disponibles para tratar la meningitis bacteriana aguda, la fiebre tifoidea y no tifoidea y las infecciones respiratorias. La resistencia a esta clase de antibióticos puede resultar de la transmisión de enterobacterias (entre ellas *E. coli* y *Salmonella* spp.) a partir de fuentes no humanas (WHO, 2019a).

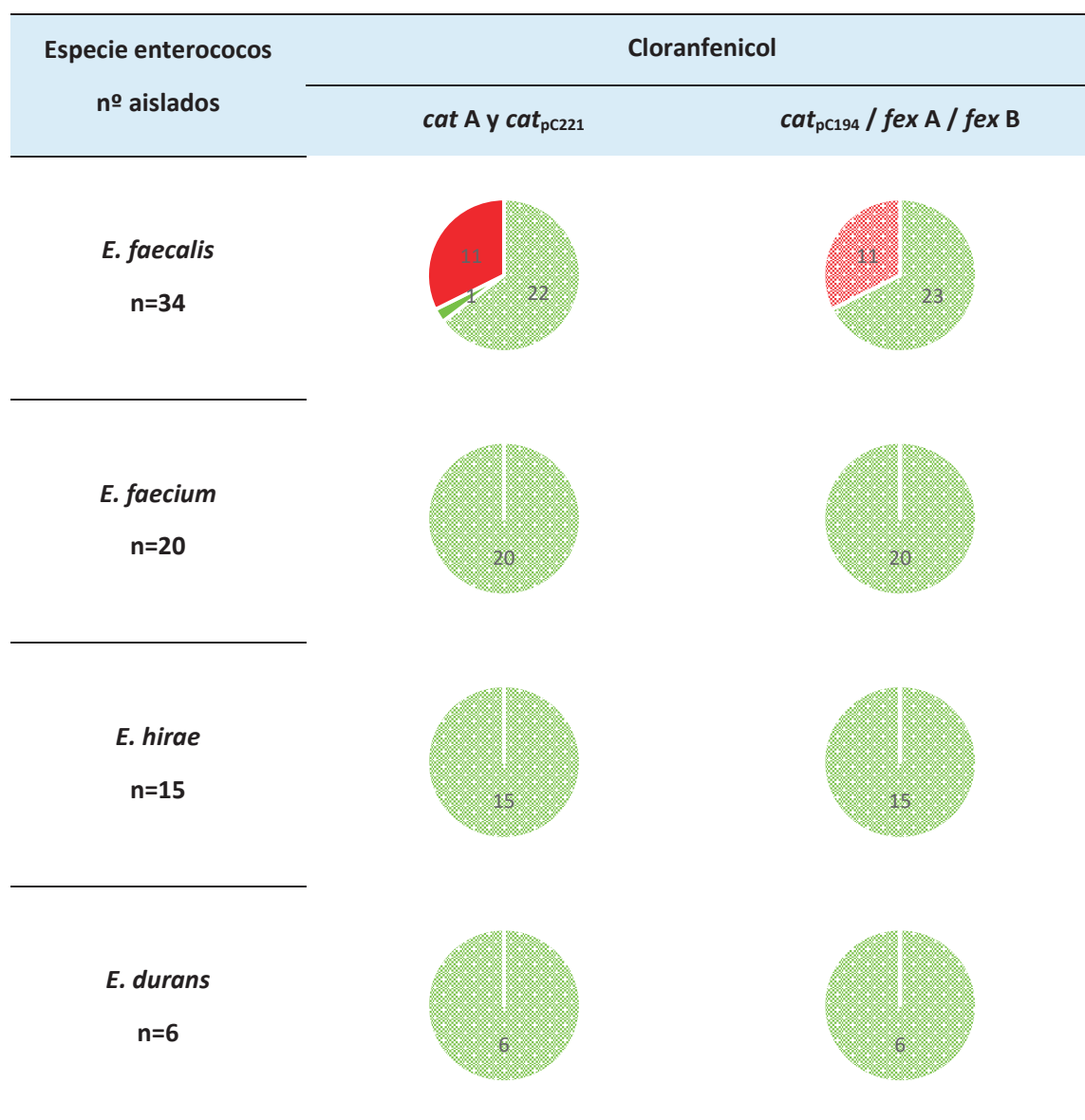
El cloranfenicol es un antibiótico poco común en medicina humana ya que puede causar anemia aplásica, por lo que su administración se reserva únicamente para el tratamiento de infecciones graves o indicaciones específicas (Bortolaia and Guardabassi, 2015). El uso de este antimicrobiano en animales de producción se prohibió en Europa y EE. UU. en los años 90 debido principalmente al riesgo toxicológico asociado a su presencia como residuo en los alimentos (Nicolich et al., 2006). Por ello, cabe esperar que la resistencia a este antibiótico en enterococos de origen alimentario no represente un problema grave actualmente.

Los genes *cat A*, *cat_{PC221}*, *cat_{PC194}*, *fex A*, *fex B*, *cfr* y *optrA*, identificados en enterococos aislados de humanos, animales y alimentos, codifican resistencia a los antibióticos del grupo de los anfenicoles. La codificación de la **enzima acetiltransferasa** (CAT) mediante los genes *cat* parece ser el mecanismo más común de resistencia a cloranfenicol, sin embargo, existen más de 16 grupos distintos de enzimas CAT y son pocos los estudios sobre la diversidad y el contexto genético de esta enzima y los genes que la codifican en aislados de enterococos (Chotinantakul et al., 2018a; Jamet et al., 2012; Kurekci et al., 2016; Torres et al., 2018).

La resistencia a cloranfenicol se asocia a la presencia de plásmidos y trasposones que a su vez transportan otros determinantes genéticos de RAM. Investigadores como Jamet et al. (2012), Klibi et al. (2013), Kurekci et al. (2016) y Rehaïem et al. (2016) han detectado fenotipo de resistencia a cloranfenicol junto a otros antibióticos entre los que se encuentra tetraciclina y eritromicina

portando el gen *cat A* junto con *tet M*, *tet L* y *erm B* indistintamente; por ello, la resistencia adquirida a cloranfenicol no solo está condicionada por la presión selectiva generada por la presencia de este antibiótico (Russo et al., 2018; Templer and Baumgartner, 2007; Torres et al., 2018).

En este trabajo, se estudió la presencia de los genes *cat A*, *cat_{pC221}*, *cat_{pC194}*, *fex A* y *fex B* en todos los aislados. La distribución de dichos determinantes genéticos de resistencia en las distintas especies de enterococos aparece representada en la **Figura 32**.



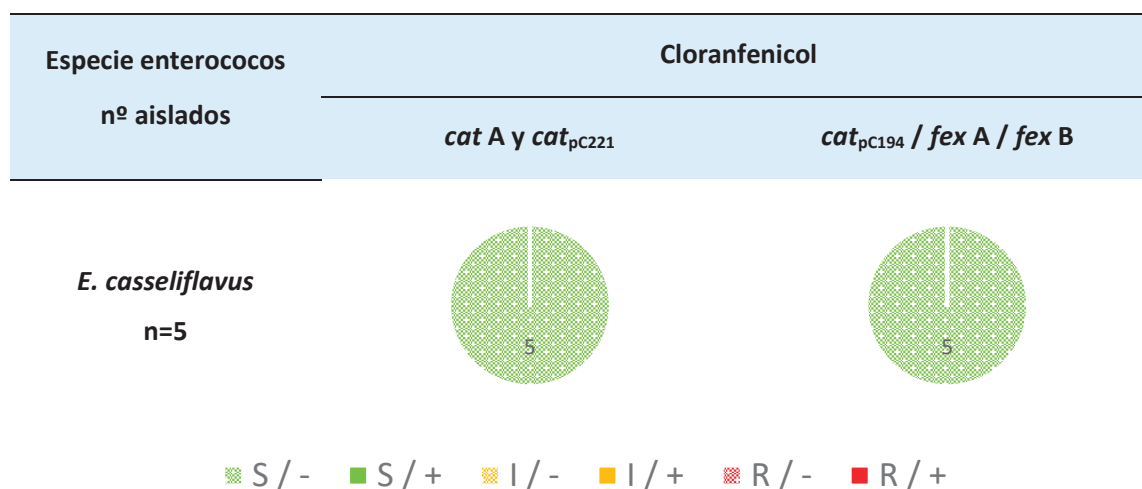


Figura 32. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a cloranfenicol en diferentes especies de enterococos de origen lácteo.

S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

El 13,8 % de los aislados mostraron resistencia *in vitro* a este antibiótico. Aunque esta cifra no es elevada, muestra valores ligeramente superiores a los señalados en otros estudios donde analizan aislados de enterococos de diversas fuentes relacionadas con el proceso de producción de alimentos lácteos (queso fresco, mozzarella, queso manchego, productos artesanos elaborados con leche cruda fermentada, heces de ganado vacuno etc..) en distintas partes del mundo (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Fernandes et al., 2015; Furlaneto-Maia et al., 2014; Jackson et al., 2011; Nieto-Arribas et al., 2011; Pesavento et al., 2014; Rehaïem et al., 2016).

Sin embargo, otros autores han mostrado resultados muy diferentes, con porcentajes de resistencia más elevados: 30 % en aislados de quesos suizos de leche cruda (Templer and Baumgartner, 2007), 55,7 % en quesos de leche cruda de vaca y pasterizada en Francia (Jamet et al., 2012) y entre un 50 % y 80 % en quesos sicilianos de leche cruda de vaca y oveja (Russo et al., 2018). Esta elevada incidencia también se ha observado puntualmente en enterococos procedentes de otros alimentos de origen animal (Ahmed and Baptiste, 2018; Chotinantakul et al., 2018a; Guerrero-Ramos et al., 2016b, 2016a; Osman et al., 2019; Terentjeva et al., 2019).

En regiones fuera de la Unión Europea y EE. UU., la prohibición del uso de cloranfenicol en animales de producción tuvo lugar años más tarde, hecho que puede explicar el incremento de resistencia a este antibiotico en ciertas áreas geográficas (Furlaneto-Maia et al., 2014; Osman et al., 2019). Otros autores sugieren que puede existir una resistencia cruzada o coresistencia con otros antibióticos

que sí se han empleado en las últimas décadas (Guerrero-Ramos et al., 2016b, 2016a). Tal es el caso del florfenicol, un antibiótico del grupo de los anfenicoles y con un mecanismo de acción similar al cloranfenicol que actualmente es utilizado en acuicultura debido a su larga estabilidad en solución (Barreto et al., 2018; Nicolich et al., 2006).

En este trabajo, todos los aislados de *E. faecalis* que presentaron fenotipo de resistencia a este antibiótico presentaron los genes *cat A* y *cat_{pC221}*. Además, estos mismos aislados también mostraron fenotipo de resistencia a tetraciclina y eritromicina codificada por la presencia de los genes *tet M* y *erm B*.

Los genes *cat A* y *cat_{pC221}* también se presentaron conjuntamente en un aislado con fenotipo sensible. Al igual que se ha observado anteriormente en el caso del gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* y la resistencia a gentamicina, esto puede explicarse por la existencia de un gen no funcional y una producción ineficiente de la enzima acetil transferasa que inactiva el antibiótico (Yang et al., 2019). Autores como Stępień-Pyśniak et al. (2021) achacan este fenómeno a la existencia de una mutación en la región reguladora del gen *cat* que puede ser responsable de la inhibición de la expresión de éste.

Los genes *cat_{pC194}*, *fex A* y *fex B* no se detectaron en ninguno de los aislados. El gen *fex A* se ha descrito principalmente en *Staphylococcus* spp. y el gen *fex B* en *Enterococcus* spp. de origen porcino, por lo que cabe esperar que el ambiente de producción de queso curado de leche de oveja no sea un ambiente proclive a dichos determinantes (Osman et al., 2019).

Resistencia a Tetraciclinas (tetraciclina y minociclina)

De acuerdo con los criterios de la OMS, las tetraciclinas son antimicrobianos de gran importancia para la salud humana por ser uno de los pocos tratamientos disponibles para las infecciones causadas por *Brucella* spp., *Chlamydia* spp. y *Rickettsia* spp. En países en los que es frecuente la transmisión de la brucelosis al ser humano a partir de fuentes no humanas esta clase de antibióticos debería considerarse de importancia crítica (WHO, 2019a).

La tetraciclina y minociclina son los dos antibióticos más comúnmente empleados del grupo de las tetraciclinas, debido a sus propiedades antimicrobianas frente a un amplio espectro de bacterias gram positivas y negativas, a la ausencia de efectos secundarios adversos, y a su bajo coste. Estos

antibióticos se han utilizado de manera extensiva tanto en la terapia de infecciones en humanos como en animales, además de su uso como promotor del crecimiento animal en acuicultura, o incluso en agricultura. Consecuencia de ello fue la aparición de resistencia a este grupo de antibióticos a partir de los años 80, siendo actualmente la resistencia a tetraciclina una de las más frecuentes en enterococos de origen clínico, animal y alimentario (Chopra and Roberts, 2001; Zaheer et al., 2020).

En este trabajo, la **tetraciclina** y la **minociclina** fueron los antibióticos que mostraron mayores porcentajes de resistencia antibiótica adquirida. El 47,5 % y 2,5 % de los aislados mostraron resistencia y susceptibilidad intermedia a tetraciclina, respectivamente, mientras que el 42,5 % y 7,5 % lo fueron a minociclina.

Se han descrito casi 60 genes que codifican resistencia adquirida a esta clase de antibióticos, aunque los más frecuentemente implicados en la resistencia de enterococos son aquellos que codifican el mecanismo de protección ribosomal (*tet M*, *tet O* y *tet S*) y bomba de eflujo (*tet K* y *tet L*) (Torres et al., 2018). Esta resistencia transferible se asocia en muchas ocasiones a la presencia de los trasposones conjugativos Tn916/Tn1545 que contienen el gen *tet M*, frecuentemente en combinación con el gen *erm B*. También puede estar mediada por la presencia de plásmidos o incluso encontrarse en el cromosoma (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Marin Garrido, 2014).

En este estudio se llevó a cabo el análisis de los determinantes genéticos *tet M* y *tet L*, los cuales codifican resistencia tanto a tetraciclina como a minociclina. La **Figura 33** representa gráficamente la distribución de los determinantes genéticos de resistencia *tet M* y *tet L* en los aislados analizados según la especie bacteriana y la susceptibilidad mostrada *in vitro* a los antibióticos tetraciclina y minociclina.

El **gen *tet M*** se detectó en todos los aislados de enterococos con susceptibilidad reducida a tetraciclina (38 resistentes y 2 intermedios) y a minociclina (34 resistentes y 6 intermedios). De los 40 aislados con genotipo *tet M*, 28 pertenecían a la especie *E. faecalis*, 10 a la especie *E. hirae* y 2 a *E. casseliflavus*. El **gen *tet L***, solo se identificó en 4 de los 40 aislados resistentes a ambos antibióticos, todos ellos de la especie *E. faecalis* y portadores a su vez del gen *tet M*. Ninguno de los aislados caracterizados fenotípicamente como sensibles mostraron estos genes.

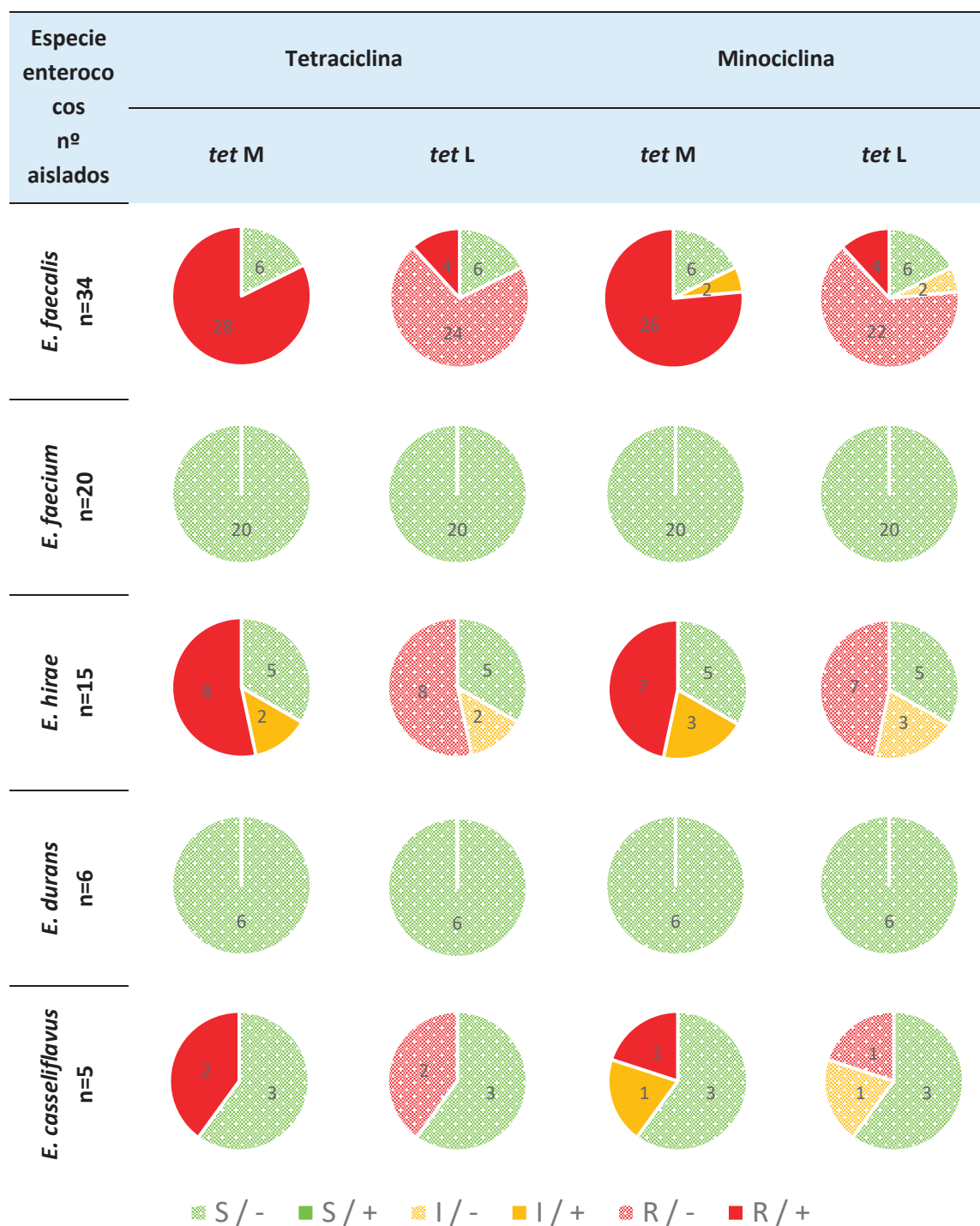


Figura 33. Concordancia entre fenotipo y genotipo de resistencia a tetraciclina y minociclina en especies de enterococos de origen lácteo.

S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente; -: Ausencia del gen; +: Presencia del gen.

Estos resultados muestran una concordancia del 100 % entre el perfil fenotípico determinado por difusión en disco y la detección del mecanismo adquirido de resistencia a tetraciclina y minociclina codificado por el gen **tet M**. Tal y como ocurre en otras bacterias gram positivas, y como se ha observado en este estudio, el mecanismo de resistencia a tetraciclina adquirido más común es la **protección ribosomal** codificada por este gen.

El **Cuadro 12** muestra un resumen de estudios publicados sobre prevalencia de resistencia a tetraciclinas, así como los determinantes genéticos detectados en enterococos aislados de alimentos lácteos.

Cuadro 12. Estudios publicados en enterococos de origen lácteo con fenotipo, genotipo y genes de resistencia a tetraciclinas asociados.

Alimento	País	Fenotipo	%	Genotipo	+gen/nº TE ^R *	Referencia
Queso leche BO, OV y CA cruda y pasterizada	Francia	TE	92,4	<i>tet M</i>	18/29	(Jamet et al., 2012)
		MIN	86,1	<i>tet M + tet L</i>	8/29	
Queso fresco	Brasil	TE	30,6	<i>tet L</i>	1/29	(Furlaneto- Maia et al., 2014)
Queso fresco, semi curado, curado	Turquía	TE	33,8	<i>tet M</i>	36/47	(Kurekci et al., 2016)
				<i>tet L</i>	2/47	
				<i>tet M + tet L</i>	1/47	
Queso leche BO cruda	Egipto	TE	65,0	<i>tet L</i>	1/54	(Hammad et al., 2015)
				<i>tet K</i>	1/54	
				<i>tet M + Tn916</i>	3/54	
				<i>tet M + tet L + Tn916</i>	3/54	
Queso leche OV cruda 90 y 180 días maduración (Ragusano y Pecorino siciliano)	Italia	TE	50,7	-	-	(Russo et al., 2018)

Alimento	País	Fenotipo	%	Genotipo	+gen/nº TE ^R *	Referencia
Cuajada, queso fresco, semi curado, curado, leche agria y otros productos lácteos	Polonia	TE	11,6	<i>tet M</i>	16/43	(Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020)
				<i>tet L</i>	7/43	
				<i>tet W</i>	1/43	
				<i>tet M + tet L</i>	13/43	
				<i>tet M + tet K</i>	5/43	

*+gen/nº TE^R: nº aislados portadores del gen/nº de aislados con fenotipo resistente a tetraciclinas; -: No analizado; LPC: listo para el consumo; TE: Tetraciclina; MIN: Minociclina; BO: Bovino; OV: Ovino; CA: Caprino.

Los resultados obtenidos en este estudio son muy similares a los observados por otros trabajos en enterococos de origen lácteo, los cuales detectaron elevados porcentajes de resistencia *in vitro* a esta clase de antibióticos y su asociación con la alteración ribosomal codificada por el gen *tet M*. En menor medida, se describen otros determinantes genéticos de resistencia como el gen *tet L* y *tet K* relacionados con la expulsión del antibiótico por mecanismos de bomba eflujo. Al igual que lo observado en este trabajo, en muchas ocasiones, el gen *tet L* se presenta conjuntamente con el gen *tet M* (Delpech et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Jamet et al., 2012; Nieto-Arribas et al., 2011; Pesavento et al., 2014; Rehaiem et al., 2016; Russo et al., 2018; Sánchez Valenzuela et al., 2009).

A pesar de que la prevalencia de RAM y la distribución de los genes varía significativamente dependiendo de la región geográfica y el origen de las cepas, se ha demostrado un aumento considerable en los últimos años de resistencia a tetraciclina en enterococos aislados de diversos productos lácteos. Este aumento se asocia al uso indiscriminado de tetraciclina en producción animal, de hecho, en alimentos cárnicos derivados de cerdo y pollo, estos porcentajes son superiores y se asocian al sistema de cría intensiva (Bortolaia and Guardabassi, 2015; Rehaiem et al., 2016; Torres et al., 2018). Aunque en ganado vacuno y ovino no se ha hecho uso tan extensivo de los antibióticos como en otras especies animales, los datos aportados en este trabajo demuestran que el queso curado de oveja es una fuente de bacterias portadoras de los genes *tet M* y *tet L* y por tanto un vehículo potencial de diseminación de resistencia a tetraciclina en la microbiota intestinal humana.

Es necesario destacar la aparición emergente de resistencia a tigeciclina una gliciliciclina derivada de la tetraciclina. Este antibiótico tiene un espectro de acción más amplio y una actividad

antimicrobiana cinco veces superior a las tetraciclinas por lo que forma parte de los antibióticos de último recurso cuando es la única alternativa terapéutica posible frente a ciertas infecciones. Hasta hace poco, se pensaba que ningún mecanismo de resistencia a tetraciclinas asociado a bomba eflujo o protección ribosomal confería resistencia a las gliciliclinas, sin embargo, recientemente se ha descrito la implicación de algunos genes *tet L* y *tet M* en la resistencia a esta clase de antibióticos. Aunque todavía hay poca información disponible relacionada con las bases molecular de la resistencia a tigeciclina, es importante llevar cabo programas de vigilancia que permitan controlar la diseminación de las resistencias antimicrobianas a tetraciclinas para poder predecir la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia y sus vías de propagación (Yaghoubi et al., 2021).

Resistencia a Sulfonamidas (Trimetoprima/sulfametoxazol)

Las sulfonamidas son antimicrobianos categorizados por la OMS como muy importantes. En algunas zonas geográficas puede ser uno de los pocos tratamientos disponibles para la meningitis bacteriana aguda, las infecciones sistémicas por *Salmonella* spp. no tifoideas y otras infecciones. La resistencia a esta clase de antibióticos en personas puede resultar de la transmisión de enterobacterias (entre ellas *E. coli*) a partir de fuentes no humanas (WHO, 2019a).

La **trimetoprima** y el **sulfametoxazol** (STX) son dos antibióticos del grupo de las sulfonamidas que **inhiben el metabolismo celular**, interviniendo en la síntesis del ácido fólico. Los enterococos son resistentes intrínsecamente a esta combinación antibiótica debido a la capacidad de éstos de utilizar fuentes exógenas de folato por lo que, aunque puedan presentar susceptibilidad *in vitro*, estos compuestos son inefectivos *in vivo*. Existen muy pocos estudios que reporten información sobre la resistencia a esta combinación antibiótica, además de que en muchas ocasiones los puntos de corte no están disponibles en las guías clínicas. Tampoco se han descrito determinantes genéticos transmisibles en aislados de enterococos (Russo et al., 2018; Torres et al., 2018).

No obstante, al tratarse de una antibioterapia clínicamente relevante, en este trabajo se estudió la susceptibilidad a STX mediante el test de difusión en disco y únicamente cuatro aislados (5 %) presentaron resistencia. Todos ellos lo fueron igualmente a tetraciclina, minociclina, Q/D, estreptomina y/o gentamicina y 3 de ellos también a cloranfenicol. El análisis genético demostró

la presencia de los genes *tet M* y *erm B* en combinación con los genes *lnu B*, *ant (6)-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *cat A*, *cat_{pC194}* de forma variable según el aislado.

Estos resultados sugieren que puede existir un fenómeno de coresistencia donde la existencia de una isla genética portadora de diversos genes RAM puede arrastrar consigo determinantes de resistencia a otros antibióticos como STX, incluso cuando en esta combinación antibiótica no ha estado presente en ese ambiente. En otro trabajo llevado a cabo por Jamet et al. (2020) en quesos elaborados con leche cruda y leche pasteurizada en Francia, detectaron porcentajes de resistencia a SXT en torno al 10 %, aunque este porcentaje no es elevado, se demostró que la RAM a SXT estaba asociada con la resistencia a minociclina y tetraciclina.

En comparación con otros microorganismos gram positivos, la resistencia a sulfonamidas en enterococos no es relevante, sin embargo, es importante tener en consideración la capacidad de este género bacteriano para recibir y donar material genético que codifique mecanismos de resistencia a SXT, entre otros antibióticos (Eliopoulos and Huovinen, 2001; Xu et al., 2018).

3.2 Tipificación molecular de *Enterococcus* spp.

El objetivo principal fue determinar la diversidad genética entre los aislados del género *Enterococcus* circulantes en el proceso de elaboración de queso de leche cruda de oveja y su relación filogenética con aislados de origen humano, así como aportar datos sobre la diseminación clonal entre ambientes diferentes.

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de la diversidad genética con la finalidad de estudiar la distribución de fenotipos y genotipos de RAM existentes en el proceso de elaboración de queso curado. Para diferenciar enterococos a nivel de cepa se emplearon dos herramientas moleculares: la técnica PFGE considerada el estándar de oro (*gold standard*), por su excelente poder de discriminación y alto grado de reproducibilidad, y la técnica RAPD PCR como alternativa más sencilla, rápida y económica.

La técnica RAPD PCR se aplicó a 80 aislados de diferentes especies (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* y *E. casseliflavus*) y la técnica PFGE a 54 aislados pertenecientes a las especies *E. faecalis* y *E. faecium*. Cada una de estas técnicas presenta ciertas ventajas y desventajas para la tipificación, las cuales se evalúan y discuten más adelante.

3.2.1 Tipado molecular de *Enterococcus* spp. mediante RAPD PCR

En el presente trabajo, se ha evaluado la RAPD PCR como herramienta de tipificación rápida para llevar a cabo el seguimiento epidemiológico de RAM asociada a *Enterococcus* spp. comparando los resultados con los obtenidos de la PFGE, considerada técnica "*gold standard*".

Dado que la RAPD PCR es muy sensible a las condiciones de la reacción de amplificación y electroforesis, fue necesario optimizar dichas condiciones para evitar que las diferencias en los patrones de bandas fueran debidas a problemas de la reacción, en lugar de reflejar diferencias genéticas. Por ello se optimizaron previamente los protocolos de PCR y electroforesis en gel de agarosa, para valorar posteriormente la reproducibilidad de la técnica bajo las condiciones de análisis establecidas. Los resultados de la optimización y el estudio de reproducibilidad se describen en el **Anexo II** y **Anexo III**.

Todos los aislados del G^o *Enterococcus* (n=80) identificados a nivel de especie mediante MALDI-TOF fueron caracterizados genéticamente por medio de la técnica RAPD PCR con los cebadores M13 y D8635, aplicando como límite de discriminación el coeficiente de similitud del 90 % derivado del estudio de reproducibilidad (**Anexo III**).

Los perfiles RAPD PCR obtenidos con cada uno de los cebadores generaron de 5 a 18 fragmentos de tamaño comprendido entre 100 a 1700 pb, tal y como ocurrió con las cepas de referencia. Los cebadores M13 y D8635 discriminaron 30 y 23 genotipos diferentes, respectivamente. La combinación de patrones con ambos cebadores, permitió diferenciar 55 genotipos. Asimismo, el análisis de bandas polimórficas de RAPD determinó 7 clúster (A, B, C, D, E, F y G) que agrupan los aislados de las diferentes especies identificadas a excepción de *E. faecalis* y *E. hirae* para las cuales se obtuvieron 2 clústeres bien diferenciados genéticamente (**Figura 34**).

