



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

ENTEROCOCOS INTESTINALES

Alumno: Pérez Morales, Luis Ángel

Jaén, Junio, 2021

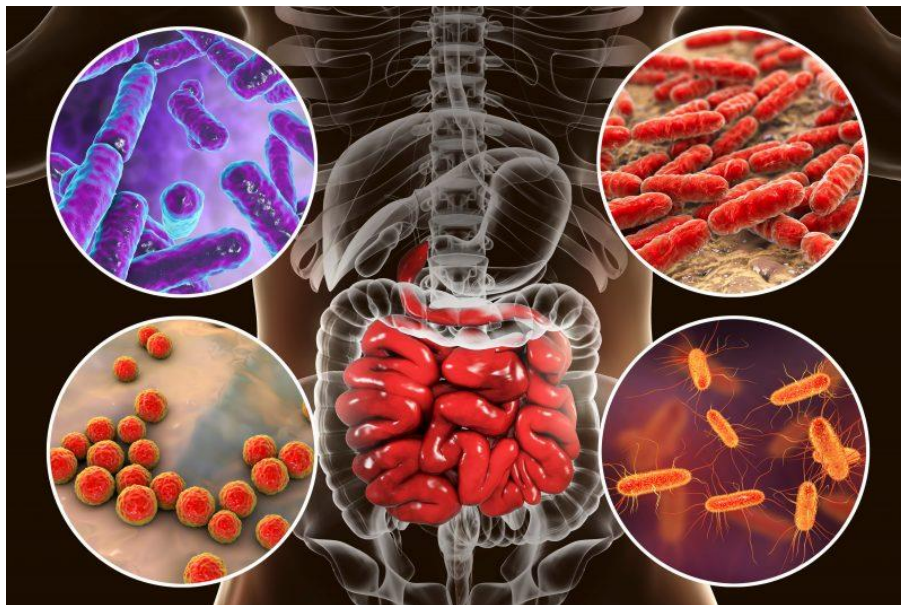


**UNIVERSIDAD
DE JAÉN**



Trabajo Fin de Grado

ENTEROCOCOS INTESTINALES



Alumno: Pérez Morales, Luis Ángel

Jaén, Junio, 2021

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Microbiota intestinal	3
1.2. Género <i>Enterococcus</i>	4
1.3. Naturaleza dual del género <i>Enterococcus</i>	5
1.4. Adquisición de resistencia a antibióticos y factores de virulencia.	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
4. RESULTADOS	11
4.1. “Antimicrobial resistance and virulence genes in <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> from humans and retail red meat” (Golob <i>et al.</i> , 2019).....	11
4.2. “Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice” (Sánchez <i>et al.</i> , 2019	15
4.3. “Prevalence of an Intestinal ST40 <i>Enterococcus faecalis</i> over Other <i>E. faecalis</i> Strains in the Gut Environment of Mice Fed Different High Fat Diets” (Sánchez <i>et al.</i> , 2020)	19
4.4. “Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Biofilm Formation Capacity Among <i>Enterococcus</i> species From Yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China” (Cui <i>et al.</i> 2020).....	19
5. DISCUSIÓN	22
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA	24

RESUMEN

Los enterococos intestinales son microorganismos bastante ubicuos que forman parte de la microbiota intestinal de los humanos. La facilidad con la que estos microorganismos adquieren resistencias a antibióticos sumado a la gran capacidad que poseen para sobrevivir en cualquier ambiente, ha ocasionado serios problemas de salud, principalmente en personas hospitalizadas. En esta revisión se expondrán distintos artículos relacionados con el tema a través de los cuales se extraerán las principales conclusiones. Todos estos estudios se centran en la resistencia a antibióticos y los genes de virulencia del género *Enterococcus* en la ruta oral-fecal, pues caracterizándolos lo mejor posible podemos aumentar el abanico de posibilidades a la hora de responder frente a infecciones por estos enterococos y sobre todo, evitar que se produzcan mediante un control más estricto sobre los alimentos y los animales, pues son importantes reservorios de enterococos patógenos para el ser humano.

ABSTRACT

Intestinal enterococci are very ubiquitous microorganisms that are part of the human gut microbiota. The ability of these microorganism to acquire several antibiotic resistances and their capacity to survive in any environment has occasioned several health problems, principally in hospitalized people. This review will show different articles related to this theme in order to extract the principal conclusions. All of them focus in the virulence genes and antibiotic resistance of the *Enterococcus* genus in the oral-fecal route with the purpose of characterize all of them in order to increase the posible treatments against infections caused by enterococci and, specially, avoid them with a strict control over food and animals, which are important reservoirs of pathogenic enterococci for humans.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microbiota intestinal

En el intestino humano podemos encontrar una gran variedad de miembros que forman la llamada microbiota intestinal. La microbiota intestinal tiene una gran importancia, tanto que sus funciones metabólicas, nutricionales y moduladoras de la inmunidad de nuestro sistema han sido ampliamente estudiadas (Sebastián Domingo y Sánchez Sánchez, 2018). Es de gran interés en el ámbito médico la relación entre los microorganismos intestinales y algunas enfermedades como la osteoartritis o la diabetes mellitus tipo 2 (Wu *et al.*, 2019; Horie *et al.*, 2017). Este interés ha ido en aumento desde que se mostró el cambio que sufría dicha microbiota en pacientes con enfermedades intestinales, alergias o enfermedades relacionadas con el estilo de vida. El equilibrio de la microbiota intestinal es determinante para que el medio intestinal se encuentre en buenas condiciones y la manipulación de esta mediante prebióticos puede ayudar al buen mantenimiento intestinal o a mejorar una enfermedad de este ámbito (Kataoka, 2016).

En el contexto de nuestra microbiota, podemos encontrar bacterias, arqueas y virus, cuyas relaciones con el hospedador van desde la simbiosis al parasitismo. Estos microorganismos se pueden clasificar en dos grupos: los autóctonos, los cuales pertenecen a la microbiota normal del individuo, y los alóctonos, aquellos que no suelen formar parte de esa microbiota (Milani *et al.*, 2017). Así mismo, la composición de la microbiota intestinal dependerá de factores como la dieta del individuo, las interacciones entre los organismos que la componen y la genética del propio individuo (Zhang *et al.*, 2010). Los primeros microorganismos detectados tras el nacimiento son *Lactobacillus*, probablemente por la exposición al canal del parto, posteriormente aparecen *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Escherichia coli* por exposición al ambiente. Tras el destete, el intestino es colonizado por gran diversidad de bacterias y la microbiota intestinal ya se empieza a asemejar a la adulta (Kataoka, 2016).

El efecto de la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal es muy importante, debido a la variación en el tipo de nutrientes y la competencia por los recursos de los distintos tipos bacterianos (Albenberg *et al.*, 2014). El equilibrio existente entre la microbiota intestinal y el hospedador se puede romper debido a

factores ambientales como infecciones, cambios en la composición de dicha microbiota o la dieta que se tenga y otros factores como la edad o el estilo de vida (Sebastián Domingo y Sánchez Sánchez, 2018). Esta revisión bibliográfica se centrará en el género bacteriano *Enterococcus*, así como la dualidad implícita en su naturaleza (Golob *et al.*, 2019).

1.2. Género *Enterococcus*

Los enterococos son bacterias pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico. Se trata de un grupo muy heterogéneo de bacterias y cuyas propiedades y variedad ha sido de gran interés para los investigadores, aunque han ido cambiando a lo largo de las décadas (Garmasheva y Kovalenko, 2010). Son bacterias gram positivas ovoides o esféricas cuyo patrón de crecimiento es en parejas o en cadenas de longitud variable (Hardie y Whiley, 1997; Murray, 1990). Suelen estar en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente donde desempeñan el papel de comensales, siendo los cocos Gram-positivos más abundantes en humanos (Tannock y Cook, 2002).

A diferencia del resto de bacterias pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico, el género *Enterococcus* no se considera “generalmente reconocido como seguro” (GRAS). Esto es debido a la controvertida naturaleza de los enterococos, los cuales son útiles en campos como la fermentación de alimentos pero a su vez son patógenos oportunistas para los humanos (Ogier y Serror, 2008).

Al principio, este género fue clasificado dentro del género *Streptococcus*, pero posteriormente y debido a estudios genéticos por hibridación de ARN-ADN y ADN-ADN se concluyó que debían clasificarse en un nuevo género (Schleifer y Kilpper-Balz, 1984). Para ello, se llevaron a cabo diferentes técnicas para poder identificarlos de forma correcta, en especies y subespecies, como el ribotipado (Moore *et al.*, 2005), REP-PCR o BOX-PCR (Nayak *et al.*, 2011), técnicas electroforéticas en campo pulsado (Gordillo *et al.*, 1993; Tenover *et al.*, 1997) y tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007). Los métodos basados en el fenotipo de los enterococos para diferenciarlos suponen un problema, ya que la gran diversidad que estos presentan hace muy complicada esta tarea (Devriese *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1999).

1.3. Naturaleza dual del género *Enterococcus*

Las bacterias del género *Enterococcus* se distribuyen ampliamente en diferentes ambientes, aunque se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente, formando así parte de su microbiota intestinal (Murray, 1990). También pueden encontrarse en diversas comidas de origen animal y vegetal debido a su extraordinaria capacidad para sobrevivir en medios cuyas condiciones son bastante adversas y poseen propiedades organolépticas únicas que les confiere la utilidad de ser usados para fermentar ciertas comidas donde, además, tienen un papel beneficioso (Murray, 1990; Muller *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2003; Foulquié *et al.*, 2006). Además, podemos destacar como propiedades beneficiosas de este género la producción de bacteriocinas (Reis *et al.*, 2012; Jouani *et al.*, 2015) frente a bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*, y que pueden ser usadas en conservación de comida y como probióticos (Franz *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2011).

