



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Sede Trelew

Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas de *Enterococcus* spp. aislados de cerdos y muestras clínicas

Tesina para optar al Grado Académico de
Licenciada en Ciencias Biológicas

GIL, MARIANELA SOLEDAD

Directora: Dra. Vallejo Marisol

Codirector: Lic. Aguirre Luis Fabián

2021

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Marisol Vallejo, por su apoyo en todo el desarrollo de esta tesis, sus recomendaciones y permanentes sugerencias. A mi codirector Fabián Aguirre por sus aportes fundamentales para este trabajo.

A mi asesora Julieta Manrique y coasesor Leandro Jones, por el atento seguimiento de los últimos años de carrera, y la enseñanza que me brindaron en sus cátedras y desarrollo del terreno de laboratorio.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNPSJB por el financiamiento del PI “Factores de virulencia y resistencia a metales pesados en cepas de enterococos provenientes de alimentos y animales de cría de la provincia de Chubut” (PI N°1531) mediante el cual se llevó a cabo el trabajo de tesis.

Al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) por la beca “Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC)”.

Al Sr. PASTRIÁN DE TREORCKY y a los encargados/dueños de los establecimientos porcinos de las ciudades de Rawson y Dolavon. A la Lic. Diana Berry del Hospital Zonal de Trelew por las cepas provenientes de clínica.

A mi familia, mis padres, mis abuelos y mis hermanos por el acompañamiento y apoyo durante todos estos años de carrera, y por estar siempre cuando los necesito. A Lautaro, mi compañero de todos los días, por ser el sostén fundamental en esta última etapa.

A mis amigos y compañeros de facultad, por brindarme las palabras de aliento necesarias en cada momento, y compartir aprendizajes, salidas de campo, y momentos que me llevo de esta experiencia.

A los docentes de esta carrera que aportaron a mi formación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Producción porcina.....	7
1.2 Antibióticos.....	8
1.2.1 Historia.....	8
1.2.2 Usos en medicina animal.....	9
1.2.3 Resistencia.....	10
1.3 Sales de Cobre y Zinc.....	12
1.4 Género <i>Enterococcus</i>	13
1.4.1 Características.....	13
1.4.2 Hábitat.....	14
1.4.3 Factores de Virulencia y rasgos negativos.....	14
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Área geográfica y toma de muestras.....	20
3.2 Aislamiento, selección e identificación preliminar de cepas de enterococos.....	20
3.4 Conservación de los aislamientos.....	21
3.5 Identificación fenotípica.....	21
3.6 Evaluación de la seguridad de las cepas.....	21
3.6.1 Actividad de la gelatinasa.....	21
3.6.2 Actividad hemolítica.....	22
3.6.3 Producción de exopolisacáridos.....	22
3.7 Resistencia a cobre y zinc.....	22

3.8 Sensibilidad a antibióticos	23
3.9 Extracción de ADN	23
3.9.1 Amplificación de genes de resistencia a tetraciclina y vancomicina	23
3.9.2 Identificación genotípica.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 Factores de virulencia	27
4.2 Resistencia a cobre y zinc.....	30
4.3 Sensibilidad a antibióticos	33
4.4 Amplificación de genes de resistencia	39
4.5 Identificación genotípica	41
5. CONCLUSIÓN.....	44
6. BIBLIOGRAFÍA.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Año de descubrimiento de los antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos.....	9
Tabla 2: Primers y condiciones de PCR utilizadas en este estudio	25
Tabla 3: Componentes, volúmenes y concentraciones de la mezcla de PCR estándar utilizados en este estudio.....	25
Tabla 4: Especies de <i>Enterococcus</i> estudiadas de cerdos y humanos	27
Tabla 5: Resistencia a cobre y zinc en cepas de <i>Enterococcus</i> spp. aislados de muestras clínicas	31
Tabla 6: Resistencia a cobre y zinc en cepas de <i>Enterococcus</i> spp. determinado por la localidad del establecimiento porcino.....	33

Tabla 7: Resistencia a antimicrobianos en cepas de <i>Enterococcus</i> spp. aisladas de muestras clínicas	35
Tabla 8: Resistencia a antimicrobianos en cepas de <i>Enterococcus</i> spp. aisladas de cerdos.....	38
Tabla 9: Presencia de gen <i>TetM</i> de cepas aisladas de cerdos y humanos resistentes a tetraciclina	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de cepas clínicas que presentaron factores de virulencia, diferenciado por especie de <i>Enterococcus</i> spp.....	30
Figura 2: Número de cepas aisladas de cerdos que presentaron factores de virulencia, diferenciado por especie de <i>Enterococcus</i> spp.....	30
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa del producto de la amplificación del gen <i>TetM</i>	40
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR múltiple para identificación genotípica y amplificación del gen <i>VanA</i>	42