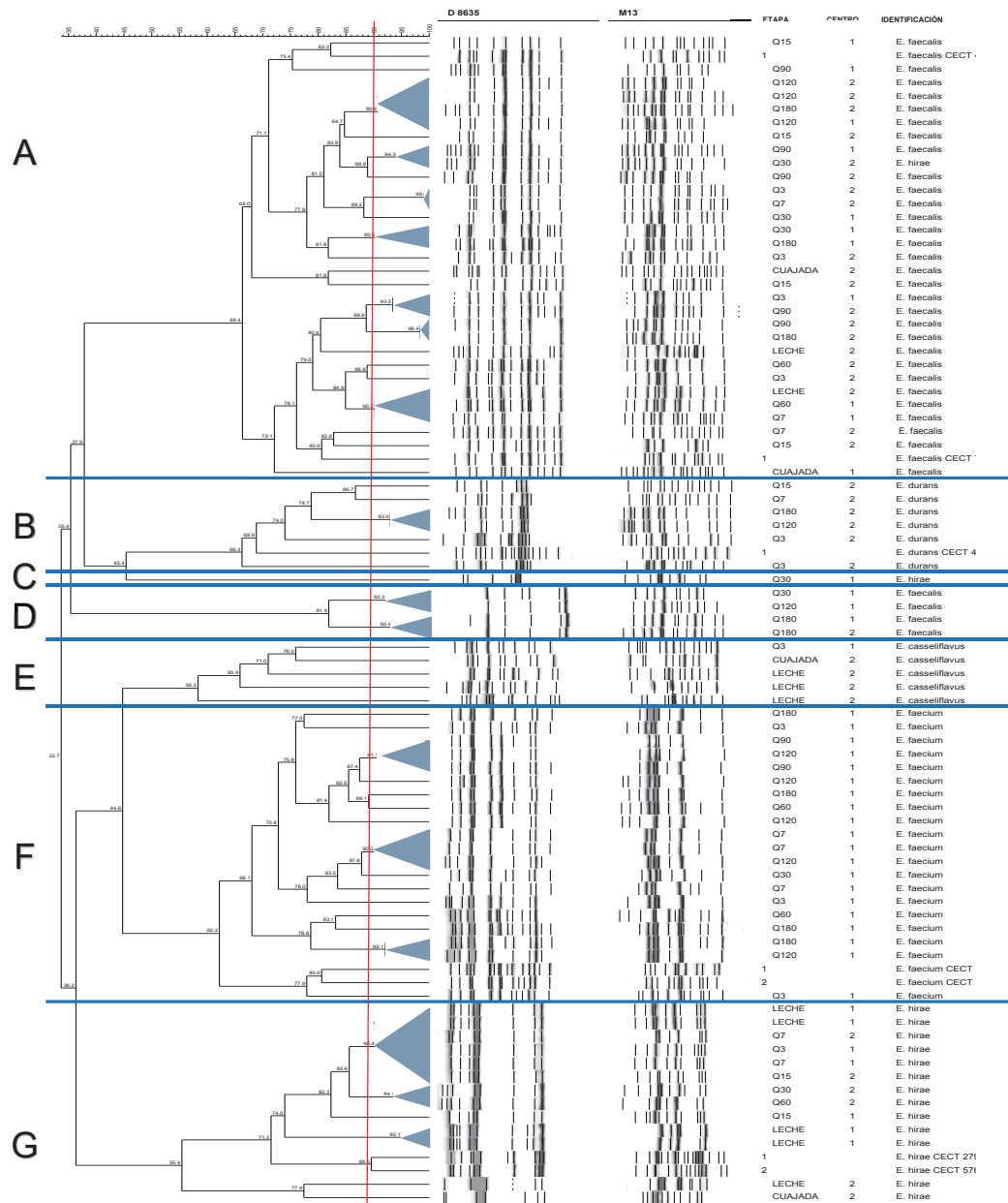


Figura 34. Dendrograma basado en polimorfismos de RAPD aplicado a enterococos aislados del proceso de elaboración de queso curado.

Linea vertical roja indica coeficiente de similitud del 90% por encima del cual se agruparon los aislados como genéticamente idénticos. 1= Centro de producción 1; 2= Centro de producción 2; Etapas del proceso: Q3 = queso de 3 días; Q7 = queso 7 días, Q15 = queso 15 días, Q30 = queso 30 días, Q60 = queso 60 días, Q90 = queso 90 días, Q120 = queso 120 días, Q180 = queso 180 días

Los aislados de *E. faecalis* fueron agrupados en dos clústeres (A y D) con una baja similitud genética entre sí.

El **cluster A**, que incluye las cepas de referencia *E. faecalis* CECT 481 y CECT 795, agrupó **31 aislados** con un nivel de similitud de 66,4 %. Todos los aislados fueron identificados previamente mediante MALDI-TOF como *E. faecalis* a excepción de un aislado identificado anteriormente como *E. hirae* que presentó similitud genética del 94,3 % con *E. faecalis*. Este hecho podría corresponderse con material identificado incorrectamente mediante MALDI-TOF. Algunos autores han descrito dificultades técnicas a la hora de usar esta técnica para la identificación de cocos gram positivos; sin embargo, no debemos descartar que este resultado discrepante se deba a un fallo en la manipulación de la muestra en la etapa preanalítica o un error en la fase analítica o postanalítica (Carlos Rodríguez et al., 2016; Keppel et al., 2020; Schulthess et al., 2013).

En este grupo se diferenciaron **21 genotipos**, divididos en 14 patrones únicos y 7 grupos genómicos, uno de los cuales estaba formado por cuatro aislados, uno por tres aislados y cinco por dos aislados, que en todos los casos se consideraron idénticos (nivel de similitud >90 %). Este clúster presentó a su vez 2 subclústers A1 y A2 con un nivel de similitud de 66,4 %. Cabe destacar que ambos subclústers presentaron genotipos formados por aislados procedentes de diferentes centros de producción y de muestras muy diversas del proceso de elaboración del queso.

El subclúster A1 (*E. faecalis* CECT 481) lo conformaron 19 aislados procedentes de ambos centros de producción, los cuales fueron diferenciados en 12 genotipos con un nivel de similitud de 68 %. En general, los aislados provenían de etapas muy variadas del proceso de maduración en ambos centros.

El subclúster A2 (*E. faecalis* CECT 795) lo formaron 14 aislados clasificados en 9 genotipos con un nivel de similitud del 72,1 %. Al igual que en el subclúster A1, los aislados pertenecían a ambos centros de producción y diferentes muestras del proceso de fabricación.

El **clúster D** integró **4 aislados** de *E. faecalis* con un nivel de similitud entre ellos de 81,9 %, clasificados en dos grupos genómicos, uno de ellos relacionado con el centro de producción 1 y el otro con ambos centros de producción.

Los aislados identificados como *E. durans* fueron agrupados en el **clúster B**, que incluye la cepa de referencia *E. durans* CECT 411. Este clúster lo constituyeron **6 aislados** con un nivel de similitud del 66,3 % y se diferenciaron 4 perfiles únicos y un grupo genómico de dos aislados. Todos los aislados provenían del centro de producción 2.

Los aislados identificados mediante MALDI-TOF como *E. hirae* fueron agrupados en dos clústeres (C y G). El **subclúster C**, constituido por un perfil único presentó una baja similitud genética con los aislados del clúster G. El **clúster G** agrupó las cepas de referencia *E. hirae* CECT 279 y 5784 y **13 aislados** con un nivel de similitud de 55,4 %. Los aislados procedían de ambos centros de producción y de muestras de etapas tempranas del proceso de fabricación (leche, cuajada, queso de 3, 7, 30 y 60 días). Se diferenciaron **6 genotipos**, un genotipo formado por 6 aislados, dos genotipos formados por dos aislados cada uno, uno de los cuales se identificó en muestra de leche del centro 1, y el otro genotipo en el centro 2. Por último, tres perfiles únicos, dos de ellos aislados de leche y cuajada del centro de producción 2, y uno de queso de 15 días del centro 2.

El **clúster E** lo formaron **5 aislados** identificados mediante MALDI-TOF como *E. casseliflavus*. Y fueron clasificados como cepas diferentes (**5 genotipos**) con un nivel de similitud de 58,3 %. Cabe destacar su relación con las muestras de leche cruda en el centro de producción 2.

Por último, el **clúster F** lo formaron los 20 aislados identificados mediante MALDI-TOF como *E. faecium* junto con las cepas de referencia *E. faecium* CECT 410 y CECT 5253 con un nivel de similitud de 62,2 %. Todos ellos procedían del centro de producción 1. Se identificaron **15 genotipos** constituidos por 12 perfiles únicos y tres grupos genómicos integrados por 4, 3 y 2 aislados, respectivamente. En este clúster se diferenciaron a su vez 3 subclústers F1, F2 y F3, con una alta similitud genética entre ellos.

El subclúster F1 lo formaron 15 aislados clasificados en 11 genotipos diferentes con un nivel de similitud de 72,8 %, todos procedentes de diferentes etapas del proceso de maduración. El subclúster F2 lo formaron 4 aislados clasificados en 3 genotipos diferentes con un nivel de similitud de 73,7 % entre ellos y el subclúster F3 un aislado clasificado con un nivel de similitud de 77,9 % junto con las cepas de referencia (CECT 410 y 5253).

Estos resultados muestran una gran diversidad genética entre los aislados del Gº *Enterococcus* en ambos centros de producción. Se han podido tipificar todos los aislados estudiados y diferenciar

entre especies genéticamente muy relacionadas que no son fáciles de diferenciar mediante métodos convencionales. La utilización de dos cebadores ha permitido agrupar los aislados en distintos genotipos o grupos genómicos y por tanto distinguir a nivel de cepa.

Los agrupamientos obtenidos fueron coherentes con las diferencias genéticas conocidas entre especies, cuya identidad fue verificada mediante el análisis MALDI-TOF. Se observó que los patrones de genotipos asignados a la misma especie o clasificados en el mismo clúster exhibieron varias bandas en común, pudiéndose considerar bandas representativas a nivel de especie. Únicamente un aislado de *E. hirae* quedó clasificado en un grupo genético diferente. Este hecho puede explicarse por un fallo en la manipulación de la muestra y por tanto una identificación incorrecta.

De los resultados se concluye que el análisis RAPD ha permitido caracterizar 80 aislados en 55 genotipos o grupos genómicos, demostrando una importante variabilidad intraespecífica, especialmente en los clústers correspondientes a las especies *E. faecalis* (cluster A) y *E. faecium* (cluster F); ambos se han podido subdividir en varios subclúster diferenciando cepas dentro de la misma especie.

Por otra parte, la técnica RAPD PCR ha evidenciado perfiles genéticos idénticos en aislados de enterococos procedentes de centros de producción de queso diferentes. Este hecho pone de manifiesto la existencia de una microbiota endémica bien adaptada, no solo a las condiciones de elaboración propias de cada centro de producción, sino también a las condiciones específicas de la zona geográfica de procedencia.

También se ha detectado la presencia de cepas diferentes procedentes de la misma muestra de queso, demostrando que efectivamente el Gº *Enterococcus* está presente de forma significativa a lo largo de todo el proceso, formando parte de la microbiota específica del queso curado elaborado con leche cruda de oveja.

El análisis de los resultados corrobora la presencia y variabilidad genética de este género bacteriano en queso curado elaborado con leche cruda de oveja, de manera similar a la señalada en otros quesos artesanos elaborados en la zona del mediterráneo u otras regiones, donde las especies *E. faecalis* y *E. faecium* representan la microbiota dominante del género *Enterococcus*, especialmente *E. faecalis* (Christian Andrighetto et al., 2001; Domingos-Lopes et al., 2017; Jamet et al., 2012;

Margalho et al., 2020; Martín-Platero et al., 2009; Morandi et al., 2006; Nieto-Arribas et al., 2011; Pesavento et al., 2014; Pino et al., 2018; Rehaiem et al., 2016; Vandra et al., 2020).

En cuanto a la distribución y la dinámica poblacional, los resultados mostraron la presencia de algunos genotipos estables a lo largo del proceso de fabricación, mientras que otros genotipos son predominantes en las fases iniciales o en las últimas etapas de la maduración, como ocurre con el clúster E (*E. casseliflavus*) identificado en leche, cuajada y queso de 3 días o el subclúster G2 (*E. hirae*) en leche y cuajada. Esto puede ser debido a una mayor o menor tolerancia a las características fisicoquímicas en cada etapa del proceso, sumado a la competitividad con otros microorganismos que forman la microbiota del queso (Margalho et al., 2020).

En conclusión, la técnica RAPD PCR ha puesto de manifiesto la existencia de una gran diversidad microbiana de enterococos, tanto interespecífica como intraespecífica, resultados altamente probables si tenemos en cuenta que se trata de un proceso de fermentación que sucede de forma espontánea a expensas de los microorganismos presentes en la leche cruda, superficies de equipos y utensilios, y el propio ambiente de los centros de producción.

Estos resultados concuerdan con los anteriormente descritos por otros autores, los cuales demostraron que la técnica RAPD PCR resulta ser un método válido y preciso para el estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas complejas en quesos tradicionales, así como para la caracterización genética de aislados de enterococos (C. Andrighetto et al., 2001; Emaneini et al., 2016; Muñoz-Atienza et al., 2016; Olive and Bean, 1999; Rossetti and Giraffa, 2005).

3.2.2 Tipado molecular de *Enterococcus* spp. mediante PFGE

La PFGE ha demostrado ser una técnica altamente discriminativa y reproducible, motivo por el cual es considerada el *gold standard* para la tipificación de la mayoría de las bacterias a nivel de cepa. En la investigación epidemiológica se aplica para reconocer brotes de infección, detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, y para identificar cepas particularmente virulentas y su fuente de infección, entre otros fines.

El objetivo de este estudio fue determinar la relación genética de *E. faecalis* (34 aislados) y *E. faecium* (20 aislados), identificados previamente a nivel de especie por MALDI-TOF, en el proceso

de elaboración de queso curado de leche cruda de oveja. Los resultados obtenidos se han empleado como referencia para evaluar el poder discriminatorio de la técnica RAPD PCR. En la **Figura 35** y la **Figura 36** se observan los perfiles electroforéticos obtenidos para cada uno de los aislados, utilizando el enzima de restricción *Sma*-I.

De forma reiterada, dos aislados de la especie *E. faecium* no mostraron restricción del genoma bacteriano (**Figura 35**, carril 12 y 19), razón por la cual fueron excluidos del estudio. Igualmente, el patrón obtenido para un aislado de *E. faecalis* (**Figura 35**, carril 7) se descartó del estudio por mostrar un perfil poco nítido. En consecuencia, el estudio de tipificación se realizó a 33 aislados de *E. faecalis* y 18 de *E. faecium*.

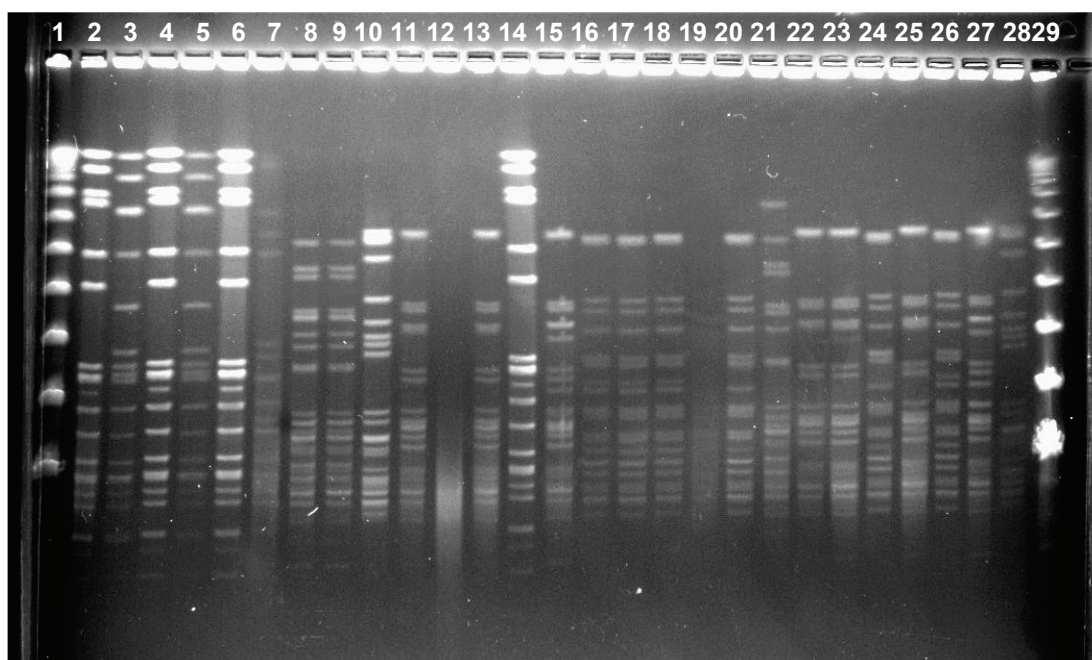


Figura 35. Perfiles PFGE *Sma*I obtenidos de los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*. Carril 1 y 29: Marcador de peso molecular, Carril 2-28: Aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*.

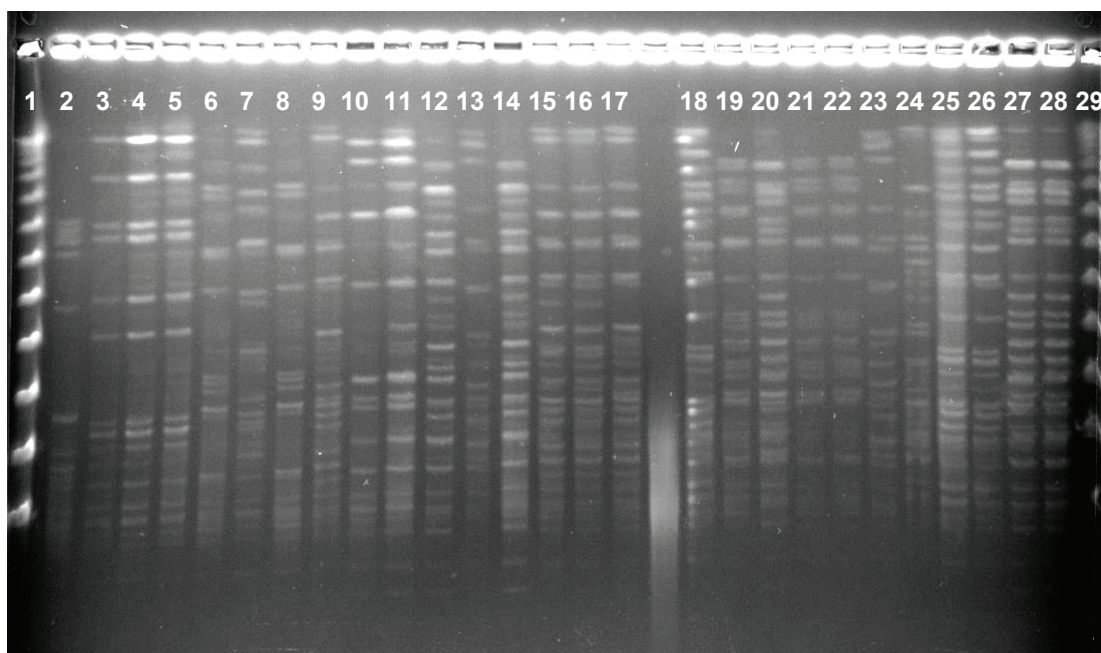


Figura 36. Perfiles PFGE *Sma*I obtenidos de los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*. Carril 1 y 29: marcador de peso molecular; Carril 2-28: Aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*.

En la **Figura 37** y la **Figura 38** se representa la relación genética de los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente, mediante la construcción de un dendograma. En total se obtuvieron **18 patrones o pulsotipos distintos**, 12 pulsotipos (A-L) de *E. faecalis* y 6 pulsotipos (M-Q) de *E. faecium*.

En el caso de *E. faecalis* destacan tres pulsotipos (L, D y H) que incluían 6, 5 y 4 aislados, respectivamente, mientras que los pulsotipos A, F y G estuvieron representados por un único perfil. El resto de aislados (15) fueron clasificados en 6 pulsotipos (B, C, I, E, J y K) tal y como se observa en la **Figura 37**.

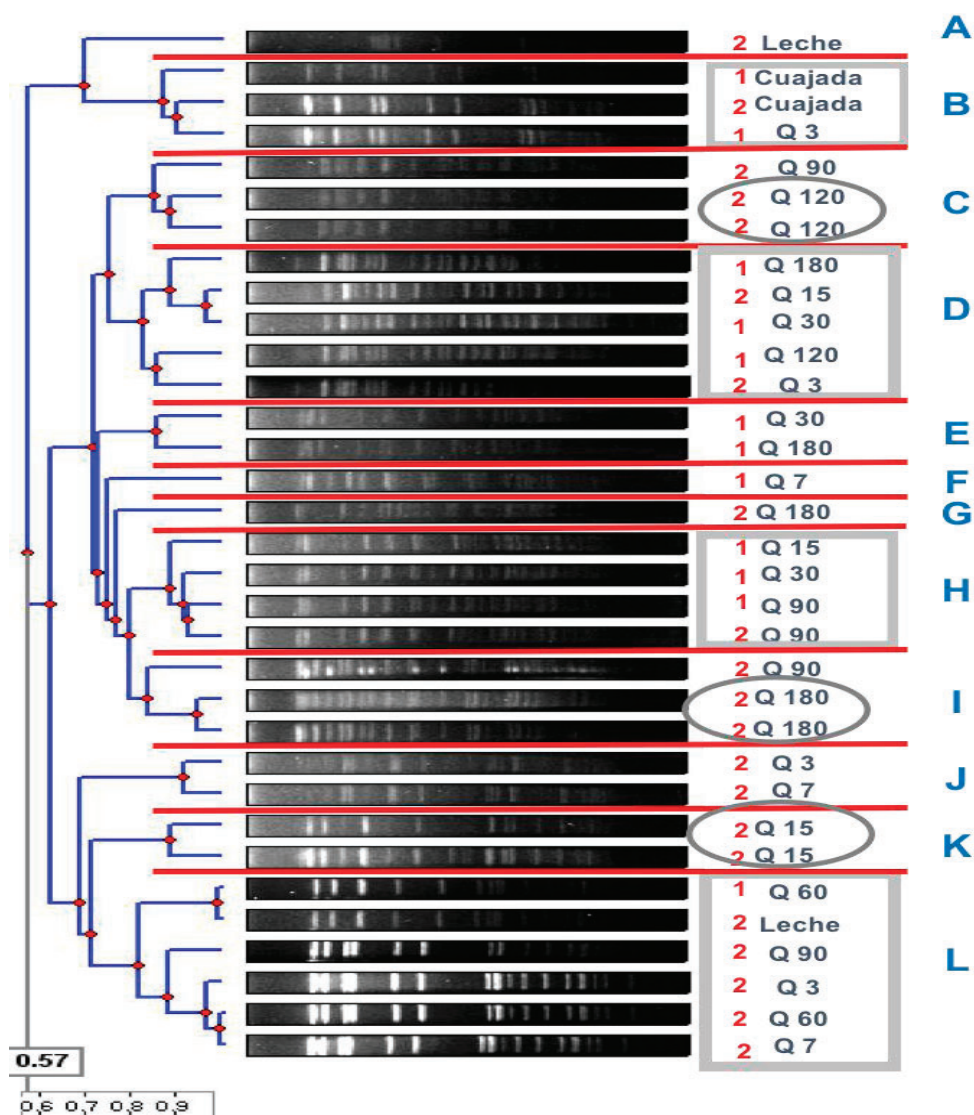


Figura 37. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA de los perfiles electroforéticos PFGE de *E. faecalis* de origen lácteo.

1= centro de producción 1; 2= centro de producción 2; Etapas del proceso: Q3 = queso de 3 días; Q7 = queso 7 días, Q15 = queso 15 días, Q30 = queso 30 días, Q60 = queso 60 días, Q90 = queso 90 días, Q120 = queso 120 días, Q180 = queso 180 días.

Los rectángulos engloban aquellos pulsotipos constituidos por aislados procedentes de diferentes centros de producción y diferentes etapas del proceso de fabricación (B, D, H y L). Los óvalos, incluyen aquellos pulsotipos que clasifican al menos dos aislados procedentes del mismo centro de producción y misma etapa del proceso (C, I y K).

En general, se observó un alto nivel de homogeneidad genética entre las cepas pertenecientes al mismo centro de producción, y heterogeneidad genética entre las cepas de diferentes centros de producción, con algunas excepciones (pulsotipos B, D, H y L) que demuestran la circulación de clones adaptados al ambiente de producción quesera.

El análisis de cada centro no evidenció una tendencia definida de distribución de clones en el proceso de elaboración, con la excepción de dos pulsotipos (C, I) exclusivamente asociados al producto final y un pulsotipo (K) relacionado con el inicio de la fabricación.

Los aislados de *E. faecium* (18) fueron clasificados en 6 pulsotipos, con 2 pulsotipos principales (N y P) que agruparon un total de 10 aislados, mientras que 2 pulsotipos (M y O) presentaron un único perfil. El resto de aislados (6) fueron clasificados en 2 pulsotipos (Ñ y Q) tal y como se muestra en la **Figura 38**. Todos los aislados procedían del centro de producción 1.

Cabe destacar que ningún aislado de *E. faecium* procedía de leche o cuajada, y que gran parte de ellos fueron detectados en las etapas tardías del proceso de producción (queso 90, 120 y 180 días). Este hecho podría explicar la importancia de esta especie bacteriana en el proceso de maduración del centro de producción 1 y su implicación en las últimas etapas de maduración donde los productos adquieren gran parte de las características organolépticas debido a la actividad proteolítica y lipolítica de esta especie (Margalho et al., 2020).

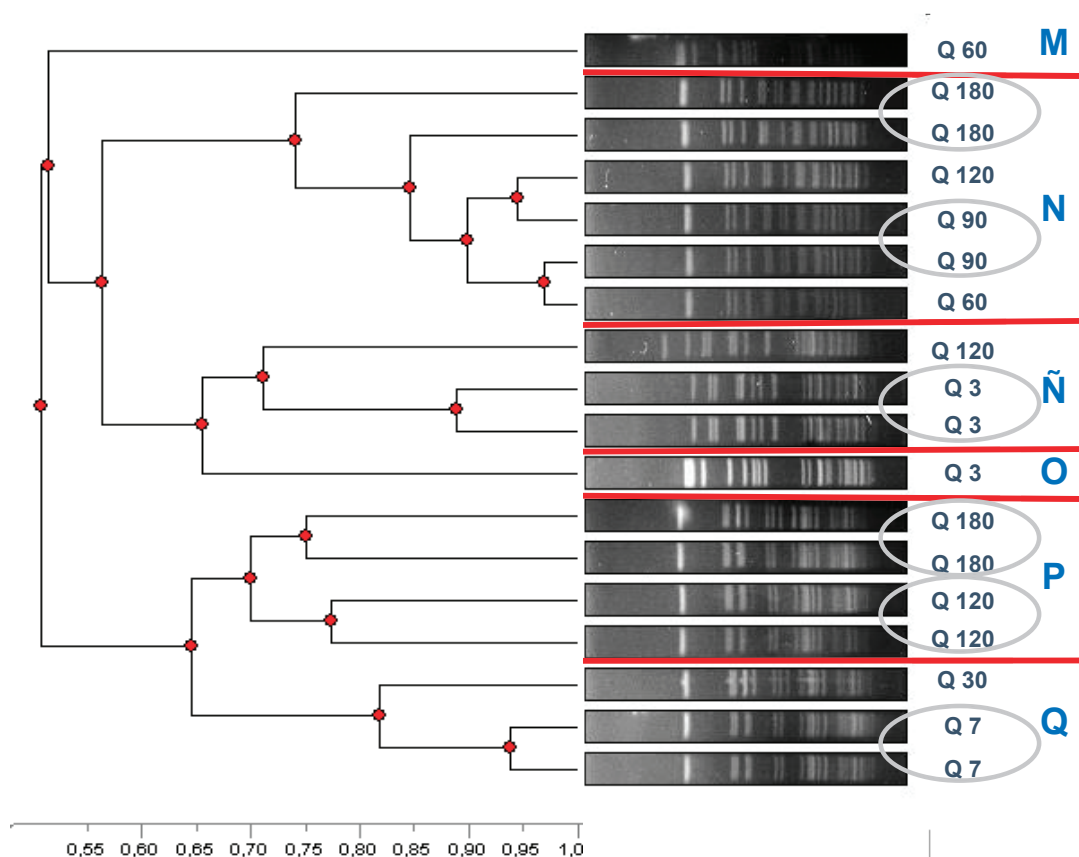


Figura 38. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA de los perfiles electroforéticos PFGE de *E. faecium* de origen lácteo.

Etapas del proceso: Q3 = queso de 3 días; Q7 = queso 7 días, Q30 = queso 30 días, Q60 = queso 60 días, Q90 = queso 90 días, Q120 = queso 120 días, Q180 = queso 180 días

Los resultados demostraron la existencia de una biota común de ambas queserías, la cual está presente en etapas muy diversas del proceso de elaboración del queso y por tanto confirma el importante papel que juegan los enterococos durante todo el proceso de elaboración del queso curado elaborado con leche cruda.

Asimismo, se observó la presencia de cepas bien adaptadas a cada una de las queserías como *E. faecium* aislado únicamente en centro de producción 1, donde esta especie está presente en casi todas las etapas del proceso de maduración. En el caso de *E. faecalis*, se observó la existencia de cepas comunes a ambos centros, así como cepas propias de cada quesería y cepas únicas de etapas concretas del proceso de fabricación del queso, lo que confirma ya no solo su importante actividad como BAL sino su capacidad para adaptarse a diferentes etapas y centros de producción.

3.2.3 Estudio comparativo de las técnicas RAPD PCR y PFGE para el seguimiento epidemiológico de RAM en *Enterococcus* spp. de origen lácteo

Tanto el método RAPD PCR como la PFGE son empleados para la tipificación de bacterias altamente relacionadas y permiten obtener información molecular sin requerir del conocimiento previo de la secuencia genómica.

Con el fin de valorar la utilidad de la técnica RAPD PCR para la diferenciación genética del G^o *Enterococcus*, se realizó un estudio comparativo de los resultados obtenidos para *E. faecalis* y *E. faecium* mediante RAPD PCR y PFGE, respectivamente. A partir de 51 aislados de enterococos, el análisis PFGE discriminó un total de 18 pulsotipos (12 de *E. faecalis* y 6 de *E. faecium*), mientras que el análisis RAPD PCR diferenció 35 genotipos (23 de *E. faecalis* y 12 de *E. faecium*).