Su alto contenido en las heces humanas y animales los convierten también en un perfecto indicador para valorar el estado de las aguas para consumo humano y agrícola (US Environmental Protection Agency, 2004; Wade, 2008), ya que su presencia en dichas aguas indicaría una contaminación fecal, convirtiéndose en un riesgo para la salud (Cizek *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2007; Schoen *et al.*, 2011; Tseng y Jiang, 2012).

Si bien los enterococos poseen numerosas aplicaciones y efectos beneficiosos, también son reconocidos como patógenos humanos (Golob *et al.*, 2019). Estos microorganismos son los principales patógenos que provocan enfermedades nosocomiales, es decir, aquellas que afectan a las personas hospitalizadas durante su estancia en el centro médico, transmitiéndose a través de comida contaminada o por contacto con una persona infectada, provocando infecciones del tracto urinario y heridas, bacteremia y endocarditis (Kayser, 2003; Franz *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2000; Murray y Weinstock, 1999). Estos enterococos causantes de enfermedades nosocomiales también poseen un punto de vista económico además del claramente sanitario que es bastante interesante, pues este género tiene un impacto en la economía ya que prolonga el tiempo de

hospitalización de los pacientes a los que afecta y provoca el empleo de tratamientos médicos adicionales sobre los mismos (Wenzel y Edmond, 2001).

Las complicaciones mencionadas anteriormente se deben a que tienen la capacidad de pasar a través del epitelio intestinal intacto, invadiendo así zonas fuera de este y modificando su papel de comensales a patógenos (Wells *et al.*, 1990). En este sentido, cabe destacar a *Enterococcus faecalis* (90%) y *Enterococcus faecium* (10%) dentro de este ámbito por ser responsables de numerosas infecciones nosocomiales (Murray, 1990; Jett *et al.*, 1994; Jones *et al.* 2004). Originalmente, *E. faecalis* era el principal agente causante de infecciones nosocomiales, pero en las últimas dos décadas, ha ocurrido justo lo contrario. La mayor parte de las infecciones han sido provocadas por *E. faecium*, el cual tiene mayor facilidad para volverse resistente frente a vancomicina y ampicilina que *E. faecalis* (Willems y Schaik, 2009; Agudelo Higueta y Huycke, 2014). Sin embargo, otras especies como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* o *E. raffinosus* no han tenido la misma relevancia desde el punto de vista médico y de la salud pública como causantes directos de infecciones por enterococos (Ogier y Serror, 2008).

Los principales factores de riesgo que conducen a una infección por enterococos son principalmente el tratamiento previo de infecciones con antibióticos, la presencia de catéteres en el tracto urinario o vascular, las largas estancias en el hospital y la mala praxis a la hora de aplicar las medidas de higiene básicas, causando una mortalidad del 20-30% (Lucas *et al.*, 1998; Caballero-Granado *et al.*, 2001; Lavigne *et al.*, 2005).

1.4. Adquisición de resistencia a antibióticos y factores de virulencia

Los diferentes enterococos van evolucionando en la microbiota en función de la dieta, la competencia por los recursos y la propia autorregulación del organismo, desarrollando así mecanismos de defensa para protegerse de productos químicos (medicamentos) y proteínas perjudiciales. Dentro de estos mecanismos cabe destacar la resistencia a antibióticos y los factores de virulencia, los cuales afectan en gran medida al hospedador pudiendo causarle graves infecciones (Sánchez *et al.*, 2019). La facilidad con la que los enterococos adquieren resistencia a los antibióticos se debe a la transferencia horizontal de genes, dándoles así una mayor

variabilidad genética y la posibilidad de aumentar su supervivencia en el tracto intestinal (Golob *et al.*, 2019). Poco a poco, los enterococos están mostrando que son resistentes a la mayoría de antibióticos usados para combatir infecciones humanas (Hollenbeck y Rice, 2012).

Las bacterias pueden adquirir los factores de virulencia siguiendo diferentes caminos. Los factores de virulencia están codificados tanto por el genoma de la bacteria como por los plásmidos que esta contenga, cuyo número puede variar desde 1 a varios cientos (Huguet, J. *et al.*, 2002). Por tanto, los genes que poseen pueden contribuir de forma directa o indirecta a la virulencia de la bacteria (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 1999, 2001, 2003; Kayser, 2003). Otra forma de adquirir esta virulencia es a través de los intercambios de ADN con otras cepas bacterianas por conjugación, transposones y secuencias de inserción (Franz *et al.*, 2007). El hecho de que sean microorganismos comensales en el tracto intestinal hace difícil el estudio de sus factores de virulencia, pues en ahí donde ocurren los fenómenos de intercambio de ADN (Eaton y Gasson, 2001). Uno de estos factores de virulencia más estudiados es *agg*, se trata de una proteína de agregación producida por el gen *agg*. A través de esta proteína las bacterias pueden formar agregados, lo que facilita los fenómenos de transferencia de plásmidos que pueden llevar genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Clewell, 1993); adherirse a otras células (epiteliales o intestinales) y superar los mecanismos inmunológicos del hospedador (Tendolkar *et al.*, 2004). Otros factores de virulencia participan en resistencia a macrófagos, adherencia a proteínas extracelulares de la matriz, evasión del sistema inmune y daño tisular (Gilmore *et al.*, 2002; Tendolkar *et al.*, 2003). Los más importantes son la gelatinasa (*gelE*), la citolisina (*cytA*), la proteína de superficie de enterococos (*esp*), la hialuronidasa (*hyl*), la proteína de unión al colágeno (*ace*), los antígeno de endocarditis (*efaA*) y la dismutasa superóxido extracelular (Foulquié *et al.*, 2006; Vankerhoven *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2010; Ferguson *et al.*, 2016). Se ha demostrado que muchos de los genes de virulencia descritos están involucrados en el comienzo de enfermedades humanas o en el empeoramiento de los síntomas de dichas enfermedades (Anderson *et al.*, 2016).

Tabla 1.1 Genes de virulencia de *E. faecalis* y sus funciones (Ogier y Serror, 2007).

Gene	Encoded factor	Putative role	Reference
Adhesins			
<i>agg</i>	Aggregation substance	Adhesion and colonization	Kreft et al. (1992), Rozdzinski et al. (2001)
		Resistance to host defense	Sartingen et al. (2000), Wells et al. (2000), Waters and Dunny (2001)
<i>efaA</i>	<i>E. faecalis</i> antigen A	Colonisation	Rakita et al. (1999), Vanek et al. (1999), Sussmuth et al. (2000)
<i>esp</i>	Enterococcal surface protein	Adhesion and colonization	Singh et al. (1998a)
<i>ace</i>	Adhesin to collagen of <i>E. faecalis</i>	Adhesion to ECM	Shankar et al. (2001)
			Nallapareddy et al. (2000)
Proteases			
<i>gelE</i>	Gelatinase	Tissue damage	Singh et al. (1998b)
<i>sprE</i>	Serine protease	Tissue damage	Sifri et al. (2002)
Secreted factors			
<i>cylA-M</i>	Cytolysin/Hemolysin	Tissue damage	Ike et al. (1984), Jett et al. (1992)
<i>gls24</i>	Glucose starvation induced protein	Persistence in the host	Nannini et al. (2005)
Exopolysaccharides			
<i>cpsA-K</i>	Capsular polysaccharide	Resistance to host defense	Hancock and Gilmore (2002), Huebner et al. (2000), Hufnagel et al. (2004)
<i>epa</i>	Capsular polysaccharide	nd ^a	Xu et al. (2000)
Transcriptional regulator^b			
<i>cylR1-R2</i>	2 component peptide system	<i>cylA-M</i> regulation	Jett et al. (1992), Chow et al. (1993), Haas et al. (2002)
<i>fsrA-C</i>	<i>agr</i> -like regulatory system	<i>gelE</i> and <i>sprE</i> regulation	Qin et al. (2000), Mylonakis et al. (2002)
			Qin et al. (2001), Sifri et al. (2002)
<i>etaRS</i>	OmpR-like 2 component system	nd	Teng et al. (2002)
<i>hypR</i>	Hydrogen peroxide regulator	Resistance to host defense	Vermeuil et al. (2005a), Vermeuil et al. (2004)
<i>perR</i>	Peroxide regulator	nd	Vermeuil et al. (2005b)

Los enterococos más estudiados en esta problemática son *E. faecium* y *E. faecalis*, pues son los que tienen un mayor impacto clínico. La resistencia de los enterococos a las condiciones adversas tanto del intestino como de otros hábitats, les confiere un grado de resistencia a bajas concentraciones de distintos antibióticos tales como los β -lactámicos o las quinolonas (Kacmaz y Aksoy, 2005). Además de esta resistencia natural que poseen, han adquirido factores genéticos que los convierten en resistentes a otros antibióticos (Endtz *et al.*, 1999). El problema principal son los enterococos resistentes a vancomicina, pues suponen un gran problema a la hora de tratar las infecciones humanas, ya que este antibiótico se usa como tratamiento de último recurso en infecciones producidas por enterococos resistentes a múltiples antibióticos (Huycke *et al.*, 1998).

