

# LA DOBLE FACETA DEL GÉNERO *ENTEROCOCCUS*, Y SU IMPORTANCIA EN ALIMENTOS

HIKIMATE ABRIOUEL<sup>1</sup>, NABIL BEN OMAR<sup>1</sup>, ROSARIO LUCAS LÓPEZ<sup>1</sup>, ANTONIO GÁLVEZ<sup>1</sup>

## RESUMEN

El género *Enterococcus* incluye a un conjunto de microorganismos extremadamente versátiles, capaces de provocar infecciones hospitalarias principalmente en individuos con enfermedades subyacentes o inmunodeprimidos. Determinados componentes celulares pueden actuar como factores de virulencia en las infecciones enterocócicas, lo que junto con la resistencia adquirida a diferentes antimicrobianos hacen más difícil su erradicación. Los enterococos forman parte de la microbiota intestinal normal de individuos sanos, y están presentes en muchos alimentos. Poseen propiedades tecnológicas de interés como sus actividades glicolítica, lipolítica y proteolítica, y la producción de bacteriocinas. Están presentes en numerosos quesos regionales, jugando un papel importante en su maduración. Esta doble faceta despierta una gran inquietud sobre la seguridad de las cepas presentes en alimentos, y aquellas asociadas a ambientes hospitalarios.

## 1. INTRODUCCIÓN

El término “enterococo” fue utilizado por primera vez en 1899 por Thiercelin, para referirse a un diplococo Gram positivo encontrado en el intestino humano. En el mismo año, MacCallun y Hastings, describieron un caso de endocarditis atribuido a

---

<sup>1</sup> Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: agalvez@ujaen.es

un microorganismo que ellos llamaron *Micrococcus zymogenes*, y que posteriormente se identificó como un enterococo hemolítico

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de bacterias acidolácticas (BAL). Son cocos Gram-positivos, no esporulados, catalasa negativos que se agrupan en parejas o en cortas cadenas. Las diferentes especies reconocidas en la actualidad (1) se asocian en diferentes grupos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especies del género *Enterococcus* (adaptado de 1).

Grupo	Especie(s)
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. haemoperoxidus</i> , <i>E. moraviensis</i> , <i>E. silesiacus</i> , <i>E. termitis</i> , <i>E. caccae</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. villorum</i> , <i>E. canis</i> , <i>E. ratti</i> , <i>E. asini</i> , <i>E. phoeniculicola</i> , <i>E. canintestini</i>
<i>E. avium</i> microbiótica	<i>E. avium</i> , <i>E. pseudoavium</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. raffinosus</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. pallens</i> , <i>E. hermanniensis</i> , <i>E. devriesei</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> , <i>E. columbae</i>
Especies no agrupadas	<i>E. saccharolyticus</i> , <i>E. sulfureus</i> , <i>E. aquimarinus</i> , <i>E. dispar</i> , <i>E. italicus</i>

Los enterococos crecen de forma óptima a 37°C, aunque la mayoría de las especies crece en un rango de temperatura de 10 a 45°C. También son capaces de crecer a pH 9.6, en presencia de NaCl al 6.5%, en presencia de un 40% de sales biliares, y de hidrolizar la esculina, con ciertas excepciones. Algunas especies son pigmentadas (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. sulfureus*) o móviles (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). En general son anaerobios aerotolerantes, ya que aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasas y peroxidasas que destruyen respectivamente el O<sup>2</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se generan en condiciones de aerobiosis.

### 1.1. Hábitat

Los enterococos se consideran microorganismos integrantes de la flora intestinal del hombre y otros animales. Las especies más frecuentes en el intestino humano son *E. faecalis* y *E. faecium*. La proporción de éstas varía dependiendo de la región geográfica, lo que hace suponer la influencia de la dieta y de otros factores ambientales en la presencia de tales microorganismos en el intestino

Las diferentes especies de enterococos muestran un grado variable de especificidad de hospedador. Así *E. durans* se ha encontrado en hombre y también en aves,

pero no en otras especies de granja. *E. gallinarum* se encuentra en aves, mientras que *E. avium* se aísla preferentemente de mamíferos. *E. faecium* es una de las especies de *Enterococcus* que se encuentra con más frecuencia en pollos y cerdos sanos.

Los enterococos, especialmente las especies pigmentadas *E. casseliflavus*, *E. mundtii* y *E. sulfureus* se encuentran también en la superficie de las plantas, como verdaderas bacterias epifitas. *E. faecalis* y *E. faecium* pueden encontrarse también asociados a plantas. Se cree que los insectos juegan un papel importante en esta variación estacional.

## 2. PATOGENICIDAD

### 2.1. Infecciones enterocócicas en humanos

Los enterococos forman parte de la microbiota gastrointestinal, encontrándose en más del 90% de los individuos sanos. Por ello, con frecuencia son considerados como comensales inocuos o bien con bajo potencial patogénico. Sin embargo, esta percepción ha cambiado en las últimas décadas debido al incremento de su incidencia en las infecciones nosocomiales, así como de su resistencia a los antibióticos (2-5). Los enterococos se encuentran entre los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales, estando implicados con mayor frecuencia en infecciones del tracto urinario y bacteremias primarias y secundarias. También se aíslan a partir de infecciones de heridas pélvicas y abdominales, aunque en estos casos, generalmente se trata de infecciones mixtas. También ocasionan endocarditis y otras infecciones mucho más infrecuentes, tales como meningitis postquirúrgica, osteomielitis e infecciones respiratorias. Son patógenos oportunistas que generalmente provocan infecciones en personas con enfermedades subyacentes graves o inmunodeprimidos (2, 4, 6). También pueden causar infecciones neonatales e infecciones del sistema nervioso central en todas las edades. La especie aislada con mayor frecuencia es *E. faecalis* (80-90%), seguida de *E. faecium* (5-10%) y otras especies de enterococos (menos del 10%).