En general ambas técnicas mostraron resultados concordantes entre los genotipos y pulsotipos diferenciados por RAPD PCR y PFGE, respectivamente.

La **Tabla 14** muestra la concordancia de la tipificación de *E. faecalis* mediante RAPD PCR (23 genotipos) y PFGE (12 pulsotipos), y la **Tabla 15** la concordancia para *E. faecium* analizados por RAPD PCR (12 genotipos) y PFGE (6 pulsotipos). Enmarcado en color naranja se indica el coeficiente de similitud entre genotipos diferenciados mediante RAPD PCR, los cuales fueron agrupados en el mismo pulsotipo por la técnica PFGE.

Tabla 14. Concordancia entre los pulsotipos PFGE y los genotipos RAPD PCR en los aislados de *E. faecalis* de origen lácteo.

		Genotipos RAPD PCR																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Pulsotipos PFGE	A															I								
	B											I	66,4	I									I	
	C			II	89,9	I																		
	D			I	I		77,9			II	I													
	E																							
	F																							
	G			I																				
	H		I	I		77,1	I		77,9	I														
	I														I	I								I
	J							II																
	K												II										I	
	L															I	78,0	I	I	II	I			

I: 1 aislado
II: 2 aislados

En *E. faecalis*, el método RAPD PCR diferenció patrones clonales genéticamente cercanos, con porcentajes de similitud superiores al 70 % en la mayoría de los casos, mientras que la PFGE los agrupaba en el mismo pulsotipo considerándolos estrechamente relacionados. La principal diferencia se observó en el pulsotipo I, ya que la RAPD PCR discriminó dos aislados como no relacionados (35,4 %) que fueron considerados genéticamente cercanos mediante PFGE.

Tabla 15. Concordancia entre los pulsotipos PFGE y los genotipos RAPD PCR en los aislados de *E. faecium* de origen lácteo.

		Genotipos RAPD PCR													
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
Pulsotipos PFGE	M													I	
	N			III	85,5	II				69,1		I			
	Ñ		I	75,9	I				72,9	I					
	O														I
	P		I												II
	Q														

En el caso de *E. faecium*, la concordancia entre los pulsotipos obtenidos mediante PFGE y los grupos genómicos mediante RAPD PCR fue similar. En todos los casos los genotipos diferenciados por RAPD

PCR que fueron clasificados en el mismo pulsotipo presentaron porcentajes de similitud superiores o muy próximos al 70 %.

En este trabajo, tanto el análisis RAPD PCR como PFGE ha verificado la existencia de cepas propias de un centro de producción, así como de cepas comunes en ambos centros. Además, ambas técnicas han permitido estudiar la dinámica poblacional y diferenciar los genotipos y/o pulsotipos y asociarlos a las etapas del proceso de fabricación del queso.

A excepción de escasas discrepancias, estos resultados sugieren que, aislados pertenecientes a grupos genómicos con una similitud superior al 70 % de acuerdo con el resultado de la técnica RAPD PCR, pueden agruparse en el mismo pulsotipo PFGE.

Diversos autores han descrito divergencias entre los resultados de ambas técnicas, asociándolo a la diferencia en las dianas moleculares en las que se basa cada. La técnica RAPD PCR genera un patrón a partir de la amplificación aleatoria de regiones no específicas teniendo en cuenta tanto el ADN cromosómico como el ADN plasmídico, mientras que la PFGE emplea la digestión enzimática del ADN cromosómico y su posterior separación en fragmentos de diferentes tamaños, obteniendo así un patrón específico de cepa (Barbier et al., 1996; Sanchez et al., 2004).

Como grandes inconvenientes de la PFGE están el tiempo necesario, su laboriosidad, y la necesidad de un equipo especial de electroforesis para el campo pulsado.

Por otra parte, es sabido que la técnica RAPD PCR presenta ciertas limitaciones como es la baja reproducibilidad, sin embargo, la selección y optimización de cebadores así como el estudio de reproducibilidad llevado a cabo en este trabajo, han permitido aumentar la eficiencia del método con coeficientes de similitud intraespecífica semejantes a los obtenidos en otros trabajos con objetivos similares (C. Andrighetto et al., 2001; Cosentino et al., 2004; Morandi et al., 2006; Psoni et al., 2006).

Esta técnica fue ensayada inicialmente por su rapidez, bajo coste y sencillez, como alternativa a la técnica PFGE recomendada como *gold standard* para la caracterización intraespecie de *E. faecalis* y *E. faecium*. La comparación de ambos métodos, principalmente en cuanto a su capacidad para diferenciar cepas y clones de *Enterococcus* spp, sugiere que la RAPD podría ser implementada para la caracterización de enterococos intralaboratorio, dado que bajo condiciones controladas y optimizadas demuestra niveles apropiados de polimorfismo y reproducibilidad, con la ventaja

añadida de tipificar aquellos aislados que nos son tipables mediante PFGE, así como la facilidad de ejecución en el laboratorio.

En general, ambas técnicas han mostrado resultados comparables, no obstante, los resultados no son del todo concluyentes y por tanto en este trabajo se optó por la técnica PFGE para el estudio de la relación filogenética entre los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* portadores de genes de resistencia antimicrobiana. La PFGE estandarizada ofrece la ventaja de que los perfiles electroforéticos generados son más sencillos de interpretar y pueden ser comparados interlaboratorio, lo cual es esencial para la investigación epidemiológica con el fin de identificar las fuentes de RAM.

3.2.4 Estudio de la relación clonal de *E. faecalis* y *E. faecium* de origen lácteo y su relación filogenética con aislamientos de otros orígenes por medio de la técnica MLST

La utilidad de la técnica *Multilocus Sequence Type* (MLST) es principalmente epidemiológica, ya que identifica variaciones que se acumulan lentamente en genes muy conservados dentro de la población bacteriana, con la ventaja que ofrece el almacenamiento y disponibilidad de las secuencias de los alelos de referencia y los tipos de secuencia para cada microorganismo, además de aportar información sobre los factores epidemiológicos, accesibles vía Internet.

Este método es muy útil para rastrear la propagación interhospitalaria de clones virulentos, epidémicos y multirresistentes en estudios epidemiológicos a nivel mundial, y sirve como herramienta para relacionar diferentes líneas clonales aisladas de distintos ambientes y trazar su dispersión global y evolución en el ambiente extrahospitalario.

La evaluación de la clonalidad es indispensable en la investigación de los fenómenos de diseminación de RAM con la finalidad de tomar medidas de control y prevención en los diferentes ámbitos que afectan a la salud pública.

En este trabajo, la técnica MLST ha sido utilizada con el objetivo de estudiar la evolución genética de clones de *E. faecalis* y *E. faecium* de origen lácteo y su relación filogenética con aislados de otros ambientes, humano, animal, ambiental o alimentario. Estos datos aportan información sobre la circulación de clones entre ambientes y la repercusión que puede tener para la salud pública la presencia de clones de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a antibióticos en alimentos listos para el consumo como el queso curado.

El análisis MLST se aplicó a una selección de cepas representativas de cada grupo filogenético determinado mediante el análisis de los pulsotipos obtenidos por PFGE. Una vez caracterizadas las cepas por MLST se agruparon en los complejos clonales (CC) para su estudio epidemiológico. A continuación, se muestran los resultados de clonalidad de 12 cepas de *E. faecalis* y 6 cepas de *E. faecium* de origen lácteo diferenciadas previamente por PFGE.

3.2.4.1 Relación filogenética de *E. faecalis* de origen lácteo con aislados de otras fuentes

El análisis MLST permitió asignar la secuencia tipo (ST) a las 12 cepas de *E. faecalis* seleccionadas por cada patrón de PFGE, mediante la comparación de las secuencias de 7 genes *housekeeping* con las depositadas en la base de datos pública (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis>). En la **Tabla 16** se muestran para cada pulsotipo, los perfiles alélicos de la secuenciación de los 7 genes *housekeeping*, las secuencias tipo resultantes y los complejos clonales detectados.

Tabla 16. Tipado molecular de *E. faecalis* de origen lácteo mediante MLST.

Pulsotipo	Genes <i>housekeeping</i>							ST	CC
	gdh	gyd	pstS	gki	aroE	xpt	yiqL		
B, I	3	7	23	1	9	16	7	55	55
C, J	2	7	11	11	3	4	2	25	25
A	12	7	3	17	6	2	5	538	2
D	1	7	11	11	3	4	2	283	25
E	5	1	1	3	7	7	6	16	16
F	3	6	23	12	9	10	7	40	40
G	2	7	11	1	3	16	2	133	25
H	2	1	23	11	3	2	2	206	23
K	1	2	12	8	1	16	1	1056*	19
L	3	7	23	1	9	6	7	1057*	55

*Secuencias tipo no descritas anteriormente y asignadas tras este estudio.

ST: Secuencia tipo; CC: Complejo clonal.

Los resultados obtenidos mostraron una amplia diversidad de STs en el entorno de producción de queso, identificándose un total de 10 STs entre las 12 cepas analizadas. De las 10 STs cabe destacar la identificación a nivel mundial de dos nuevas combinaciones alélicas que fueron depositadas y registradas en la base de datos con los números consecutivos, ST1056 y ST1057. El resto (ST25, ST55, ST538, ST283, ST16, ST40, ST133, ST206) fueron STs conocidas que habían sido descritas previamente según los datos contenidos en dicha base de datos.

Mediante el programa bioinformático *Phyloviz* 2.0 y el análisis por *eBURST* v3 se estudió la relación evolutiva y las variaciones genéticas entre las STs detectadas (**Figura 39**).

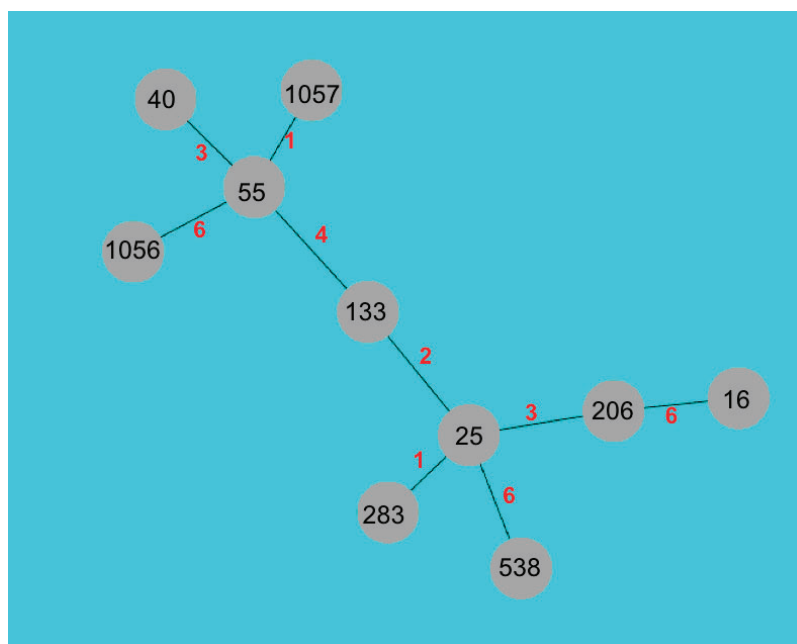


Figura 39. Análisis *eBURST* de las secuencias tipo detectadas en *E. faecalis* de origen lácteo (*Phyloviz 2.0*). Los números en rojo (distancia lineal) reflejan el número de alelos diferentes del esquema de MLST.

Los resultados mostraron cierta diversidad entre los perfiles alélicos, sugiriendo que la población de *E. faecalis* estudiada no es clonal en su conjunto. Se observó una conexión entre las secuencias ST283 y ST25, así como entre la ST55 y la nueva ST1057, ya que varían en sólo 1 alelo (*Single Locus Variant*; SLV). Por otra parte, la ST25 y la ST133 resultaron ser DLV (*Double-Locus Variants*; DLV). La nueva ST1056 junto con la ST16, ST206, ST40 y ST538 presentaron variaciones de tres o más alelos con el resto de STs.

Cabe destacar que la ST1056 no tiene ninguna relación genética con la ST1057 y apenas coincide a nivel de loci con otras STs detectadas en este trabajo. Por ello, podría tratarse de una ST especialmente adaptada al ambiente de la producción de queso artesano, ya que según el análisis PFGE, esta cepa se ha detectado en ambos centros de producción.

Con el fin de conocer la circulación y dispersión de las STs de *E. faecalis* identificadas en este trabajo se analizó la información epidemiológica disponible en la base de datos pública de secuencias tipo, la cual se resume en el **Cuadro 13**.

Cuadro 13. Información epidemiológica de los clones descritos para cada una de las secuencias tipo de *E. faecalis* identificadas en este trabajo.

CC	ST	Nº aislados en base de datos*	Fuente	Area geográfica	Año
25	25	19	-Pacientes hospitalizados -Personas hospitalizadas -Alimentos -Medio ambiente -Ganadería	no -Europa (España, Polonia, Reino Unido, Francia y Bélgica) -Rusia	1950-2020
	133	12	-Pacientes hospitalizados	-Europa (Polonia, Francia, Bélgica) -Rusia	2002-2020
	283	6	-Alimentos	-Europa (Francia, Polonia)	2005-2009
55	55	20	-Pacientes hospitalizados -Personas hospitalizadas -Alimentos -Medio ambiente -Ganadería	no -Europa (España, Polonia, Francia, Portugal, Bélgica, Noruega, Países Bajos) -América (Estados Unidos)	1993-2020
40	40	67	-Pacientes hospitalizados -Personas hospitalizadas -Alimentos -Medio ambiente -Ganadería -Animal hospitalizado	no -Europa (España, Holanda, Dinamarca, Polonia, Islandia, Grecia, Francia, Suiza, Países Bajos, Suecia, Noruega, Bélgica) -América (Estados Unidos, Cuba, Brasil) -África (Nigeria) -Rusia	1946-2021
16	16	70	-Pacientes hospitalizados -Personas hospitalizadas -Medio ambiente -Ganadería -Animal de compañía	no -Europa (España, Países Bajos, Hungría, Dinamarca, Polonia, Noruega, Francia, Bélgica) -África (Nigeria) -Asia (Japón) -América (Brasil, Cuba) -Rusia	1998-2020
23	206	3	-Pacientes hospitalizados -Personas hospitalizadas -Alimentos	no -Europa (Alemania, Francia, Polonia)	2000-2009
2	538	1	-Paciente hospitalizado	-Europa (España)	2014

ST: Secuencia Tipo; CC: Complejo Clonal; * Base de datos pública
<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis>

En *E. faecalis* de origen lácteo, la ST25 y ST55 fueron las más frecuentes ya que cada una de ellas agrupó a dos pulsotipos o cepas, mientras que el resto de STs estuvieron representadas por un solo pulsotipo.

Tal y como muestra la base de datos MLST, **la ST25 y ST55** incluyen aislados, en su mayoría, procedentes de muestras clínicas humanas de diferentes países de Europa, Rusia o EE. UU. entre los años 1992 y 2009. En menor medida también se han aislado en el medio ambiente y en alimentos de origen animal, especialmente queso elaborado en Francia y Portugal en los años 2005 y 2009. Estos resultados demuestran la capacidad de diseminación y adaptación de estos dos clones a diferentes ambientes, ya no solo por ser las STs más frecuentes en el proceso de elaboración del queso analizado, y su extendida presencia en diferentes etapas del proceso de maduración en ambas queserías, sino también por su frecuencia de aislamiento en otros ambientes y otras partes del mundo.

El **pulsotipo F** presentó la combinación alélica correspondiente a la **ST40** que también está ampliamente distribuida en diferentes tipos de muestras en diversas zonas del mundo (Europa, América Latina, EE. UU. y Rusia); aunque destaca principalmente en muestras clínicas de pacientes hospitalizados, también se ha identificado en heces de animales de producción, como cerdos en Dinamarca (2001) y Nigeria (2008), en alimentos de origen animal en Polonia (alimento desconocido), Islandia (pescado) y Francia (queso).

El **pulsotipo E** se asoció a la **ST16**, este clon ha sido descrito en su mayoría en aislados de pacientes hospitalizados de diferentes partes del mundo (Japón, Rusia, España, Francia, Polonia, Brasil, Cuba, Hungría y Nigeria) entre los años 1998 y 2016. También se ha identificado en otros ambientes como heces de cerdos en Dinamarca, ganado vacuno en España, aves y animales domésticos (origen desconocido). Igualmente se ha descrito en muestras clínicas de perros en Holanda. A la vista de los resultados, este clon se encuentra ampliamente diseminado y bien adaptado al ambiente hospitalario y tracto intestinal de animales. Hasta la fecha no consta en la base de datos MLST consultada su relación con los alimentos, si bien, recientemente diversos autores lo han identificado en aislados de carne y leche en África y Asia (Elghaieb et al., 2019; Kim et al., 2021).

Hay que destacar que la **ST40** y la **ST16** se consideran dos de los siete clones de *E. faecalis* más prevalentes en aislados clínicos asociados a brotes hospitalarios siendo la ST16 uno de los clones

más descritos a nivel mundial en aislados clínicos multirresistentes (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2013; Rao et al., 2020; Ruiz-Garbajosa et al., 2006; Saavedra et al., 2020).

El **pulsotipo G** se asoció a la **ST133**, la cual ha sido identificada en 10 aislamientos procedentes de diversas fuentes tales como pacientes hospitalizados en Polonia (2002), Francia (2009) y Rusia (2017), medio ambiente en Polonia (2009) y en 2 aislados de alimentos de origen animal en Polonia y Francia, siendo este último identificado en muestras de queso. A pesar de que la ST133 no se encuentra muy diseminada, se puede destacar su capacidad de adaptación a diferentes ambientes entre los que se encuentra el ambiente quesero.

La **ST283**, asociada al **pulsotipo D**, ha sido anteriormente descrita en 6 aislados, 4 de ellos procedentes de muestras ambientales analizadas en Polonia (2009) y 2 de queso en Francia (2015). Estos resultados demuestran que se trata de un clon adaptado a ambientes no clínicos.

El **pulsotipo H** correspondió con la **ST206**, la cual ha sido descrita únicamente en 3 aislados, dos de ellos en orina y heces de pacientes de Alemania (2000) y Francia (2003), respectivamente, y el tercero en Polonia (2003) a partir de alimento de origen animal.

Por último, la **ST538** asociada al **pulsotipo A**, ha sido descrita únicamente en heces de un paciente hospitalizado en Madrid (2014).

Con la información disponible podríamos concluir que estos dos últimos clones (**ST206 y ST538**) están poco diseminados, sin embargo, es importante destacar su identificación tanto en ambiente hospitalario como en la cadena alimentaria.

En relación a las ST nuevas (**ST1056 y ST1057**), se analizó la relación de *Single Locus Variant* (SLV) y *Double Locus Variant* (DLV) entre ellas y las depositadas en la base de datos (**Cuadro 14 y Cuadro 15**).

Cuadro 14. Información epidemiológica de las *Single* y *Double Locus Variant* de la secuencia tipo 1056.

Relación	Secuencia Tipo	Nº aislados en base de datos*	Fuente	Area geográfica	Año		
SLV	19	20	-Alimentos	-Europa (Polonia, Francia, Países Bajos, Reino Unido)	1947-2012		
			-Pacientes hospitalizados				
			-Medio ambiente				
			-Persona hospitalizada	no			
			-Animal hospitalizado	-América (Estados Unidos)			
	120	1	-Paciente hospitalizado	-Europa (Polonia)	1996		
DLV	20	1	-Animal hospitalizado	-Europa (Holanda)	1994		
			339	1	-Animal salvaje	-Europa (España)	2006
					1117	2	-Pacientes hospitalizados

*Base de datos pública (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis>); SLV: *Single Locus Variant*; DLV: *Double locus Variant*

La **ST1056** presentó relación de SLV con la ST19 y la ST120, las cuales se asocian principalmente a muestras de pacientes hospitalizados en Europa y EE. UU., alimentos de origen animal en Francia y muestras de medio ambiente en Polonia. Además, presentó relación de DLV con la ST20, ST339 y ST1117, identificadas en diferentes fuentes en Europa.

Cuadro 15. Información epidemiológica de las *Single* y *Double Locus Variant* de la secuencia tipo 1057.

Relación	Secuencia Tipo	Nº aislados en base de datos*	Fuente	Area geográfica	Año
SLV	218	1	-Paciente hospitalizado	-Europa (Polonia)	2007
	55	20	Información Cuadro 13		
DLV	285	1	-Alimento	-Europa (Francia)	2005
	434	1	-Persona no hospitalizada	-Europa (Francia)	1997
	511	1	-Persona no hospitalizada	-Europa (España)	2009
	276	1	-Paciente hospitalizado	-Europa (Francia)	no disponible
	510	1	-Persona no hospitalizada	-Europa (España)	2009
	456	1	-Alimento	-África (Túnez)	2011
	431	1	-Persona no hospitalizada	-Europa (Francia)	1997

*Base de datos pública (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis>); SLV: *Single Locus Variant*; DLV: *Double locus Variant*

La ST1057 coincide en 6 loci con dos secuencias tipo depositadas en la base de datos (ST218 y ST55). La **ST218** ha sido descrita en heces de un paciente hospitalizado en Polonia (2007), y como se ha mencionado anteriormente, la ST55 que ha sido aislada de queso en este trabajo, se relaciona con ambientes diversos (hospitalario, comunitario, ambiental, animal y alimentario). Siete STs presentaron relación de DLV, gran parte de ellas aisladas en personas hospitalizadas y alimentos, y en su mayoría asociadas a países europeos.

Las STs identificadas se agruparon en complejos clonales mediante el análisis *eBURST* considerando CC aquellos grupos de STs que comparten al menos 5 alelos (Feil et al., 2004). De esta manera las STs detectadas se agruparon en 7 complejos clonales: CC2 (ST538), CC16 (ST16), CC19 (ST1056), CC23 (ST206), CC25 (ST25, ST133 y ST283), CC40 (ST40) y CC55 (ST55 y ST1057), confirmando la relación evolutiva entre la ST25, ST283 y ST133 y entre ST55 y ST1057 (**Figura 40**).

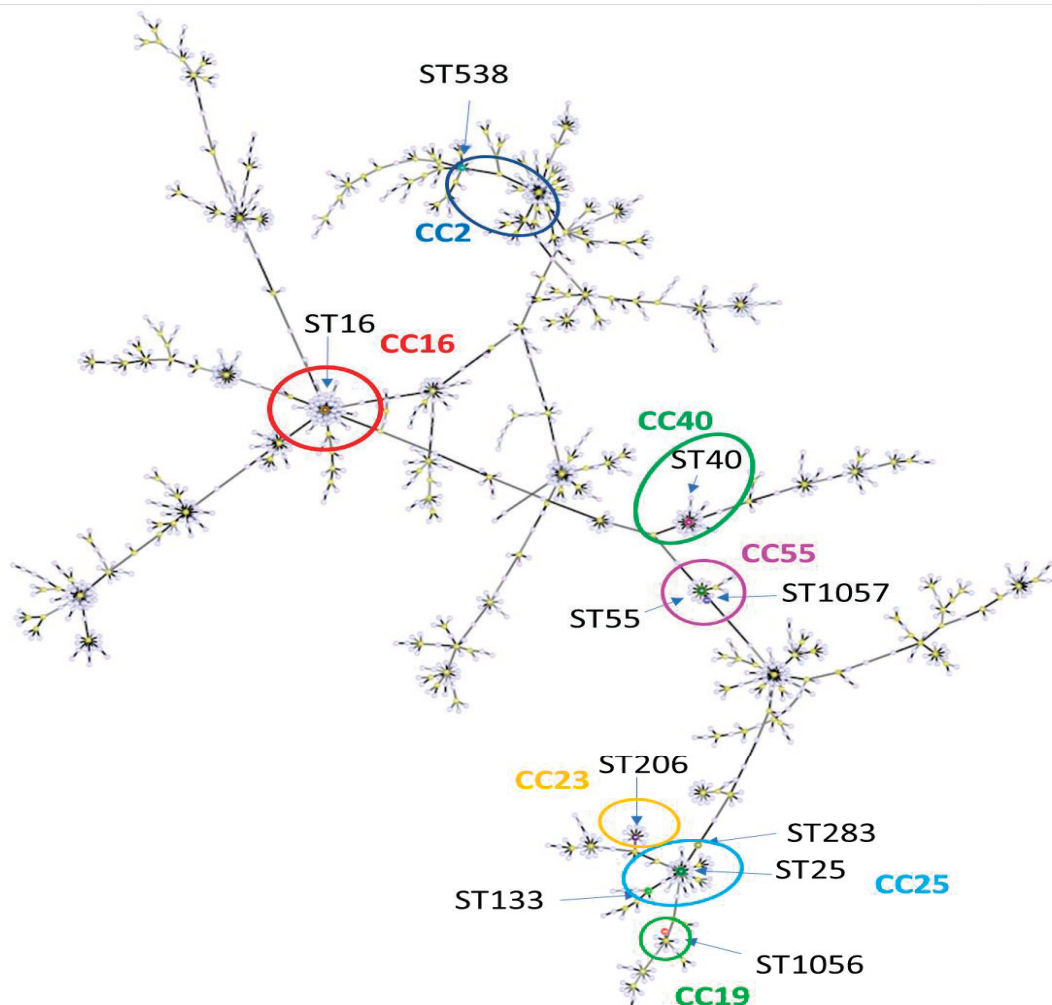


Figura 40. Distribución de los complejos clonales (CC) y las secuencias tipo (ST) en la especie *E. faecalis*.

ST: Secuencia Tipo; CC: Complejo Clonal

Tres STs identificadas en este trabajo pertenecen a complejos clonales relevantes en salud humana: ST538 (CC2), ST16 (CC16) y ST40 (CC40). Los **CC2**, **CC16** y **CC40** son tres de los principales complejos clonales de alto riesgo que agrupan la mayor parte de *E. faecalis* resistentes a vancomicina y causantes de brotes hospitalarios a nivel mundial (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2013; Rao et al., 2020).

Cabe resaltar que la ST538 se asoció con el **CC2**, siendo DLV de la ST6 fundadora de este complejo clonal (Kim et al., 2018). En España, la ST6 es una de las líneas genéticas mejor adaptadas al

ambiente hospitalario, cepas de este linaje han sido identificadas también en cerdo y rata salvaje, demostrando su distribución en entornos variados (Alonso et al., 2017).

La ST16 y ST40 constituyen la secuencia fundadora del CC16 y CC40, respectivamente. Estos complejos clonales se han aislado de infecciones clínicas, muestras intestinales de pacientes hospitalizados, personas sanas y animales en muchas regiones de Europa y Asia, considerándose las líneas genéticas más prevalentes relacionadas con infecciones asociadas a la atención médica en todo el mundo y se caracterizan por desempeñar un papel importante en la propagación de RAM en el ambiente hospitalario (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2013; Dai et al., 2018; Rao et al., 2020).

El resto de STs se agruparon en los complejos clonales de *E. faecalis* **CC19, CC25, CC55 y CC23**, los cuales se encuentran diseminados en diversos ambientes (animal, pacientes hospitalizados, personas sanas), lo que demuestra que no existe el fenómeno de especiación para esta especie bacteriana, es decir, aislamientos de diversos orígenes se agrupan en la misma ST y CC. El CC19 donde se clasifica la nueva ST1056, está formado por 6 STs distribuidas en Europa y Asia y relacionadas en su mayoría con pacientes hospitalizados, animales de producción y animales de vida salvaje. Investigadores como Elghaieb et al. (2019), Jamet et al. (2012) y Kim et al. (2021) señalan la importancia de una diseminación entre el animal y el hombre a través de la cadena alimentaria, como sucede con el CC25 y CC55 que predominan en aislados humanos y han sido las predominantes en el proceso de elaboración de queso de leche cruda de oveja curado.

Estos resultados ponen de manifiesto la circulación de clones de *E. faecalis* de interés sanitario en el entorno de elaboración de queso de leche cruda y el potencial de los alimentos en la diseminación de *E. faecalis* a otros entornos, incluido el ambiente hospitalario, hecho altamente preocupante si tenemos en cuenta que se han identificado líneas genéticas potencialmente patógenas y multirresistentes como la **CC2** (ST538), **CC16** (ST16) y **CC40** (ST40).

3.2.4.2 Relación filogenética de *E. faecium* de origen lácteo con aislados de otras fuentes

A partir de las variantes alélicas obtenidas del análisis MLST de 6 cepas de *E. faecium* caracterizadas por PFGE, se detectaron un total de 5 STs, dos de las cuales fueron nuevas combinaciones alélicas que fueron depositadas y registradas como ST1853 y ST1854. Las tres restantes (ST47, ST286, ST1491) ya habían sido descritas en la base de datos pública (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium>).

En la **Tabla 17** se muestran, para cada pulsotipo, las secuencias tipo obtenidas a partir de las variantes alélicas resultantes de la secuenciación de los 7 genes *housekeeping* y los complejos clonales identificados y en el **Cuadro 16** se resume la información epidemiológica de la STs identificadas en este estudio.

Tabla 17. Tipado molecular de *E. faecium* de origen lácteo por MLST.

Pulsotipo	Gen <i>housekeeping</i>							ST	CC
	<i>atp A</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>pur K</i>	<i>gyd</i>	<i>pst S</i>	<i>adk</i>		
M	9	2	1	11	1	14	5	47	-**
N	110	2	1	11	2	14	5	1491	-**
Ñ	40	4	12	9	1	1	5	286	-**
O	9	2	1	11	1	14	5	47	-**
P	35	4	1	9	2	20	5	1853*	-**
Q	35	4	92	9	2	20	5	1854*	-**

ST: Secuencia tipo; CC: Complejo clonal

*Secuencias tipo no descritas anteriormente y asignadas tras este estudio.

** Singleton: Secuencia tipo que no puede asignarse a ningún complejo clonal.

Cuadro 16. Información epidemiológica de las secuencias tipo de *E. faecium* identificadas en este trabajo.