RESUMEN

En la década del '50 se comenzaron a utilizar antibióticos como un suplemento adicional en la alimentación de animales destinados para consumo humano, tanto por su función terapéutica como para aumentar su crecimiento y eficacia en el valor alimenticio. Los metales pesados como el cobre y el zinc también eran administrados con el mismo propósito en los piensos de animales. Sin embargo, la incorporación de esta práctica en esos tiempos produjo, además de beneficios económicos, el aumento de resistencias debido al uso indiscriminado de antimicrobianos, ejerciendo una presión selectiva en el ambiente y a la flora microbiana de los animales tratados originando características que desencadenan patologías e infecciones en seres humanos.

El género *Enterococcus* está presente en una amplia variedad de ambientes como el suelo, agua, plantas, alimentos, tracto gastrointestinal de animales y humanos. Se los considera patógenos oportunistas para los humanos, especialmente en el ambiente hospitalario y generalmente provocan infecciones en personas con enfermedades subyacentes graves o inmunodeprimidos.

Teniendo en cuenta esta situación, el objetivo de este trabajo fue estudiar cepas de enterococos de origen clínico y de animales de cría que pueden actuar como reservorio de genes vinculados con factores virulencia, resistencia a antibióticos y a metales pesados.

Se analizaron en total 125 cepas que correspondieron al muestreo y aislamiento de 97 cepas provenientes de ganado porcino y 28 cepas ya aisladas y suministradas por el Laboratorio de Patologías Prevalentes del Hospital "Adolfo Margara" y el Laboratorio de análisis clínicos de la Clínica San Miguel de la ciudad de Trelew. Todas las cepas se identificaron a nivel especie mediante pruebas bioquímicas

y se clasificaron 93 cepas como *E. faecium*, 10 como *E. faecalis*, 3 como *E. durans*, y 19 cepas no lograron identificarse fenotípicamente.

La producción de exopolisacáridos fue el factor de virulencia más frecuente y se detectó en 104 aislamientos, la actividad hemolítica se presentó en 17, mientras que la actividad gelatinasa en solo 10.

La prueba de dilución en agar reveló que 75 cepas de origen porcino y 17 de clínica presentaron resistencia a zinc (≥ 12 mM), mientras que 93 cepas de cerdos y 7 de clínica exhibieron resistencia intermedia a cobre (4-12 mM).

El estudio de la concentración inhibitoria mínima (CIM) reveló que 17 cepas de clínica y 47 de cerdos exhibieron resistencia a ampicilina (≥ 16 $\mu\text{g/mL}$), mientras que seis cepas clínicas y cinco de cerdos resultaron resistentes a glicopéptidos (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$). La resistencia a tetraciclina resultó la más frecuente entre los aislamientos, obteniéndose 16 cepas de origen clínico y 75 de cerdos con una CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$.

Las cepas que resultaron resistentes a vancomicina y tetraciclina se evaluaron por técnicas de biología molecular para determinar la presencia de los genes de resistencia. Un total de 84 cepas presentaron el gen *TetM* de resistencia a tetraciclina, entre cepas porcinas y humanas, y solo 3 cepas de origen clínico amplificaron el gen *VanA* de resistencia a vancomicina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Producción porcina

A lo largo de los años los alimentos incorporados en la dieta humana fueron variando, pero el consumo de carne se ha mantenido y debido a que la demanda mundial se incrementó, las especies de crecimiento rápido con un alto índice de conversión de alimentos, como es en el caso de los cerdos, contribuyen en gran medida al desarrollo del subsector pecuario (Errecalde, 2004). A nivel mundial, la carne de cerdo es la carne roja de mayor consumo, siendo Asia quien lidera el crecimiento, seguido de Europa, América del Norte y África, donde en los últimos años se registró un aumento de la producción porcina (Errecalde, 2004).

El promedio anual de consumo de carne de cerdo en Argentina es de 9 Kg por persona, que se dividen en 3 Kg de carne fresca y 6 Kg de fiambres y chacinados (SENASA, 2015). La carne porcina contiene proteínas de alto valor biológico, aporta minerales esenciales como potasio, fósforo, zinc y vitaminas como B12 (Agro Chubut, 2020).