Los enterococos constituyen la tercera causa más común de infección nosocomial (aproximadamente un 12% del total). El incremento de las infecciones nosocomiales enterocócicas se debe a diversos factores: resistencias múltiples a antibióticos, uso intensivo de agentes antimicrobianos a los que estas bacterias son resistentes, y empleo de dispositivos que alteran las defensas mecánicas tales como catéteres urinarios, dispositivos intravasculares, etc. (4, 6, 7).

Los ambientes hospitalarios pueden estar altamente contaminados con enterococos, encontrándose recuentos más elevados en las camas, mesitas portables,

orinales, equipos de medida de tensión arterial, estetoscopios, y otros instrumentos (8). La tenacidad y la capacidad de los enterococos para sobrevivir en el ambiente deben ser consideradas como factores clave para su transmisión intrahospitalaria. La principal vía de infección, sobre todo en unidades de cuidados intensivos, es la transmisión de unos pacientes a otros (7). La transmisión a través de las manos del personal sanitario y de utensilios es un factor considerable.

## 2.2. Factores de virulencia

Uno de los problemas más importantes para establecer la presencia de determinantes de virulencia ha sido la dificultad para satisfacer los postulados de Koch en las infecciones experimentales empleando modelos animales. Los enterococos son microorganismos oportunistas, y los individuos sanos o los animales solo son infectados rara vez. Numerosos estudios han permitido identificar una serie de componentes celulares que pueden actuar (de forma determinante en unos casos, y de forma mucho más imprecisa en otros) como factores de virulencia (2, 4). Sin embargo, ninguno de ellos parece ser esencial, y la ausencia de un modelo experimental animal adecuado, junto con el carácter oportunista de esta bacteria, impiden discernir con claridad en la actualidad qué hace que una cepa se comporte como patógena. Por otra parte, numerosos estudios indican que los factores de virulencia se encuentran también, aunque con menor frecuencia, en las cepas aisladas de alimentos y otros ambientes (9, 10, 11).

Entre los componentes descritos como posibles factores de virulencia (2, 4) cabe destacar proteínas de superficie implicadas en la adherencia, como la sustancia de agregación (AS), la adhesina para el colágeno (Ace), la proteína de superficie de enterococos (Esp), o el antígeno A de la endocarditis (EfaA). Los enterococos también producen fimbrias adhesivas (conocidas como fimbrias Ebp, o pilis de la endocarditis y biofilms), que podrían intervenir en la adherencia a los tejidos (12). Sin embargo, este componente está también ampliamente distribuido en cepas de alimentos y aguas (13). Otros posibles factores de virulencia descritos incluyen la presencia de cápsulas polisacáridicas y la producción de citolisina (Cyl), gelatinasa (Gel), y de iones superóxido (2, 4).

Algunos de los factores de virulencia descritos están codificados en plásmidos transmisibles (AS, Cyl) o agrupados en regiones cromosómicas como i) el locus *fsr* (GelE, SprE, Fsr), ii) el locus *cps* y iii) las islas de patogenicidad descritas en *E. faecalis* y *E. faecium*, que codifican para posibles adhesinas e invasinas, exoenzimas, pro-

teasas, y proteínas de superficie (5). La incidencia de islas de patogenicidad parece estar incrementada en las muestras clínicas con respecto a las muestras ambientales y de alimentos, como sugieren estudios recientes de tipado molecular, que indican la existencia de subpoblaciones adaptadas a diferentes ambientes (14, 15).

### 3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia intrínseca de grado variable a un gran número de antibióticos, y pueden adquirir nuevas resistencias con una gran facilidad. Son comunes las resistencias adquiridas a cloranfenicol, eritromicina, a altos niveles de aminoglicósidos y a tetraciclina (2, 3). La resistencia a antibióticos es un factor clave para la prevalencia de los enterococos en las infecciones nosocomiales, ya que dificultan su erradicación. Así mismo, los enterococos pueden contribuir a la diseminación de genes de resistencia fuera del ámbito hospitalario, lo que tiene una especial importancia en alimentos.

#### 3.1. Beta-lactámicos

Los enterococos presentan una baja resistencia intrínseca a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la penicilina, ampicilina, piperacilina e imipenem, que ejercen sobre ellos un efecto bacteriostático. Los principales mecanismos de resistencia adquirida a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos implican la producción de proteínas de unión a penicilinas (PBPs) de baja afinidad, y en mucho menor grado, producción de  $\beta$ -lactamasas. En *E. faecium* se ha descrito un mecanismo adicional de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediado por una transpeptidasa alternativa a la DD-transpeptidasa sensible a penicilina.