ST	Nº aislados depositados	Fuente	Area geográfica	Año
47	1	-Persona no hospitalizada	-Europa (Países bajos)	1998
1491	1	-Alimento	-Europa (Italia)	2018
286	2	-Paciente hospitalizado	-Europa (Italia)	2005

ST: Secuencia tipo

La secuencia tipo más frecuente entre los pulsotipos identificados fue la **ST47**, que agrupó a los **pulsotipo M** y **O**. Esta secuencia tipo ha sido únicamente descrita en un aislado de muestras de heces de un paciente no hospitalizado en Holanda (1998).

Por otra parte, la **ST1491 (pulsotipo N)** ha sido descrita en queso siciliano elaborado en Italia (2018). El **pulsotipo Ñ** presentó una combinación alélica correspondiente con la **ST286**, la cual ha sido descrita en bilis de un paciente hospitalizado de Italia (2005) y en un aislado registrado en la base de datos en 2015 de origen desconocido.

Los **pulsotipos P** y **Q** mostraron una combinación de loci nueva que no correspondió con ninguna secuencia tipo depositada en la base de datos. Las secuencias tipo conocidas más relacionadas coincidían en 5 loci y 4 loci, asociadas a heces de pacientes no hospitalizados y heces de animales (cerdos), respectivamente, analizadas en diferentes partes del mundo y en distintos años. Sería necesario disponer de más información de la estructura dinámica de *Enterococcus* spp. de origen lácteo a nivel mundial para concluir sobre el posible origen autóctono y diseminación regional de las STs nuevas detectadas en este estudio.

Al contrario de lo observado en *E. faecalis*, los resultados obtenidos corroboran lo observado por Freitas et al., (2019), el cual describe el fenómeno de especificidad de origen, donde aislamientos de *E. faecium* procedentes de determinados orígenes epidemiológicos se agrupan en líneas genéticas concretas. La estructura poblacional de *E. faecium* se divide en dos clados distintos, el clado A asociado a aislados de origen hospitalario y el clado B asociado al ambiente comunitario. Los aislados pertenecientes al clado A se diferencian del clado B por presentar con frecuencia resistencia a altos niveles de aminoglucósidos, ampicilina y vancomicina además de factores de virulencia y elementos genéticos, consecuencia de la adaptación al ambiente hospitalario (Belloso Daza et al., 2021).

En la **Figura 41** se muestran las variaciones genéticas y la posible relación evolutiva entre los STs detectados empleando el programa bioinformático *Phyloviz* 2.0 y el análisis por *eBURST* v3.

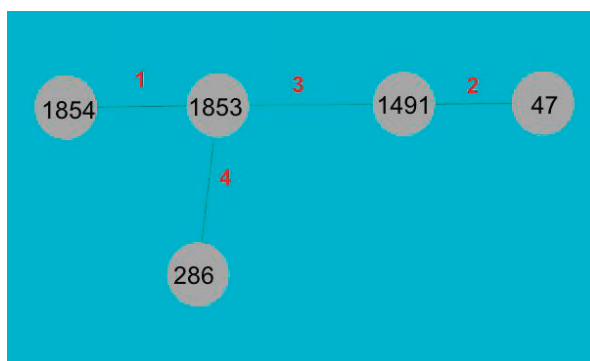


Figura 41. Análisis *eBURST* de las secuencias tipo detectadas en *E. faecium* de origen lácteo (*Phyloviz* 2.0). Los números en rojo (distancia lineal) reflejan el número de alelos diferentes entre los 7 alelos del esquema de MLST.

Tal y como se ha observado para la especie *E. faecalis*, las STs obtenidas para *E. faecium* presentaron diversidad en los perfiles alélicos, a excepción de las nuevas secuencias tipo descritas **ST1853** y **ST1854** que varían entre sí en 1 alelo, considerándose SLV. La ST1491 y ST47 presentaron una relación DLV y el resto variaciones entre sí de tres o más alelos, lo que sugiere que no hay una elevada relación genética entre las cepas aisladas de origen lácteo.

En la **Figura 42** se puede observar la relación de las STs identificadas con las STs representativas de los CCs descritas en la base de datos.

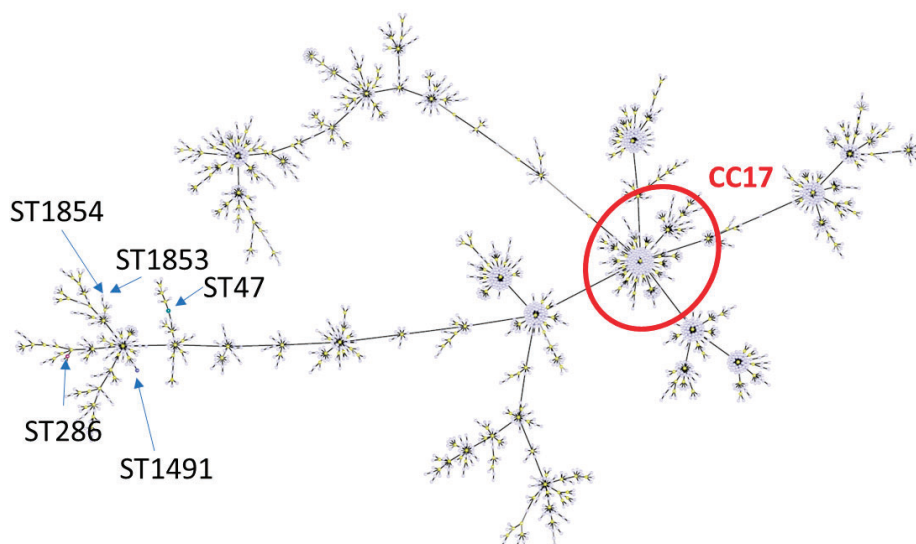


Figura 42. Distribución de las secuencias tipo en la especie *E. faecium*.

ST: Secuencia Tipo; CC: Complejo Clonal

Todas las STs fueron agrupadas como *singleton* tal y como describe Ruiz-Garbajosa et al. (2006); no obstante, algunas de las STs detectadas presentaron analogía genética con otras STs aisladas de animales, pacientes hospitalizados y personas sanas, si bien no forman parte de los principales complejos clonales asociados a brotes hospitalarios como el CC17, el más frecuente en ambiente hospitalario a nivel mundial (**Figura 42**) (Alonso et al., 2017; Rios et al., 2020; Torres et al., 2009; Zhou et al., 2020). La secuenciación de los genomas de cepas pertenecientes a esta línea genética se asocia con perfiles de multirresistencia antibiótica y presencia de islas de patogenicidad que codifican nuevas rutas metabólicas, pudiendo clasificarse en el clado A. La prevalencia de clones pertenecientes a este complejo en cepas que colonizan a individuos sanos de la comunidad y animales es baja; sin embargo, no se descarta que los alimentos puedan actuar como ruta de diseminación de *E. faecium* CC17 (Lee et al., 2019).

Es importante destacar en este trabajo el hallazgo de las secuencias tipo **ST47** y **ST286** en muestras de alimentos, lo que muestra un salto de nicho interesante; si bien, el perfil alélico obtenido en los aislados de *E. faecium* sugiere que podrían formar parte del clado B.

Estos resultados demuestran una vez más que los alimentos pueden ser un vehículo de transmisión zoonótica de bacterias clínicamente relevantes. Si bien *E. faecalis* es el principal responsable de las infecciones enterocócicas, *E. faecium* presenta mayores tasas de resistencia adquirida a los antimicrobianos en el ambiente hospitalario, hecho altamente preocupante por la posible diseminación y transferencia de genes de resistencia antimicrobiana a otras cepas (Russo et al., 2018).

La técnica MLST ha permitido conocer la estructura poblacional de *E. faecalis* y *E. faecium* en el proceso de elaboración de queso artesano, así como estudiar la relación filogenética con aislados de otras partes del mundo. Estos resultados aportan información básica en la vigilancia de la aparición y circulación de líneas genéticas potencialmente patógenos y multirresistentes en la cadena alimentaria; sin embargo, la falta de información sobre la estructura poblacional de estas especies en alimentos hace difícil concluir sobre la diseminación de cepas entre ambientes humano, animal, ambiental o alimentario. Es necesario la incorporación de información de la estructura poblacional de entornos no hospitalarios con el objetivo de enriquecer la base de datos MLST y

comprender con mayor certeza la relación filogenética y el posible origen y circulación de clones de alto riesgo dentro del contexto *Una Sola Salud*.

3.2.5 Evaluación del impacto para la salud pública de la RAM en enterococos de origen lácteo

En determinadas circunstancias pueden emerger clones que, debido a una ventaja selectiva producida por la utilización de antibióticos, evolucionan de manera independiente en cada ambiente. Estos genotipos resistentes predominan sobre el resto creando una falsa apariencia de clonalidad, no obstante, su persistencia aumenta la posibilidad de transmisión de RAM a otros clones y facilita la dispersión de ésta a otros ambientes.

Una vez estudiada la relación genética entre los aislados y conocido el perfil de RAM de cada uno de ellos se analizó la distribución de los perfiles genotípicos de RAM en el ambiente de producción de queso, se estudió el grado de clonalidad en base al perfil genotípico de RAM y se evaluó la posible repercusión que tiene para la salud pública la presencia de clones resistentes en el queso curado.

3.2.5.1 Evaluación del entorno de producción quesera como fuente de RAM

En este apartado, se analiza la carga genética de RAM en base al número de aislados con determinantes de RAM en el entorno de producción de queso curado elaborado con leche cruda de oveja en dos centros de producción distintos ubicados en la provincia de Teruel.

En la **Figura 43** aparecen representados gráficamente el número de aislados portadores de determinantes genéticos de RAM identificados en muestras de cada una de las etapas del proceso de elaboración del queso, analizando conjuntamente los dos centros de producción.

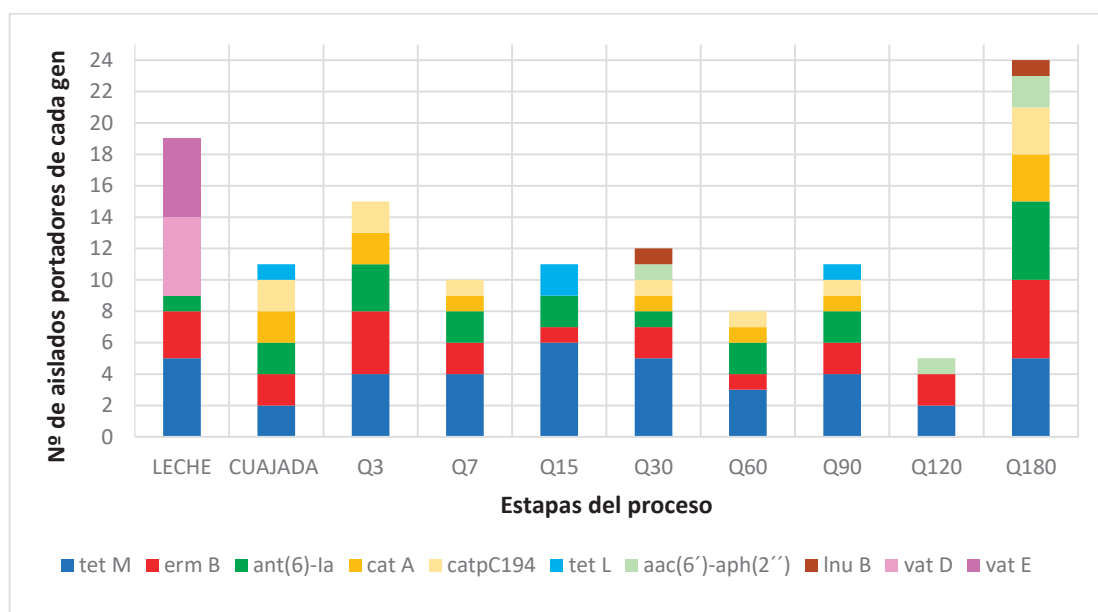


Figura 43. Distribución de los genes de RAM en las distintas etapas del proceso de maduración en ambos centros de producción.

En todas las muestras del proceso de elaboración de queso curado se identificaron genes de resistencia a antibióticos, no obstante, la leche y el queso de 180 días fueron las muestras que presentaron mayor carga genética de RAM, si bien el queso de 180 días mostró mayor diversidad de genes en comparación con la leche.

En general no se observó una tendencia clara en la distribución de los genes de RAM detectados, debido principalmente a que éstos estuvieron asociados a la especie *E. faecalis* presente durante todo el proceso de elaboración de queso curado en ambos centros.

La baja carga genética de RAM observada en puntos concretos del proceso de elaboración (120 días) se explica por el predominio de *E. faecium* y *E. durans*, especies que no presentaron ninguno de los determinantes genéticos de RAM analizados.

Los determinantes de resistencia más prevalentes fueron **tet M** y **erm B**, los cuales se detectaron en todas las muestras del proceso de elaboración, coincidiendo con lo mostrado por Jamet et al. (2012) los cuales describen la presencia generalizada de ambos genes en el ambiente quesero.

Por el contrario, los genes **vat D** y **vat E**, fueron detectados únicamente en la leche, asociados a las especies *E. hirae* y *E. casseliflavus*, las cuales predominaron en las etapas tempranas de la maduración.

En la **Figura 44** aparece reflejada gráficamente la distribución de los determinantes de RAM en cada centro de producción. Tal y como se ha observado en el análisis global, la distribución ha estado principalmente asociada al dinamismo de las diferentes especies de enterococos a lo largo del proceso de elaboración, si bien ambos centros presentan una diversidad genética de RAM muy similar.

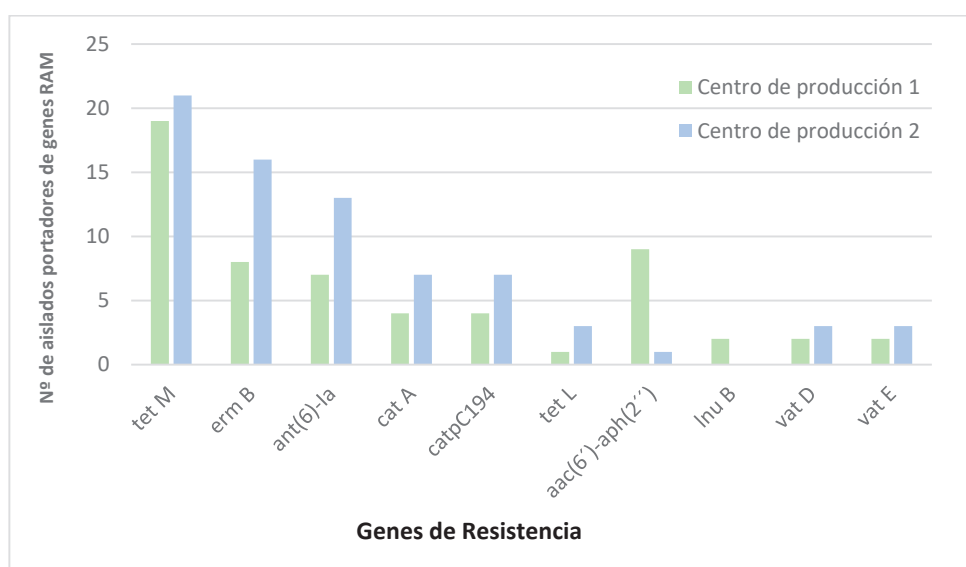


Figura 44. Distribución de los genes de RAM en las distintas etapas del proceso de maduración en los centros de producción 1 y 2.

El centro de producción 1 ha presentado menor número de aislados portadores de genes RAM, debido principalmente al predominio de la especie *E. faecium* en este centro. Los genes **vat D** y **vat E** se han identificado en proporciones similares en los dos centros demostrando la diseminación del mismo material genético en ambos, pero asociados a distintas especies de enterococos (*E. hirae* en Centro 1 y *E. casseliflavus* en centro 2).

Los determinantes genéticos asociados principalmente a la especie *E. faecalis* (**tet M**, **tet L**, **erm B**, **ant(6')-Ia**, **aac(6')-Ie-aph(2'')**-Ia, **cat A**, **cat_{pC194}**, **vat D**, **vat E** y **Inu B**), también estuvieron presentes en ambos centros de producción, a excepción del gen *Inu B*, el cual fue detectado únicamente en el

centro de producción 1. Esto podría demostrar la existencia de microbiota específica portadora de distintas plataformas genéticas en este centro, consecuencia del intercambio de material genético entre microorganismos, así como de la diseminación de aislados resistentes en el ambiente de producción.

La presencia de genes de RAM tanto en la leche como en el producto final en ambos centros de producción pone de manifiesto la existencia de una población enterocócica resistente en el entorno de producción de queso curado. La última etapa de la maduración ha presentado una mayor carga genética de RAM, indicando que el queso curado es una vía potencial de transmisión de RAM de importancia para la salud pública. Este hecho puede plantear un problema sanitario ya que, a través de la ingesta de queso curado elaborado con leche cruda, la microbiota intestinal se expone a la presencia de microorganismos resistentes y su consecuente diseminación ambiental a través de las aguas residuales.

3.2.5.2 Relación clonal de cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* y *E. faecium* de origen lácteo y su impacto para la salud pública

E. faecalis y *E. faecium* son dos especies bacterianas reconocidas como patógenos humanos desde hace varias décadas siendo en la actualidad dos de los principales microorganismos asociados a infecciones nosocomiales a nivel mundial (Dapkevicius et al., 2021). El estudio epidemiológico de la resistencia antimicrobiana en estas especies es fundamental para contener su diseminación entre ambientes diferentes.

En este apartado se ha estudiado la relación de las STs con los perfiles genotípicos de RAM en los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*. La **Tabla 18** muestra el patrón de resistencia genotípico, denominado resistotipo, asociado a las STs y CCs de *E. faecalis* en función de la etapa del proceso de elaboración de queso y el centro de producción.

Tabla 18. Perfil genotípico de resistencia antimicrobiana de los clones detectados de *E. faecalis* de origen lácteo.

CC	ST	Pulsotipo	Origen		Resistotipo							
			Etapa*	Centro	tet M	erm B	ant(6)-Ia	cat A	cat _{pC194}	tet L	aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia	Inu B
55		B	cuajada	1	■	■	■	■	■	■	■	■
			cuajada	2								
			Q3	1								
55		I	Q90	2	■	■	■	■	■	■	■	■
			Q180									
			Q180									
1057		L	Q60	1	■	■	■	■	■	■	■	■
			leche	2								
			Q3									
			Q7									
			Q60									
25		C	Q90	2	■	■	■	■	■	■	■	■
			Q120									
			Q120									
			Q3									
25		J	Q7	2	■	■	■	■	■	■	■	■
			Q180	2								
			Q3	2								
283		D	Q15	1	■	■	■	■	■	■	■	■
			Q30									
			Q120									
			Q180									
23	206	H	Q15	1	■	■	■	■	■	■	■	■
			Q30									
			Q90									
19	1056	K	Q15	2	■	■	■	■	■	■	■	■
			Q15									
16	16	E	Q30	1	■	■	■	■	■	■	■	■
			Q180									
40	40	F	Q7	1	■	■	■	■	■	■	■	■
2	538	A	Leche	2	■	■	■	■	■	■	■	■

*Etapa del proceso: Q3 = queso de 3 días; Q7 = queso 7 días, Q30 = queso 30 días, Q60 = queso 60 días, Q90 = queso 90 días, Q120 = queso 120 días, Q180 = queso 180 días.

Al analizar la relación entre el perfil genotípico de RAM de *E. faecalis* y los STs y CCs identificados, se observaron, en general, clones circulantes con mismo perfil de RAM. No obstante, en algunas STs se detectaron varios perfiles de RAM, no siempre asociados al mismo centro de producción, demostrándose tanto similitud como variación intercentro e intracentro entre los resistotipos.

Los pulsotipos **C, E, H, K y J** se correspondieron con un patrón de resistencia característico asociado al mismo centro de producción; lo que demuestra que se trata de clones estables adaptados a un ambiente que persisten en etapas sucesivas del proceso de elaboración en cada uno de los centros. De forma opuesta, algunos pulsotipos (**B, D, I, y L**) mostraron variabilidad en el patrón genético de RAM, observándose clones idénticos que difieren en el resistotipo. Estas variaciones probablemente sean debidas al intercambio genético a través de elementos genéticos móviles como plásmidos y trasposones, hecho bastante probable si tenemos en cuenta que todos los genes detectados en este trabajo fueron identificados en ADN de origen plasmídico. Cada clon puede diseminarse en el ambiente y evolucionar de forma independiente, sin embargo, las técnicas moleculares que analizan el ADN total no siempre son capaces de detectar esta nueva incorporación de material genético de tal manera que clones pertenecientes al mismo pulsotipo PFGE pueden mostrar distinto patrón de RAM (Bang et al., 2017; Jamet et al., 2012; Quiñones et al., 2009; Stępień-Pyśniak et al., 2021).

En general no se observó una relación clara en el patrón de RAM asociado a cada centro de producción. Ejemplo de ello fueron los pulsotipos **E, F y H** identificados únicamente en el centro de producción 1 y los pulsotipos **A, I, C, J, K y G** exclusivos del centro 2. Los resistotipos mostrados por estos pulsotipos específicos de cada centro fueron muy variados entre sí lo que podría indicar que existe un intercambio de genes de RAM incluso a nivel intracepa. De igual manera, se identificaron 3 pulsotipos comunes de ambos centros (**B, D y L**) que presentaron variabilidad en los patrones RAM, observándose perfiles diferentes entre clones procedentes del mismo centro.

Por otro lado, también se observaron clones con idéntico patrón genotípico procedentes de distintos centros, hecho que confirma la circulación de clones de *E. faecalis* entre ambos centros. Esta diseminación puede deberse al movimiento de animales y personas, así como a la contaminación a través de aguas residuales o el propio ambiente. Este fenómeno se ha descrito en el entorno hospitalario donde se ha demostrado la diseminación de clones entre diferentes hospitales debido a la capacidad de los enterococos de sobrevivir en distintas superficies, incluyendo personal sanitario, pacientes o superficies inanimadas (Alonso et al., 2017; Liese et al., 2019; Saito et al., 2021).

Estos resultados confirman la existencia de una movilización de genes de RAM en el proceso de elaboración de queso curado en la provincia de Teruel condicionado por la diseminación de clones de *E. faecalis* con resistotipos variados.

De interés para la salud pública destaca el hecho de que las cepas pertenecientes a la **ST16** presentaron la mayor diversidad de genes RAM (7 genes) en *E. faecalis* de origen lácteo, al igual que el estudio realizado por Elghaieb et al. (2019) que identificaron distintos patrones de multirresistencia y plataformas genéticas que confirman la transferencia horizontal de genes de RAM asociados a esta ST. Esta secuencia tipo es la más frecuente a nivel mundial en aislados multirresistentes, destacando en los últimos años la adquisición de resistencia a linezolid mediada por el gen *optrA*, una de las escasas opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por ERV (Kim et al., 2021; Saavedra et al., 2020).

La **ST40** se considera igualmente un clon de alto riesgo, sin embargo, en este trabajo ha presentado únicamente dos genes de RAM (*tet M* y *ant(6)-Ia*) lo que podría indicar que se trata de una línea genética que evolucionó de forma independiente a los clones adaptados al ambiente hospitalario. Algo similar sucede con la **ST538**, la cual únicamente presentó el gen *erm B*. Recientemente Kim et al. (2018) identificaron aislados multirresistentes de esta ST en muestras de carne de pollo en Corea, detectando mutaciones en las subunidades *gyrA* (ADN girasa) y *parC* (topoisomerasa IV) que confieren resistencia a fluoroquinolonas. En Corea, la administración de esta clase de antibióticos en aves es habitual por lo que es probable que la presión ejercida haya condicionado la aparición de resistencias adquiridas en esa área geográfica. Recientemente Moure et al. (2020) detectaron la circulación de clones pertenecientes al mismo complejo clonal (**ST6-CC2**), resistentes a linezolid en diferentes hospitales de España.

Es importante resaltar que ninguna de las STs que forman parte de CCs de alto riesgo (ST16, ST40 y ST538), presentaron los genes *van* en su genoma, hecho que podría explicarse por las diferencias en el uso de diferentes antimicrobianos en distintos ambientes, así como la circulación de líneas genéticas sensibles a glucopéptidos en el entorno de producción de queso. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que los clones se extienden originalmente como líneas genéticas susceptibles a vancomicina y más tarde incorporan mecanismos de resistencia adquiridos en su genoma mediante transferencia horizontal.

La **ST55** presentó un perfil de multirresistencia (5 y 6 genes) que ha sido igualmente descrito por Jamet et al. (2012), por el contrario, Elghaieb et al. (2019) no detectaron RAM asociada a esta ST a partir de muestras de animales de producción y sus productos en Túnez. Es interesante destacar que la nueva **ST1057**, mostró similitud en el perfil genotípico de RAM con la ST55, ambas agrupadas en el CC55, confirmando que podría originarse a partir de la ST55.

Las cepas pertenecientes a la **ST25** (pulsotipos C y J), presentaron baja diversidad genética de RAM, únicamente el **pulsotipo J** presentó el gen *erm B*, mientras que el **pulsotipo C** fue la única cepa de *E. faecalis* que no presentó genes de resistencia. Estos resultados coinciden con el trabajo publicado por Elghaieb et al. (2019), donde se identificó esta ST en muestras de animales de producción de alimentos y sus productos en Túnez, siendo en todos los casos sensible a diferentes antibióticos. Sin embargo, la misma ST descrita en aislados procedentes de queso elaborado en Francia, presentó perfiles de resistencia a diversos antibióticos (Jamet et al., 2012), hecho altamente probable al tratarse de una línea genética muy diseminada a nivel mundial, sobre todo en ambiente hospitalario. En España, Moure et al. (2020) han identificado aislados clínicos de *E. faecalis* ST25 resistentes a linezolid en diferentes hospitales confirmando la circulación interregional de clones portadores del gen *optrA*.

Por otro lado, la **ST133 y ST283**, agrupadas con la ST25 en el mismo complejo clonal (CC25), presentaron perfiles de RAM diversos, si bien se observó una carga genética de RAM (2 y 3 genes) inferior a la observada en otras STs identificadas en este trabajo.

Al analizar de forma conjunta los resultados obtenidos, se observó una gran diversidad clonal y de perfiles genéticos de resistencia en las cepas de *E. faecalis* en ambos centros de producción. Ello revela una vez más la capacidad adaptativa y de adquirir nuevos determinantes genéticos de RAM de esta especie bacteriana, hecho que a su vez facilita la supervivencia y la persistencia en el proceso de maduración de queso elaborado con leche cruda de oveja, donde tienen lugar continuos cambios adaptativos a nivel microbiano.

El elevado grado de multirresistencia observado en los aislados de *E. faecalis* supone una grave amenaza ya que, tal y como se ha observado mediante el análisis PFGE y MLST, el ambiente de producción de queso curado es un reservorio de clones de *E. faecalis* resistentes adaptados. Las STs con mayor carga genética de RAM detectadas en este trabajo se han descrito también en el

ambiente hospitalario, siendo algunas de ellas consideradas líneas genéticas de alto riesgo, lo que refuerza el potencial de los alimentos en la diseminación de RAM de importancia para la salud humana (Alonso et al., 2017; Rios et al., 2020; Torres et al., 2009; Valdezate et al., 2009; Zhou et al., 2020). Además, la mayoría de las STs detectadas en este trabajo están diseminadas en diversos ambientes, lo que implica un riesgo de transferencia de determinantes genéticos de RAM y, en consecuencia, diseminación de clones resistentes a antibióticos a través de la cadena alimentaria.

A la vista de los resultados, podemos afirmar que el queso curado elaborado con leche cruda es un vehículo de líneas genéticas de *E. faecalis* de relevancia clínica asociadas a multirresistencia antibiótica. La mayor parte de los clones de *E. faecalis* presentes en el proceso de elaboración de queso son portadores de los determinantes genéticos de RAM *tet M* y *erm B*, confirmando la diseminación multiclonal de resistencia a tetraciclina y eritromicina entre la población de *Enterococcus* spp. de diferentes orígenes epidemiológicos descrita desde hace más de una década por Nishimoto et al. (2005) y Ruiz-Garbajosa et al. (2006).

Asimismo, es importante destacar la presencia de los genes *ant(6)-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *cat A* o *cat_{PC194}* en los clones pertenecientes a líneas genéticas de mayor riesgo, hecho que cobra gran importancia, dada la elevada capacidad de diseminación y adaptación de *E. faecalis* a ecosistemas a nivel mundial.

En el caso de *E. faecium*, ninguno de los clones identificados mostró genes de resistencia en su genoma. Como se ha desrito anteriormente, la reducción de la susceptibilidad a eritromicina y Q/D en esta especie bacteriana, no se pudo asociar a ninguno de los determinantes genéticos de RAM estudiados pudiendo estar implicados otros genes no estudiados en este trabajo, si bien no podemos descartar que el método de difusión en disco haya podido interferir en la clasificación del fenotipo a eritromicina. En la **Tabla 19**, aparecen representados los clones identificados para esta especie, así como la etapa del proceso de elaboración y el centro del que fueron aislados.

Tabla 19. Clones detectados en la especie *E. faecium* de origen lácteo.

ST	Pulsotipo	Origen		Resistotipo
		Etapa*	Centro	
47	M	Q60	1	~**
	O	Q3	1	~**
1491	N	Q60	1	~**
		Q90		
		Q90		
		Q120		
		Q180		
		Q180		
286	Ñ	Q3	1	~**
		Q120		
		Q3		
1853	P	Q120	1	~**
		Q120		
		Q180		
		Q180		
1854	Q	Q7	1	~**
		Q7		
		Q30		

*Etapa del proceso: Q3 = queso de 3 días; Q7 = queso 7 días, Q30 = queso 30 días, Q60 = queso 60 días, Q90 = queso 90 días, Q120 = queso 120 días, Q180 = queso 180 días; **: Ausencia de genes RAM.

A diferencia de lo observado mediante MLST donde no se ha podido apreciar gran similitud genética entre las secuencias tipo detectadas, todos los aislados presentaron el mismo resistotipo, es decir, ausencia de genes RAM. Este hecho representa un gran hallazgo; ya que, nuestros resultados confirman que los clones identificados no se consideran una vía de transmisión de RAM. A la vista de los resultados podemos concluir que el queso elaborado con leche cruda puede suponer un vehículo de transmisión de bacterias responsables de infecciones nosocomiales; no obstante, no contribuye a la propagación de aislados de *E. faecium* multirresistentes.