En nuestro país, la actividad porcina se desarrolló como un complemento a la actividad agrícola a través de pequeños productores que luego se volcaron a sistemas de cría intensiva, donde se buscó un mejoramiento de la genética, nutrición e infraestructura. Con el tiempo, la producción porcina se transformó en una actividad esencial y a gran escala, atribuida además al aumento de precios de la carne bovina, la mayor eficiencia de conversión respecto a otras especies y nuevos hábitos de consumo (Rearte, 2010).

Los principales establecimientos se concentran al norte de la provincia de Buenos Aires, sur de Santa Fe y centro de Córdoba, además de la distribución dispersa de otros establecimientos en todo el territorio nacional.

En nuestra provincia hay dos tipos de productores que definen esta actividad. Por un lado, se encuentran los grandes empresarios con producción intensiva a gran escala, que incorporan tecnologías en cuanto a manejo genético, presentan un sistema de faenado formal, comercialización y en algunos casos cuentan con carnicerías propias. Por otro lado se encuentran los pequeños productores de tipo familiar (que representan el 70 % de los productores porcinos en la provincia) con baja eficiencia productiva, una comercialización del tipo informal, con marcada ausencia de un control sanitario desconociendo así, los tipos de alimentos que se administran a los cerdos (Vacca, 2016).

En el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh), se encuentra el 65 % de cabezas porcinas con los que cuenta toda la provincia (un total de 22.573 cabezas) y que se distribuyen entre las localidades de Gaiman, Rawson y, en menor proporción, Trelew y Dolavon. Se estima que el consumo per cápita en la provincia de Chubut es de 1,5 Kg de carne de cerdo al año (Albertoli, 2016).

1.2 Antibióticos

1.2.1 Historia

Desde el descubrimiento de la penicilina por parte del científico Alexander Fleming en la década de 1920, los antibióticos comenzaron a formar parte de la medicina humana para tratar enfermedades e infecciones causadas por distintos microorganismos. Existen antibióticos de amplio espectro, eficaces sobre una amplia variedad de géneros y especies diferentes de microorganismos, y de espectro reducido que sólo son activos frente un grupo limitado de bacterias.

Antibióticos como los aminoglucósidos, tetraciclina y macrólidos fueron descubiertos en la década del '50 (Tabla 1), la vancomicina y meticilina se

descubrieron en 1956 y 1960 respectivamente, dando así un gran paso para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Rayamajhi, Cha, & Yoo, 2010). El ácido nalidíxico, un antibiótico perteneciente al grupo de las quinolonas sintéticas, eficaz tanto para bacterias Gram-positivas como Gram-negativas se introdujo para su uso clínico en 1967 (Saga & Yamaguchi, 2009). Con estos descubrimientos se logró un punto de inflexión en la historia de la humanidad, utilizándose con eficacia contra patógenos comunes en infecciones humanas.

Tabla 1: Año de descubrimiento de los antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos.

Droga	Descubrimiento	Uso clínico	Resistencia clínica	Tiempo hasta resistencia
Penicilina	1928	1943	1954	11 años
Estreptomicina	1944	1947	1956	9 años
Tetraciclina	1946	1952	1956	4 años
Eritromicina	1952	1955	1956	4 años
Vancomicina	1956	1972	1994	22 años
Gentamicina	1963	1967	1968	1 año
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985	3 años

Datos tomados de Rovere, 2018

1.2.2 Usos en medicina animal

Los antibióticos comenzaron a tener protagonismo en animales para tratar también infecciones bacterianas. En el caso de los animales destinados al consumo, los antimicrobianos empezaron a ser una ventaja para tratar enfermedades y así evitar las pérdidas y resguardar el bienestar animal (Taylor, 1999). Fue entonces, que en 1951 la FDA (United States Food and Drug Administration) aprobó el uso de

antibióticos en alimentos para animales sin necesidad de prescripción veterinaria (Jones & Ricke, 2003).

Por aquellos años se comenzó a alimentar cerdos con desechos de fermentación de tetraciclinas, y fue en ese momento donde se descubrió que los cerdos crecían más que los que recibían otros alimentos (Errecalde, 2004). Aparentemente, Moore y col. (1946) fueron los primeros que demostraron que la inclusión en la alimentación de los pollos causaba un aumento de peso; de esa manera fue como comenzaron a usarse los antimicrobianos como promotores de crecimiento. Con ese tipo de implementación en los alimentos, lograban una tasa de natalidad elevada, una mayor capacidad de engorde y en consecuencia un aumento de la producción animal, (Chancho Grande *et al.*, 2000; Nazhad Fard *et al.*, 2011). A nivel mundial, durante el año 2010, 63.200 toneladas de antibióticos fueron utilizadas en la industria ganadera, y las predicciones sugieren que esta tendencia seguirá en aumento (Rovere, 2018).