#### 3.2. Aminoglucósidos

Los enterococos pueden presentar al menos tres mecanismos de resistencia a aminoglucósidos:

1) Todos los enterococos presentan una resistencia intrínseca moderada debida a una baja permeabilidad celular. El tratamiento combinado con una penicilina facilita la entrada de los aminoglucósidos a la célula.

2) Elevados niveles de resistencia (CMI,  $\geq 2.000 \mu\text{g/ml}$ ), debidos a la producción de enzimas capaces de inactivar a los aminoglucósidos.

3) Elevados niveles de resistencia, debidos a mutaciones puntuales que afectan a una proteína de la subunidad 30S del ribosoma.

La estreptomicina adeniltransferasa (codificada por el gen *aadA*) confiere a los enterococos resistencia a elevadas concentraciones de estreptomicina, aunque no a gentamicina. La resistencia a gentamicina se debe al enzima bifuncional 2'-fosfotransferasa-6'-acetiltransferasa [AAC(6')-APH(2')], que promueve la fosforilación dependiente de ATP de varios aminoglucósidos como la tobramicina, metilmicina, amikacina y kanamicina. Esta enzima está codificada por el gen *aac(6')-aph(2')*. Otros genes confieren un menor grado de resistencia a la gentamicina, como *aph(2')-Id* y *aph(2')-Ic*. Algunas cepas han adquirido resistencia a todos los antibióticos aminoglucósidos descritos. En tales cepas no existe sinergismo con las penicilinas, y por tanto la adición conjunta de aminoglucósidos y agentes activos sobre la pared celular carece de valor terapéutico.

### 3.3. Glicopéptidos

La vancomicina se desarrolló en los años cincuenta como un antimicrobiano activo frente a gérmenes Gram-positivos y, sobre todo, frente a los estafilococos productores de  $\beta$ -lactamasa. En los años ochenta se aislaron las primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a los glicopéptidos. Desde entonces, la resistencia a glicopéptidos se ha convertido en un factor importante en la infección y colonización por enterococos, sobre todo en ambientes hospitalarios.

En enterococos se han descrito seis genotipos de resistencia a vancomicina: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG* (16, 17). La resistencia se debe a la producción de precursores del peptidoglicano modificados con una afinidad muy reducida por los glicopéptidos. Las cadenas peptídicas del peptidoglicano de los enterococos sensibles terminan en el dipéptido D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala), al cual se une la vancomicina inhibiendo la reacción de entrecruzamiento. Por el contrario, las cadenas de las cepas resistentes terminan en el depsipéptido D-alanil-D-lactato (D-ala-D-lac; fenotipos VanA, VanB, VanD), o bien en el dipéptido D-alanil-D-serina (D-ala-D-ser; fenotipos VanC, VanE y VanG).

Con frecuencia, los genes *van* están localizados en plásmidos o transposones, lo que facilita su diseminación mediante transferencia horizontal. Los fenotipos VanA y VanB son los más importantes desde el punto de vista clínico, y tienen una mayor incidencia en *E. faecium*. La mayoría de las cepas hospitalarias resistentes a vanco-

micina derivan de una única línea clonal llamada Complejo C-17 (18). El fenotipo VanC sólo se observa en las especies *E. gallinarum* (*vanC-1*), *E. casseliflavus* (*vanC-2*) y *E. flavescens* (*vanC-3*), las cuales muestran una resistencia intrínseca a la vancomicina (CMI, 2-32 µg/ml), aunque son sensibles a la teicoplanina. Este tipo de resistencia es de localización cromosómica y de expresión constitutiva, a excepción de algunas cepas de *E. gallinarum* en las que su expresión es inducible.

### 3.4. Macrólidos y lincosamidas

Los antibióticos macrólidos se emplean en el tratamiento de infecciones en humanos, siendo la eritromicina el antibiótico de primera elección en pacientes alérgicos a las penicilinas. La resistencia a los macrólidos se basa en diferentes mecanismos:

- Modificación de la diana por mutaciones puntuales de la subunidad 23S del ARN ribosómico.
- Metilación de la subunidad 23S del ARN ribosómico, impidiendo la unión de los macrólidos (genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR*).
- Hidrólisis del anillo de lactona de la molécula de antibiótico.
- Bombas de exporte, que retiran el antibiótico del interior de la bacteria (genes *mefA*, *mefE*, *msrA*, *mreA*).

Los genes de resistencia a macrólidos más frecuentes (*erm*) codifican para una metiltransferasa que actúa sobre residuos específicos de la subunidad 23S del ARN ribosómico. Este enzima provoca una N<sup>6</sup>-dimetilación de un residuo de adenina en la subunidad 23S del rRNA, inhibiendo la unión de la eritromicina. La modificación de la diana ribosómica provoca resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>), o bien a macrólidos y lincosamidas (ML), o a macrólidos, cetólidos y estreptogramina A y B (MKS). Se han descrito diversos genes *erm*, siendo *ermB* el predominante en enterococos (88%).

En *E. faecium* se ha descrito un segundo mecanismo de resistencia a lincosamidas, mediado por una lincosamida nucleotidil transferasa (*linB*), que cataliza la 3-(5'-adenilación) de la lincomicina y la clindamicina.

También se han descrito mecanismos de exporte para los antibióticos macrólidos, en ausencia de resistencia a lincosamidas o a estreptogramina A. Los genes responsables (*mef*) presentan una elevada movilidad entre diversas especies Gram-positivas.