E. faecium es uno de los patógenos nosocomiales clínicamente más relevantes a nivel mundial debido a la capacidad de adquirir determinantes de RAM y por tanto presentar con mayor frecuencia multirresistencias, sobre todo si se compara frente a *E. faecalis* (Dapkevicius et al., 2021). *E. faecium* resistente a vancomicina constituye un riesgo creciente para la salud humana y es

considerado por la OMS como patógeno de prioridad elevada para el cual es necesario encontrar nuevos antibióticos (WHO, 2016b).

Es probable que la ausencia de genes de RAM en los aislados de esta especie esté relacionada con la especificidad de origen y la asociación de determinadas líneas genéticas a orígenes epidemiológicos definidos. La adaptación de esta *E. faecium* al medio hospitalario y por tanto la adquisición de mecanismo de RAM ha tenido lugar principalmente para determinadas STs y CCs que no se han diseminado en otros ambientes como la producción de alimentos de origen animal (Cercenado, 2011; Lee et al., 2019).

Estos resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía, donde la resistencia adquirida en aislados de *E. faecium* procedentes de alimentos se encuentra a niveles muy inferiores de lo observado en aislados clínicos por lo que podemos concluir que, en la actualidad, *E. faecium* de origen lácteo no supone un problema de interés sanitario si bien es importante realizar una vigilancia epidemiológica de la RAM en esta especie bacteriana con el fin de evaluar el papel de la cadena alimentaria como vehículo de líneas genéticas multirresistentes entre diferentes ecosistemas (Dapkevicius et al., 2021; Zaheer et al., 2020).

3.2.5.3 Relación clonal de cepas de *E. hirae*, *E. durans* y *E. casseliflavus* resistentes a antibióticos y su impacto para la salud pública

Las especies *E. hirae*, *E. durans* y *E. casseliflavus* han sido detectadas en diversos productos lácteos. Su presencia en leche y cuajada supone igualmente un impacto positivo en las propiedades sensoriales de diversos quesos, por lo que el estudio de estas especies se centra en las ventajas que puede suponer su presencia en los alimentos desde un punto de vista tecnológico (Dapkevicius et al., 2021).

Por otro lado, estas especies se han aislado ocasionalmente a partir de infecciones en humanos. Los escasos métodos diagnósticos para su detección y tipificación, así como la falta de datos científicos sobre las características clínicas y los posibles tratamientos hacen que exista poca información en la bibliografía científica acerca de la susceptibilidad antibiótica natural, así como posibles mecanismos de resistencia que puedan adquirir mediante la transferencia de elementos genéticos móviles.

En los últimos años investigadores como Monticelli et al. (2018), Nakamura et al. (2021) o Pinkes et al. (2019) han descrito casos de meningitis, septicemia, infecciones del tracto urinario y heridas quirúrgicas causadas por especies poco patógenas como *E. casseliflavus* y *E. hiraе*, lo que sugiere un cambio evolutivo en el comportamiento clínico de estas especies o la adquisición de factores de virulencia y resistencias antimicrobianas; sin embargo, *E. durans* es menos frecuente y los casos de infección descritos causados por esta especie son extremadamente raros.

Con el objetivo de analizar el impacto que puede tener la RAM en aislados del proceso de elaboración de queso curado, se ha estudiado la estructura poblacional de estas especies en base a los genotipos obtenidos mediante RAPD PCR y su relación con el perfil genotípico de RAM.

En la **Tabla 20** se presentan los perfiles genéticos de RAM asociados a cada uno de los genotipos de *E. hiraе* y *E. casseliflavus* identificados en este estudio.

Tabla 20: Perfil genotípico de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. hirae* y *E. casseliflavus* de origen lácteo.

<i>E. hirae</i>						<i>E. casseliflavus</i>					
Perfil RAPD	Origen		Resistotipo			Perfil RAPD	Origen		Resistotipo		
	Etapa*	Centro	tet M	vat D	vat E		Etapa*	Centro	tet M	erm B	vat D
G1	leche	1	■	■	■	E1	Leche	■	■	■	■
	leche					2					
	Q3	1									
	Q7										
	Q15	2									
	Q7										
G2	Q15	1									
G3	Q30	2									
	Q60										
G4	leche	1								■	■
	leche										
G5	leche	2									
	cuajada										
G6	Q30	2									

*Etapa del proceso: Q3 = queso de 3 días; Q7 = queso 7 días, Q30 = queso 30 días, Q60 = queso 60 días, Q90 = queso 90 días, Q120 = queso 120 días, Q180 = queso 180 días.

Los resultados muestran poca variabilidad en cuanto a los perfiles de RAM y no se observaron diferencias en los resistotipos observados en los aislados clasificados dentro de un mismo genotipo.

De los 6 genotipos de *E. hirae*, 2 no presentaron ninguno de los genes de resistencia analizados, 1 presentó el resistotipo *tet M* y 3 el perfil *vat D/vat E*.

En el caso de *E. casseliflavus*, cada uno de los aislados fue clasificado en un genotipo diferente donde 2 de ellos no presentaron los genes de resistencia analizados, 1 presentó el resistotipo *vat D/vat E* y los dos restantes mostraron el perfil *tet M/erm B/vat D/vat E*.

E. hirae forma parte de la microbiota intestinal de varias especies de animales domésticos por lo que es frecuente encontrar esta especie en alimentos y aguas como consecuencia de la contaminación fecal. *E. casseliflavus* se asocia con plantas y ambientes acuáticos por lo que no se considera una especie común en el ámbito de la producción de alimentos de origen animal si bien,

puede aparecer ocasionalmente como consecuencia de la contaminación a través de aguas residuales (Dapkevicius et al., 2021; Micallef et al., 2013).

La identificación de infecciones causadas por *E. hirae* y *E. casseliflavus* ha aumentado en los últimos años tras la implantación de técnicas como MALDI-TOF. Ambas especies han sido reconocidas recientemente como agentes patógenos, especialmente en pacientes con enfermedades subyacentes; sin embargo, es necesario ampliar el estudio de los patrones de resistencia y las vías de transmisión de estos microorganismos al hombre para comprender el impacto que supone su presencia en los alimentos y el medio ambiente.

La información obtenida en este trabajo confirma que las especies *E. hirae* y *E. casseliflavus* son capaces de adquirir determinantes genéticos de RAM mediante la movilización de ADN plasmídico y por tanto pueden ser un vehículo de diseminación de éstos a través del ambiente y de la cadena alimentaria. La presencia de estas dos especies portadoras de genes de RAM en el proceso de elaboración de queso curado y en particular en la leche cruda empleada para su elaboración, pone de manifiesto el problema de interés ecológico que supone el flujo e intercambio de bacterias resistentes y de genes de resistencia en la cadena alimentaria.

Las tetraciclinas y los macrólidos son dos clases de antibióticos categorizadas por la OMS como antimicrobianos de importancia alta (tetraciclina) y crítica (macrólidos) para la salud humana siendo ampliamente utilizados a nivel mundial (ECDC, EFSA & EMA, 2021b; FDA, 2018), tanto en medicina humana como veterinaria, por lo que la detección del gen *tet M* en *E. hirae* y los genes *erm B* y *tet M* en *E. casseliflavus* supone un riesgo para la salud pública asociado a su transmisión potencial a través de la cadena alimentaria.

Concluyendo este apartado y a la vista de los resultados, podemos afirmar que los aislados de enterococos circulantes en el proceso de elaboración de queso curado elaborado en la provincia de Teruel fueron genéticamente muy **diversos**, mostrando perfiles **variados** de resistencia a antibióticos considerados de importancia crítica para la salud humana, y con evidencias de circulación de clones multirresistentes de importancia clínica en la cadena alimentaria. De especial interés es la resistencia detectada a los **macrólidos** y los **aminoglucósidos**, siendo estos últimos la opción terapéutica para el tratamiento de infecciones enterocócicas. Igualmente, hay que destacar que no se observó resistencia a **linezolid** que constituye una de las escasas opciones terapéuticas

ante infecciones causadas por ERV, y tampoco a otros antibióticos de elección para el tratamiento de enterococos tales como **glucopéptidos** o **β -lactámicos**.

De acuerdo con la bibliografía consultada, la prevalencia de RAM observada en este trabajo coincide con lo mostrado por otros estudios donde se han analizado aislados de enterococos procedentes de alimentos lácteos fermentados. No se han observado RAM emergentes, si bien estos resultados sugieren que hay una tendencia ascendente en la prevalencia de RAM para antimicrobianos empleados en la actualidad en la práctica clínica, lo que demuestra que, a pesar de las medidas llevadas a cabo para evitar la aparición y diseminación de RAM, el uso de sustancias antimicrobianas en cualquier ambiente (humano, animal o medio ambiente), tiene graves repercusiones para la salud pública.

La mayor trascendencia clínica de las infecciones producidas por enterococos resistentes son las limitadas opciones terapéuticas que existen. La circulación y propagación de líneas clonales de alto riesgo supone un tema de especial preocupación dado que puede comprometer el tratamiento antibiótico de dichas infecciones. En las últimas décadas, el interés de la comunidad científica se ha centrado en la vigilancia de RAM en bacterias patógenas aisladas de procesos infecciosos en humanos y en menor medida en animales; sin embargo, se ha hecho necesario extender estos programas de vigilancia a bacterias comensales que se encuentran diseminadas en diferentes entornos y que pueden servir como marcadores de la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos.

El género *Enterococcus* es probablemente el género bacteriano gram positivo que mejor refleja la transferencia horizontal de material genético entre bacterias, considerándose un candidato idóneo como bacteria centinela de la RAM adquirida. Los estudios poblacionales de aislados de este género permiten determinar la presencia y diseminación de clones bacterianos multirresistentes de interés tanto a nivel hospitalario como en otros ecosistemas.

El sector de la producción de alimentos está fuertemente vinculado con fuentes de RAM de origen humano, animal y ambiental de una manera cíclica. La diseminación de clones resistentes entre estos nichos puede constituir una hipótesis para explicar la diseminación de líneas genéticas de gran relevancia clínica portadoras de determinantes de RAM en la cadena alimentaria. De esta manera, podemos considerar la transferencia de bacterias multirresistentes a través de los alimentos como un problema de seguridad alimentaria.

Los enterococos forman parte de la microbiota de multitud de alimentos fermentados y además de sus propiedades tecnológicas y potencial probiótico, su interés en los últimos años se centra en la RAM asociada y en la evaluación del riesgo que supone la presencia de enterococos resistentes en alimentos desde la perspectiva de *Una Sola Salud*.

En este trabajo se aportan los primeros datos en España sobre la estructura poblacional de *Enterococcus* spp. circulantes en el ambiente de producción de queso de leche cruda de oveja y su relación epidemiológica a nivel mundial, así como del riesgo potencial para la salud pública definido por los perfiles de resistencia a antibióticos, los cuales pueden diferir entre cepas del mismo clon. En conclusión, los resultados ponen de manifiesto la importancia de monitorear la evolución de clones circulantes de *E. faecalis* y *E. faecium* para detectar clones emergentes con resistencia antimicrobiana de importancia en salud pública.



Conclusiones

4 CONCLUSIONES

1. La elevada prevalencia de multirresistencia a antibióticos considerados de importancia crítica para la salud humana, en enterococos de origen alimentario, mediada por genes de ubicación plasmídica, supone un hecho preocupante por su potencial de propagación entre diferentes especies bacterianas y su diseminación hacia otros nichos.
2. Dada la emergencia actual de resistencias a β -lactámicos, vancomicina y linezolid en infecciones enterocócicas hay que destacar como aspecto positivo, la detección de fenotipos sensibles a estos antibióticos en el entorno quesero. No obstante, conviene mantener su vigilancia en la cadena alimentaria, con el fin de identificar posibles fuentes emergentes de diseminación de estas resistencias.
3. La falta de concordancia detectada puntualmente entre fenotipo y genotipo de resistencia puede ser atribuida a la existencia de genes no funcionales con potencial de ser transmitidos y ser expresados o a limitaciones en la interpretación de la prueba de difusión en disco. Ello debería ser considerado en la elección de técnicas para el análisis de resistencias antimicrobianas.
4. En enterococos de origen alimentario, el análisis RT PCR ha permitido identificar, en la mayoría de los casos, mecanismos de resistencia antimicrobiana convencionales asociados a antibióticos de importancia para la salud humana, lo que refuerza la emergencia en la búsqueda de nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes.
5. En la terapia antimicrobiana dirigida y en el desarrollo de nuevos fármacos deben ser tenidos en cuenta los mecanismos de resistencia emergentes; de nuestro estudio se concluye que es necesario realizar estudios adicionales que permitan esclarecer sobre los mecanismos de resistencia a estreptograminas, vancomicina y eritromicina.
6. Del estudio comparativo de las técnicas de tipado molecular ensayadas se deduce que, bajo condiciones controladas y optimizadas, la técnica RAPD-PCR puede ser una buena alternativa a la PFGE para establecer relaciones filogenéticas en *Enterococcus* spp.; no obstante, la PFGE se muestra la más idónea para estudios epidemiológicos.
7. De todas las especies estudiadas, *E. faecalis* destaca por su alta diversidad clonal y por ser el principal reservorio de genes de resistencia en el entorno quesero, lo que le podría conferir una ventaja selectiva sobre la microbiota de otros ambientes y facilitar su diseminación.

8. Del análisis MLST cabe destacar la identificación, en el entorno quesero, de cuatro nuevos secuenciotipos, dos de *E. faecium* sensibles a todos los antibióticos ensayados y dos de *E. faecalis*, resistentes hasta a cuatro clases de antibióticos, los cuales deben ser objeto de vigilancia y seguimiento para determinar su origen y su potencial de diseminación.
9. La presencia de los clones epidémicos de alto riesgo de *E. faecalis*, CC2, CC16 y CC40, en dos plantas elaboradoras de queso, evidencia la circulación de dichos clones entre diferentes nichos, a la vez que pone de manifiesto el importante papel epidemiológico de los alimentos en el mantenimiento y diseminación de líneas genéticas potencialmente patógenas y multirresistentes.
10. El análisis molecular ha confirmado la especificidad de origen de *E. faecium* y una muy baja prevalencia de resistencia antibiótica en aislados de origen lácteo; este hecho podría inducir a la clasificación de estas cepas en el clado B, que no incluye cepas de origen hospitalario.
11. Del análisis del entorno quesero como fuente de resistencia antimicrobiana se concluye que la microbiota bacteriana habitual de la leche cruda de oveja actúa como reservorio de genes de resistencia a antibióticos relacionados con su uso veterinario, observándose en el queso curado de 180 días hasta cuatro resistotipos multirresistentes con implicaciones importantes para la seguridad alimentaria y la salud pública.
12. Los resultados de esta tesis doctoral aportan información, aún muy escasa en la bibliografía científica, sobre resistencias en poblaciones bacterianas comensales de origen alimentario, y evidencian la importancia del enfoque *Una Sola Salud* para abordar el control de la resistencia antimicrobiana y predecir la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia y sus vías de propagación.



Bibliografía

5 BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner–Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(00\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(00)00130-9)
- Abd El-Tawab, A., Elhofy, F., Mahmoud, M., Amin, E., 2019. Genotyping and resistance genes of *Enterococcus faecalis* isolated from different food sources in Egypt. *Benha Vet. Med. J.* 37, 149–153. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2019.16026.1080>
- Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas López, R., Gálvez, A., 2008. La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. *An. Real Acad. Cienc. Vet. Andal. Orient.* 21, 65–84.
- Adzitey, F., Huda, N., Ali, G.R.R., 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech* 3, 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>
- AEMPS, 2022. El problema de la resistencia a los antibióticos: objetivos y líneas de acción del PRAN. Agencia Española del Medicamento y los Productos Sanitarios (AEMPS), Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/eventos/2022-eventos/el-pran-se-suma-a-la-semana-de-la-administracion-abierta-con-un-evento-online/> consultado: 1 de Junio de 2022.
- AEMPS, 2020. Vigilancia Nacional de la Resistencia a Antimicrobianos. Propuesta elaborada por el Grupo de Trabajo de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).
- AEMPS, 2019. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) 2019-2021. Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios (AEMPS) 2019.
- AEMPS, 2017. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS); Informe Anual 2016-2017.
- Ahmed, M.O., Baptiste, K.E., 2018. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microb. Drug Resist.* 24, 590–606. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0147>
- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., Berg, D.E., 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 20, 5137–5142. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5137>
- Alonso, C.A., Rezusta, A., Seral, C., Ferrer, I., Castillo, F.J., Torres, C., 2017. Persistencia de un clon ST6 de *Enterococcus faecalis* con genotipo van B2 en dos hospitales de

- Aragón. Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica 35, 578–581. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.020>
- Andrighetto, Christian, Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F., 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. J. Dairy Res. 68, 303–316. <https://doi.org/10.1017/S0022029901004800>
- Andrighetto, C., Zampese, L., Lombardi, A., 2001. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). Lett. Appl. Microbiol. 33, 26–30. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00939.x>
- Arana, D.M., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Alós, J.I., 2014. First clinical isolate in Europe of clindamycin-resistant group B Streptococcus mediated by the lnu(B) gene. Rev. Esp. Quimioter. Publicacion Of. Soc. Esp. Quimioter. 27, 106–109.
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M.I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T.H., Rasool, M.H., Shahid, A., Xueshan, X., Baloch, Z., 2021. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Aurilio, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L.G., Coppolino, F., Barbarisi, A., Passavanti, M.B., Pace, M.C., 2022. Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. Antibiotics 11, 421. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421>
- Azzouz, A., Preuss, C.V., 2022. Linezolid, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J. Pharm. Anal. 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Banerjee, T., 2013. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Typing of Multidrug Resistant Enterococcus faecium Urinary Isolates from a Tertiary Care Centre, Northern India. J. Clin. Diagn. Res. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6541.3742>
- Bang, K., An, J.-U., Kim, W., Dong, H.-J., Kim, J., Cho, S., 2017. Antibiotic resistance patterns and genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from military working dogs in Korea. J. Vet. Sci. 18, 229. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.229>
- Barbier, N., Saulnier, P., Chachaty, E., Dumontier, S., Andremont, A., 1996. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. J. Clin. Microbiol. 34, 1096–1099. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1096-1099.1996>
- Barbosa, J., Ferreira, V., Teixeira, P., 2009. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. Food Microbiol. 26, 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.03.005>

- Barreto, F.M., da Silva, M.R., Braga, P.A.C., Bragotto, A.P.A., Hisano, H., Reyes, F.G.R., 2018. Evaluation of the leaching of florfenicol from coated medicated fish feed into water. *Environ. Pollut.* 242, 1245–1252. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.017>
- Belloso Daza, M.V., Cortimiglia, C., Bassi, D., Cocconcelli, P.S., 2021. Genome-based studies indicate that the *Enterococcus faecium* Clade B strains belong to *Enterococcus lactis* species and lack of the hospital infection associated markers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004948>
- Ben Braïek, O., Smaoui, S., 2019. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed Res. Int.* 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>
- Bender, J.K., Cattoir, V., Hegstad, K., Sadowy, E., Coque, T.M., Westh, H., Hammerum, A.M., Schaffer, K., Burns, K., Murchan, S., Novais, C., Freitas, A.R., Peixe, L., Del Grosso, M., Pantosti, A., Werner, G., 2018. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist. Updat.* 40, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2018.10.002>
- Bertelloni, F., Salvadori, C., Moni, A., Cerri, D., Mani, P., Ebani, V.V., 2015. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from laying hens of backyard poultry flocks. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 22, 665–669. <https://doi.org/10.5604/12321966.1185771>
- Blasco, A., 2013. Caracterización microbiológica del proceso de fabricación del queso de Teruel mediante técnicas convencionales y técnicas moleculares dependientes e Independientes de cultivo. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Boers, S.A., van der Reijden, W.A., Jansen, R., 2012. High-Throughput Multilocus Sequence Typing: Bringing Molecular Typing to the Next Level. *PLoS ONE* 7, e39630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039630>
- Bortolaia, V., Guardabassi, L., 2015. Zoonotic Transmission of Antimicrobial Resistant Enterococci: A Threat to Public Health or an Overemphasised Risk?, in: Sing, A. (Ed.), *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 407–431. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9457-2_16
- Bottery, M.J., Pitchford, J.W., Friman, V.-P., 2021. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *ISME J.* 15, 939–948. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00832-7>
- Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.-S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., Leclercq, R., 1999. A New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 925–929. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.925>
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time

- PCR Experiments. Clin. Chem. 55, 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 27, 44–52.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Candel, F.J., Maresanz David, M., Barberán López, J., 2019. Nuevas perspectivas para la reevaluación de la fosfomicina: aplicabilidad en la práctica clínica actual. *Rev. Esp. Quimioter. Publicacion Of. Soc. Esp. Quimioter.* 32 (suppl. 1), 01–07.
- Cantón, R., 2010. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 28, 375–385.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.001>
- Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., 2013. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.). *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 31, 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.08.001>
- Carcione, D., Siracusa, C., Sulejmani, A., Leoni, V., Intra, J., 2021. Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics* 10, 995. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080995>
- Carlos Rodríguez, J., Ángel Bratos, M., Merino, E., Ezpeleta, C., 2016. Utilización de MALDI-TOF en el diagnóstico rápido de la sepsis. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 34, 19–25. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30186-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30186-0)
- Casals-Pascual, C., Vergara, A., Vila, J., 2018. Intestinal microbiota and antibiotic resistance: Perspectives and solutions. *Hum. Microbiome J.* 9, 11–15.
<https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.05.002>
- CA-SFM, 2013. Société Française de Microbiologie, CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed ; 2013.
- Cavaco, L.M., Korsgaard, H., Kaas, R.S., Seyfarth, A.M., Leekitcharoenphon, P., Hendriksen, R.S., 2017. First detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in enterococci isolated from food products in Denmark. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 9, 128–129. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.04.001>
- CDC, 2021. Centers for Disease Control and Prevention, CDC; Be antibiotics aware; disponible en: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/>; consultado: 20 mayo 2022.
- CDC, 2019. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- CDC, 2017. Antibiotic Use in the United States, 2017 (No. Progress and Opportunities. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2017.).
- CDC, 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Center for Disease Control and Prevention, CDC.

- Cercenado, E., 2011. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 29, 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70045-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70045-3)
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., García-Solache, M., 2020. Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant Enterococcus strains: Phenotypic and genotypic characteristics. *J. Dairy Sci.* 103, 4068–4077. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17395>
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Łaniewska-Trokenheim, Ł., 2016. Diversity of Antibiotic Resistance Genes in *Enterococcus* Strains Isolated from Ready-to-Eat Meat Products: Antibiotic resistance genes in food.... *J. Food Sci.* 81, M2799–M2807. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13523>
- Cheng, G., Ning, J., Ahmed, S., Huang, J., Ullah, R., An, B., Hao, H., Dai, M., Huang, L., Wang, X., Yuan, Z., 2019. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 8, 158. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0623-2>
- Choi, J.-M., Woo, G.-J., 2013. Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 165, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.016>
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- Chotinantakul, K., Chansiw, N., Okada, S., 2018b. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from Thai fermented pork in Chiang Rai Province, Thailand. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 12, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.021>
- Christaki, E., Marcou, M., Tofarides, A., 2020. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J. Mol. Evol.* 88, 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Clark, N.C., Olsvik, Ø., Swenson, J.M., Spiegel, C.A., Tenover, F.C., 1999. Detection of a Streptomycin/Spectinomycin Adenylyltransferase Gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 157–160. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.1.157>
- CLSI, 2011. Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Coll, P., Coque, T.M., Dominguez, M.A., Vázquez, J., Vila, J., 2005. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Dominguez M.A. (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado E, Cantón R (editores).
- COM (2017) 339 final, 2017. Comunicación de la Comisión Europea al Consejo y al Parlamento Europeo. Plan de Acción Europeo, Plan de Acción Europeo “Una sola Salud” para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos.

- Coque, T.M., Seetulsingh, P., Singh, K.V., Murray, B.E., 1998. Application of Molecular Techniques to the Study of Nosocomial Infections Caused by Enterococci, in: *Molecular Bacteriology*. Humana Press, New Jersey, pp. 469–494. <https://doi.org/10.1385/0-89603-498-4:469>
- Cosentino, S., Pisano, M.B., Corda, A., Fadda, M.E., Piras, C., 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *J. Dairy Res.* 71, 444–450. <https://doi.org/10.1017/S002202990400041X>
- Dahl, K.H., Simonsen, G.S., Olsvik, O., Sundsfjord, A., 1999. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1105–1110. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1105>
- Dai, D., Wang, H., Xu, X., Chen, C., Song, C., Jiang, D., Du, P., Zhang, Y., Zeng, H., 2018. The emergence of multi-resistant *Enterococcus faecalis* clonal complex, CC4, causing nosocomial infections. *J. Med. Microbiol.* 67, 1069–1077. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000761>
- Dapkevicius, M. de L.E., Sgardioli, B., Câmara, S.P.A., Poeta, P., Malcata, F.X., 2021. Current Trends of Enterococci in Dairy Products: A Comprehensive Review of Their Multiple Roles. *Foods* 10, 821. <https://doi.org/10.3390/foods10040821>
- Davis, E., Hicks, L., Ali, I., Salzman, E., Wang, J., Snitkin, E., Gibson, K., Cassone, M., Mody, L., Foxman, B., 2020. Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Colonization in Nursing Facilities. *Open Forum Infect. Dis.* 7, ofz553. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz553>
- de Candia, S., De Angelis, M., Dunlea, E., Minervini, F., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Gobbetti, M., 2007. Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.062>
- de Fátima Silva Lopes, M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo Marques, J.J., Tenreiro, R., Crespo, M.T.B., 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.025>
- De Graef, E.M., Decostere, A., De Leener, E., Goossens, H., Baele, M., Haesebrouck, F., 2007. Prevalence and Mechanism of Resistance against Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among *Enterococcus faecium* Isolates from Food-Producing Animals and Hospital Patients in Belgium. *Microb. Drug Resist.* 13, 135–141. <https://doi.org/10.1089/mdr.2007.718>
- Decisión (UE) 2020/1729, de 17 de noviembre de 2020 relativa a la vigilancia y la notificación de la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias zoonóticas y comensales y por la que se deroga la Decisión de Ejecución 2013/652/UE de la Comisión.

- Delpech, G., Pourcel, G., Schell, C., De Luca, M., Basualdo, J., Bernstein, J., Grenovero, S., Sparo, M., 2012. Antimicrobial Resistance Profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Artisanal Food of Animal Origin in Argentina. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 939–944. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1192>
- Di Grigoli, A., Francesca, N., Gaglio, R., Guarrasi, V., Moschetti, M., Scatassa, M.L., Settanni, L., Bonanno, A., 2015. The influence of the wooden equipment employed for cheese manufacture on the characteristics of a traditional stretched cheese during ripening. *Food Microbiol.* 46, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.008>
- Directiva 70/524/CE, de 23 de noviembre de 1970 sobre los aditivos en la alimentación animal.
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G., 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol.* 63, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>
- Donabedian, S.M., Perri, M.B., Vager, D., Hershberger, E., Malani, P., Simjee, S., Chow, J., Vergis, E.N., Muder, R.R., Gay, K., Angulo, F.J., Bartlett, P., Zervos, M.J., 2006. Quinupristin-Dalfopristin Resistance in *Enterococcus faecium* Isolates from Humans, Farm Animals, and Grocery Store Meat in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3361–3365. <https://doi.org/10.1128/JCM.02412-05>
- Dowling, A., Dwyer, J.O., Adley, C.C., 2017. Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. *Antimicrob. Res. Nov. Bioknowledge Educ. Programs.*
- DSMZ, 2022. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zeellkulturen GmGH (DSMZ), Disponible en: <https://lpsn.dsmz.de/genus/enterococcus>.
- Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 24–27. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.1.24-27.1995>
- ECDC, 2021. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual Epidemiological Report 2020, Stockholm: ECDC; 2021.
- ECDC, 2020. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm: ECDC; 2020.
- ECDC, EFSA & EMA, 2021a. Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and animals: third joint inter-agency report on integrated analysis of antimicrobial agent consumption and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA: JIACRA III 2016–2018. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control & European Medicines Agency (EFSA, ECDC & EMA). Publications Office, LU.

- ECDC, EFSA & EMA, 2021b. Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA. *EFSA J.* 19. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6712>
- EFSA, 2019. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 9: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2018. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA J.* 17. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5555>
- EFSA, 2018. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- EFSA, 2017. Percepción pública de los riesgos asociados a la resistencia a los antimicrobianos. European Food Safety Authority (EFSA). Publications Office, LU.
- EFSA, 2008. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *The EFSA journal* 141: 1-4. European Food Safety Authority (EFSA).
- EFSA, 2007. Report including a proposal for harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. *The EFSA journal*, 96: 1-46. European Food Safety Authority (EFSA).
- EFSA & ECDC, 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *EFSA J.* 19. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>
- EFSA & ECDC, 2020. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *EFSA J.* 18. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>
- EFSA & ECDC, 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- EFSA & ECDC, 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *EFSA J.* 13. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4036>
- Elghaieb, H., Freitas, A.R., Abbassi, M.S., Novais, C., Zouari, M., Hassen, A., Peixe, L., 2019. Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxtA* or *optrA* in retail

- meat and food-producing animals from Tunisia. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2865–2869. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz263>
- Eliopoulos, G.M., Huovinen, P., 2001. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1608–1614. <https://doi.org/10.1086/320532>
- Ellington, M.J., Ekelund, O., Aarestrup, F.M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., Grundman, H., Hasman, H., Holden, M.T.G., Hopkins, K.L., Iredell, J., Kahlmeter, G., Köser, C.U., MacGowan, A., Mevius, D., Mulvey, M., Naas, T., Peto, T., Rolain, J.-M., Samuelsen, Ø., Woodford, N., 2017. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012>
- EMA, 2021. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020: trends from 2010 to 2020. Publications Office, LU.
- EMA, 2020. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018: trends from 2010 to 2018: tenth ESVAC report., European Medicines Agency (EMA). Publications Office, LU.
- EMA, 2011. Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health, European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use; 2011.
- Emaneini, M., Khoramian, B., Jabalameli, F., Beigverdi, R., Asadollahi, K., Taherikalani, M., Lari, A.R., 2016. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *J. Prev. Med. Hyg.* 57, E197–E200.
- Estévez, R.M., 2016. Estudio histórico del uso y prohibición de los promotores del crecimiento en ganadería española. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria.
- EUCAST, 2021. EUCAST reading guide for broth microdilution. European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing (EUCAST), version 3.0.
- EUCAST, 2020. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
- European Commission, 2018. Antimicrobial resistance: report. Special Eurobarometer 478. European Commission. Disponible en: <http://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/index.cfm>; consultado 1 de Junio de 2022. Publications Office.
- FAO, 2016. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020. Roma: FAO.