El análisis genético es crucial para determinar el potencial de virulencia que poseen las distintas especies de enterococos, así como para llevar a cabo la trazabilidad de los distintos focos. Así, por ejemplo, nos permite detectar una posible zoonosis hacia el ser humano por contaminación de carne fresca durante la matanza del animal, pues se encuentran colonizando su intestino y puede suponer un grave problema de salud (Poulsen *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2018).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Partimos de la hipótesis de que los enterococos son bacterias comensales de nuestro intestino, pero que factores tanto intrínsecos como extrínsecos pueden romper el equilibrio entre las poblaciones de este género y el hospedador dando lugar a un cuadro clínico.

El objetivo principal será:

- Descubrir los factores que alteran la relación comensal entre el hospedador y las poblaciones de enterococos intestinales.

Los objetivos específicos serán:

- Desentrañar elementos de la relación entre el hospedador y las poblaciones de enterococos intestinales.
- Revisar formas de mantener la relación beneficiosa entre la microbiota intestinal y el hospedador.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta revisión bibliográfica sobre enterococos intestinales se ha llevado a cabo buscando información sobre el tema en cuestión usando la base de datos online PubMed, donde están recogidos los artículos científicos usados para la elaboración de la memoria. De esta forma, filtrando rigurosamente la información encontrada sobre la hipótesis de trabajo, se hallaron las claves necesarias para responder a los objetivos e hipótesis propuestos. Los artículos analizados en el siguiente apartado fueron encontrados mediante la modalidad de “filtrado avanzado” en el buscador de PubMed, tal y como se expone a continuación en detalle.

En primer lugar, se realiza una búsqueda en PubMed restringiendo el filtro de año de publicación a los dos últimos años y se añaden las palabras clave “enterococci”, “virulence”, “antibiotic resistance” y “diet”. Como resultado, aparecen dos artículos, entre los cuales se escoge “Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice” (Sánchez *et al.*, 2019), ya que el otro artículo habla de los enterococos pero aislados en mariposas y por tanto, los resultados de este estudio no son trasladables a lo que ocurre en mamíferos, pues son más cercanos al hombre que es lo que se busca en esta revisión bibliográfica. Además, escogemos también el artículo “Prevalence of an Intestinal ST40 *Enterococcus faecalis* over

Other *E. faecalis* Strains in the Gut Environment of Mice Fed Different High Fat Diets” (Sánchez *et al.*, 2020), encontrado al revisar los artículos que habían citado al anterior, ambos están tan relacionados que es necesario hablar de los dos si se analiza uno solo.

Se realiza una segunda búsqueda más amplia para encontrar más variedad de artículos referentes al tema en cuestión, para ello se elimina la palabra clave “diet” y se mantienen las demás. En esta búsqueda se realiza un análisis de los abstracts de los artículos encontrados, seleccionando aquellos que traten sobre enterococos intestinales o de alimentos y que no traten sobre cepas clínicas, ya que lo que se buscan son cepas comensales que puedan volverse clínicas en el interior del hospedador al romperse la relación de equilibrio con él. Con esta búsqueda aparecen cinco artículos, de los cuales, a través del análisis de los abstracts seleccionamos “Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat” (Golob *et al.*, 2019) y “Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Biofilm Formation Capacity Among *Enterococcus* species From Yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China” (Cui *et al.*, 2020). El resto se descartan, puesto que tratan sobre cepas y aislados clínicos o sobre otros microorganismos también como *E. coli* en animales salvajes.

Las palabras clave de esta revisión bibliográfica son “enterococos”, “genes de virulencia”, “resistencia a antibióticos”, “riesgo sanitario” y “salud humana”.

De acuerdo a la información encontrada, se elaborarán unos resultados que recojan los aspectos más importantes y que permitan responder a los objetivos e hipótesis y, seguidamente, una discusión crítica de los mismos.

4. RESULTADOS

En este apartado se mostrará una ampliación de los artículos encontrados en el apartado “material y métodos” y que son de gran interés acerca del tema tratado en esta revisión bibliográfica. Estos artículos son “Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat” (Golob *et al.*, 2019), “Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice” (Sánchez *et al.*, 2019), “Prevalence of an Intestinal ST40 *Enterococcus faecalis* over Other *E. faecalis* Strains in the Gut Environment of Mice Fed Different High Fat Diets” (Sánchez *et al.*, 2020) y “Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Biofilm Formation Capacity Among *Enterococcus* species From Yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China” (Cui *et al.*, 2020).

Se irán desgranando los aspectos más relevantes de estos artículos en relación a nuestra hipótesis, profundizando en los resultados y conclusiones que se obtuvieron para posteriormente, realizar una discusión que englobe a todos ellos a modo de aclaración y resumen.

4.1. “Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat” (Golob *et al.*, 2019)

En este artículo se realiza un proceso experimental para comprobar el grado de resistencia a antibióticos de dos especies del género *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*), aislados tanto de muestras clínicas humanas como de carne roja vendida al por menor en Eslovenia. Probaron un total de 12 antibióticos distintos sobre las muestras aisladas de enterococos.

Ambas especies fueron clasificadas como resistentes o susceptibles de acuerdo a los valores de corte del Comité Europeo de pruebas de sensibilidad a antibióticos (EUCAST) y a las recomendaciones del laboratorio de referencia de resistencia a antimicrobianos de Europa (EURL-AR) (EFSA y ECDC, 2019).

Tabla 4.2. Resultados del test de resistencia a antibióticos de 191 *E. faecalis* y 51 *E. faecium* aislados de muestras clínicas humanas y carne roja vendida al por menor (Golob *et al.*, 2019).

Resistance to no. of antimicrobials	Human clinical specimens No. of isolates [%]		Red meat No. of isolates [%]	
	Efs (n=71)	Efm (n=30)	Efs (n=120)	Efm (n=21)
6	1 [1.4]	3 [10.0]	0 [0.0]	0 [0.0]
5	4 [5.6]	*** 13 [43.3]	0 [0.0]	0 [0.0]
4	4 [5.6]	3 [10.0]	0 [0.0]	0 [0.0]
3	** 12 [16.9]	3 [10.0]	2 [1.7]	0 [0.0]
MDR	**** 21 [29.6]	**** 22 [73.3]	2 [1.7]	0 [0.0]
2	*** 14 [19.7]	3 [10.0]	4 [3.3]	1 [4.8]
1	27 [38.0]	2 [6.7]	39 [32.5]	2 [9.5]
Susceptible	9 [12.7]	3 [10.0]	**** 75 [62.5]	**** 18 [85.7]
Total	101		141	

Efs: *Enterococcus faecalis*; Efm: *Enterococcus faecium*; MDR: multidrug resistant.

Como se puede observar en las especies aisladas de muestras clínicas humanas, solo un 11,9% fueron clasificadas como susceptibles a antibióticos frente a un 69,5% de susceptibilidad que presentaban las especies aisladas de la carne. La gran mayoría de especies con resistencia a múltiples antibióticos (MDR) para ambas especies se encuentran dentro de las aisladas en muestras humanas, mientras que en las de la carne apenas encontramos este fenotipo. Otro dato interesante es que ambas especies tanto de muestras humanas como de carne son susceptibles a daptomicina, linezolid, teicoplanin y vancomicina. Existe una fuerte conexión entre el origen de la comida y las especies susceptibles aisladas.

Así mismo, recopilamos datos sobre los genes que codifican factores de virulencia en ambas especies, diferenciando entre los aislados de muestras clínicas humanas y los de la carne roja para observar la comparativa.

Tabla 4.3. Distintos genes codificantes de factores de virulencia presentes en 191 *E. faecalis* y 51 *E. faecium* aislados de muestras clínicas humanas y carne roja vendida al por menor (Golob *et al.*, 2019).

Virulence gene	Human clinical specimens No. of isolates [%]		Red meat No. of isolates [%]	
	Efs	Efm	Efs	Efm
<i>ace</i>	54 [76.1]	4 [13.3]	92 [76.7]	0 [0.0]
<i>asal</i>	**** 46 [64.8]	2 [6.7]	38 [31.7]	0 [0.0]
<i>cylA</i>	**** 32 [45.1]	2 [6.7]	6 [5.0]	0 [0.0]
<i>efaA</i>	69 [97.2]	4 [13.3]	115 [95.8]	0 [0.0]
<i>esp</i>	**** 51 [71.8]	**** 21 [70.0]	13 [10.8]	0 [0.0]
<i>gelE</i>	*** 63 [88.7]	2 [6.7]	79 [65.8]	0 [0.0]
<i>hyl</i>	2 [2.8]	**** 16 [53.3]	0 [0.0]	0 [0.0]
Total	71	30	120	21

Efs: *Enterococcus faecalis*, Efm: *Enterococcus faecium*; ace: collagen-binding protein; asal: aggregation substance; cylA: cytolysin; efaA: endocarditis antigen; esp: enterococcal surface protein; gelE: gelatinase; hyl: hyaluronidase

Ninguno de los enterococos aislados presentaba todos los factores de virulencia testados. En el caso de *E. faecalis* aislado de muestras humanas, en el 94,4% de los casos presentaba varios genes codificantes de factores de virulencia y en los aislados de la carne, en un 70% de los casos. Por otra parte, *E. faecium* aislado de muestras humanas solamente presenta varios factores de virulencia simultáneos en un 13,3% de los casos y en los aislados de la carne no se encontró ninguno que poseyera genes de virulencia. *E. faecium* no es muy relevante en el ámbito de infecciones humanas, pero hay que considerarlo como una forma de transferencia de genes de virulencia a otros enterococos que sí son patógenos. Por otro lado, *E. faecalis* aislado de animales es considerado una amenaza para los humanos por sí mismo, pues los tipos son iguales a los aislados en pacientes con una bacteremia por enterococos, carne, animales y muestras de heces humanas (Hammerum, 2012).