La elevada resistencia a macrólidos se ha asociado claramente al uso de la tilosina (y también de la espiramicina) para el tratamiento de infecciones en animales, y también como promotor del crecimiento. La resistencia a macrólidos se ha diseminado entre estafilococos, estreptococos y enterococos. La resistencia a macrólidos se puede transmitir de la microbiota de animales a humanos, bien por diseminación de las bacterias resistentes o por transferencia horizontal a través de elementos genéticos móviles.

### 3.5. Tetraciclinas

Se estima que entre el 60 y el 65% de las cepas de enterococos de origen clínico muestran resistencia a tetraciclinas, aunque estos antibióticos no son empleados de forma rutinaria en el tratamiento de las infecciones por enterococos. También se ha descrito la presencia de cepas resistentes a tetraciclina en diversos alimentos de origen animal.

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas mediante interferencia con la unión de los aminoacil-t-RNAs al ribosoma. En enterococos existen dos mecanismos fundamentales de resistencia:

- Bombas de exporte.
- Protección del ribosoma, impidiendo la unión de las moléculas de antibiótico.

Los genes *tet(K)* y *tet(L)* codifican para bombas de exporte. Estas son grandes proteínas con al menos 14 dominios transmembrana, que bombean las moléculas de antibióticos al exterior de la célula. El gen *tet(L)* es el más frecuente en enterococos, pudiendo estar localizado tanto en el cromosoma como en plásmidos conjugativos.

Los genes *tet(M)*, *tet(O)* y *tet(S)* codifican para proteínas que proporcionan resistencia a tetraciclina y minociclina mediante protección del ribosoma. Las proteínas que codifican se unen al ribosoma alterando su conformación de forma que impiden la unión de las moléculas de antibiótico al mismo. El gen *tet(M)* es el más común en enterococos. Está localizado generalmente en el cromosoma asociado a elementos transponibles de tipo *Tn916*, aunque también puede estar presente en plásmidos conjugativos.

### 3.6. Quinupristina-dalfopristina

La combinación quinupristina/dalfopristina (Synercid®) es una mezcla de estreptograminas A y B sintéticas para uso clínico frente a infecciones multirresistentes, incluidas las provocadas por *E. faecium*. Los dos componentes actúan de forma sinérgica, uniéndose a diferentes lugares de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. A pesar del uso clínico del Synercid®, la virginiamicina (otra combinación de estreptograminas) ha sido utilizada para promover el engorde de animales.

*E. faecalis* muestra resistencia de forma natural a este tipo de antibióticos, y más recientemente se ha descrito que la resistencia a lincosamida y estreptogramina A está ligada a la presencia de un transportador de tipo ABC, codificado por el gen *lsa*. Otros genes que codifican para resistencia a estreptograminas, como *vat(E)*, están ligados con frecuencia a determinados genes de resistencia a eritromicina, como *erm(B)*.

### 3.7. Quinolonas y otros antibióticos

Las quinolonas muestran una actividad baja o moderada frente a los enterococos, y muchas cepas muestran una resistencia intrínseca a ciprofloxacina. El empleo de fluoroquinolonas en aplicaciones clínicas ha provocado también un incremento de la resistencia en enterococos, habiéndose descrito mutaciones que afectan al gen *gyrA* (que codifica para la subunidad GyrA de la ADN girasa), y, más frecuentemente, al gen *parC*, que codifica para la subunidad ParC de la topoisomerasa IV.

Entre los antibióticos oligosacáridicos destaca la avilamicina, que ha sido empleada como promotor del crecimiento en animales de granja en la Unión Europea durante varios años. Ello ha provocado la aparición de un elevado porcentaje de cepas de *E. faecium* resistentes a este antimicrobiano, así como la aparición de resistencia cruzada a la evernimicina (un antibiótico de potencial uso terapéutico cuyo desarrollo ha debido ser suspendido por esta causa). Este tipo de resistencia se ha detectado también en *E. faecalis*. Los estudios efectuados han demostrado que una mutación que altera la proteína ribosómica L16 es la responsable de la resistencia a estos antibióticos.

La linezolid es un inhibidor de la biosíntesis de proteínas perteneciente al grupo de las oxazolidinonas, con una elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (CMI  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ). Se han detectado mutaciones en la subunidad 23S del ribosoma, que confieren resistencia a este antibiótico (CMI  $8 \mu\text{g/ml}$ ). En las cepas aisladas se ha detectado también co-resistencia a otros antibióticos tales como

vancomicina, ampicilina, macrólidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, rifampina, gentamicina, nitrofurantoina y trimetropim/sulfametoxazol.

Los inhibidores de la dihidrofolato-reductasa, como el trimetropim-sulfametoxazol (TMP-SMX), muestran una eficacia limitada frente a los enterococos, debido a la capacidad de esta bacteria para usar timina y timidina así como dihidrofolato y tetrahidrofolato. Se han descrito mutaciones en el enzima diana (la dihidrofolato-reductasa) que confieren una elevada resistencia, como *dfrE*.