- FAO, OIE & WHO, 2019. Monitoring and evaluation of the global action plan on antimicrobial resistance: framework and recommended indicators. The Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health & World Health Organization (FAO-OIE-WHO). World Health Organization, Geneva.
- FAO, OIE & WHO, 2010. Sharing responsibilities and coordinating global activities to address health risks at the animal-human-ecosystems interfaces. The Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health & World Health Organization (FAO-OIE-WHO) Collaboration. A Tripartite Concept Note.
- FDA, 2018. Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals, Food and Drugs Administration (FDA), Center for Veterinary Medicine, 2019.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2004. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J. Bacteriol.* 186, 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>
- Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D.H., Prasad, A.B., Slotta, D.J., Tolstoy, I., Tyson, G.H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P.F., Tadesse, D.A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J.P., Klimke, W., 2019. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63. <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>
- Fernandes, M. da S., Fujimoto, G., de Souza, L.P., Kabuki, D.Y., da Silva, M.J., Kuaye, A.Y., 2015. Dissemination of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Ricotta Processing Plant and Evaluation of Pathogenic and Antibiotic Resistance Profiles: *Enterococcus* in a ricotta processing plant.... *J. Food Sci.* 80, M765–M775. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12824>
- Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F., Torre, P., 2012. Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiol.* 29, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.011>
- Florez-Cuadrado, D., Moreno, M.A., Ugarte-Ruiz, M., Domínguez, L., 2018. Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, pp. 115–136. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.004>
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>

- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00007-0)
- Freitas, A.R., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Coque, T.M., Peixe, L., 2009. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 1104–1111. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp103>
- Furlaneto-Maia, L., Rocha, K.R., Henrique, F.C., Giazzi, A., Furlaneto, M.C., 2014. Antimicrobial Resistance in <i>Enterococcus</i> sp Isolated from Soft Cheese in Southern Brazil. *Adv. Microbiol.* 04, 175–181. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.43023>
- Giraffa, G., 2007. Enterococci and Dairy Products, in: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Products Manufacturing*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 85–97. <https://doi.org/10.1002/9780470113554.ch50>
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)
- Gómez, J., 2015. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*; 28; 1-9. 28, 1–9.
- Green, M.R., Sambrook, J., 2018. Optimizing Primer and Probe Concentrations for Use in Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018, pdb.prot095018. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095018>
- Guerrero-Ramos, E., Cordero, J., Molina-González, D., Poeta, P., Igrejas, G., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2016a. Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiol.* 53, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.007>
- Guerrero-Ramos, E., Molina-González, D., Blanco-Morán, S., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2016b. Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Genotypic Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci in Meat Preparations. *J. Food Prot.* 79, 748–756. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-390>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathog.* 7, e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Hammad, A.M., Aly, S.S., Hassan, H.A., Abbas, N.H., Eltahan, A., Khalifa, E., Shimamoto, T., 2021. Occurrence, Phenotypic and Molecular Characteristics of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Retail Raw Milk in Egypt. *Foodborne Pathog. Dis.* <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0054>
- Hammad, A.M., Hassan, H.A., Shimamoto, T., 2015. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control* 50, 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.020>

- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R., 2018. The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Front. Microbiol.* 9, 1791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
- Harada, T., Motooka, D., Nakamura, S., Yamamoto, Y., Yamaguchi, T., Kawahara, R., Kawatsu, K., 2020. Detection of Genetic Elements Carrying *vanA* in Vancomycin-Resistant *Enterococcus saigonensis* VE80^T Isolated from Retail Chicken Meat. *Foodborne Pathog. Dis.* 17, 772–774. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2827>
- Homan, W.L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, J.D.A., Willems, R.J.L., 2002. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1963–1971. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002>
- Huey, B., Hall, J., 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 171, 2528–2532. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2528-2532.1989>
- Hwang, I.Y., Ku, H.O., Lim, S.K., Lee, K.J., Park, C.K., Jung, G.S., Jung, S.C., Park, Y.H., Nam, H.M., 2010. Distribution of streptogramin resistance genes and genetic relatedness among quinupristin/dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* recovered from pigs and chickens in Korea. *Res. Vet. Sci.* 89, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.01.011>
- ISO 707/IDF 50, n.d. ISO 707/IDF 50, 2008-08-15. ISO (International Organization for Standardization), Third edition; Milk and Milk products. Guidance on sampling.
- İspirli, H., Demirbaş, F., Dertli, E., 2017. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT* 75, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.010>
- Jackson, C.R., Lombard, J.E., Dargatz, D.A., Fedorka-Cray, P.J., 2011. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle: Enterococci in dairy cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02964.x>
- Jamet, E., Akary, E., Poisson, M.-A., Chamba, J.-F., Bertrand, X., Serror, P., 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol.* 31, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.009>
- Juste, A., Thomma, B., Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* 25, 745–761. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.009>
- Kahlmeter, G., EUCAST, 2019. Redefining susceptibility testing categories S, I and R. EUCAST.
- Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 33, 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

- Kassim, A., Omuse, G., Premji, Z., Revathi, G., 2016. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 15, 21. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0135-3>
- Keppel, M.H., Cadamuro, J., Haschke-Becher, E., Oberkofler, H., Felder, T.K., Lippi, G., Mrazek, C., 2020. Errors within the total laboratory testing process, from test selection to medical decision-making – A review of causes, consequences, surveillance and solutions. *Biochem. Medica* 30, 215–233. <https://doi.org/10.11613/BM.2020.020502>
- Khan, Z.A., Siddiqui, M.F., Park, S., 2019. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics* 9, 49. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049>
- Kim, E., Shin, S.-W., Kwak, H.-S., Cha, M.-H., Yang, S.-M., Gwak, Y.-S., Woo, G.-J., Kim, H.-Y., 2021. Prevalence and Characteristics of Phenicol-Oxazolidinone Resistance Genes in *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* Isolated from Food-Producing Animals and Meat in Korea. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11335. <https://doi.org/10.3390/ijms222111335>
- Kim, Y.B., Seo, H.J., Seo, K.W., Jeon, H.Y., Kim, D.K., Kim, S.W., Lim, S.-K., Lee, Y.J., 2018. Characteristics of High-Level Ciprofloxacin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Retail Chicken Meat in Korea. *J. Food Prot.* 81, 1357–1363. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-046>
- Kime, L., Randall, C.P., Banda, F.I., Coll, F., Wright, J., Richardson, J., Empel, J., Parkhill, J., O'Neill, A.J., 2019. Transient Silencing of Antibiotic Resistance by Mutation Represents a Significant Potential Source of Unanticipated Therapeutic Failure. *mBio* 10, e01755-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01755-19>
- Klibi, N., Said, L.B., Jouini, A., Slama, K.B., López, M., Sallem, R.B., Boudabous, A., Torres, C., 2013. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Sci.* 93, 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.020>
- Kurekci, C., Onen, S.P., Yipel, M., Aslantas, O., Gundogdu, A., 2016. Characterisation of Phenotypic and Genotypic Antibiotic Resistance Profile of Enterococci from Cheeses in Turkey. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 36, 352–358. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.3.352>
- Laupland, K.B., Valiquette, L., 2013. The Changing Culture of the Microbiology Laboratory. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 24, 125–128. <https://doi.org/10.1155/2013/101630>
- Laws, M., Shaaban, A., Rahman, K.M., 2019. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 490–516. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>

- Lebreton, F., Willems, R.J.L., Gilmore, M.S., 2014. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization, in: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D.F.J., Giske, C.G., Heisig, P., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Nordmann, P., Rodloff, A.C., Rossolini, G.M., Soussy, C.-J., Steinbakk, M., Winstanley, T.G., Kahlmeter, G., 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 141–160. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>
- Lee, T., Pang, S., Abraham, S., Coombs, G.W., 2019. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 16, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.016>
- Li, Y.Q., 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 3191–3201. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003608>
- Liese, J., Schüle, L., Oberhettinger, P., Tschörner, L., Nguyen, T., Dörfel, D., Vogel, W., Marschal, M., Autenrieth, I., Willmann, M., Peter, S., 2019. Expansion of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in an Academic Tertiary Hospital in Southwest Germany: a Large-Scale Whole-Genome-Based Outbreak Investigation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e01978-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01978-18>
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1062–1066. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1062>
- Liu, H., Taylor, T.H., Pettus, K., Johnson, S., Papp, J.R., Trees, D., 2016. Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 5, 46. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0148-x>
- Lozano, C., Torres, C., 2017. Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 35, 2–8. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(17\)30028-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(17)30028-9)
- Makovec, J.A., Ruegg, Dr.P.L., 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 1582–1589. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.1582>
- Margalho, L.P., van Schalkwijk, S., Bachmann, H., Sant’Ana, A.S., 2020. *Enterococcus* spp. in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined

- with multivariate statistics. *Food Control* 118, 107425. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107425>
- Marin Garrido, A., 2014. Antimicrobial Resistance in Enterococci. *J. Infect. Dis. Ther.* 02. <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000150>
- Markwart, R., Willrich, N., Eckmanns, T., Werner, G., Ayobami, O., 2021. Low Proportion of Linezolid and Daptomycin Resistance Among Bloodborne Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Europe. *Front. Microbiol.* 12, 664199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664199>
- Martínez, J.A., 2007. Mecanismo de acción de los antibióticos. *Jano: Medicina y humanidades*.
- Martín-Platero, A.M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J., Martínez-Bueno, M., 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiol.* 26, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.004>
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martín-Sánchez, I., Martínez-Bueno, M., 2008. Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5662–5673. <https://doi.org/10.1128/AEM.00418-08>
- Matsuda, K., 2017. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 45–72. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>
- McDonnell, L., Armstrong, D., Ashworth, M., Dregan, A., Malik, U., White, P., 2017. National disparities in the relationship between antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe: an observational study in 29 countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3199–3204. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx248>
- McEwen, S.A., Collignon, P.J., 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Micallef, S.A., Rosenberg Goldstein, R.E., George, A., Ewing, L., Tall, B.D., Boyer, M.S., Joseph, S.W., Sapkota, A.R., 2013. Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on U.S. Mid-Atlantic farms. *Food Microbiol.* 36, 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.016>
- Miller, W.R., Munita, J.M., Arias, C.A., 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12, 1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
- Monticelli, J., Knezevich, A., Luzzati, R., Di Bella, S., 2018. Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. *J. Infect. Chemother.* 24, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.01.001>

- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R., 2006. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *Int. Dairy J.* 16, 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.005>
- Morvan, A., Moubareck, C., Leclercq, A., Hervé-Bazin, M., Bremont, S., Lecuit, M., Courvalin, P., Le Monnier, A., 2010. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2728–2731. <https://doi.org/10.1128/AAC.01557-09>
- Moure, Z., Lara, N., Marín, M., Sola-Campoy, P.J., Bautista, V., Gómez-Bertomeu, F., Gómez-Dominguez, C., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., Campos, J., Cercenado, E., Oteo-Iglesias, J., 2020. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxxA* genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 105977. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105977>
- Muñoz-Atienza, E., Araújo, C., Campo, R. del, Hernández, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M., 2016. Safety assessment and molecular genetic profiling by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and PCR-based techniques of *Enterococcus faecium* strains of food origin. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.038>
- Nakamura, T., Ishikawa, K., Matsuo, T., Kawai, F., Uehara, Y., Mori, N., 2021. *Enterococcus hirae* bacteremia associated with acute pyelonephritis in a patient with alcoholic cirrhosis: a case report and literature review. *BMC Infect. Dis.* 21, 999. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06707-2>
- Nicolich, R.S., Werneck-Barroso, E., Marques, M.A.S., 2006. Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 565, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.105>
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Chicón, R., Cabezas, L., Palop, L., 2011. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol.* 28, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.005>
- Nishimoto, Y., Kobayashi, N., Alam, M.M., Ishino, M., Uehara, N., Watanabe, N., 2005. Analysis of the Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese Hospital. *Microb. Drug Resist.* 11, 146–153. <https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.146>
- O’Neill, J., 2015. Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste; The Review on Antimicrobial Resistance.
- OECD, 2019. Antimicrobial Resistance, Tackling the burden in the European Union. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD.
- Ogier, J., Serror, P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus☆. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>

- Olive, D.M., Bean, P., 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1661–1669. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1661-1669.1999>
- Olson, N.D., Morrow, J.B., 2012. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res. Notes* 5, 668. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
- Oromí, J., 2000. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Editorial* 36, 367–370.
- Ortigosa, M., Irigoyen, A., Urdin, M., García, S., Ibañez, F.C., Torre, P., 2008. Sources of enterococci in Idiazábal-type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.035>
- Osman, K.M., Badr, J., Orabi, A., Elbehiry, A., Saad, A., Ibrahim, M.D.S., Hanafy, M.H., 2019. Poultry as a vector for emerging multidrug resistant *Enterococcus* spp.: First report of vancomycin (van) and the chloramphenicol–florfenicol (cat-fex-cfr) resistance genes from pigeon and duck faeces. *Microb. Pathog.* 128, 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.006>
- Oviaño, M., Rodríguez, B., Caballero, J. de D., Muñoz, J.L., 2019. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. Oviaño M (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado E, Cantón R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2019.
- Palomino-Camargo, C., González-Muñoz, Y., 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* 31. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.313.93>
- Pesavento, G., Calónico, C., Ducci, B., Magnanini, A., Lo Nostro, A., 2014. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiol.* 41, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.008>
- Pinkes, M.E., White, C., Wong, C.S., 2019. Native-valve *Enterococcus hirae* endocarditis: a case report and review of the literature. *BMC Infect. Dis.* 19, 891. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4532-z>
- Pino, A., Liotta, L., Randazzo, C.L., Todaro, A., Mazzaglia, A., De Nardo, F., Chiofalo, V., Caggia, C., 2018. Polyphasic approach to study physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of artisanal Nicastrese goat's cheese. *Food Microbiol.* 70, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.005>
- Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopouloutzanetaki, E., 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.027>

- Quiñones, D., Kobayashi, N., Nagashima, S., 2009. Molecular Epidemiologic Analysis of *Enterococcus faecalis* Isolates in Cuba by Multilocus Sequence Typing. *Microb. Drug Resist.* 15, 287–293. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0028>
- Rao, C., Dhawan, B., Vishnubhatla, S., Kapil, A., Das, B., Sood, S., 2020. Emergence of high-risk multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* CC2 (ST181) and CC87 (ST28) causing healthcare-associated infections in India. *Infect. Genet. Evol.* 85, 104519. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104519>
- Reglamento (UE) 1831/2003, n.d. , de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. L 268/29, de 18 de Octubre de 2003.
- Reglamento (UE) 2019/6, de 11 de diciembre de 2018, sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, número L 4/43, de 7 de Enero de 2019., n.d.
- Rehaim, A., Fhoula, I., Slim, A.F., Ben Boubaker, I.B., Chihi, A.B., Ouzari, H.-I., 2016. Prevalence, acquired antibiotic resistance and bacteriocin production of *Enterococcus* spp. isolated from tunisian fermented food products. *Food Control* 63, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.034>
- Rios, R., Reyes, J., Carvajal, L.P., Rincon, S., Panesso, D., Echeverri, A.M., Dinh, A., Kolokotronis, S.-O., Narechania, A., Tran, T.T., Munita, J.M., Murray, B.E., Planet, P.J., Arias, C.A., Diaz, L., 2020. Genomic Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) in Latin America: Revisiting The Global VRE Population Structure. *Sci. Rep.* 10, 5636. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62371-7>
- Rossetti, L., Giraffa, G., 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Methods* 63, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.001>
- Ruiz Ripa, L., 2020. Epidemiología molecular de *Staphylococcus* spp. desde un enfoque One Health: genes emergentes e inusuales de resistencia a antibióticos y de virulencia. Tesis doctoral. Universidad de la Rioja.
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M.J.M., Robinson, D.A., Top, J., Nallapareddy, S.R., Torres, C., Coque, T.M., Cantón, R., Baquero, F., Murray, B.E., del Campo, R., Willems, R.J.L., 2006. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecalis* Reveals Hospital-Adapted Genetic Complexes in a Background of High Rates of Recombination. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2220–2228. <https://doi.org/10.1128/JCM.02596-05>
- Russo, N., Caggia, C., Pino, A., Coque, T.M., Arioli, S., Randazzo, C.L., 2018. *Enterococcus* spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano cheese types: A snapshot of their antibiotic resistance distribution. *Food Chem. Toxicol.* 120, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.023>
- Saavedra, S.Y., Bernal, J.F., Montilla-Escudero, E., Torres, G., Rodríguez, M.K., Hidalgo, A.M., Ovalle, M.V., Rivera, S., Perez-Gutierrez, E., Duarte, C., 2020. Vigilancia

- nacional de aislamientos clínicos de *Enterococcus faecalis* resistentes al linezolid portadores del gen *oprA* en Colombia, 2014-2019. *Rev. Panam. Salud Pública* 44, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.104>
- Sabnis, A., Hagart, K.L., Klöckner, A., Becce, M., Evans, L.E., Furniss, R.C.D., Mavridou, D.A., Murphy, R., Stevens, M.M., Davies, J.C., Larrouy-Maumus, G.J., Clarke, T.B., Edwards, A.M., 2021. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *eLife* 10, e65836. <https://doi.org/10.7554/eLife.65836>
- Saito, N., Kitazawa, J., Horiuchi, H., Yamamoto, T., Kimura, M., Inoue, F., Matsui, M., Minakawa, S., Itoga, M., Tsuchiya, J., Suzuki, S., Hisatsune, J., Gu, Y., Sugai, M., Kayaba, H., 2021. Interhospital Transmission of Vancomycin-resistant *Enterococcus Faecium* in Aomori, Japan (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-929573/v1>
- Sanchez, I., Sesena, S., Palop, L.L., 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *J. Appl. Microbiol.* 97, 446–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02324.x>
- Sánchez Valenzuela, A., Benomar, N., Pérez Pulido, R., Hikmate, A., Gálvez, A., 2009. Resistencia a antimicrobianos en enterococos Aislados de alimentos de origen animal, pescado y mariscos. *Anales Vol. 22 (1); Dic 2009; Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía oriental.*
- Schnellmann, C., Gerber, V., Rossano, A., Jaquier, V., Panchaud, Y., Doherr, M.G., Thomann, A., Straub, R., Perreten, V., 2006. Presence of New *mecA* and *mph* (C) Variants Conferring Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* spp. Isolated from the Skin of Horses before and after Clinic Admission. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4444–4454. <https://doi.org/10.1128/JCM.00868-06>
- Schulthess, B., Brodner, K., Bloemberg, G.V., Zbinden, R., Böttger, E.C., Hombach, M., 2013. Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Comparison of Different Preparation Methods and Implementation of a Practical Algorithm for Routine Diagnostics. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1834–1840. <https://doi.org/10.1128/JCM.02654-12>
- SEIMC, 2020. Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos; Procedimiento de Microbiología Clínica; Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- SEIMC, 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos; Procedimiento de Microbiología Clínica; Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

- SEIMC, 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos; Procedimientos en Microbiología Clínica; Recomendaciones de la sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (SEIMC).
- Sirichoat, A., Flórez, A.B., Vázquez, L., Buppasiri, P., Panya, M., Lulitanond, V., Mayo, B., 2020. Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus* spp. From the Human Vagina, and Genome Analysis of the Genetic Basis of Intrinsic and Acquired Resistances. *Front. Microbiol.* 11, 1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01438>
- Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Howard, J., Woodford, N., 2000. Mechanisms of Resistance to Quinupristin-Dalfopristin among Isolates of *Enterococcus faecium* from Animals, Raw Meat, and Hospital Patients in Western Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 433–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.2.433-436.2000>
- Stahl, J.-P., 2017. Lincosamidas. *EMC - Tratado Med.* 21, 1–4. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(17\)86925-7](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(17)86925-7)
- Stępień-Pyśniak, D., Hauschild, T., Dec, M., Marek, A., Brzeski, M., Kosikowska, U., 2021. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* from yolk sac infections in broiler chicks. *Poult. Sci.* 100, 101491. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101491>
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T., 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J. Appl. Microbiol.* 89, 267–274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01120.x>
- Sweeney, M.T., Lubbers, B.V., Schwarz, S., Watts, J.L., 2018. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1460–1463. <https://doi.org/10.1093/jac/dky043>
- Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., Wang, S., Grys, T.E., Haydel, S.E., Tao, N., 2017. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics* 7, 1795–1805. <https://doi.org/10.7150/thno.19217>
- Tedim, A.P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodríguez, C.M., Cantón, R., Willems, R.J., Baquero, F., Coque, T.M., 2015. Population Biology of Intestinal *Enterococcus* Isolates from Hospitalized and Nonhospitalized Individuals in Different Age Groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1820–1831. <https://doi.org/10.1128/AEM.03661-14>
- Templer, S.P., Baumgartner, A., 2007. Enterococci from Appenzeller and Schabziger Raw Milk Cheese: Antibiotic Resistance, Virulence Factors, and Persistence of Particular Strains in the Products. *J. Food Prot.* 70, 450–455. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.450>
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>

- Terentjeva, M., Streikiša, M., Avsejenko, J., Trofimova, J., Kovaļenko, K., Elferts, D., Bērziņš, A., 2019. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. and the Major Foodborne Pathogens in Calves in Latvia. *Foodborne Pathog. Dis.* 16, 35–41. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2523>
- Thumu, S.C.R., Halami, P.M., 2014. Phenotypic expression, molecular characterization and transferability of erythromycin resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from naturally fermented food. *J. Appl. Microbiol.* 116, 689–699. <https://doi.org/10.1111/jam.12386>
- Torres, C., Alonso, C.A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R., Coque, T.M., 2018. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018>
- Torres, C., Cercenado, E., 2010. Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 28, 541–553. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.003>
- Torres, E., Pérez, S., Vindel, A., Rodríguez-Baño, J., Camba, V., Villanueva, R., Coque, T.M., Bou, G., 2009. Enterococcus faecium resistente a glucopéptidos en un hospital del norte de España. Caracterización molecular y epidemiología clínica. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 27, 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.09.014>
- Torres Manrique, C., 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Presented at the Acto de recepción académica 2012, Zaragoza.
- Tyson, G.H., Zhao, S., Li, C., Ayers, S., Sabo, J.L., Lam, C., Miller, R.A., McDermott, P.F., 2017. Establishing Genotypic Cutoff Values To Measure Antimicrobial Resistance in Salmonella. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. <https://doi.org/10.1128/AAC.02140-16>
- Valdezate, S., Labayru, C., Navarro, A., Mantecón, M.A., Ortega, M., Coque, T.M., García, M., Saéz-Nieto, J.A., 2009. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 Enterococcus faecium containing Tn5382 in a Spanish hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 17–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn449>
- Van de Klundert, J.A., Vliegthart, J.S., 1993. Nomenclature of aminoglycoside resistance genes: a comment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 927–928. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.4.927>
- Vandera, E., Parapouli, M., Kakouri, A., Koukkou, A.-I., Hatziloukas, E., 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 Microbiol.* 86, 103335. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103335>
- Werner, G., Coque, T.M., Franz, C.M.A.P., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., van Schaik, W., Weaver, K., 2013. Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 360–379. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.03.001>

- WHO, 2021. Orientaciones normativas de la OMS sobre las actividades integrales para la optimización de los antimicrobianos. World Health Organization, WHO. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- WHO, 2019a. Critically important antimicrobials for human medicine. World Health Organization (WHO), 6th rev. ed. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2019b. Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/WSI/AMR/2019.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO, 2016a. United Nations meeting on antimicrobial resistance. World Health Organization, WHO. Bull. World Health Organ. 94, 638–639. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.020916>
- WHO, 2016b. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. World Health Organization (WHO). Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Wisell, K.T., Kahlmeter, G., Giske, C.G., 2008. Trimethoprim and enterococci in urinary tract infections: new perspectives on an old issue. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 35–40. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn147>
- Wittwer, C.T., 2017. Democratizing the Real-Time PCR. *Clin. Chem.* 63, 924–925. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.263269>
- Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M., 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736–755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Wright, G.D., 2010. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* 8, 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
- Xu, Y., Guo, C., Lv, J., Hou, S., Luo, Y., Zhang, Y., Xu, J., 2018. Spatiotemporal profile of tetracycline and sulfonamide and their resistance on a catchment scale. *Environ. Pollut.* 241, 1098–1105. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.050>
- Yaghoubi, S., Zekiy, A.O., Krutova, M., Gholami, M., Kouhsari, E., Sholeh, M., Ghafouri, Z., Maleki, F., 2021. Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04121-1>
- Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Wang, X., Yan, Z., Li, H., Li, J., 2019. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J. Dairy Sci.* 102, 140–144. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14576>
- Zaheer, R., Cook, S.R., Barbieri, R., Goji, N., Cameron, A., Petkau, A., Polo, R.O., Tymensen, L., Stamm, C., Song, J., Hannon, S., Jones, T., Church, D., Booker, C.W.,

-
- Amoako, K., Van Domselaar, G., Read, R.R., McAllister, T.A., 2020. Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Sci. Rep.* 10, 3937. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5>
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H., Sun, Z., 2017. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiol. Res.* 196, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.009>
- Zhou, X., Willems, R.J.L., Friedrich, A.W., Rossen, J.W.A., Bathoorn, E., 2020. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 9, 130. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00770-1>
- Zhu, X.-Q., Wang, X.-M., Li, H., Shang, Y.-H., Pan, Y.-S., Wu, C.-M., Wang, Y., Du, X.-D., Shen, J.-Z., 2016. Novel *lnu* (G) gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation, located on Tn 6260 from *Enterococcus faecalis* E531. *J. Antimicrob. Chemother.* dkw549. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw549>



Anexos

6 ANEXOS

Anexo I. Optimización del método RT PCR para el estudio genotípico de resistencia en *Enterococcus* spp.

El objetivo de este estudio fue optimizar las condiciones de análisis para la detección rápida de 19 determinantes genéticos de RAM en *Enterococcus* spp. por RT PCR con la sensibilidad y especificidad requeridas.

Evaluación espectrofotométrica del ADN aislado en las cepas diana de referencia

En biología molecular, el método de extracción de los ácidos nucleicos es una de las etapas críticas ya que determina la cantidad y la pureza del ADN obtenido. Por ello, tras realizar la extracción de ADN genómico y ADN plasmídico, y previo a la optimización de la amplificación por RT PCR, se evaluó la cantidad y pureza del ácido nucleico obtenido.

En la **Tabla 21** se muestran los valores del ratio A_{260}/A_{280} indicador de la pureza del ADN, así como la concentración estimada de ADN total y plasmídico determinada a partir del valor de absorbancia a 260 nm, para cada una de las 14 cepas de referencia.

En todos los casos se utilizó el método de extracción de ADN genómico descrito (método 1) excepto para *Staphylococcus aureus* C2548; en este caso, dado que no se logró la amplificación de ADN genómico obtenido con el método 1, se empleó el método basado en lisostafina y proteinasa K (método 2). Este método se recomienda para la extracción de ácidos nucleicos en *Staphylococcus* spp. debido a la capacidad de la lisostafina para lisar la pared celular de este género bacteriano, sobre todo cuando otros agentes lisantes incorporados en los productos comerciales no son suficientemente eficaces (SEIMC, 2000).

La cantidad estimada de ADN total y ADN plasmídico obtenida osciló en los rangos 37-580 ng/ μ L y 4-51,2 ng/ μ L, respectivamente. En todos los casos, los ratios A_{260}/A_{280} estuvieron comprendidos entre 1,7 y 2,1, indicando un grado de pureza óptimo del ADN obtenido con los productos comerciales utilizados.

Tabla 21. Concentración y pureza del ADN total y plasmídico obtenido de las cepas diana de referencia.

Cepas de referencia	ADN Total		ADN Plasmídico	
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[ADN] ng/μL	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[ADN] ng/μL
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,9	196,0	1,8	9,0
<i>Staphylococcus aureus</i> C1923	2,0	237,0	1,8	9,0
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	2,1	167,0	2,0	15,0
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	1,9	164,0	1,7	4,0
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	2,0	198,0	1,7	7,0
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	2,0	185,0	1,9	36,0
<i>Staphylococcus aureus</i> C2944	2,0	170,0	1,8	10,0
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	1,7	55,0	1,9	30,0
<i>Enterococcus faecalis</i> C3679	1,8	37,5	1,7	18,8
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 5253	1,7	14,5	1,7	23,0
<i>Enterococcus faecium</i> C1708	1,8	217,5	1,8	24,6
<i>Staphylococcus hominis</i> C5862	2,0	293,9	1,8	43,3
<i>Staphylococcus aureus</i> C4159	2,1	322,8	2,0	21,4
<i>Enterococcus faecium</i> C10004	2,0	580	1,9	51,2

A₂₆₀ = Absorbancia a 260 nm; A₂₈₀ = Absorbancia a 280 nm

Especificidad de los cebadores

La especificidad de los cebadores se evaluó para cada uno de los genes de resistencia mediante el análisis de la curva de fusión generada tras la amplificación del ADN genómico y plasmídico (Figura 45). En todos los casos se apreció el producto de amplificación de interés y la ausencia de estructuras secundarias correspondientes a la amplificación de productos inespecíficos o hibridaciones inapropiadas. La temperatura de fusión (T_m) obtenida para los productos específicos de amplificación estuvo comprendida entre 74 °C y 88 °C.

Con este análisis se pudo establecer el valor de T_m utilizado para la detección específica de cada determinante genético de RAM y se adoptó el criterio de considerar una cepa portadora del gen si se detectaba un fragmento amplificado cuya temperatura de fusión se correspondía con el valor establecido para la cepa de referencia +/- 1 °C.