Los antibióticos se pueden administrar con fines terapéuticos, para inhibir diferentes patógenos y suplementando los piensos como una vía para administrar el fármaco; o pueden emplearse como promotores de crecimiento, favoreciendo el control de la flora bacteriana, y un mayor aprovechamiento de nutrientes con el consiguiente aumento de peso (Cancho Grande *et al.*, 2000). Algunos de los antibióticos utilizados en la producción ganadera son de importancia para la salud humana, entre ellos se destacan los macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas y cefalosporinas (Ardonio *et al.*, 2017).

1.2.3 Resistencia

El uso indiscriminado y/o sin prescripción médica y veterinaria de los antibióticos, como la administración de dosis sub-terapéuticas durante un tiempo prolongado crearon las condiciones necesarias para el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (Ardonio *et al.*, 2007). Este fenómeno comenzó a suceder poco tiempo

después del uso generalizado de antibióticos; los entornos hospitalarios proporcionan un ambiente propicio para la diseminación de cepas resistentes (Murray, 1990).

Existen dos tipos de resistencia: la resistencia intrínseca vinculada a la existencia de genes en el genoma bacteriano que desarrollan un fenotipo de resistencia natural (Davies, 2010) y la resistencia adquirida que resulta de una mutación en el ADN o se transmite a través de la transferencia horizontal de genes por medio de elementos genéticos móviles. Este mecanismo permite a una bacteria desarrollar resistencia a un antimicrobiano sin haber estado expuesto a él, y en consecuencia diseminarse más ampliamente y con mayor velocidad. Las descargas de metales pesados, fármacos, desinfectantes y otros contaminantes al medio ambiente combinado con la eliminación de aguas contaminadas con bacterias resistentes, incrementan la presencia de genes de resistencia en la población, a través, de elementos móviles dentro de las distintas poblaciones bacterianas, debido a la presión de selección del medio (Gaze *et al.*, 2011).

La tetraciclina en la actualidad no se la utiliza con frecuencia para los tratamientos de infecciones humanas y/o animal, sin embargo, es el más utilizado en la producción ganadera en todo el mundo, particularmente en la producción porcina lo que ha inducido a desarrollar una frecuente resistencia (Delsol, 2003).

Cuando los antibióticos son administrados como promotores de crecimiento, inducen mecanismos de resistencia, el ejemplo más conocido es el de la avoparcina, un análogo de la vancomicina que fue eficaz contra bacterias Gram-positivas. Su uso en Dinamarca tuvo tal alcance, que en 1994 se utilizaron 24.000 Kg de avoparcina como promotor de crecimiento, equivalente a 24 Kg de vancomicina administrados en medicina en el mismo año (Wegener, 1998). Sin embargo, debido a los negativos efectos producidos, entre 1995 y 2000 se prohibió definitivamente su uso en varios países de Europa y Asia, junto con los restantes antibióticos que eran utilizados para el mismo fin (Ardonio *et al.*, 2017; Hammerum, 2012; Hao *et al.*, 2016).

En Argentina se tomó la misma medida mediante la resolución 63/2009 de SENASA y además, se implementó un Programa Nacional de Vigilancia aprobado en resolución 591/2015 (SENASA, 2015) para la concientización y el control de resistencia a antimicrobianos (RAM) que busca monitorear la prevalencia de la resistencia en bacterias zoonóticas y comensales a diferentes antimicrobianos. De esta manera se busca retrasar o impedir la diseminación de bacterias resistentes minimizando su riesgo para la salud pública y animal y reducir la pérdida de la eficacia de aquellos antimicrobianos de importancia clínica, esenciales en salud humana minimizando su uso o haciendo un manejo responsable.

1.3 Sales de Cobre y Zinc

Además del uso de antimicrobianos en producción animal en dosis sub-terapéuticas, se utilizan sales de cobre y/o zinc por sus efectos favorables para el crecimiento, consumo de alimentos y conversión alimentaria (Badillo, 2016).