Tabla 4.4. Patrones de genes de virulencia observados en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de muestras clínicas humanas y de carne (Golob *et al.*, 2019).

Virulence gene pattern	Human clinical specimens No. of isolates		Red meat No. of isolates	
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	22	1	0	0
<i>ace-asa1-cylA-efaA-gelE</i>	2	0	1	0
<i>ace-asa1-efaA-esp-gelE</i>	2	0	0	0
<i>ace-efaA-asa1-esp-cylA</i>	4	0	4	0
<i>asa1-cylA-efaA-esp-gelE</i>	4	0	1	0
<i>ace-asa1-cylA-efaA</i>	0	1	0	0
<i>ace-asa1-efaA-gelE</i>	9	0	17	0
<i>ace-efaA-esp-gelE</i>	7	1	3	0
<i>asa1-efaA-esp-gelE</i>	2	0	1	0
<i>ace-asa1-efaA</i>	0	0	9	0
<i>ace-efaA-esp</i>	1	1	0	0
<i>ace-efaA-gelE</i>	7	0	39	0
<i>asa1-efaA-esp</i>	1	0	0	0
<i>asa1-efaA-gelE</i>	0	0	3	0
<i>efaA-esp-gelE</i>	6	0	4	0
<i>ace-efaA</i>	0	0	19	0
<i>asa1-efaA</i>	0	0	1	0
<i>asa1-gelE</i>	0	0	1	0
<i>efaA-gelE</i>	2	0	8	0
<i>esp-hyl</i>	2	16	0	0
<i>efaA</i>	0	0	5	0
<i>esp</i>	0	2	0	0
<i>gelE</i>	0	0	1	0
None	0	8	3	21
Total	71	30	120	21

Por último, estos autores recogieron información sobre los patrones de genes de virulencia que presentaban los distintos enterococos aislados. En *E. faecalis* aislados de muestras humanas el patrón más común es *ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE*, encontrado en el 31% de las muestras, un 73,3% de las muestras presentaban 4 o más factores de virulencia simultáneamente frente a un 10% que presentaban *E. faecium*. En el caso de las muestras aisladas de la carne, en el caso de *E. faecium*, no se encuentra ningún factor de virulencia, pero en *E. faecalis* sí, aunque con una incidencia menor que en las muestras humanas, pues la mayoría presentan solo 3 factores de virulencia a la vez frente a los 6 que presentan mayoritariamente las muestras humanas de esta especie.

En conclusión, los autores tratan los resultados de la investigación desde un punto de vista positivo, pues todos los enterococos aislados eran sensibles a daptomicina, linezolid, teicoplanin y vancomicina, junto a una mayor proporción de muestras sensibles a antibióticos y con menos factores de virulencia encontradas en la carne frente a las obtenidas de muestras clínicas humanas. Sin embargo, los patrones de genes de virulencia encontrados en los enterococos de la carne, no fueron apenas encontrados en los que se encuentran en humanos, por tanto, la carne puede ser considerada una fuente de *E. faecalis* virulentos. En el caso de *E. faecium*, la carne no es un posible transmisor de individuos virulentos.

4.2. “Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice” (Sánchez *et al.*, 2019)

En este artículo en el cual se trata de comparar una colección de 50 enterococos aislados de heces de ratones alimentados de forma distinta (dieta estándar, dieta alta en grasas con aceite de oliva virgen extra, dieta alta en grasas con aceite refinado y dieta alta en grasas con mantequilla). Las comparativas se realizan a las 6 semanas y a las 12 semanas tras el comienzo de la dieta y se compara la resistencia a antibióticos que poseen en función de la dieta.

Las especies de enterococos se fueron aislando conforme progresaba el ensayo, 12 especies al momento de comenzar, 18 más a las 6 semanas y otras 20 a las 12 semanas. Casi todas ellas fueron aisladas de las heces de ratones con dieta alta en grasas con mantequilla (BT). Por el contrario, de las heces de ratones con dieta alta en grasas con aceite de oliva (EVOO) apenas se aislaron especies. Las especies más frecuentemente aisladas fueron *E. faecalis* y *E. casseliflavus*.

A esas 50 cepas de enterococos aisladas se les hizo una RAPD-PCR, para poder agruparlas según la similitud existente entre ellas, lo que generó una figura en forma de árbol que agrupaba a las especies en 3 grupos principales. El grupo 1, que incluía solo 5 cepas todas ellas aisladas de ratones con dieta estándar (SD); el grupo 2, con un 40% de las especies aisladas pertenecientes tanto a los ratones SD como a los otros grupos en la semana 0; por último el grupo 3, que incluía al resto

de las especies (52%), la mayoría de ellas aisladas de ratones con dietas BT, EVOO y ROO.

Tras eso, se llevó a cabo otro ciclo de PCRs específicas para identificar los genes de virulencia de las cepas aisladas. De todas ellas, 36 presentaban al menos un factor de virulencia, 6 eran positivas para dos factores de virulencia y solo una de ellas era positiva para 3 factores de virulencia. Sin embargo, solo el gen *esp* alcanzó el número necesario de positivos para realizar un estudio estadístico. Este estudio no produjo diferencias significativas en la presencia del gen *esp* entre los 4 tipos de dietas por separado, pero al comparar la dieta estándar con el conjunto de dietas altas en grasas, se deduce que los enterococos aislados de ratones SD apenas presentan este gen virulento en comparación con el resto de dietas.

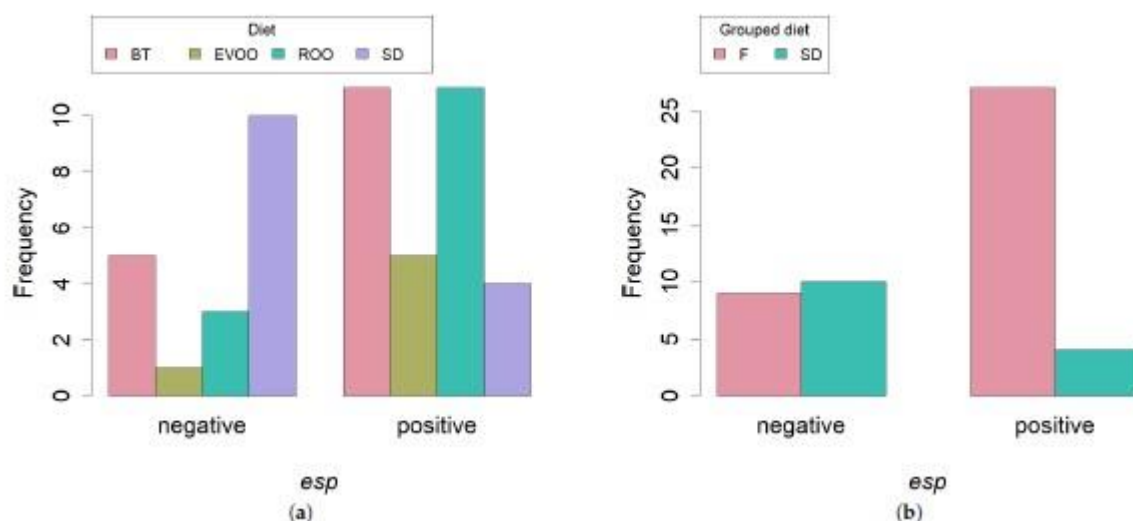


Figura 4.1. Gráfico de barras del número de cepas con presencia (positivas) o ausencia (negativas) del gen *esp*, distribuido entre las cuatro dietas; (a) Prueba exacta de Fisher ($p = 0.0234$) o entre dietas SD y altas en grasas; (b) Prueba exacta de Fisher ($p = 0.0037$). SD: dieta estándar; BT, dieta enriquecida con mantequilla; EVOO, dieta enriquecida con aceite oliva virgen extra; ROO, dieta enriquecida con aceite de oliva refinado; F, todas las dietas altas en grasas (Sánchez *et al.*, 2019).

Además de estos análisis, también se estudió si las especies aisladas contenían genes codificantes de aminos biógenas perjudiciales para la salud. El procedimiento fue el mismo empleado para la detección de los genes de virulencia, mediante PCR. Se obtuvo que al menos 29 especies dieron resultado positivo para el gen que codifica la tirosina descarboxilasa (*tyr*). Para la realización del análisis estadístico, se usaron solo las dietas de las cuales se aislaron cepas en las semanas 0, 6 y 12, con el fin de obtener diferencias significativas ($p < 0.05$), por lo que se descartó la dieta

EVOO. Las cepas aisladas a las 12 semanas presentan un mayor porcentaje de positivos para el gen *tdc*, mientras que las que se aislaron en la semana 0 apenas presentan este gen.