#### **4. IMPORTANCIA DE LOS ENTEROCOCOS EN ALIMENTOS**

Los enterococos se aíslan con gran frecuencia a partir de alimentos, incluyendo gran parte de aquellos elaborados mediante métodos tradicionales de fermentación (19, 20). La distribución ecológica de esta bacteria permite explicar fácilmente su presencia en los alimentos. Los enterococos constituyen una fracción importante de la microbiota intestinal autóctona de los mamíferos y otros animales. Una vez liberados al medio ambiente junto con las excretas, son capaces de colonizar diversos nichos ecológicos gracias a su capacidad para sobrevivir a las condiciones ambientales desfavorables y crecer en ambientes hostiles. A partir del intestino o del medio ambiente, pueden contaminar las materias primas empleadas para la elaboración de los alimentos (especialmente los de origen cárnico y lácteo). La colonización de las plantas de elaboración de alimentos y la contaminación cruzada durante los procesos de fabricación completan las rutas de transmisión. Por todo ello, este grupo de bacterias, junto con las coliformes, han sido consideradas como indicadores del grado de higiene de los alimentos.

##### **4.1. Riesgos asociados a la presencia de enterococos en alimentos**

En los últimos años, el incremento de la incidencia de cepas virulentas de enterococos en los ambientes hospitalarios así como el aumento en la resistencia a antibióticos, han provocado una cierta inquietud sobre el posible riesgo que puede suponer la presencia de esta bacteria en los alimentos. Las cepas procedentes de alimentos no están exentas de portar factores de virulencia y con frecuencia muestran resistencia a diferentes tipos de antibióticos (4, 5, 9, 10, 11, 14), si bien la incidencia es bastante inferior en comparación con los aislados clínicos. Hasta el momento, no se ha podido demostrar que las cepas presentes en alimentos puedan ocasionar enfermedad en humanos. Además, estudios recientes indican que las cepas portadoras

de caracteres de virulencia forman un grupo genómico diferente de la mayoría de las cepas aisladas de alimentos (14, 21).

No obstante, la aparición de resistencias a antibióticos no es un fenómeno exclusivo de los ambientes clínicos, sino que también es fácilmente detectable en cepas aisladas de alimentos. Así, por ejemplo, en enterococos aislados de quesos en Europa se detectaron cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a diferentes antimicrobianos, tales como penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, lincomicina, rifampicina, ácido fucsídico y vancomicina (22, 23). Entre todos ellos destaca la resistencia a tetraciclina (22).

Por otra parte, los estudios epidemiológicos han permitido establecer una fuerte relación entre el uso de antibióticos en la cría de animales y la aparición de cepas resistentes en los alimentos derivados de los mismos, y posteriormente en el tracto gastrointestinal de humanos (24). La resistencia a antibióticos del tipo MLS como la eritromicina y la quinupristina-dalfopristina es bastante común en enterococos procedentes de animales que han recibido dietas suplementadas con antibióticos relacionados como la tilosina (un macrólido) o la virginiamicina (una combinación de dos pristinamicinas similar a la quinupristina-dalfopristina) como promotores del crecimiento (24). La avoparcina, que ha sido ampliamente utilizada como suplemento en el engorde de animales, selecciona la aparición de cepas resistentes a vancomicina en la microbiota intestinal de los animales. La abolición por ley del uso de este antibiótico para la cría de animales de granja en Europa se está traduciendo ya en un descenso en la incidencia de cepas resistentes a vancomicina. Cabe esperar que el uso racional de agentes antimicrobianos en la cría de animales haga descender de igual modo la incidencia de la resistencia a antibióticos no solo en enterococos, sino también en el resto de las bacterias que forman parte de la microbiota de los alimentos.

Otro de los aspectos negativos de los enterococos en alimentos es su capacidad para descarboxilar aminoácidos, generando aminas biógenas, especialmente a partir de la tirosina y en menor grado de la histidina. La intoxicación debida a la ingestión de aminas biógenas provoca diversos síntomas, tales como dolor de cabeza, vómitos, aumento de la presión arterial, e incluso reacciones alérgicas de gran intensidad (19). Se han aislado cepas capaces de producir aminas biógenas a partir de alimentos tales como embutidos fermentados y quesos. La intoxicación por consumo de queso curado está asociada en la mayoría de los casos a su alto contenido en tiramina. La intensa proteólisis que puede tener lugar durante la maduración puede liberar cantidades suficientes de tirosina. Aunque se desconoce el grado de actividad de las descarboxilasas en las condiciones de pH ácido que tienen lugar en los alimentos fermentados, la frecuencia de cepas productoras de tiramina puede ser muy elevada (25).

#### 4.2. Propiedades tecnológicas de los enterococos

Los enterococos juegan un papel importante en la elaboración de diversos tipos de alimentos mediante fermentación y contribuyen al desarrollo de las propiedades organolépticas durante los procesos de maduración de muchos alimentos. Ello se debe tanto a su elevada tolerancia a las condiciones ambientales desfavorables (deseccación, congelación, calor, ácidos orgánicos, NaCl..) como a su metabolismo fermentador y a los equipos enzimáticos que poseen muchas de las cepas. Por una parte, los enterococos poseen características metabólicas (tales como la presencia de actividad proteolítica y lipolítica, su capacidad para utilizar el citrato y el piruvato, o la producción de compuestos volátiles) que contribuyen al desarrollo de sabores y texturas específicos en los alimentos (20, 25).

Entre las actividades enzimáticas encontradas con mayor frecuencia en las cepas aisladas de alimentos destacan la actividad leucina y valina arilamidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa ácida, esterasa y esterasa-lipasa. Muchas cepas también poseen actividad proteolítica.