El cobre es un elemento esencial que no es muy abundante en la naturaleza, y debe ser suministrado mediante la alimentación y bebida en humanos y animales, siendo importante en procesos como la formación de la hemoglobina junto con el hierro, y también se lo utiliza como alguicida, bactericida, funguicida entre otros usos (Badillo, 2016). Tiene, además, la capacidad de inactivar virus, como los virus de la gripe, los norovirus o el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Vincent, 2018).

El zinc, es otro de los elementos esenciales más abundantes en el cuerpo humano después del hierro y, junto con el cobre y el selenio, intervienen en procesos bioquímicos necesarios para el desarrollo de la vida, como la respiración celular, la reproducción, el mantenimiento de la membrana celular, entre otras. (Armendáriz Rubio *et al.*, 2004). En la dieta animal se adiciona a los piensos como óxido de zinc para regular la microflora intestinal de lechones y evitar la diarrea post-destete,

además, suministrado como sales inorgánicas junto con el cobre mejoran el crecimiento de los lechones (Badillo, 2016; Nazhad Fard *et al.*, 2011).

En combinación, se utilizan en la industria porcina altas combinaciones de óxido de zinc (2.000 a 3.000 ppm) y/o sulfato de cobre (125 a 250 ppm) (Aarestrup, 2004; Hasman *et al.*, 2006; Vahjen, 2015). La Unión Europea decidió prohibir el óxido de zinc para 2022, debido a los efectos negativos que provoca, tanto para el rendimiento animal como para el medio ambiente (Fonseca, 2018). Debido a que la biodisponibilidad y absorción de estos metales pesados es baja, la mayor parte no es retenida por el organismo y aparece en heces y orina (Zea & Vílchez, 2014), acumulándose y aumentando la contaminación de suelos y aguas subterráneas.

Otro rasgo negativo es que al ser elementos tóxicos, en concentraciones altas muchas bacterias desarrollan un mecanismo de resistencia (Aarestrup *et al.*, 2006). Estudios previos reportaron que la resistencia al zinc y a antibióticos están vinculados en los mismos elementos genéticos móviles (Nemergut *et al.*, 2004, Nield *et al.*, 2001) lo que contribuye a la diseminación de resistencia a metales pesados en especies bacterianas de origen animal debido a una presión de selección por el uso inadecuado.

1.4 Género *Enterococcus*

1.4.1 Características

El género *Enterococcus* comprende un grupo de microorganismos Gram positivos, esféricos u ovoides dispuestos en pares o cadenas; son anaerobios facultativos, catalasa negativo, no formadores de esporas y fermentadores obligados (Gilmore, 2014). Se desarrollan de forma óptima a 35 °C, aunque la mayoría de las especies crece en un rango de temperatura de 10 a 45 °C, hasta pH 9,6, altas concentraciones de sal (6,5 %), en presencia de un 40% de sales biliares y son capaces de hidrolizar la esculina, con ciertas excepciones (Johnson, 2018). Hasta la

fecha se han descrito 72 especies diferentes dentro de este género y dos subespecies (Euzéby, 2021).

1.4.2 Hábitat

Los enterococos habitan distintos ambientes, principalmente el tracto gastrointestinal y heces de humanos y animales, además se encuentran en alimentos, plantas, insectos, en el agua, en la tierra, y también pueden aislarse de vagina, uretra, piel, conductos biliares e incluso orofaringe (Hammerum, 2012; Lopardo, 2020). Pueden tener efectos beneficiosos utilizándose como probióticos (Sparo & Nun, 2008) y se destacan en la fermentación y madurez de ciertos alimentos de origen animal, especialmente para la elaboración de quesos y embutidos (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2002).

1.4.3 Factores de Virulencia y rasgos negativos

Debido a su naturaleza ubicua, a los enterococos también se les atribuyen rasgos negativos; están involucradas en el deterioro de carnes, cerveza, jugo de fruta y con mayor atención pueden causar enfermedades humanas, como endocarditis, bacteriemia e infecciones del tracto urinario en personas con enfermedades subyacentes (Morrison, 1997; Murray, 1990).

Han adquirido una gama de respuestas que le permiten desarrollarse en ambientes hospitalarios debido a las presiones selectivas de su entorno, como son ciertos factores de virulencia y RAM. La presencia de genes de resistencia por sí solo no indica la patogenicidad de una cepa, sin embargo, la combinación de ambos mecanismos le confieren virulencia. En particular, ocurre porque los genes que confieren y/o expresan la RAM y los factores de virulencia a menudo se encuentran en los mismos elementos genéticos móviles.(Chajęcka-Wierzchowska, 2016). *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies más importantes y los patógenos más frecuentes en estos ambientes (Sharifi *et al.*, 2015).