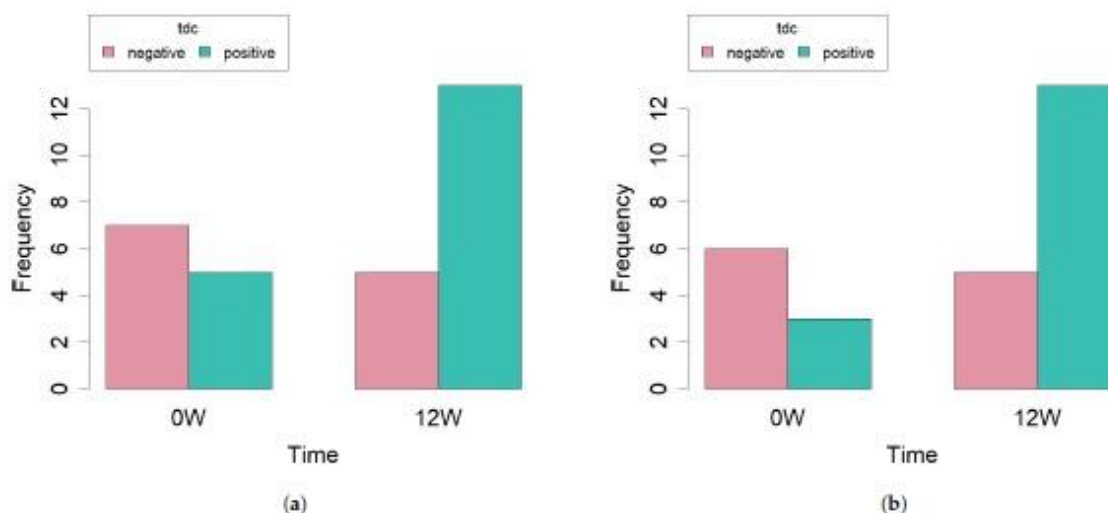


Figura 4.2. Gráfico de barras del número de cepas con presencia (positivas) o ausencia (negativas) del gen *tdc*, al comienzo o al final del experimento considerando cepas de todas las dietas; (a) Prueba exacta de Fisher ($p = 0,1362$) o de todas las dietas excepto una enriquecida con aceite de oliva virgen extra; (b) Prueba exacta de Fisher ($p = 0,0968$) (Sánchez *et al.*, 2019).

Otro parámetro estudiado fue la resistencia a antibióticos presentada por las 50 especies aisladas a 50 antibióticos distintos. Las especies se clasificaron en resistentes, resistencia intermedia o sensibles. El efecto de cada antibiótico fue muy distinto según la cepa afectada, excepto en el caso de la kanamicina, norfloxacin y levofloxacin para los cuales la mayoría de las especies eran sensibles. De las 50 especies, 31 fueron resistentes a 5 o más antibióticos, mientras que solamente 3 especies no presentaron ninguna resistencia. Tras el análisis estadístico, se concluyó que las especies aisladas de ratones SD presentaban una menor resistencia que las especies aisladas de los ratones con dietas altas en grasas.

Por último, se comparó el crecimiento de las cepas aisladas de las heces de ratones con las diferentes dietas en presencia de aceite de oliva virgen para ver las diferencias mostradas en función de la alimentación y la resistencia que estos adquieren al aceite de oliva, conocido por su efecto antimicrobiano y comprobar si este efecto era distinto entre oliva virgen y refinado. Cuando las cepas de las todas las dietas se intentaron crecer en presencia de EVOO, se encontró una inhibición parcial del crecimiento en todas ellas, sin embargo en presencia de ROO se

encontró una alternancia de cepas con crecimiento parcialmente inhibido y otras que no. Es decir, había menos inhibición por ROO. A continuación se muestra la gráfica resultante del análisis estadístico realizado a partir de los datos obtenidos, en la cual se muestra además como en la dieta ROO es donde se encuentra la mayor tasa de crecimiento bacteriano con respecto a las otras dietas. Es decir, las cepas de enterococos aisladas de ratones alimentados con aceite de oliva refinado presentan mayor resistencia a crecer en presencia de esta grasa.

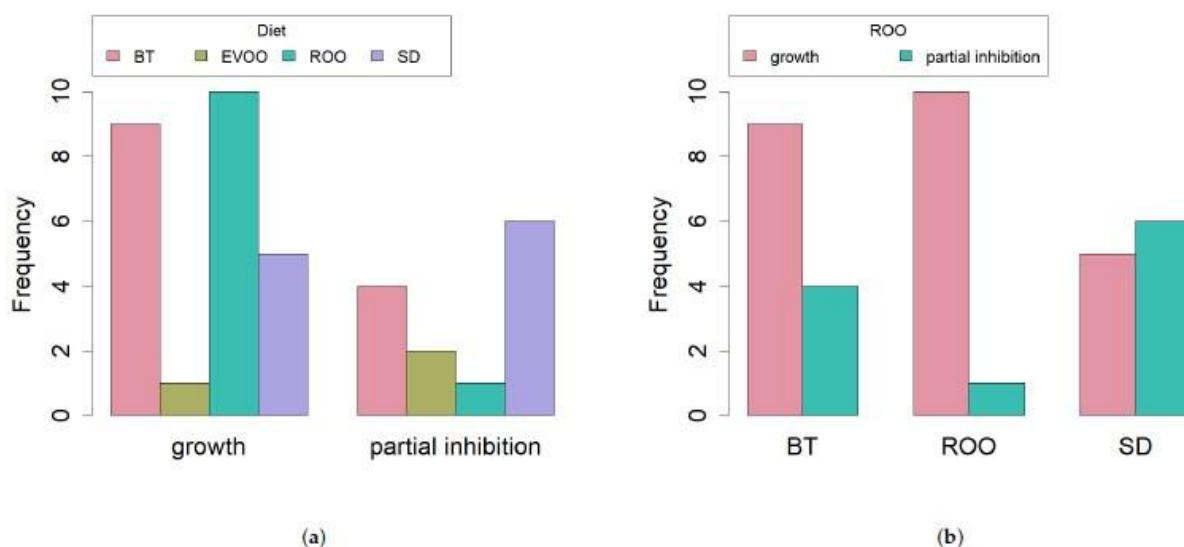


Figura 4.3. Gráficos de barras del número de cepas con crecimiento total o inhibición parcial en presencia de aceite de oliva refinado; (a) según la dieta (prueba exacta de Fisher $p = 0,0692$); (b) análisis de datos emparejados de cepas aisladas de BT (Prueba de McNemar $p = 0,0040$), ROO (prueba de McNemar $p = 0,0019$) y SD (prueba de McNemar $p = 0,062$).

SD: dieta estándar; BT, dieta enriquecida con mantequilla; EVOO, dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra; ROO, dieta enriquecida con aceite de oliva refinado (Sánchez *et al.*, 2019).

Para finalizar, los autores concluyen que las dietas altas en grasas favorecen la presencia de especies virulentas, mejora la adaptación al crecimiento de estas especies en un ambiente alto en grasas e incrementa el número de resistencias a antibióticos. Sin embargo, hay una excepción, se trata de la dieta EVOO, pues el aceite de oliva virgen extra muestra una dinámica diferente al resto de grasas adicionadas debido a sus componentes que le confieren propiedades antimicrobianas adicionales.

4.3. “Prevalence of an Intestinal ST40 *Enterococcus faecalis* over Other *E. faecalis* Strains in the Gut Environment of Mice Fed Different High Fat Diets” (Sánchez *et al.*, 2020)

Lo importante de este artículo es que es realmente una continuación del artículo expuesto anteriormente. En este caso, aprovechando los resultados del estudio anterior, se aisló de las heces de los ratones 15 cepas distintas de *E. faecalis* y se observó que al final del experimento, una sola de ellas (cepa ST40) es la única que prevaleció en el intestino de estos animales.

Para averiguar el porqué de este hecho, se prosiguió con la investigación y las 15 cepas de *E. faecalis* fueron analizadas usando un estudio metagenómico y posteriormente un estudio proteómico. Los resultados obtenidos se compararon con los recogidos en una base de datos de *E. faecalis* y se observó una clara diferencia, pues estas cepas predominantes mostraron una mayor tasa de producción de sustancias antimicrobianas, una mayor protección frente a factores ambientales como los xenobióticos, que son compuestos químicos que no forman parte de la composición de los organismos vivos (Koppel *et al.*, 2017), el estrés oxidativo y la acumulación de metabolitos. Por estas razones, esta cepa ha sido capaz de imponerse al resto de cepas en el intestino de los ratones.

4.4. “Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Biofilm Formation Capacity Among *Enterococcus* species From Yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China” (Cui *et al.* 2020)

El estudio realizado por estos investigadores se centrará en los yaks y la población tibetana de Aba en China, pues estas personas utilizan a los yaks como principales productores de alimentos de primera necesidad como la carne y la leche. A raíz de esta relación entre los yaks y la población tibetana de Aba, se planteó el estudio de los enterococos presentes en la microbiota de estos animales en cuanto a factores como la resistencia a antibióticos, genes de virulencia y formación de biopelículas. De esta forma, se intentó esclarecer si los yaks actúan como un reservorio de enterococos patógenos para los humanos o, por el contrario, no existe ningún riesgo.

Para ello, se recogieron las heces de yaks sanos de 37 granjas diferentes de Aba y los enterococos aislados de ellas se clasificaron e identificaron atendiendo a sus secuencias de rDNA 16S extraído y posteriormente secuenciado. Las especies predominantes fueron *E. faecalis* (42,99%) y *E. faecium* (37,80%).

Los tests de resistencia a antimicrobianos se realizaron siguiendo las pautas del CLSI (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio). Tras testar los antimicrobianos elegidos por los investigadores en las cepas aisladas de las heces, se vió que presentaban una alta resistencia a rifampicina y tetraciclina mayormente, y con menor frecuencia una resistencia a eritromicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, nitrofurantonina, penicilina y ampicilina. El patrón de resistencia más comúnmente encontrado fue a tetraciclina, eritromicina y rifampicina. En cuanto a especies, *E. faecium* fue la que más resistencia a antibióticos presentó, con un 75,69% de resistencias múltiples, seguida de *E. faecalis* con un 68,13% de resistencias múltiples a los antimicrobianos testados.