La presencia de enzimas glicolíticas es de vital importancia para el aprovechamiento de los azúcares presentes en los alimentos (como por ejemplo la lactosa) y la producción de ácidos orgánicos (como el lactato o el fórmico). Las enzimas glicolíticas también son importantes para la degradación de otros azúcares como la rafinosa o la estaquiosa, o bien otros componentes (como los glucósidos) que pueden resultar tóxicos para la célula. La actividad  $\beta$ -glucosidasa se ha relacionado con la capacidad para degradar glucósidos como la oleuropeína, y podría jugar un papel importante en la disminución de la toxicidad ejercida por algunos compuestos fenólicos en alimentos de origen vegetal. La capacidad para utilizar el citrato también se considera de gran interés tecnológico, sobre todo en determinados tipos de quesos, ya que los productos finales del metabolismo de este compuesto podrían contribuir a su sabor y aroma (20).

Las actividades esterasa y esterasa lipasa podrían estar relacionadas con la capacidad de los enterococos para degradar componentes lipídicos en los alimentos. La actividad lipolítica resulta de indudable valor para el desarrollo de sabores y aromas, conferidos por los propios ácidos grasos resultantes de la hidrólisis (especialmente en aquellos de cadena corta), y por los compuestos (tales como aldehídos, ésteres y cetonas) resultantes de posteriores transformaciones y reacciones con otros componentes del alimento, que pueden tener lugar durante los procesos de maduración. En los derivados lácteos, predominan los ésteres de ácidos grasos de cadena corta e intermedia.

La actividad proteolítica es una característica bastante común en enterococos aislados de alimentos. Esta actividad es importante tecnológicamente en productos lácteos, ya que la hidrólisis de la caseína induce cambios de textura. Así mismo, los péptidos liberados pueden conferir sabores característicos al queso (que pueden ser agradables o inapropiados, dependiendo del tipo de queso). Muchas cepas también presentan actividad exopeptidasa. En su conjunto, las actividades proteolítica y peptidolítica de los enterococos pueden ser importantes en el desarrollo de textura, sabor y aroma en los alimentos sometidos a un proceso de maduración (20).

### 4.3. Producción de bacteriocinas

Los enterococos son uno de los grupos microbianos de mayor interés por su capacidad de producir bacteriocinas. Estas se definen como péptidos antimicrobianos, de síntesis ribosómica, modificados o no. Las bacteriocinas son buenos candidatos para la conservación natural de los alimentos, o bioconservación (26, 27).

Muchas de las bacteriocinas producidas por enterococos (o enterocinas) muestran actividad bactericida frente a microorganismos patógenos o alterantes presentes en los alimentos (como *L. monocytogenes* y *S. aureus*, *B. cereus* o *C. tyrobutyricum*), por lo que se ha sugerido que podrían jugar un papel importante como conservantes naturales.

Las enterocinas se clasifican en diferentes clases, de acuerdo con su estructura (28) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de las bacteriocinas descritas en *Enterococcus*.

Clase	Bacteriocina
Clase I. Lantibióticos	Citolisina
Clase II. Péptidos lineales no lantibióticos	
II.1. Enterocinas de la familia de las pediocinas	Enterocina A, mundticina, mundticina KS, enterocina CRL35, enterocina SE-K4, enterocina P, bacteriocina 31, bacteriocina RC714, bacteriocina T8
II.2. Enterocinas producidas sin péptido señal	Enterocinas L50A y L50B, enterocinas MR10A y MR10B, enterocina RJ-11, enterocina Q, enterocina EJ97
II.3. Otras enterocinas de estructura lineal	Enterocina B, enterocinas 1071A y 1071B, bacteriocina 32
Clase III. Péptidos cíclicos	Enterocinas AS-48 y AS-48RJ
Clase IV. Grandes proteínas	Enterolisina A

#### 4.4. Presencia de enterococos en alimentos cárnicos

La presencia de enterococos en el tracto gastrointestinal de los animales representa un alto potencial de contaminación de la carne durante el sacrificio y despiece de los animales. Los recuentos en superficie de carne de cerdo en el matadero pueden oscilar entre  $10^4$  a  $10^8$  por  $100 \text{ cm}^2$ , predominando las especies *E. faecium* y *E. faecalis*.

Muchos productos cárnicos son elaborados mediante un proceso de fermentación, tras el cual son consumidos crudos, o bien salados o ahumados. En estos alimentos, los enterococos pueden multiplicarse y alcanzar cifras elevadas. Las concentraciones de enterococos en los productos cárnicos fermentados como el salami pueden oscilar entre 100 y  $2,6 \times 10^5$  UFC/g. En este tipo de productos, sobre todo en aquellos elaborados de forma artesanal en los que es más frecuente la presencia de esta bacteria, los enterococos podrían jugar un papel importante en el desarrollo de aroma durante la maduración del producto, gracias a sus actividades glicolítica, proteolítica y lipolítica (29).