Entre los factores de virulencia se destaca la citolisina o hemolisina, una toxina extracelular del tipo bacteriocina capaz de lisar eritrocitos humanos, equinos y de conejo; su actividad incrementa la virulencia de enterococos y demuestra una mayor gravedad de infección (Gilmore *et al.*, 2014).

La gelatinasa es una metaloproteasa extracelular capaz de hidrolizar gelatina, elastina, colágeno, hemoglobina, insulina y otros péptidos del hospedador que mejoran la migración y difusión de los enterococos por los tejidos dañados (Qin *et al.*, 2000). También se la vincula con la translocación intestinal, adherencia y formación de biopelículas, características importantes que aumentan las posibilidades de producir infecciones (Lopardo *et al.*, 2015).

La proteína de superficie extracelular (esp), contribuye a la formación de biofilm y se la relaciona con la posibilidad de colonizar superficies inertes utilizadas habitualmente en clínica (Eaton & Gasson, 2001), como son las sondas uretrales y catéteres intravasculares. Es un importante factor de virulencia, porque cuando los enterococos se encuentran formando biofilm son más resistentes a la fagocitosis, más difíciles de erradicar y aumenta su resistencia a antibióticos (Holloway, 1982).

1.4.3.1 Resistencia a antimicrobianos

Las especies de este género son naturalmente resistentes a cefalosporinas, aminoglucósidos y poseen resistencia adquirida a antimicrobianos como quinolonas, macrólidos, tetraciclinas y glucopéptidos como vancomicina y teicoplanina (Mendiratta *et al.*, 2008). Su capacidad para adquirir genes de resistencia a través de transposones conjugativos y plásmidos (Werner *et al.*, 2013) los hace difícil de combatir y por tanto multirresistentes. Un ejemplo es el caso ya mencionado de avoparcina, su prohibición logro disminuir el porcentaje de enterococos resistentes a vancomicina (ERV), sin embargo todavía se registra persistencia de cepas resistentes en animales de granja (Nilsson, 2012).

1.4.3.2 Resistencia a glicopéptidos y tetraciclina

Hasta la fecha se han descrito nueve fenotipos de resistencia a glicopéptidos en enterococos: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM y VanN (Nilsson, 2012) siendo los fenotipos VanA y VanB los de mayor distribución e importancia clínica. Los ERV se aislaron primero en Europa en 1986 y poco después en Estados Unidos (Cetinkaya *et al.*, 2000). En Argentina, se aisló por primera vez en el año 1998 una cepa de *E. faecium* de origen clínico resistente con fenotipo VanA (Marin *et al.*, 1998), posteriormente se comunicó la presencia de ERV en alimentos de origen animal (Delpech *et al.*, 2012).

Tanto la vancomicina como la teicoplanina se unen a la mitad terminal D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) de precursores de peptidoglicano, con la función de evitar la unión de las cadenas de peptidoglicanos e inhibir la síntesis de la pared celular (Miller *et al.*, 2014). El operón *vanA* codifica resistencia inducible de alto nivel a vancomicina (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) y a teicoplanina (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) y se adquiere generalmente a través del transposón Tn1546 o de transposones relacionados de la familia Tn3. El operón *vanB* concede resistencia inducible de bajo nivel a la vancomicina (CIM 4 a >1.000 $\mu\text{g/mL}$) pero no a teicoplanina y está presente en el cromosoma; y *vanC* se presenta con menor frecuencia en especies que presentan motilidad (*E. gallinarum* y *E. casseliflavus*) y produce baja resistencia a vancomicina (2-32 $\mu\text{g/mL}$) y sensibilidad a teicoplanina (Cercenado, 2012).

La tetraciclina actúa al unirse a la subunidad 30S del ribosoma e interferir con el acoplamiento de aminoacil-tRNA, inhibiendo de esa forma la síntesis proteica de las bacterias (Vincent *et al.*, 2018). La fijación al ribosoma es reversible, lo que explicaría su efecto bacteriostático. La resistencia también está mediada por múltiples genes pero involucra dos estrategias generales: la eliminación hacia el exterior de la célula, mediante una bomba de eflujo, y la protección ribosómica, la cual consiste en inhibir la unión de la tetraciclina con la subunidad ribosomal 30S (Jara, 2007). Los genotipos

TetA, *TetB*, *TetC*, *TetD*, *TetE*, *TetH*, *TetI*, *TetJ*, *TetK*, *TetL* y *TetY* codifican bombas de eflujo para la expulsión del antibiótico de la célula y son transmitidos por plásmidos. Los genotipos *TetM*, *TetO* y *TetS* codifican para mecanismos de protección ribosomal de resistencia a tetraciclina, y están asociados con transposones conjugativos, con preferencia por el cromosoma (Leng *et al.*, 1997).