A su vez, también se detectaron los genes de resistencia a antimicrobianos, en total se hallaron 15 de ellos. El gen de resistencia con la tasa más alta fue el gen *tetM*, presente en el 54,07% de las cepas aisladas, involucrado en la resistencia a tetraciclina. Otros genes con alta proporción fueron *tetL*, que también interviene en la resistencia a tetraciclina con una tasa de 45,14%, *ermB* que confiere resistencia a eritromicina con una tasa de 30,45% y el gen *cat* que interviene en la resistencia al cloranfenicol con una tasa de 25,98%. El resto de genes de resistencia a antimicrobianos poseen tasas inferiores al 15%, lo cual significa que son muy poco comunes en las cepas aisladas. Sin embargo, no se detectaron los genes de resistencia a vancomicina ni a ciprofloxacina en las cepas correspondientes resistentes a tales antimicrobianos.

Tabla 4.5. Distribución de los genes de resistencia a antimicrobianos en los enterococos aislados de las heces de yak (Cui *et al.*, 2020).

Resistance genes	<i>E. faecalis</i> N=160	<i>E. faecium</i> N=144	<i>E. hirae</i> N=37	<i>E. mundtii</i> N=29	<i>E. durans</i> N=6	<i>E. casseliflavus</i> N=3	<i>E. gallinarum</i> N=1	<i>E. avium</i> N=1	No. (%) of isolate Total no.
<i>ermA</i>	29	30	1	0	0	0	0	0	60 (15.75%)
<i>ermB</i>	73	37	5	0	0	0	1	0	116 (30.45%)
<i>tetA</i>	10	13	0	0	0	0	1	1	25 (6.56%)
<i>tetB</i>	0	9	0	0	1	0	0	0	10 (2.62%)
<i>tetM</i>	116	78	8	2	1	0	0	1	206 (54.07%)
<i>tetL</i>	95	67	6	2	1	0	0	1	172 (45.14%)
<i>cat</i>	77	22	0	0	0	0	0	0	99 (25.98%)
<i>qnrA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>qnrB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>qnrS</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>qepA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>optrA</i>	10	5	0	0	0	0	0	0	15 (3.94%)
<i>poxA</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.26%)
<i>vanA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>vanB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Una vez realizados los análisis anteriores, se procedió al análisis de formación de biopelículas por las cepas aisladas. Esta capacidad de formación de biopelículas es importante, ya que representa una gran fuente de contaminación en las industrias de comida procesada y los enterococos aislados de la comida poseen esta capacidad (Ch'ng *et al.*, 2019; Igbinosa *et al.*, 2019). Los resultados de este análisis fueron que la mayoría de las cepas (67,45%) eran formadoras de biopelículas.

El último análisis que los investigadores realizaron sobre estos aislados, fue la prevalencia de los genes de virulencia. Los resultados que se obtuvieron indicaban que el gen de virulencia más común entre las especies aisladas fue *ace* (64,57%), seguido de *ebpC* (45,93%) y *agg* (42,52%). Solamente 3 aislados de *E. faecalis* presentaban todos los genes de virulencia testados, por el contrario, todas de las cepas de *E. mundtii* fueron negativas para todos los genes de virulencia testados. Por tanto, *E. faecalis* es el que tiene una mayor potencial de virulencia y *E. mundtii* el que menos tiene.

Tras la realización y análisis de las pruebas expuestas anteriormente, los investigadores llegaron a la conclusión de que al contrario de estudios anteriores en estos animales, la proporción de *E. faecium* fue ligeramente superior a la de *E. faecalis* (De *et al.*, 2019; De *et al.*, 2018; Lei *et al.*, 2019) y la de *E. mundtii* también fue superior a la descrita en estudios previos (De *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2016; Osman *et al.*, 2019). Con estos cambios en las proporciones de los microorganismos

encontrados, se afirma que la composición de enterococos de la microbiota de los yaks varía en función del ambiente en el que se encuentren. Además, se observó una gran proporción de enterococos resistentes a múltiples antimicrobianos, lo cual representa una seria amenaza para la salud pública y que debe ser tratada urgentemente. A pesar de que algunos de los enterococos aislados no presentaban genes de resistencia a algún antibiótico específico, estos sí que presentaron resistencia. Un ejemplo sería *E. faecalis*, el cual no presenta genes de resistencia a vancomicina pero sí es resistente a ella, esto se debe a la capacidad que posee para la formación de biopelículas.

5. DISCUSIÓN

Los enterococos intestinales son microorganismos con una relación de comensalismo, localizados en el intestino de los mamíferos. Sin embargo, el equilibrio en el que se encuentran se puede romper debido a factores como la edad, el estilo de vida o factores ambientales (dieta, infecciones). En base a los datos recogidos en los artículos seleccionados, se puede afirmar que los enterococos son patógenos importantes de origen comensal causantes de enfermedades nosocomiales en pacientes con largas estancias en centros sanitarios, produciendo infecciones más o menos graves que pueden llevar a la muerte del paciente.

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta cuando se habla de composición de la microbiota intestinal es la dieta. Una dieta saludable y equilibrada puede favorecer que en el intestino se encuentren enterococos beneficiosos para el organismo. Por el contrario, una dieta alta en grasas se ha comprobado que influye notablemente en la aparición de enterococos virulentos y por consiguiente, la aparición de cuadros clínicos en el hospedador como se afirma en “Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice” (Sánchez *et al.*, 2019). La forma de mantener la relación beneficiosa con la microbiota intestinal es llevar un estilo de vida saludable, con una dieta equilibrada y ejercicio para prevenir de esta forma la aparición de infecciones o cambios en la microbiota debido a los nutrientes que puedan romper el equilibrio.

La principal problemática de las infecciones causadas por estos microorganismos se debe a la facilidad con la que adquieren múltiples resistencias a

antibióticos y factores de virulencia debido a los fenómenos de conjugación y transferencia de material genético de unos a otros, pudiendo además atravesar la membrana intacta del intestino y dar lugar a una infección grave. Además, poseen una alta capacidad de resistencia al medio en el que viven y están adaptados a un medio tan hostil como lo es el tracto gastrointestinal.

La naturaleza dual de los enterococos es bien sabida y se destaca en muchos de los estudios realizados en torno a ellos. Por un lado, son importantes patógenos de humanos como se ha indicado antes, pero por otro lado son un importante componente de la microbiota intestinal pues tiene un papel muy relevante en el funcionamiento general del organismo, funciones metabólicas, nutricionales y moduladoras de la inmunidad. Aparte de esto, son ampliamente usados en la industria alimenticia para la elaboración de productos fermentados. Es por ello que se ha indagado sobre la posibilidad de que los enterococos presentes en la comida puedan ser reservorios de cepas patógenas o que puedan transferir genes de resistencia a los enterococos de nuestro intestino al ingerir dicho alimento. Según los estudios realizados, se indica una nula incidencia de los enterococos presentes en la comida, pues no se ha podido confirmar que estuviesen implicados en infecciones causadas por ellos mismos, además su vulnerabilidad a los antibióticos es mucho mayor que la de los enterococos presentes en el intestino. Así mismo, los propios animales pueden actuar como reservorios de enterococos virulentos y con múltiples resistencias a antibióticos (MDR) si no se controla el uso excesivo de antibióticos sobre los mismos, tal y como se refleja en los artículos analizados “Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat” (Golob *et al.*, 2019) y “Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Biofilm Formation Capacity Among *Enterococcus* species From Yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China” (Cui *et al.* 2020)

Sin embargo, no hay que dejar este tema a un lado, se debe continuar investigando sobre estos microorganismos y su implicación en las infecciones humanas, sobre todo en aquellos presentes en los alimentos, pues el no haber encontrado evidencias de que sean patógenos para nosotros no significa que nunca puedan convertirse en importantes reservorios de genes de resistencia a antibióticos y dar lugar a cepas patógenas. Por tanto, las líneas de investigación próximas deberán continuar esclareciendo los datos que aún no se han podido confirmar,

como la distinción entre enterococos patógenos y beneficiosos y el conocimiento sobre sus mecanismos de patogenicidad.

6. CONCLUSIONES

En base a los objetivos propuestos anteriormente y tras el análisis de los artículos científicos expuestos, las conclusiones son:

- Ciertos alimentos, como la carne roja, pueden actuar como reservorios de enterococos patógenos para la población, pero estos son sensibles a diversos antibióticos.
- El equilibrio entre los enterococos intestinales y el huésped se puede romper debido a la edad o factores ambientales como la dieta o infecciones.
- El tipo de dieta influye en si los enterococos presentes en el tracto gastrointestinal son virulentos o no. De hecho, las dietas altas en grasas parecen favorecer la presencia de enterococos virulentos en el intestino.
- Las dietas altas en grasa se han relacionado también con mayor resistencia a antibióticos en los enterococos intestinales
- El uso descontrolado de antibióticos puede provocar el surgimiento de enterococos MDR (resistentes a múltiples antibióticos) en animales, actuando estos como reservorios de estos microorganismos y pudiendo transferirlos a los humanos a través de la cadena alimenticia.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Agudelo Higueta, N. I. y Huycke, M. M. (2014): "Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment," en M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, N. Shankar, (eds.): *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, Last Updated: 2014 Feb 24, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, USA, pp. 65–99.
2. Albenberg, L.G. y Wu, G.D. (2014): "Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease", *Gastroenterology*, 146, pp. 1564–1572.
3. Anderson, A.C, Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Wittmer, A., Al-Ahmad, A. (2016): "*Enterococcus*

faecalis from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation”, *Microbiology*, Jan 11; 6:1534.