Los alimentos cárnicos procesados (salados o no) son generalmente sometidos a un proceso de cocción cuya temperatura oscila entre  $60^\circ\text{C}$  y  $70^\circ\text{C}$ . Debido a que los enterococos son bacterias termotolerantes y capaces de soportar altas concentraciones de sal, pueden sobrevivir a los tratamientos de cocción (ya que toleran tratamientos de hasta  $70^\circ\text{C}$  durante 30 min) y provocar la alteración posterior de los productos cárnicos cocidos. Después de sobrevivir al tratamiento con calor, *E. faecium* y *E. faecalis* han sido descritos como causantes de la alteración de productos cárnicos tales como jamón pasteurizado y chuletas envasadas. El riesgo es más elevado sobre todo cuando se eliminan las bacterias competidoras presentes en la materia prima o se evita la recontaminación con otras bacterias, como por ejemplo, cuando los productos se calientan después de ser envasados en latas o recubiertos de plásticos impermeables. En la alteración de carnes procesadas empaquetadas al vacío, generalmente predominan miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, aunque con frecuencia se encuentra también enterococos y pediococos.

La práctica de reprocesar las unidades defectuosas (como por ejemplo, aquellas que presentan el envoltorio roto) mezclándolas con la materia prima contribuye enormemente a incrementar la concentración de enterococos en los productos cárnicos. Los productos defectuosos contienen enterococos termo-resistentes, que pueden multiplicarse durante la manipulación y sobrevivir en gran número a un segundo proceso de calentamiento. A causa de esta alta resistencia al calor y a la supervivencia bajo condiciones medio-ambientales adversas, los enterococos han sido propuestos frecuentemente como indicadores de la calidad sanitaria de los alimentos.

#### 4.5. Presencia de enterococos en alimentos lácteos

Los enterococos (principalmente *E. faecium* y *E. faecalis*) son muy frecuentes en la leche cruda y en los productos lácteos (19, 30). Se desarrollan en gran variedad de quesos, especialmente en quesos artesanales producidos en el sur de Europa (Portugal, España, Italia y Grecia), como los de cabra crudos o pasteurizados, oveja o búfala, en muchos de los cuales juegan un papel importante en la maduración y el desarrollo del aroma (Tabla 3). Los niveles de enterococos en quesos oscilan entre  $10^4$  y  $10^7$  UFC/g. *E. faecium* y *E. faecalis* son las especies de enterococos predominantes. Su presencia en el queso se debe en parte, en la contaminación de la leche y a la supervivencia en el ambiente de la lechería mientras que otra parte proviene del crecimiento bajo las condiciones de fabricación y la maduración del queso. El dominio y la persistencia de los enterococos en algunos quesos durante la maduración se atribuyen al amplio rango de temperatura de crecimiento, y/o a la alta tolerancia a las sales y ácidos orgánicos. La concentración de sales aumenta durante la maduración del queso, siendo este un factor determinante para el crecimiento de bacterias tolerantes a la sal, como los enterococos.

**Tabla 3.** Algunos ejemplos de quesos que contienen enterococos.

Origen	Producto
España	Cebreiro, Tetilla, Serra da Estella, Cueva de la Magahá, Quesaila y Torta Arochena, Genesoto, Armada, Idiazábal, Manchego
Italia	Fiore Sardo, Vanoi, Rolle, Mozzarella, Fontina, Provolone, Pecorino, Montasio
Francia	Saint Nectaires, Comté
Grecia	Feta, Kefalotyri, Batzos, Orinotyri, Anthotyro
Portugal	Picante, y otros quesos regionales
Eslovenia	Tolmic
Serbia	Zlatar
Irlanda	Cheddar
Marruecos	Jben

Los enterococos presentan mayor actividad proteolítica que otras BAL y se consideran importantes para la maduración del queso. También ejercen efectos beneficiosos debidos a la hidrólisis de los ácidos grasos de la leche por las esterases que producen. Generan compuestos que confieren sabor y/o aroma, como acetaldehído, acetoína y diacetilo. En la maduración del queso Serra da Estrella, se ha relacionado la presencia de enterococos con la generación de compuestos volátiles como el ácido

butírico, hexil-acetato, y etil-decanoato (31). Este papel beneficioso de los enterococos en el desarrollo del aroma del queso conduce al uso de cepas seleccionadas como cultivos iniciadores. Actualmente, se acepta de forma generalizada que los enterococos juegan un papel importante en la fabricación de quesos típicos de algunas regiones, y su uso es de gran importancia en la industria láctica.

#### **4.6. Presencia de enterococos en alimentos de origen vegetal**

La presencia de enterococos en los alimentos de origen vegetal ha sido estudiada en mucho menor detalle en comparación con otros alimentos. Las cepas asociadas de forma natural a la filosfera de las plantas, y las de origen fecal, transmitidas a través del agua o por contaminación cruzada con otros alimentos, suponen la principal fuente de contaminación de los alimentos vegetales, bien sean crudos o procesados. En los ensilados, están presentes de forma natural y llegan a jugar un papel importante en la fermentación, por lo que algunas cepas se utilizan como inóculos.

En la fermentación de alimentos basados en sustratos amiláceos (como la mandioca o el maíz) se ha detectado la presencia de *E. saccharolyticus*, aunque se desconoce el papel que puede jugar esta bacteria en dicha fermentación. También están presentes en muchos alimentos vegetales fermentados de origen africano: Hussuwa (Sudán), DawaDawa (Nigeria), y Opekhe (Nigeria).