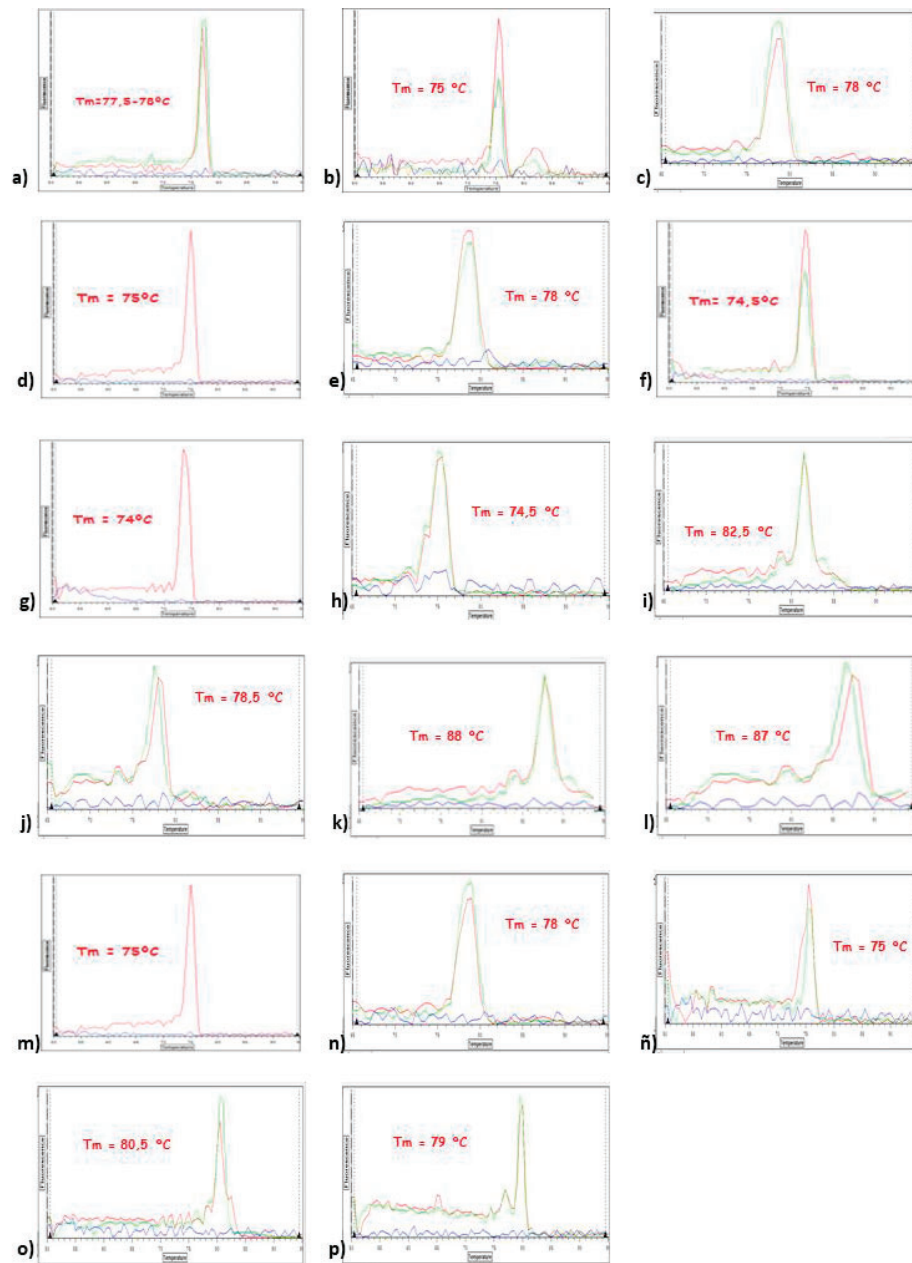


Figura 45. Curvas de fusión y valores de T_m de los genes de resistencia amplificados.

Rojo ADN total, verde ADN plasmídico, azul Control negativo

a) gen *mef A*; b) gen *tet M*; c) gen *tet L*; d) gen *erm A*; e) gen *erm B*; f) gen *msr A*; g) gen *lnu A*; h) gen *lnu B*; i) gen *ant(6)-la*; j) gen *van B*; k) gen *aac(6)-le-aph(2'')-la*; l) gen *van A*; m) gen *cat A*; n) gen *cat_{pC194}*; ñ) gen *cat_{pC221}*; o) gen *fex A*; p) gen *fex B*.

Ante la imposibilidad de disponer de cepas diana de referencia portadoras de los genes *vat D* y *vat E*, la T_m para la detección de dichos determinantes genéticos se estableció experimentalmente con

las cepas de enterococos objeto de estudio, analizando las curvas de fusión obtenidas tras la amplificación con los cebadores *vat D* y *vat E*. Dichos valores fueron 81,5 °C (*vat D*) y 80 °C (*vat E*) (Figura 46).

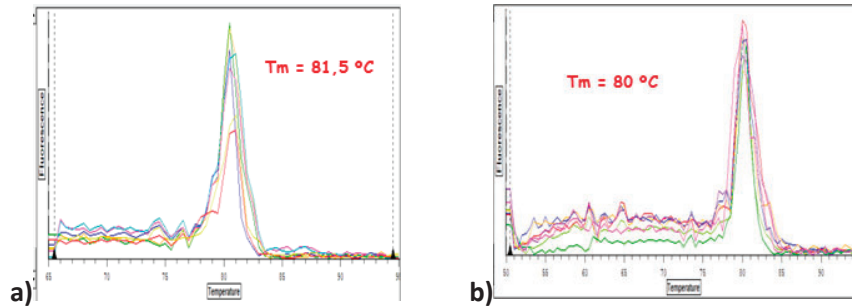


Figura 46. Curvas de fusión y T_m obtenidas tras la amplificación de ADN total y ADN plasmídico de *Enterococcus* spp.
a) cebador *vat D*; b) cebador *vat E*

En todos los casos la especificidad de los cebadores fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa después de llevar a cabo una PCR convencional con las mismas condiciones analíticas. Para todos los cebadores, el análisis evidenció una banda única definida, revelando que el tamaño de los productos amplificados coincidía con el tamaño esperado para cada gen estudiado. En la **Figura 47** aparecen representados a modo de ejemplo los productos de amplificación obtenidos con los cebadores *ant(6)*-Ia, *van A*, *van B*, *cat A*, *aac(6')*-Ie-*aph(2'')*-Ia, *erm B*, *erm A* y *cat*_{pC221}.

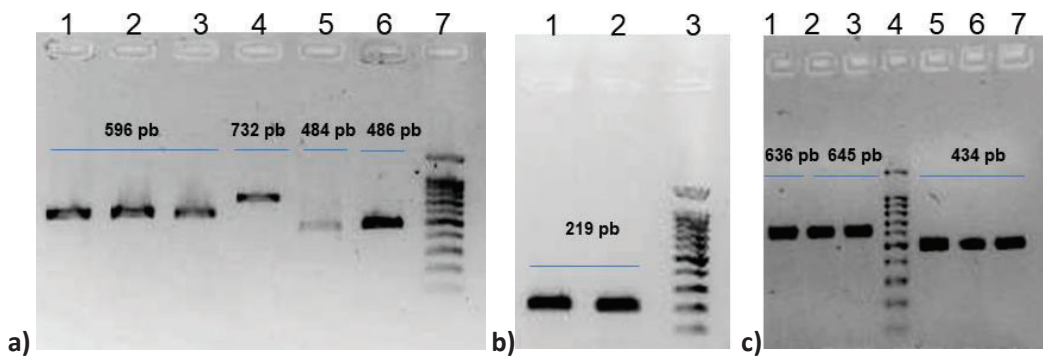


Figura 47: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación obtenidos con los cebadores.
a) Línea 1, 2 y 3: *ant(6)*-Ia; línea 4: *van A*; línea 5: *van B*; línea 6: *cat A*; línea 7: marcador de peso molecular;
b) Línea 1 y 2: *aac(6')*-Ie-*aph(2'')*-Ia; línea 3: marcador de peso molecular; c) Línea 1: *erm B*; línea 2 y 3: *erm A*; línea 4: marcador de peso molecular; línea 5, 6 y 7: *cat A*; línea 7: *cat*_{pC221}.

Adicionalmente, se llevó a cabo la secuenciación de cada uno de los productos amplificados con los cebadores específicos con el fin de confirmar mediante herramientas *in silico* BLAST la especificidad de la reacción optimizada (Bustin et al., 2009; Green and Sambrook, 2018).

El alineamiento de las secuencias obtenidas mostró numerosas alineaciones con las secuencias depositadas en las bases de datos de NCBI, con una similitud de entre el 90 y el 99 % (Tabla 22). En todos los casos las secuencias correspondieron a fragmentos del genoma que codifican los genes de RAM objeto de estudio. El valor *expect* informó del número de alineamientos que han podido deberse al azar, por lo que, en este caso, con valores cercanos a cero se pudo concluir que todos los alineamientos fueron debidos a una relación biológicamente significativa y por tanto se confirmó la identidad de cada amplicón.

Tabla 22. Resultados del análisis *in silico* de las secuencias de bases nitrogenadas obtenidas a partir de la secuenciación de cada uno de los amplicones obtenidos durante la optimización de la reacción de amplificación de cada uno de los determinantes genéticos de resistencia estudiados

GEN	SECUENCIA	% SIMILITUD	EXPECT VALUE	Nº ACCESO GENBANK
<i>mef A</i> ADN total	gagcgatatttttactacagaaaacaggatctgcatggcttctctatggcttcattagtaggttttttac cctatgcatgtttgggacctgccattggtgctgctagtgatcgtcatgtaggaagaagataatgattggtg ccgattaattatcgagcagctgggagcagctgctgctattgttcattctgtaggagctacctgctgcatg attatgatagtagttttatccgtagcattggaacagctttcatccccagcactcaatgctggttacaccac ttttataccc	300/305 98%	1e-146	MT345176. 1
<i>mef A</i> ADN Plasmídico	tatcgatatttttactacagaaaacaggatctgcatggcttctctatggcttcattagtaggttttttac cctatgcatgtttgggacctgccattggtgctgctagtgatcgtcatgtaggaagaagataatgattggtg ccgattaattatcgagcagctgggagcagctgctgctattgttcattctgtaggagctacctgctgcatg attatgatagtagttttatccgtagcattggaacagctttcatccccagcactcaatgctggttacaccac ttttatacccagaagaa	307/311 99%	3e-152	LR216014.1
<i>msr A</i> ADN total	gskrcttgwaccgatagaggattgwtgttctcctaaagtcaaatggcactactatcgtaactgcttatt gaagcywygctgacgtttcattatgcaaatattaatggatgaacggattcatcagaatcattcagtag agctatttaataacttgggttaaatgaagcactgactgcttctgtaattgtttgagtggtgggaaaga acgaaattatcgtagcattattttcaacgaaagcgaatattgtaatttggatgaaccaactaatttttt agatattaaacattagaagcattagaatgtttatgaataaatctcggatcattttgcttccatg	335/342 98%	4e-167	MN120434. 1
<i>msr A</i> ADN Plasmídico	tkrcattaccgatagaggattgattgttctcctaaagtcaaatggcactactatcgtaactgcttattg aagacatgctgacgtttcattatgcaaatattaatggatgaacggattcatcagaatcattcagtagag ctatttaataacttgggttaaatgaagcactgactgcttctgtaattgtttgagtggtgggaaagaac gaaattatcgtagcattattttcaacgaaagcgaatattgtaatttggatgaaccaactaattttta gatattaaacattagaagcattagaatgtttatgaataaatctcggatcattttgcttccatg ata	360/366 98%	8e-179	MN120434. 1
<i>erm A</i> ADN total	ttggaaaaaagaacaactgttattcacgggttaccactatacaaaaaaaaaaagggtactttttgt agtcctctttgaaatcaatgttccgatgctgtcaagaacaatcaatacagagctctacactggcttaggat gaaaatagtagtggtactttttgagcattttatattcattcctcaccattaatagtaaaccaagctcgt tgcagattttgcaatcttttcgaaatccttctcaacgataagatagctataattagcctgacttcaaggt aattctttgacaataatccgtactgatttataaggaataattaccatatacttatagtttatagttttgggaa ggaaaatttaaaatccgttggatcccttttaattctcgggggtttaaccgttcttagcccttgaa	524/589 90%	0,0	NG_047789. 1

	ataagcctcattcattttaaagccggaactgccaatccatttggataggtcttggaaaaatggcctt tcctgaaccaatccaataagttggcctggttaaggaaattcggggagtcaaaaattctttaaattccttt aaaaaa			
erm B	agcatgaacagtaaccgataccgagkgaattgattgkcycckaagtgrmatgkmatacyatcaccgr cttgctatgtagaatgcawgacgtttgtattgacagatttcwagtctgaaackattcracaaaatcatt cagaagagctatgyamataaactggggtgaatgaagcacttgatcttctgwmattykagagagr wgattgaagaaagaatcctyacyattwragywctttwctwatwaagcaagtgkktttktaagctk gccccwsacatctcatcagattgtaaaagaaggattccatagaaatgyttatgaatwcatctcgcgaatc attttctgmyccatgatctcagcaatgcttaagctgccagcggaaatgctttcatcctaaacca aaagtaaacagtgcttaataaaacttaccgcataaccacagatgttccagataaataatgggaagctata tacgtactttgttcaaaatgggcaatcgagaatactgcaactgtttactaaaaatcagtttcatcaagca atgaaacacgccaagtaacaatttaagaaccttact	236/237	7e-117	EU168280.1
ADN total		99%		
erm B	agaaattcaagaaccgataccgtttacgaattggaacaggtaaagggcatttaacgacgaaactggcga aaataagtaaacaggtacgtctattgaattagacagctatcttcaacttctgcagaaaaataaaa ctgaacaattcgtgtactttaattaccaagatattctacagtttcaattcccaacaacagaggtataaaa ttgttgggagttacccttaagcacaacaaatataaaaaagtggttttgaagccatgcgctga catctatctgatttgaagaaggattctacaagcgtacctggatattcaccgaaacactaggggtgctctg caactcaagctcagcgaattgcttaagctccagcggaaatgctttactcaaaacccaagaatgaaac agtgcttaataaaaacttaccgccataccacagatgttccagataaataatgggaagctatactgacttt gtttcaaaatgggcaatcgagaatactgcaactgtttactaaaaatcagtttcatcaagcaatgaaacac gccaagtaacaatttaagctaccgttac	602/606	0,0	MG252535. 1
ADN Plasmídico		99%		
Inu A	acccaaggaggacacagagatagatagatttggacgctcaacacactcaaaaagtatacaaaaat tagaagatctcgatacaaaaatagaagttgattggatcctcagatggaacttaagcatgaagaat gggtatttagatattcctataaactcaaatgatgatggatcaattaccaagcaaaaccagaaggtggt aattatgttttcaaaaatgactggttttcagaaactaattcaaaaggtcgaaaaaatccatgtattcaaaa gaagc	285/287	2e-143	NG_047916. 1
ADN total		99%		
Inu A	ccccaggagaaacagagatagatagatttggacgctcaacacactcaaaaagtatacaaaaat agaagatacggatacaaaaatagaagttgattggatcctcagatggaacttaagcatgaagaat gggtatttagatattcctataaactcaaatgatgatggatcaattaccaagcaaaaccagaaggtggt atattgttttcaaaaatgactggttttcagaaactaattcaaaaggtcgaaaaaatccatgtattcaaaa aagca	285/287	9e-12	NG_047916. 1
ADN Plasmídico		99%		
Inu B	gtaaaaataaattgtacgaaaataaatttaggtttgtagagatttggattgcccacaataactaaaagat atttacatgaaagggtgaagaatgttaaaacaaaagaattaattgcaaacgttaagaatcttactgagt cagatgaacgaattacagcttgatgatgatggatcgtttaccaaaggagaagtgaccaatactctgat atagagttctatataattttgaaagatagataaacctcgaaacttgatcatccaactggtttgtgacgtgac tccgtactgatgctttataaaaatgagtcggaacagaggtagttattttgataacttatacgtggggaa tttcttcttctgaaaaagatagaacataatccccctgttaaaagattcaggttatactctgatacga ggctatgcttattacgatgaaacagggcaattagaaaaatattatcagagataagtggtgcaagaccaa atagacttctgaagaaaatgctaatttttgggtgtaattctctaactatggtgatgggaatcaacgtt ctaaaaagaggagaatgctcgttcatagaaactttatcacaactcaaaaaatacactacaacttat acgtatggcagaaaaaatgctgataattggctaaacatgagtaaaacctgaaaaagaatagcctt gaaaaataaaaaatttgcaagaccactgctgattagataaggtagaattttgaaacctataaaaa ttcttgctattagttaggattgcaagtcacttattgacaatacaacttaaaagtacacatgacatt tagaaaagattgtgaattacattagtagaaggaaatttaacgttataataa	906/911	0,0	NG_047923. 1
ADN total		99%		
Inu B	gtaaaaataaattgtacgaaaataaatttaggtttgtagagatttggattgcccacaataactaaaagat atttacatgaaagggtgaagaatgttaaaacaaaagaattaattgcaaacgttaagaatcttactgagt cagatgaacgaattacagcttgatgatgatggatcgtttaccaaaggagaagtgaccaatactctgat atagagttctatataattttgaaagatagataaacctcgaaacttgatcatccaactggtttgtgacgtgac tccgtactgatgctttataaaaaatgagtcggaacagaggtagttattttgataacttatacgtggggaa tttcttcttctgaaaaagatagaacataatccccctgttaaaagattcaggttatactctgatacga ggctatgcttattacgatgaaacagggcaattagaaaaatattatcagagataagtggtgcaagaccaa atagacttctgaagaaaaatgctaatttttgggtgtaattctctaactatggtgatgggaatcaacgtt ctaaaaagaggagaatgctcgttcatagaaactttatcacaactcaaaaaatacactacaacttat acgtatggcagaaaaaatgctgataattggctaaacatgagtaaaacctgaaaaagaatagcctt gaaaaataaaaaatttgcaagaccactgctgattagataaggtagaattttgaaacctataaaaa	906/911	0,0	NG_047923. 1
ADN Plasmídico		99%		

	ttcttcttattagttatggattgcaaaagtcaccttattgaacaatacaactaaaagttacacatgacatt tagaaagattgtgaattacattagtaagtagaaatttaacgttataataa			
ant(6)-la	caaagccggaagaatggaattattcccacctgaagaaaaggattttcctatcttctatttgatgatt acaataaaattgacttcttattgccccttggagagttagataattacctaaggcgataaataataa aggttctaattgataaagattgtagaattaaaaggacatagttccgactgatagattatcatgtaaga aagccaagcgcaaggagtagatgattgctcaatgaatttggatgtaaaccttattgattataaagg attgtgccgtaagaaattttattgctattgatcatttaacagattgctccatgagctgctgagaatga tatcatggaaggtcggcatcgaacaggctttaaattaagtgtaggcaagaactataagttattgaaagg tatataccgagatttggggagaactttgtccactaccggatgattcctatgaaaacatagggaa gcattattctatgcatcaattgttcaggcggtatccggtgaggtggcggaaaggcaaaaatgaag	558/560	0,0	KY788643.1
ADN total		99%		
ant(6)-la	gcagcggagaagaatggaattattcccacctgaagaaaaggattttcctatcttctatttgatgattac aataaaattgacttcttattgccccttggagagttagataattacctaaggcgataaataataaag gttctaattgataaagattgtagaattaaaaggacatagttccgactgatagattatcatgtaagaaa gccaagcgcaaggagtagatgattgctcaatgaatttggatgtaaaccttattgattataaaggatt gtgccgtaagaaattttattgctattgatcatttaacagattgctccatgagctgctgagaatgat catggaaggtcggcatcgaacaggctttaaattaagtgtaggcaagaactataagttattgaaaggat atctccgagatttggggagaactttgtccactaccggatggattcctatgaaaacatagggaaagc attattctatgcatcaattgttcaggcggtatccggtgaggtggcggaaaggcaaaaagag	554/558	0,0	KY788643.1
ADN Plasmídico		99%		
aac(6')-le-aph(2'')-la	ttgccagaacatgaattacacgaggcgaagaaagaagattgtaatttaaggaatagatgatgataa tgccacaattgtaagcaatgaaatattaatgagcattacttataatgataattcaagtagatagattga aataatcgtagtgattgatagtg	169/169	2e-81	KY788648.1
ADN total		100%		
aac(6')-le-aph(2'')-la	attattgaanattgccagaacatgaattacacgaggcgaagaaagaagattgtaatttaaggaatag atagatgataatgccacaattgtaagcaatgaaatattaatgagcattacttataatgataattcaag agatagattgaaataatcgtagtgattgatagtg	180/181	7e-87	KY788648.1
ADN Plasmídico		99%		
van A	cccgaaaaaatgcacggattactgttataaagaacatgaatataaaatcaacctgttgatgtagcat tttcagcttgcagcaagtcaggtgaagtgatccatacaaggtctgttgaattgctccggtatcccttt gtagctgcgataatcaagctcagcaattgtatggacaatcgttgacatacatcgttgcgaaaaatgct gggatagctactccgctttgggttataaataagatgataggccggtggcagctactgtttacatcctg ttttgttaagccggcgcgttcaggctcctcctcgtgtgaaaaagtcaatagcgggacgaattggact acgcaattgaatcgcaagacaatagacagcaaatcttaattgagcaggtcttccggctgtagggtc gggtgtcggtattgggaacagtcgctgttagttgttggcaggtggaccaatcaggctgtagtacgg aatcttctgattcatcaggaagtcgagccgaaaaaggctctgaaaaagcagttataaccttcccgag acctttcagcagaggcagggacggatagcaggaacggcaaaaaaatataaagcctggtgta gaggtctagccgtgtgatatgttttaagaataacggcgcattgtacaccctt	690/690	0,0	LC517537.1
ADN total		100%		
van A	aaatgcacggattactgttataaagaacatgaatataaaatcaacctgttgatgtagcattttcagctt tgcagcaagtcaggtgaagtgatccatacaaggtctgttgaattgctccggtatccctttttaggctg cgatatacaagctcagcaattgtatggacaatcgttgacatacatcgttgcgaaaaatgctggatag ctactccgcttttgggttataaataagatgataggccggtggcagctactgtttacatcctggtttgtt aagccggcgcgttcaggctcctcctcgtgtgaaaaagtcaatagcgggacgaattggactacgcaa ttgaatcgcaagacaatagacagcaaatcttaattgagcaggtcttccggctgtagggtcgggtgtg cggtattgggaacagtcgctgttagttgttggcaggtggaccaatcaggctgtagtacggaatctt cgtattcatcaggaagtcgagccgaaaaaggctctgaaaaagcagttataaccttcccgagaccttc agcagaggagcagggacggatagcaggaacggcaaaaaaatataaagcctc	629/629	0,0	CP040742.1
ADN Plasmídico		100%		
van B	cggggctaattctcaaaaatcgggcatcgccttccgaattcaaatattgataaagggtgacaagcc ggaggcgggtgccttacctaccctgtcttggtaagccggcaggtcaggtctgcttggcgttaacaa agttaacggtagcgaagaacttaacgctcgatagaagcggcaggaacaatagatgaaaaatcttaatt gagcaagcagattcgggctgtgaggtcgggtgtcggtcatggggaacgaggtgattgtgctggcga agtggatcaaatcggctgagccaggtatcttcgcatccatcaggaacagcagggaaaaaggctca gaaaatgcatgattacagttccgcagacattccgctgaggaacgaaatcgggtgcaggaacggca aagaaagtatatcgggtgttggatgcaaa	447/453	0,0	KT003970.1
ADN total		99%		

van B	cggggctaattcttcaaaaatcggggcatcggcttcccgaattcaaatattgataaaggtagacaagcc ggaaggcgggtgccttacctcctgtcttggtaagccggcacgggtcagggttcctttggcgtaaccaa agtaaacgggtacggaagaacttaacgctgcgatagaagcggcaggacaataatgagtaaaaaacttaatt	447/453	0,0	KT003970.1
ADN	gagcaagcgtattcgggctgtgaggtcgggtgtcgggtcatggggaacgaggatgattgattgctggcga agtggatcaaatcgggctgagccacgggtatcttcgcatccatcaggaaaaagcgggaaaaaggctca gaaaatgcgatgattacagttcccgacagattccggctcaggaaacgaaatcggggtcaggaaacggca aagaaagtatatcgggtgttgggatgcaaa	99%		
Plasmídico				
cat A	gtagatgaatgggtttagaacaggaattaatagtgagaataaattaggtattgggataagttaaatccttt gtatacagttttaataagcaaaactgaaaaattactaacattggactgaatctgataaaaactcatttct tttataataataaaaaatgacttgcctgaataaagaataaagaagaatgttctcaaaaaccgata cctgaaaaccataccgattcaatgatctctggattgatttagttcatttaataatggttaacaa tagcagctttttatgcttattacgataagtaaaattatagtgagaataaataaattatataccagttg ctctgcaacttcattctgtatgtgatggttaccatgctcattttatgaatgaaatcaagataaattc ataggtagatgattgaaa	444/444	0,0	NG_047568. 1
ADN total		100%		
cat A	gtagatgaatgggtttagaacaggaattaatagtgagaataaattaggtattgggataagttaaatcctttg tatacagttttaataagcaaaactgaaaaattactaacattggactgaatctgataaaaactcatttctt ttaataataataaaaaatgacttgcctgaataaagaataaagaagaatgttctcaaaaaccgatac ctgaaaaaccataccgattcaatgatctctggattgatttagttcatttaataatggttaacaa agcagctttttatgcttattacgataagtaaaattatagtgagaataaataaattatataccagttg ctgcaacttcattctgtatgtgatggttaccatgctcattttatgaatgaaatcaagataaattc taggtagatgattgaaa	444/444	0,0	NG_047568. 1
ADN		100%		
Plasmídico				
cat_{PC194}	tttagaacaggaataatagtagtgaaattgggattttgggataaaataaacctttatatacattgtaa taaacgaaactgaaaaatttcaaacattggatagaatcaaatgttagtttttagtctttttataatagttat aagagtgacttactgaaataaagatacaaatgaaatgttctcaaaaaccaatactgaaaaacacag gtcctatttcgatgattcctattatacaataggtaaatttatagtaagaataaagaatcattaccagttca tcattgattatacaataggtaaatttatagtaagaataaagaatcattaccagttcattgcaagttca tcacggtatgtgagttaccatgtttca	335/399	8e-100	NG_047570. 1
ADN total		84%		
cat_{PC194}	tttagaacaggaataatagtagtgaaattgggattttgggataaaataaacctttatatacattgtaa taaacgaaactgaaaaatttcaaacattggatagaatcaaatgttagtttttagtctttttataatagttat aagagtgacttactgaaataaagatacaaatgaaatgttctcaaaaaccaatactgaaaaacacag gtcctatttcgatgattcctattatacaataggtaaatttatagtaagaataaagaatcattaccagttc tcattgattatacaataggtaaatttatagtaagaataaagaatcattaccagttcattgcaagttca tcacggtatgtgagttaccatgtttca	335/399	8e-100	NG_047570. 1
ADN		84%		
Plasmídico				
cat_{PC221}	agggtttagacaggataatagtgagaataaattaggtattgggataagttaaatcctttgtatcagtttt taataagcaaaactgaaaaattactaacattggactgaatctgataaaaactcattcttttataataat tataaaaatgacttgcctgaaataaagataaagaagaatgttctcaaaaaccgatacctgaaaaaca ccataccgattcaatgattcctggattgatttagttcatttaataatggttaacaatagcagctttt tattgcttattacgataagtaaaatttatagtgagaataaataaattatataccagttgctcctcaact catcattctgtatgtgatggttacaatgcttcaaac	389/400	0,0	NG_047566. 1
ADN total		96%		
cat_{PC221}	agggtttagacaggataatagtgagaataaattaggtattgggataagttaaatcctttgtatcagtttt taataagcaaaactgaaaaattactaacattggactgaatctgataaaaactcattcttttataataat tataaaaatgacttgcctgaaataaagataaagaagaatgttctcaaaaaccgatacctgaaaaaca ccataccgattcaatgattcctggattgatttagttcatttaataatggttaacaatagcagctttt tattgcttattacgataagtaaaatttatagtgagaataaataaattatataccagttgctcctcaact catcattctgtatgtgatggttacaatgcttcaaac	389/400	0,0	NG_047566. 1
ADN		96%		
Plasmídico				
fex A	gcgattggagttcagattatggtcgaatctcagactttttgagttacgaaagctatatatctttgccattat gattctggcaagtgtagtctttatgtgcaatgccccgaacctccattgttggtttgggaagaatgggtc agggtgctgggagtgccgaattcagttctatcaatcattgcaattcgaaggtttcccacaaggaaaac gtggggagacttgggaataatcgcaggaagatggttgggaactgctgctgccaatattggtggag tagttggtcaatattaggttgaatgcttcttttgggtcatttttggtagccattatgattgtattggtgc ctactacggttacgacaataaacgagaaatcctgaggaagcaataaagaactttgattcattggtg gtttattctcggcctcagtaggattactccttttggcatcactcaaggagaactctggtttttctctgt	795/795	0,0	NG_047857. 1
ADN total		100%		