4. Barbosa, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P. (2010): “Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal,” *Food Control*, vol. 21, no. 5, pp. 651–656.
5. Caballero-Granado, F.J., Becerril, B., Cuberos, L., Bernabeu, M., Cisneros, J.M., Pachon, J. (2001): “Attributable mortality rate and duration of hospital stay associated with enterococcal bacteremia”, *Clinical Infectious Diseases*, 32, pp. 587–594.
6. Chow, J., Thal, L., Perri, M., Vazquez, J., Donabedian, S., Clewell, D., Zervos, M. (1993): “Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, pp. 2474–2477.
7. Cizek, A.R. (2008): “Comparing the partitioning behavior of *Giardia* and *Cryptosporidium* with that of indicator organisms in stormwater runoff”, *Water Research*, 42, pp. 4421– 4438.
8. Clewell, D.B. (1993): “Bacterial conjugation”.
9. Devriese, L.A., Pot, B., Collins, M.D. (1993): “Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups”, *Journal of Applied Bacteriology*, 75, pp. 399–408.
10. Eaton, T.J. y Gasson, M.J. (2001): “Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates”, *Applied and environmental microbiology*.
11. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), “The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016,” *EFSA Journal*, vol. 16, no. 2, 5182, 270 pages, 2018.
12. Endtz, H.P., van den Braak, N., Verbrugh, H.A., van Belkum, A. (1999): “Vancomycin resistance: status quo and quo vadis”, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18, pp. 683–690.

13. EUCAST (The European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) (2019): "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0", http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
14. Ferguson, D.M., Talavera, G.N., Hernández, L.A., Weisberg, S.B., Ambrose, R.F., Jay, J.A. (2016): "Virulence genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in Southern California and Puerto Rico", *Journal of Pathogens*, 2016, 7 pages.
15. Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006): "The role and application of enterococci in food and health", *International Journal of Food Microbiology*, 106, no. 1, pp. 1–24.
16. Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzapfel, W. H. (2003): "Enterococci in foods – a conundrum for food safety", *International Journal of Food Microbiology*, 88, no. 2–3, pp. 105–122.
17. Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. (2011): "Enterococci as probiotics and their implications in food safety", *International Journal of Food Microbiology*, 151, no. 2, pp. 125–140.
18. Franz C. M., Holzapfel. W. H., M. Stiles, E. (1999): "Enterococci at the crossroads of food safety?", *International Journal of Food Microbiology*, 47, no. 1–2, pp. 1–24.
19. Garmasheva, I.L. y Kovalenko, N.K. (2010): "Identification and taxonomy of Enterococci", *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 72(5), pp. 49-58.
20. Gilmore, M.S., Coburn, P.S., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E. (2002): "Enterococcal virulence", en M.S. Gilmore, D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, L.B. Rice, (eds.): *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM, Washington, D.C., pp. 301–354.
21. Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B., Zdovc, I. (2019): "Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat", *Biomed Research International*, May 9; 2019:2815279.
22. Gordillo, M.E., Singh, K.V., Murray, B.E. (1993): "Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*", *Journal of Clinical Microbiology*, 31, pp. 1570 –1574.

23. Haas, W., Shepard, B.D., Gilmore, M.S., (2002): "Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction", *Nature*, 415, pp. 84–87.
24. Hammerum A. M., (2012): "Enterococci of animal origin and their significance for public health", *Clinical Microbiology and Infection*, 18, no. 7, pp. 619–625.
25. Hancock, L.E., Gilmore, M.S., (2002): "The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell Wall", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, pp. 1574–1579.
26. Hardie J.M., Whiley R.A., (1997): "Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*, p 1S–11S", en P.W. Andrew y T.J. Mitchell, (eds.): *The biology of streptococci and enterococci: Blackwell Science*, Oxford, United Kingdom.
27. Hasan K. A., S. A. Ali, Rehman M., Bin-Asif H., Zahid S., (2018): "The unravelled *Enterococcus faecalis* zoonotic superbugs: Emerging multiple resistant and virulent lineages isolated from poultry environment", *Zoonoses and Public Health*, 65, no. 8, pp. 921–935.
28. Hollenbeck B. L., Rice L. B., (2012): "Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*", *Virulence*, 3, no. 5, pp. 421–569.
29. Horie M., Miura T., Hirakata S., Hosoyama A., Sugino S., Umeno A., Murotomi K., Yoshida Y., Koike T., (2017): "Comparative analysis of the intestinal flora in type 2 diabetes and nondiabetic mice", *Experimental Animals*, 66(4), pp. 405–416.
30. De Luca F., Shoenfeld Y., (2019): "The microbiome in autoimmune diseases", *Clinical and Experimental Immunology*, 195(1), pp. 74–85.
31. Huebner, J., Quaas, A., Krueger, W.A., Goldmann, D.A., Pier, G.B., (2000): "Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and resistant enterococci", *Infection and Immunity*, 68, pp. 4631–4636.
32. Hufnagel, M., Hancock, L.E., Koch, S., Theilacker, C., Gilmore, M.S., Huebner, J., (2004): "Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*", *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp. 2548–2557.

33. Huguet J., Huapaya B., Salazar E., (2002): "Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001", *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 19, no.2, pp. 63-67.
34. Huycke, M.M., Sahm, D.F., Gilmore, M.S., (1998): "Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future", *Emerging Infectious Diseases*, 4, pp. 239–249.
35. Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D.B., (1984): "Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice", *Infection and Immunity*, 45, pp. 528–530.
36. Jaouani I., Abbassi M.S., Ribeiro S.C., Khemiri M., Mansouri R., Messadi L., Silva C.C., (2015): "Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia". *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), pp. 1089-100.
37. Jett B. D., Huycke M. M., Gilmore M. S., (1994): "Virulence of enterococci". *Clinical Microbiology Reviews*, 7, no. 4, pp. 462–478.
38. Jett, B.D., Jensen, H.G., Nordquist, R.E., Gilmore, M.S., (1992): "Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis", *Infection and Immunity*, 60, pp. 2445–2452.
39. Jones M. E., Draghi D. C., Thornsberry C., Karlowsky J.A., Sahm D.F., Wenzel R.P. (2004): "Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American Surveillance study (2000–2002)", *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3, pp. 14.
40. Kacmaz, B., Aksoy, A., (2005): "Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, pp. 535–538.
41. Kataoka K., (2016): "The intestinal microbiota and its role in human health and disease", *Journal of Medical Investigation*, 63(1-2), pp. 27-37.
42. Kayser F. H., (2003): "Safety aspects of enterococci from the medical point of view", *International Journal of Food Microbiology*, 88, no. 2–3, pp. 255–262.
43. Koppel N., Maini Rekdal V., Balskus E.P., (2017): "Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota", *Science*, 356, issue 6344, eaag2770.

44. Kreft, B., Marre, R., Schramm, U., Wirth, R., (1992): "Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells", *Infection and Immunity*, 60, pp. 25–30.
45. Lavigne, J.P., Marchandin, H., Czarnecki, E., Kaye, C., Sotto, A., (2005): "Enterococcal bacteremia at Nîmes university hospital", *Pathologie Biologie*, 53, pp. 539–545.
46. Lucas, G.M., Lechtzin, N., Puryear, D.W., Yau, L.L., Flexner, C.W., Moore, R.D., (1998): "Vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcomes", *Clinical Infectious Diseases*, 26, pp. 1127–1133.
47. Ma L., Kornacki J.L., Zhang G., Lin C.M., Doyle M.P., (2007): "Development of thermal surrogate microorganisms in ground beef for in-plant critical control point validation studies", *Journal of Food Protection*, 70, pp. 952–957.
48. Milani C., Duranti S., Bottacini F., Casey E., Turrone F., Mahony J., Belzer C., Delgado Palacio S., Arbolea Montes S., Mancabelli L., Lugli G.A., Rodriguez J.M., Bode L., de Vos W., Gueimonde M., Margolles A., van Sinderen D., Ventura M., (2017): "The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4), pp. 17-36.
49. Moore D.F., (2005): "Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of fecal pollution sources in an urban watershed", *Journal of Applied Microbiology*, 99, pp. 618–628.
50. Muller, T., Ulrich, A., Ott, M., Muller E. M., (2001): "Identification of plant-associated enterococci.". *Journal of Applied Microbiology*, 91, no. 2, pp. 268–278.
51. Murray, B. E., (1990): "The life and times of the *Enterococcus*", *Clinical Microbiology Reviews*, 3, no. 1, pp. 46–65.
52. Murray, B. E., Weinstock, G. M., (1999): "Enterococci: new aspects of an old organism", *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111, no. 4, pp. 328–334.
53. Mylonakis, E., Engelbert, M., Qin, X., Sifri, C.D., Murray, B.E., Ausubel, F.M., Gilmore, M.S., Calderwood, S.B., (2002): "The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with