1.4.3.3 Resistencia a ampicilina

La ampicilina y la penicilina son los β -lactámicos más activos contra enterococos, inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, estructura básica de la pared celular bacteriana (Miller *et al.*, 2014). Sin embargo, los aislamientos clínicos de enterococos, principalmente *E. faecium* y rara vez *E. faecalis*, poseen cierta resistencia natural intrínseca a los β -lactámicos, que se debe a la baja afinidad de sus proteínas de unión a penicilinas (PBP o penicillin-binding proteins) por estos antibióticos. Tanto *E. faecalis* como *E. faecium* producen al menos 6 proteínas PBP (Lopardo *et al.*, 2015), el aumento de PBP5 desarrolla niveles de resistencia a ampicilina en *E. faecium* que pueden superar los 128 $\mu\text{g/mL}$ de CIM. Además de generar este tipo de resistencia, estas cepas tienen otros mecanismos como son las mutaciones puntuales cerca del residuo de serina (sitio activo) de la proteína PBP5 que provoca una menor afinidad de unión a penicilinas y un aumento de la resistencia.

1.4.3.4 Transmisión de resistencia a cepas de alimentos

La transmisión de enterococos resistentes a antimicrobianos en alimentos puede ocurrir por el consumo de productos alimenticios de origen animal contaminados, o por manipulación de comida en condiciones deficientes de higiene (Marguet *et al.*, 2008). Además de este tipo de contaminación cruzada también se le suma las granjas porcinas que al presentar malas condiciones de higiene pueden diseminar cepas resistentes a través de las heces de los animales que llegan al cuidador del establecimiento y de esta forma se produce la diseminación. En un estudio en Dinamarca, detectaron genes de resistencia a vancomicina en *E. faecium*

en muestras de cerdos y del intestino de un ser humano sano que dijo no haber tenido contacto con el animal pero si consumido carne de cerdo (Hammerum, 2012). Estudios realizados en Argentina demostraron que alimentos artesanales de origen animal son reservorios de enterococos multirresistentes que incluyen el genotipo *vanA* (Delpech *et al.*, 2012).

Exceptuando el ambiente relacionado con la salud, existe poca información en la región patagónica sobre la estructura poblacional de las cepas de enterococos (Ledesma *et al.*, 2015; Marguet *et al.*, 2008; Vallejo *et al.*, 2016). Tampoco existen estudios sobre la vía de transmisión de estos microorganismos, resultando necesario una continua vigilancia para conocer si la transmisión ocurre a través de la vía alimentaria o se generan en el medio ambiente por actividades antrópicas. Por lo expuesto, el aislamiento de cepas de enterococos provenientes de pacientes y animales de cría y su posterior estudio de factores de virulencia y resistencia a antibióticos y metales pesados, brindará información sobre ecología, distribución y características aún no descritas de estos microorganismos en la provincia de Chubut.

2. OBJETIVOS

A partir de lo expuesto el objetivo general es estudiar cepas de enterococos de origen humano y animales de cría que pueden actuar como reservorio de factores de virulencia, RAM y a metales pesados (MP).

Los objetivos específicos son:

1. Aislar e identificar mediante pruebas fenotípicas cepas de enterococos a partir de cerdos de cría provenientes del Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) empleando protocolos estandarizados.
2. Identificar mediante pruebas fenotípicas aislamientos provenientes de muestras de pacientes hospitalarios de la ciudad de Trelew.
3. Estudiar mediante pruebas fenotípicas potenciales factores de virulencia en las cepas aisladas.
4. Determinar mediante pruebas fenotípicas la resistencia a cobre y zinc en las cepas aisladas.
5. Determinar mediante pruebas fenotípicas la resistencia a antibióticos de uso veterinario y/o clínico en las cepas seleccionadas.
6. Determinar la presencia de genes de resistencia a tetraciclina y vancomicina en las cepas seleccionadas según su resistencia a MP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área geográfica y toma de muestras

La recolección de muestras se llevó a cabo en establecimientos porcinos con sistema de cría intensiva y ciclo completo ubicados en las ciudades de Dolavon ($n=44$) y Rawson ($n=50$); y en una chacra ($n=60$) con explotación de tipo familiar destinado a la cría, engorde y venta ubicado en la zona de Treorcky (Trelew) en la provincia de Chubut. El muestreo se realizó de forma aleatoria en animales sanos, adultos y crías de destete. Las muestras de hisopados fecales se conservaron a 4 °C en medio de transporte Stuart (Merck, Alemania) hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio. El tiempo transcurrido entre la colecta y su procesamiento no fue mayor de 6 h.