En la fermentación de la aceituna de mesa al estilo Español o Sevillano se han detectado enterococos en las fases tempranas de la fermentación (32). También se encuentran, aunque en muy baja proporción, en las aceitunas de mesa despachadas al detal. La presencia de enterococos en aceitunas de mesa se asocia a la contaminación cruzada durante la manipulación de las materias primas y a la capacidad de esta bacteria para sobrevivir en las salmueras.

#### **4.7. Los enterococos como probióticos**

Los probióticos se definen como “cultivos puros o mixtos de microorganismos vivos que, cuando son administrados a los animales o al hombre afectan al hospedador de forma beneficiosa mejorando las propiedades de la microbiota indígena” (33). Los efectos beneficiosos incluyen: el mantenimiento o restauración de la microbiota intestinal normal, la prevención o reducción de los trastornos gastrointestinales, la reducción de la intolerancia a la lactosa, una bajada de los niveles de colesterol en

suero, la actividad anticarcinogénica, así como una estimulación del sistema inmune y una mejora del valor nutricional de los alimentos. Determinadas cepas de enterococos, como *E. faecium* SF68, se comercializan como probióticos para uso en humanos y en animales. La cepa SF68 carece de factores de virulencia y de resistencia a los principales antibióticos. Ejerce un efecto inhibitor *in vitro* sobre el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Enterobacter* spp. Además, es resistente a pH ácido e insensible a las sales biliares, lo que favorece su implantación en el intestino y el desplazamiento de los patógenos. El empleo de *E. faecium* SF68 para el tratamiento de diarreas se considera una alternativa al tratamiento con antibióticos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Köhler, W. 2007. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 133-150.
2. Kayser, F. H. 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 255-262.
3. Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G., Witte, W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 269-290.
4. Franz, C. M. A. P., M. E. Stiles, K. H. Schleifer, W. H. Holzapfel. 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105-122.
5. Ogier, J.-C., Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 291-301.
6. Morrison, D., N. Woodford, B. Cooksen. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 83: 89S-99S.
7. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46-65.
8. Malani, P.N., C.A. Kauffman, M.J. Zervos. 2002. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment, pp. 385-408. In M.S. Gilmore (ed.), *The Enterococci. Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington, DC.
9. Eaton, T. J., M. J. Gasson. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628-1635.
10. Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M. A.P., Holzapfel, W.H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 118-130.
11. Sánchez Valenzuela, A., N. Ben Omar, H. Abriouel, R. Lucas López, E. Ortega, M. Martínez Cañamero, A. Gálvez. 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol.* 46: 2648-2652.
12. Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Sillanpaa, J., Garsin, D.A., Hook, M., Erlandsen, S.L., Murray, B.E. 2006. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* 116: 2799-807.
13. Cobo Molinos, A., H. Abriouel, N. Ben Omar, R. Lucas López, A. Galvez. 2006. Detection of *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 123-126.

14. Abriouel, H., Ben Omar, N., Cobo Molinos, A., Lucas López, R., Grande, M<sup>a</sup>.J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 38-49.
15. Grande Burgos, M.J., R. Lucas López, H. Abriouel, N. Ben Omar, A. Galvez. 2009. Multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* from vegetable foods reveals two new sequence types. *Foodborne Pathog. Dis.* 6: 231-327.
16. Courvalin, P. 2006. Vancomycin resistance in Grampositive cocci. *Infect. Dis.* 42: S25-S34
17. Werner, G., T M Coque, A M Hammerum, R Hope, W Hryniewicz, A Johnson, I Klare, K G Kristinsson, R Leclercq, C H Lester, M Lillie, C Novais, B Olsson-Liljequist, L V Peixe, E Sadowy, G S Simonsen, J Top, J Vuopio-Varkila, R J Willems, W Witte, N Woodford. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance* 13(47). pii: 19046.
18. Willems, R.J., Top, J., van Santen, M., Robinson, D.A., Coque, T.M., Baquero, F., Grundmann, H., Bonten, M.J. 2005. Global spread of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 821-828.
19. Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 744: 1-9.
20. Foulquié-Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, L. de Vuyst. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1-24.
21. Vancanneyt, M., A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K.J. Bjorkroth, C.M. Franz, M.R. Foulque Moreno, H. Revets, L. De Vuyst, J. Swings, K. Kersters, F. Dellaglio, W.H. Holzapfel. 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1381-1391.
22. Peters, J., Mac, K., Wichmann Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L. 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 311-314.
23. 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.
24. Van den Bogaard, A.E., E.E. Stobberingh. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16: S327-S-335.
25. Sarantinopoulos, P., C. Andrighetto, M.D. Georgalaki, M.C. Rea, A. Lombardi, T.M. Cogan, K. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 11: 621-647.
26. Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas López, R., Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51-70.
27. Gálvez, A., Lucas López, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 125-152.
28. Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, A. Gálvez. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293-310.
29. Hugas, M., M. Garriga, M. T. Aymerich. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 223-233.
30. Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215-222.

31. Dahl, S., F.K. Tavaría, F.X. Malcarta. 2000. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese through ripening. *Int. Dairy J.* 10: 255-262.
32. Floriano, B., J.L. Ruiz-Barba, R. Jiménez-Díaz. 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4883-4890.
33. Havenaar, R., B. Ten Brind, J.H.J. Huis in 't Veld. 1992. In Fuller, R. (ed.), pp. 209-224. Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London.