- virulence in the rabbit endophthalmitis model”, *Infection and Immunity*, 70, pp. 4678–4681.
54. Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Hook, M., Murray, B.E., (2000): “*Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I”, *Infection and Immunity*, 68, pp. 5218–5224.
 55. Nannini, E.C., Teng, F., Singh, K.V., Murray, B.E., (2005): “Decreased virulence of a gls24 mutant of *Enterococcus faecalis* OG1RF in an experimental endocarditis model”, *Infection and Immunity*, 73, pp. 7772–7774.
 56. Nayak, B.S., Badgley, B., Harwood, V.J., (2011): “Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental *Enterococcus* isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing”, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp. 5050–5055.
 57. Ogier, J.C., Serror, P., (2008): “Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus”, *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), pp. 291–301.
 58. Park, Y.J., Oh, E.J., Kim, B.K., Kim, S.M., Shim, S.I., (1999): “Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *E. faecium* polymerase chain reaction”, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34, pp. 269–273.
 59. Poulsen, L. L., M. Bisgaard, Son N. T., Trung, N.V., An, H.M., Dalsgaard, A., (2012): “*Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam”, *Emerging Infectious Diseases*, 18, no. 7, pp. 1096–1100.
 60. Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., (2000): “Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence”, *Infection and Immunity*, 68, pp. 2579–2586.
 61. Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., (2001): “Characterization of fsr, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF”, *Journal of Bacteriology*, 183, pp. 3372–3382.
 62. Rakita, R.M., Vanek, N.N., Jacques-Palaz, K., Mee, M., Mariscalco, M.M., Dunny, G.M., Snuggs, M., Van Winkle, W.B., Simon, S.I., (1999): “*Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by

- human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation”, *Infection and Immunity*, 67, pp. 6067–6075.
63. Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., Penna, A. L. B., (2012): “Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications”, *Food Engineering Reviews*, 4, pp. 1241–140.
 64. Richards, M. J., Edwards J. R., Culver D. H., Gaynes R. P., (2000): “Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States”, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21, no. 8, pp. 510–515.
 65. Rozdzinski, E., Marre, R., Susa, M., Wirth, R., Muscholl-Silberhorn, A., (2001): “Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins”, *Microbial Pathogenesis*, 30, pp. 211–220.
 66. Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M.J., 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., (2006): “Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination”, *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp. 2220– 2228.
 67. Sánchez, B., Cobo, A., Hidalgo, M., Martínez-Rodríguez, A.M., Prieto, I., Gálvez, A., Martínez-Cañamero, M., (2019): “Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), pp. 4290.
 68. Sánchez, B., Cobo. A., Hidalgo, M., Martínez-Rodríguez, A.M., Prieto, I., Gálvez, A., Martínez-Cañamero, M., (2020): “Prevalence of an Intestinal ST40 *Enterococcus faecalis* over Other *E. faecalis* Strains in the Gut Environment of Mice Fed Different High Fat Diets”, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), pp. 4330.
 69. Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., Marre, R., (2000): “Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro”, *Infection and Immunity*, 68, pp. 6044–6047.

70. Schleifer, K.H., Kilpper-Balz, R., (1984): "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. re. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, pp. 31–34.
71. Schoen, M.E., Soller, J.A., Ashbolt, N.J., (2011): "Evaluating the importance of faecal sources in human-impacted waters". *Water Res.*, 45, pp. 2670 –2680.
72. Sebastián Domingo, J.J., Sánchez Sánchez, C., (2018): "From the intestinal flora to the microbiome", *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), pp. 51-56.
73. Shankar, N., Lockatell, C.V., Baghdayan, A.S., Drachenberg, C., Gilmore, M.S., Johnson, D.E., (2001): "Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection", *Infection and Immunity*, 69, pp. 4366–4372.
74. Sifri, C.D., Mylonakis, E., Singh, K.V., Qin, X., Garsin, D.A., Murray, B.E., Ausubel, F.M., Calderwood, S.B., (2002): "Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice", *Infection and Immunity*, 70, pp. 5647–5650.
75. Singh, K.V., Coque, T.M., Weinstock, G.M., Murray, B.E., (1998^a): "In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 21, pp. 323–331.
76. Singh, K.V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B.E., (1998^b): "Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model", *Journal of Infectious Diseases*, 178, pp. 1416–1420.
77. Sussmuth, S.D., Muscholl-Silberhorn, A., Wirth, R., Susa, M., Marre, R., Rozdzinski, E., (2000): "Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst", *Infection and Immunity*, 68, pp. 4900–4906.
78. Tannock, G.W., Cook, G., (2002): "Enterococci as members of the intestinal microflora of humans", en M.S. Gilmore (eds.): *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington, D.C.

79. Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Shankar, N., (2003): "Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, pp. 2622– 2636.
80. Teng, F., Wang, L., Singh, K.V., Murray, B.E., Weinstock, G.M., (2002): "Involvement of PhoP–PhoS homologs in *Enterococcus faecalis* virulence", *Infection and Immunity*, 70, pp. 1991–1996.
81. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., (1997): "How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists", *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18, pp. 426–439.
82. Tseng, L.Y., Jiang, S.C., (2012): "Comparison of recreational health risks associated with surfing and swimming in dry weather and post-storm conditions at southern California beaches using quantitative microbial risk assessment (QMRA)", *Marine Pollution Bulletin*, 64, pp. 912–918.
83. US Environmental Protection Agency. (2004): *Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria*. EPA.
Available at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/rwqc2012.pdf>
84. Vanek, N.N., Simon, S.I., Jacques-Palaz, K., Mariscalco, M.M., Dunny, G.M., Rakita, R.M., (1999): "*Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26, pp. 49–60.
85. Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H. (2004): "Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*", *Journal of Clinical Microbiology*, 42, no. 10, pp. 4473–4479.
86. Verneuil, N., Rince, A., Sanguinetti, M., Auffray, Y., Hartke, A., Giard, J.C., (2005a): "Implication of *hypR* in the virulence and oxidative stress response of *Enterococcus faecalis*", *FEMS Microbiology Letters*, 252, pp. 137–141.
87. Verneuil, N., Rince, A., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fadda, G., Auffray, Y., Hartke, A., Giard, J.C., (2005b): "Contribution of a PerR-like regulator to the

- oxidative-stress response and virulence of *Enterococcus faecalis*", *Microbiology*, 151, pp. 3997–4004.
88. Verneuil, N., Sanguinetti, M., Le Breton, Y., Posteraro, B., Fadda, G., Auffray, Y., Hartke, A., Giard, J.C., (2004): "Effects of the *Enterococcus faecalis* hypR gene encoding a new transcriptional regulator on oxidative stress response and intracellular survival within macrophages", *Infection and Immunity*, 72, pp. 4424–4431.
 89. Wade, T.J., (2008): "High sensitivity of children to swimming associated gastrointestinal illness: results using a rapid assay of recreational water quality", *Epidemiology*, 19, pp. 375–383.
 90. Waters, C.M., Dunny, G.M., (2001): "Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance", *Journal of Bacteriology*, 183, pp. 5659–5667.
 91. Wells, C. L.; Jechorek, R. P.; Erlandsen, S. L., (1990): "Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract", *Journal of Infectious Diseases*, 162, no. 1, pp. 82–90.
 92. Wells, C.L., Moore, E.A., Hoag, J.A., Hirt, H., Dunny, G.M., Erlandsen, S.L., (2000): "Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes", *Infection and Immunity*, 68, pp. 7190–7194.
 93. Wenzel, R.P., Edmond, M.B., (2001): "The impact of hospital-acquired bloodstream infections". *Emerging Infectious Diseases*, 7, pp. 174–177.
 94. Willems, R. J., Van Schaik, W., (2009): "Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen", *Future Microbiology*, 4, no. 9, pp. 1125–1135.
 95. Wu, Y.R., Kuang, G.Y., Lu, F.G., Wang, H.X., Lu, M., Zhou, Q., (2019): "Pathological Relationship between Intestinal Flora and Osteoarthritis and Intervention Mechanism of Chinese Medicine", *Chinese Journal Integrative Medicine*, 25(9), pp. 716–720.
 96. Xu, Y., Singh, K.V., Qin, X., Murray, B.E., Weinstock, G.M., (2000): "Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis", *Infection and Immunity*, 68, pp. 815–823.

97. Zhang, C.; Zhang, M.; Wang, S.; Han, R., Cao, Y.; Hua, W., (2010): "Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice", *ISME*, 4, pp. 232–241.
98. De Jong, A., Simjee, S., Rose, M., Moyaert, H., El Garch. F., Youala, M., EASSA estudy group, (2019): "Antimicrobial resistance monitoring in commensal enterococci from healthy cattle, pigs and chickens across Europe during 2004–14 (EASSA Study)", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(4), pp. 921-930.
99. De Jong. A., Simjee, S., El Garch, F. E., Moyaert, H., Rose, M., Youala, M., EASSA study group (2018): "Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from healthy cattle, pigs and chickens in nine EU countries (EASSA Study) to critically important antibiotics", *Veterinary Microbiology*, 216, pp. 168-175.
100. Lei, C. W., Kang, Z. Z., Wu, S. K., Chen, Y. P., Kong, L. H., Wang, H. N., (2019): "Detection of the phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene *poxtA* in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* of food-producing animal origin in China", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(8), pp. 2459-2461.
101. 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", *Microbial Pathogenesis*, 128, pp. 195-205.
102. Kim, D. H., Chung, Y. S., Park, Y. K., Yang, S. J., Lim, S. K., Park, YH., Park, K.T., (2016): "Antimicrobial resistance and virulence profiles of *Enterococcus* spp. isolated from horses in korea", *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 48, pp. 6-13.
103. Ch'ng, J. H., Chong, K. K. L., Lam, L. N., Wong, J. J., Kline, K. A., (2019): "Biofilm-associated infection by enterococci". *Nature Reviews Microbiology*, 17 (2), pp. 82-94.
104. Igbinosa, EO., Beshiru, A., (2019): "Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants, and Biofilm Formation of *Enterococcus* Species From Ready to Eat Seafood". *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 728.