	<p>tctcatcgtaactagcctaattggctctgttagccttgggggatttattggagaattgtaccgagaa aatccattgtaccacctgtcctgttcaataacaaggattatgtcaatcggcacaattgcatttttctgat gttcttatttcgctgttctgtgttctccattactagctgttgaggtaaggactctcttggacaggc tggaatgatattgtccaggtgggtgctgttgaacttatctccctcgttggc</p>			
fex A	<p>gcgattggagttccgatttatggctcgaatctcagactttttgagttacgaaagctatatctttgccattat gattcggcaagtgtagtctttatgtgcaattccccgaacctccattgttggtttgggaagaatggctc agggctcgggatgtccgcaatccagttctatcaatcattgcaattcgaagtttccacaaggaaaac gtggggagcttgggaattatcgaggaagtattgggttgggaactcgtcgtgccaatattggggag tagttgtcaatattgggtggaatgcctgttttgggtcacattttgttagccattatgatttttgggtc ctactacgcttaccgacaattaaccggcagaatccgtaggaagcaataagaacttggattcattgtg gtttatccctggcctcagtaggattactccttttggcatcactcaaggagaaactcgtgttttctcgt tctcatcgttaactagcctaattggctgtgtgcttgggtggatttattggagaattgtaccgagaa aatccattgtaccacctgtcctgttcaataacaaggattatgtcaatcggcacaattgcatttttctgat gttcttatttcgctgttctgttctccattactagctgttgaggtaaggactctcttggacaggc tggaatgatattgtccaggtgggtgctgttgaacttatctccctcgttggc</p>	795/795	0,0	NG_047857. 1
ADN Plasmídico		100%		
	<p>gcaagtagttgggtcgaagtgggtgctttagtctatctatagcaatccctttatggacgtttatctga tttttaaatataaaaaactcttactaacgatttcaatataactataggaagttaaatgtatattcgc gccaatttaatttttagtattgggtagaatgttcaaggagctggcatggcagccatacctgtctatct attgtataatctctaaattatccgctggacagagaggaagaatttttaggtattatgctgtgttattg cgcttggcactgaggagcccaatattggcggcgtttaggacaattattagggtggcaatcatttttgg ggcacttttctgggttaattatagttcaggtgttcaaatatcaatgcctaaatagaatcaccagata ataacagctatcaaaaatttgaatttttaggtggactatttaggattaaccgtagggtttttactgtgt attacgcttcagaaaatgtatggtttgattctatacaaaaccaagttttctatctatgatagcttt aatagtttaatatcgcgtgattaatgttaaaaactctttatccctcagttatagaagaaccgtttat atgtaagctcaatttcattgtattcttcaatgttgcctatgtctatgctgtttttatccattattagtg ttgaggttaagggttaagtactggacagcaggccttaataactttctgggtgctcgtgtgcaatcctt tcaccaatagtggaagattatctgacaagtgcatcctaaaatactatttagttggactaattattgg gcttatctcttatatagcttctgtagcaggcgcacacctgtattattatctatcgggagtttagggata ggtatcgtt</p>	974/974	0,0	MN661250. 1
fex B		100%		
ADN total				
	<p>gcaagtagttgggtcgaagtgggtgctttagtctatctatagcaatccctttatggacgtttatctga tttttaaatataaaaaactcttactaacgatttcaatataactataggaagttaaatgtatattcgc gccaatttaatttttagtattgggtagaatgttcaaggagctggcatggcagccatacctgtctatct attgtataatctctaaattatccgctggacagagaggaagaatttttaggtattatgctgtgttattg cgcttggcactgaggagcccaatattggcggcgtttaggacaattattagggtggcaatcatttttgg ggcacttttctgggttaattatagttcaggtgttcaaatatcaatgcctaaatagaatcaccagata ataacagctatcaaaaatttgaatttttaggtggactatttaggattaaccgtagggtttttactgtgt attacgcttcagaaaatgtatggtttgattctatacaaaaccaagttttctatctatgatagcttt aatagtttaatatcgcgtgattaatgttaaaaactctttatccctcagttatagaagaaccgtttat atgtaagctcaatttcattgtattcttcaatgttgcctatgtctatgctgtttttatccattattagtg ttgaggttaagggttaagtactggacagcaggccttaataactttctgggtgctcgtgtgcaatcctt tcaccaatagtggaagattatctgacaagtgcatcctaaaatactatttagttggactaattattgg gcttatctcttatatagcttctgtagcaggcgcacacctgtattattatctatcgggagtttagggata ggtatcgtt</p>	974/974	0,0	MN661250. 1
fex B		100%		
ADN Plasmídico				

Los productos amplificados con los cebadores *vat D* y *vat E* fueron igualmente confirmados mediante secuenciación. Las secuencias obtenidas, se pueden consultar en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Resultados del análisis de las secuencias de bases nitrogenadas obtenidas a partir de la secuenciación de cada uno de los amplicones obtenidos mediante RT PCR de los genes *vat D* y *vat E* de los aislados de *E. hirae* y *E. casseliflavus* que mostraron amplificación, tanto en ADN total como en ADN plasmídico

GEN	SECUENCIA	% SIMILITUD	EXPECT VALUE	Nº ACCESO GENBANK
<i>vat D</i> ADN total	catagaatggatggctcaacatatccatttaatttatttgtaattggatgggagaaacatatgccccaaatta gatcaactacctattaagggggatacaataataggtaatgatgatggataggaaaagatgttgaattat gccaggagtaaaaatcgg	161/161 100%	6e-77	NG_048540.1
<i>vat D</i> ADN Plasmídico	catagaatggatggctcaacatatccatttaatttatttgtaattggatgggagaaacatatgccccaaatta gatcaactacctattaagggggatacaataataggtaatgatgatggataggaaaagatgttgaattat gccaggagtaaaaatcgg	161/161 100%	6e-77	NG_048540.1
<i>vat E</i> ADN total	tgactgattgccgttgaagggtgatactgtatcggaatgacgtgtggttgggcaaatgtgaccgtcc taccaggcgtaaaaataggtgacgggtccattatcggagcaaatagttgttaacaaaagacgtcgctcc atatacaattgtcgggtggcaatccaatccaactcatcgacc	184/184 100%	1e-89	NG_048542.2
<i>vat E</i> ADN Plasmídico	tgactgattgccgttgaagggtgatactgtatcggaatgacgtgtggttgggcaaatgtgaccgtcc taccaggcgtaaaaataggtgacgggtccattatcggagcaaatagttgttaacaaaagacgtcgctcc atatacaattgtcgggtggcaatccaatccaactcatcgacc	184/184 100%	1e-89	NG_048542.2

Con ello se concluyó que todos los cebadores eran idóneos para la amplificación del gen diana utilizando *SYBR Green* como fluoróforo.

Optimización de la concentración de ADN molde en la reacción de amplificación

A partir de las diluciones seriadas 1:2 obtenidas del extracto de ADN total y plasmídico, respectivamente, de cada una de las cepas diana de referencia, se construyó la curva standard con la que se calculó la eficiencia de la reacción de PCR y el coeficiente de correlación lineal r^2 . En la **Tabla 24** y la **Tabla 25**, se muestran los valores del coeficiente r^2 y la eficiencia de la reacción, a partir de los cuales se estableció el intervalo dinámico de ADN molde total y plasmídico para la amplificación de cada gen de RAM con cada una de las cepas de referencia.

En el caso de la cepa *Staphylococcus aureus* C2548, la curva standard fue construida con el ADN genómico obtenido mediante extracción con lisostafina y proteinasa K. Para el resto de cepas, el ADN ensayado se obtuvo de la extracción con el producto comercial FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Mini Kit.

Tabla 24. Intervalo dinámico determinado con la reacción de amplificación optimizada para cada uno de los genes a partir de ADN total aislado de cada cepa de referencia

CEPA BACTERIANA (gen)	Gen	Intervalo dinámico (ng/reacción)	r ²	Eficiencia (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>mef A</i>	103 - 1,6	0,99	81
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>tet M</i>	196 - 6	0,98	117
<i>Staphylococcus aureus</i> C 1923	<i>tet L</i>	4,6 - 1,6	0,98	82,5
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	<i>erm A *</i>	90,3 - 5,6	0,97	74,9
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	<i>erm B</i>	23,7 - 3	0,95	73,2
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	<i>msr A</i>	61,8 - 7,7	0,97	97,8
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	<i>lnu A</i>	23,1 - 0,1	0,99	81,5
<i>Staphylococcus aureus</i> C2944	<i>lnu B</i>	14,2 - 0,9	0,98	77
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	<i>ant(6)-la</i>	55 - 0,2	0,99	85
<i>Enterococcus faecalis</i> C3679	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	37,5 - 0,1	0,98	87
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	<i>van B</i>	7,3 - 0,3	0,99	77
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 5253	<i>van A</i>	7,3 - 0,3	0,99	72
<i>Enterococcus faecium</i> C1708	<i>cat A</i>	131,5 - 3,5	0,98	80,1
<i>Staphylococcus hominis</i> C5862	<i>cat_{pC194}</i>	178,3 - 2,8	0,99	87
<i>Staphylococcus aureus</i> C4159	<i>cat_{pC221}</i>	283,2 - 0,6	0,99	87,3
<i>Enterococcus faecium</i> C10004	<i>fex A, fex B</i>	123,4 - 0,9	0,98	89

*Rango dinámico obtenido con diluciones seriadas de DNA extraído mediante el protocolo basado en lisostafina y proteinasa K

Tabla 25: Intervalo dinámico determinado en la reacción de amplificación optimizada para cada uno de los genes a partir de ADN plasmídico aislado cada cepa de referencia

CEPA BACTERIANA	Gen	Intervalo dinámico (ng/reacción)	r ²	Eficiencia (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>mef A</i>	2,8 – 0,35	0,95	84,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>tet M</i>	4 – 0,1	0,99	82
<i>Staphylococcus aureus</i> C 1923	<i>tet L</i>	5,37 – 0,168	0,96	83,3
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	<i>erm A</i>	N.A.	-	-
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	<i>erm B</i>	1,2 – 0,15	0,99	84
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	<i>msr A</i>	4,6 – 0,29	0,99	88,5
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	<i>lnu A</i>	36 – 0,07	0,98	80,9
<i>Staphylococcus aureus</i> C2944	<i>lnu B</i>	10 – 0,04	0,98	80,2
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	<i>ant(6)-Ia</i>	30 – 0,12	0,99	77
<i>Enterococcus faecalis</i> C3679	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	9,5 – 0,04	0,99	72
<i>Enterococcus faecalis</i> C3678	<i>van B</i>	7,25 – 0,28	0,99	75
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 5253	<i>van A</i>	23 – 1,44	0,99	77
<i>Enterococcus faecium</i> C1708	<i>cat A</i>	11.6 – 0,09	0,94	81
<i>Staphylococcus hominis</i> C5862	<i>mef A</i>	17 – 0,13	0,98	89
<i>Staphylococcus aureus</i> C4159	<i>tet M</i>	21 – 0,16	0,99	93
<i>Enterococcus faecium</i> C10004	<i>tet L</i>	1,3 – 0,02	0,99	91

N.A.: No amplificado

El ADN plasmídico obtenido de la cepa *Staphylococcus aureus* C2548 con el producto comercial Plasmid MiniPrep Kit® no mostró amplificación, por lo que no se pudo obtener un intervalo dinámico a partir de ADN plasmídico para el gen *erm A*.

Los resultados mostraron que la concentración de ADN óptima para llevar a cabo el análisis de los determinantes genéticos de resistencia fue de 20 ng/μL de ADN genómico y entre 2 y 10 ng/μL de ADN plasmídico.

Anexo II: Optimización de la técnica molecular RAPD PCR para la caracterización molecular de *Enterococcus* spp.

A continuación, se presentan los resultados de la optimización y reproducibilidad de la técnica RAPD PCR utilizada para el tipado de cepas de *Enterococcus* de origen lácteo.

Protocolo de amplificación y condiciones electroforéticas seleccionadas

En la **Figura 48** y la **Figura 49** se muestra el perfil de bandas obtenido utilizando tres protocolos de PCR con cada uno de los cebadores ensayados M13 y D8635, respectivamente.

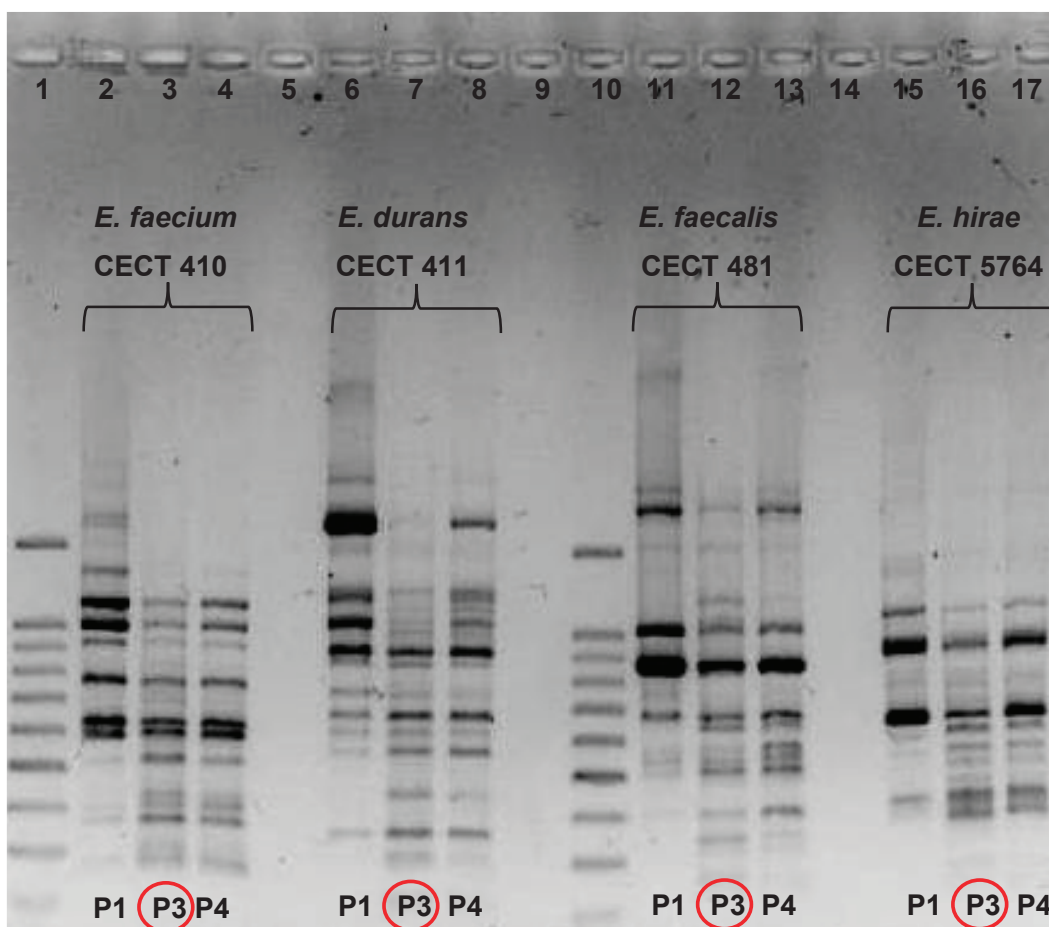


Figura 48. Perfil RAPD PCR de las cepas de referencia empleando el cebador M13 y los tres protocolos de PCR ensayados para este cebador.

P1: (Rossetti and Giraffa, 2005); P3: (Akopyanz et al., 1992); P4: (Martín-Platero et al., 2008).

Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular; carriles 2, 6, 11 y 15: protocolo 1; carriles 3, 7, 12 y 16: protocolo 3; carriles 4, 8, 13 y 17: protocolo 4. Rodeado con un círculo rojo se indica el protocolo seleccionado.

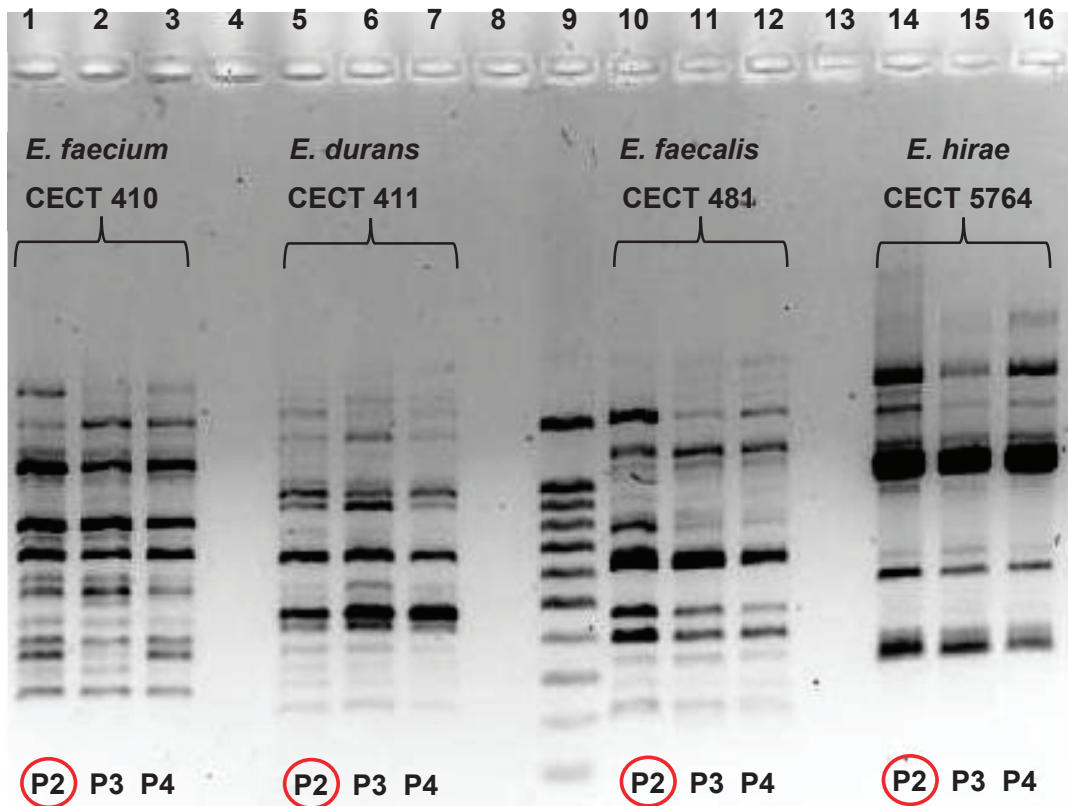


Figura 49. Perfil RAPD PCR de las cepas de referencia empleando el cebador D8635 y los tres protocolos de PCR ensayados para este cebador.

P2: (Akopyanz et al., 1992); P3: (C. Andrighetto et al., 2001); P4: (Martín-Platero et al., 2008).

Carril 9: marcador de peso molecular; carriles 1, 5, 10 y 14: protocolo 2 carriles 2, 6, 11 y 15: protocolo 3; carriles 3, 7, 12 y 16: protocolo 4. Rodeado con un círculo rojo se indica el protocolo seleccionado.

Ambos cebadores permitieron obtener perfiles diferentes entre las cepas de referencia. El cebador M13 generó perfiles de 6 a 18 fragmentos de amplificación, mientras que el cebador D8635 de 5 a 15 fragmentos, en función de la cepa. En ambos casos, las bandas generadas se correspondían con un tamaño comprendido entre 100 y 1700 pares de bases.

Tal y como se puede observar en la **Figura 48**, con el cebador M13 el protocolo 3 proporcionó un mayor número de bandas y con mejor nitidez, aunque no se observaron diferencias importantes en la intensidad de la banda de cada producto de amplificación.

Con el cebador D8635, el protocolo 2 fue el que proporcionó un perfil con mayor número y nitidez de bandas (**Figura 49**).

En conclusión, considerando el perfil de bandas obtenido con cada uno de los protocolos de PCR ensayados y con cada uno de los cebadores M13 y D8635, se seleccionaron las condiciones térmicas descritas por Akopyanz et al. (1992) con el cebador M13 y C. Andrighetto et al. (2001) con cebador D8635, las cuales se detallan en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Protocolo térmico seleccionado para cada cebador

	Cebador M13	Cebador B8635
	Akopyanz et al., 1992	C. Andrighetto et al., 2001
Desnaturalización inicial	94 °C/5min	94 °C/5min
Preciclo	40 °C/5min	40 °C/5min
	72 °C/5min	72 °C/5min
Desnaturalización	94 °C/1min	94 °C/1min
Hibridación	55 °C/1min	52 °C/1min
Extensión	72 °C/2min	72 °C/2min
(nº ciclos)	30	35
Extensión final	-	72 °C/10min

En cuanto a las condiciones de electroforesis ensayadas en gel de agarosa (30 V/330 minutos vs 120 V/65 minutos), no se observaron diferencias en el perfil de bandas por lo que se seleccionó 120 V durante 65 minutos debido a su menor tiempo de análisis.

Anexo III: Evaluación de la reproducibilidad de la técnica RAPD-PCR

Para llevar a cabo el estudio de reproducibilidad, se analizaron 7 cepas de referencia diferentes pertenecientes a 4 especies del G^o *Enterococcus*. El análisis se realizó en días diferentes considerando dos variables: extracción de ADN y amplificación por PCR.

Para cada una de las cepas de referencia y con cada cebador se obtuvieron cuatro perfiles RAPD PCR correspondientes a ADN extraído en distintos días (ADN 1 y ADN 2) y al producto de amplificación obtenido en 2 días diferentes (PCR A y PCR B). La **Figura 50**, muestra los 4 patrones obtenidos para cada una de las cepas de referencia empleando el cebador M13.

CEBADOR M13

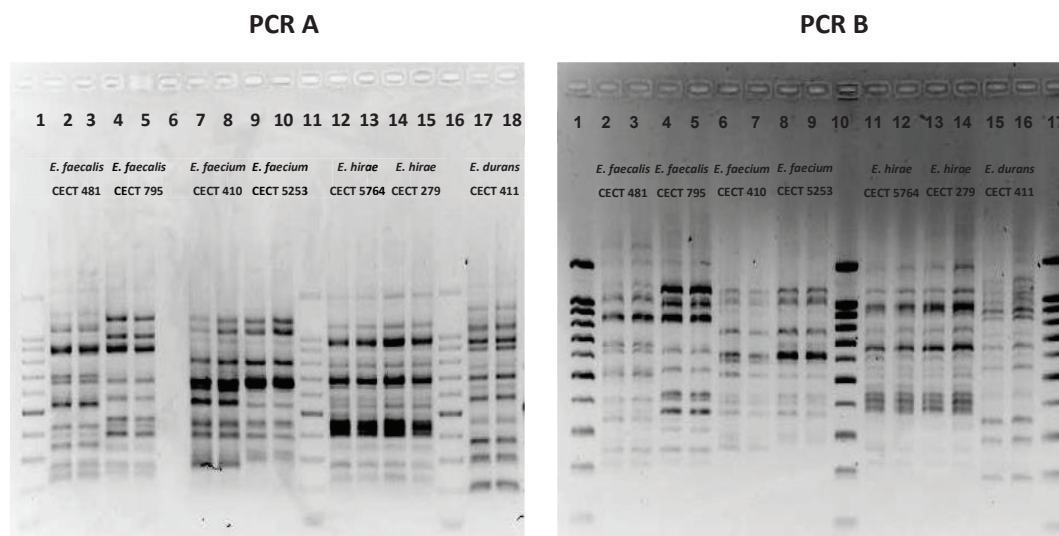


Figura 50. Perfil RAPD PCR obtenido con el cebador M13.

IZQUIERDA (PCR A): Carriles 1, 11 y 16 (marcador de peso molecular); carriles 2, 4, 7, 9, 12, 14 y 17 (ADN 1); carriles 3, 5, 8, 10, 13, 15 y 18 (ADN 2).

DERECHA (PCR B): Carriles 1, 10 y 17 (marcador de peso molecular); carriles 2, 4, 6, 8, 11, 13 y 15 (ADN 1); carriles 3, 5, 7, 9, 12, 14 y 16 (ADN 2).

Igualmente, la **Figura 51**, muestra los 4 patrones obtenidos con el cebador D8635 para cada cepa de referencia.

CEBADOR D8635

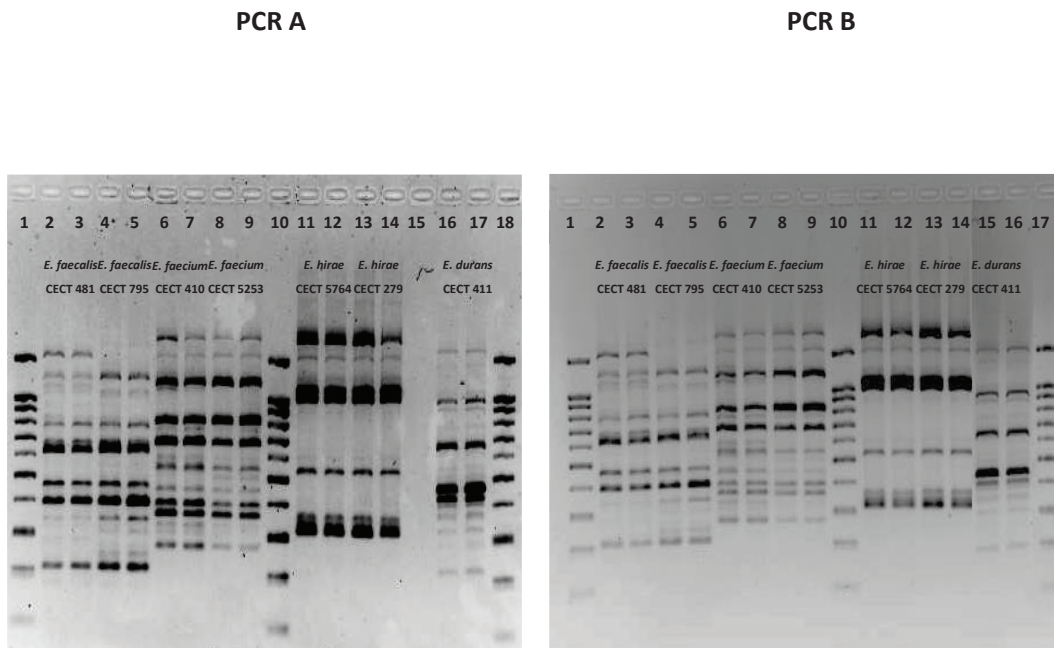


Figura 51. Perfil RAPD PCR obtenido el cebador D8635

IZQUIERDA (PCR A): Carriles 1, 10 y 18 (marcador de peso molecular); carriles 2, 4, 6, 8, 11, 13 y 16: (ADN 1); carriles 3, 5, 7, 9, 12, 14 y 17: ADN 2.

DERECHA (PCR B) Carriles 1, 10 y 17: (marcador de peso molecular); carriles 2, 4, 6, 8, 11, 13 y 15: (ADN 1); carriles 3, 5, 7, 9, 12, 14 y 16: (ADN 2).

En total se obtuvieron 28 perfiles electroforéticos con cada uno de los cebadores. Con la matriz de similitud se construyó un único dendograma tras la agrupación mediante el coeficiente de Dice y el análisis mediante el algoritmo de UPGMA, tal y como se muestra en la **Figura 52**.

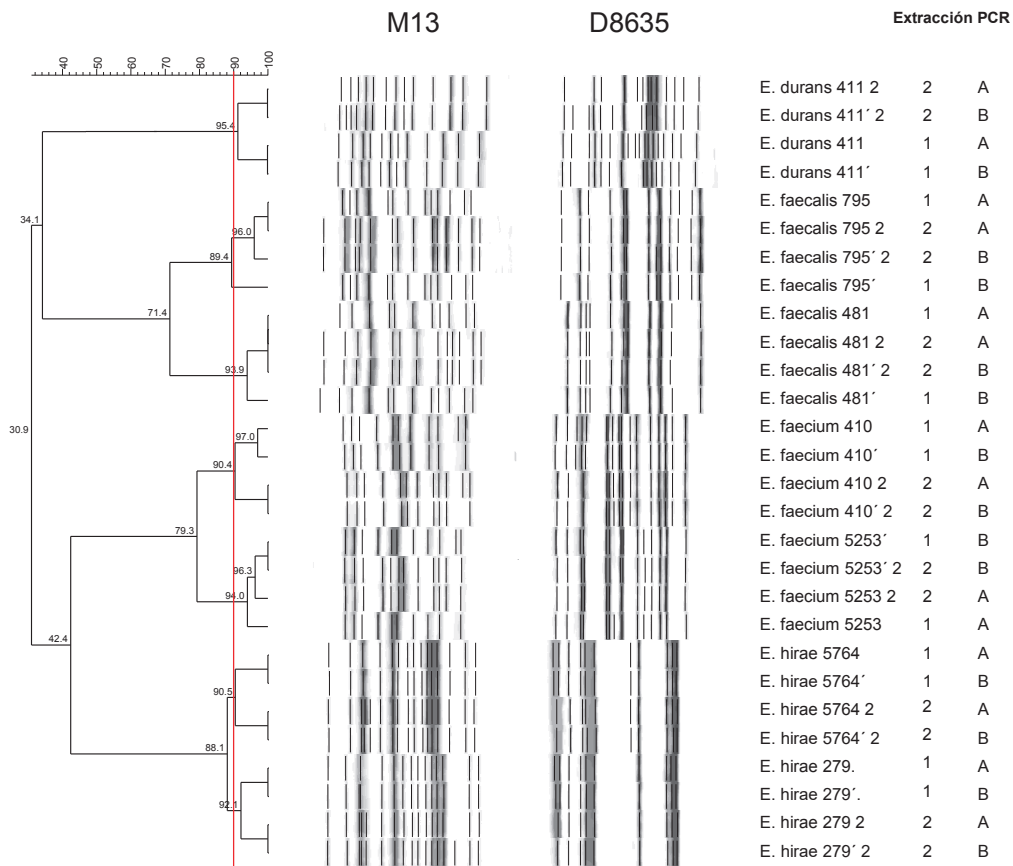


Figura 52. Dendrograma obtenido en el estudio de reproducibilidad de la técnica RAPD PCR empleando los cebadores M13 y D8635.

1: ADN 1; 2: ADN 2; A: PCR A; B: PCR B

Como puede observarse en la **Figura 52**, el análisis RAPD PCR permitió diferenciar todas las cepas estudiadas y estimar las relaciones genéticas entre éstas, con un porcentaje de similitud comprendido entre el 30,9 y 90 %. La similitud intraespecífica fue del 88,1 % (*E. hirae*), 79,3 % (*E. faecium*) y 71,4 % (*E. faecalis*).

Los resultados del análisis de agrupamiento mostraron que el porcentaje de similitud más bajo obtenido del análisis de las réplicas de cada una de las cepas fue del 89,4 % (*E. faecalis*), por ello se estableció el 90 % como umbral de discriminación por debajo del cual se consideraban genotipos diferentes. Este porcentaje, es similar al establecido por C. Andrighetto et al. (2001), Cosentino et al. (2004), Morandi et al. (2006) y Psoni et al. (2006) para el estudio de la diversidad genética de

enterococos aislados de diferentes quesos artesanos elaborados con leche cruda; así como de otras matrices no alimentarias (Banerjee, 2013).

Este estudio permitió concluir que empleando de manera controlada a nivel intralaboratorial la metodología optimizada, los patrones genéticos de RAPD presentan una buena reproducibilidad para una misma cepa, incluso cuando se aplica a extracciones de ADN diferentes.