Las cepas de enterococos provenientes de pacientes hospitalarios fueron provistas por el Laboratorio de Patologías Prevalentes del Hospital “Adolfo Margara” y el Laboratorio de análisis clínicos de la Clínica San Miguel de la ciudad de Trelew.

3.2 Aislamiento, selección e identificación preliminar de cepas de enterococos

Las muestras de hisopados fecales se sembraron en caldo púrpura de bromocresol-azida (Merck, Alemania) y/o en caldo etil violeta azida (EVA) (Difco, EEUU) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los cultivos se repicaron en agar bilis esculina (Merck, Alemania) suplementado con ácido nalidíxico (20 µg/mL) y nistatina (10 µg/mL) durante 24-48 h a 37 °C y se realizaron repiques sucesivos hasta obtener aislamientos puros.

La identificación preliminar de las colonias se realizó mediante la coloración de Gram y ensayo de la actividad catalasa y oxidasa.

3.4 Conservación de los aislamientos

Las cepas identificadas preliminarmente como *Enterococcus* spp. se conservaron en una suspensión de caldo tripticasa soja (TS) (Britania, Argentina) suplementado con glicerol al 10 % (v/v) a -30 °C en el Cepario del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (LBB) FCNyCS (Sede Trelew-UNPSJB) como parte de la colección.

3.5 Identificación fenotípica

Luego de la determinación preliminar de género, se procedió a identificar las cepas a nivel de especie basado en la descripción propuesta por el Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología (Lopardo, 2015), donde se pueden definir a las especies realizando las pruebas bioquímicas que incluyen fermentación de azúcares (manitol, sorbosa, L- arabinosa, sorbitol, rafinosa, sacarosa, α -metil-D-glucopiranosido), producción de pigmento, detección de actividad enzimática de pirrolidonil aminopeptidasa (PYR) y arginina dihidrolasa.

3.6 Evaluación de la seguridad de las cepas

Con el objetivo de determinar indicadores relacionados con posibles factores de virulencia y/o rasgos negativos para la salud humana, las cepas identificadas como *Enterococcus* spp. según procedimientos descritos, se sometieron a las siguientes pruebas:

3.6.1 Actividad de la gelatinasa

Para este ensayo se utilizó la prueba propuesta por Kanemitsu *et al.* (2001), suplementando el agar TS con 0,8 % (m/v) de gelatina. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y se revelaron con una solución de ácido tricloroacético al 20 % (v/v),

considerando como positivas las colonias que presentaron zonas claras a su alrededor. Se utilizó como control positivo la cepa *E. faecalis* ATCC 29212.

3.6.2 Actividad hemolítica

Se evaluó la producción de hemolisinas mediante agar cerebro corazón (Biokar, Francia) suplementado con sangre desfibrinada humana al 5 % y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se interpretó como positivas las colonias que presentaron a su alrededor un halo de hemólisis completa (β -hemólisis). Se utilizó como control positivo la cepa *E. faecalis* ATCC 29212.

3.6.3 Producción de exopolisacáridos

La producción de exopolisacáridos de las cepas se evaluó de manera cualitativa en agar cerebro corazón suplementado con sacarosa 50 g/L y 0,8 g/L de rojo Congo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se consideraron como positivas las colonias que presentaron color negro (Çiftci *et al.*, 2009). Como control positivo se utilizó la cepa de *E. mundtii* Tw278 perteneciente al Cepario del LBB.

3.7 Resistencia a cobre y zinc

Los ensayos de susceptibilidad se llevaron a cabo por el método de dilución en agar propuesto por Aarestrup & Hasman (2004). Para tal fin se utilizó el agar Mueller-Hinton (Britania, Argentina) adicionado con concentraciones crecientes entre 2-28 mM de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y entre 0,25-32 mM de sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Las soluciones para ambos metales se prepararon con agua destilada y se esterilizaron a través de filtración por membrana (0,22 μm). Todas las placas se inocularon con 5 μL de cultivos bacterianos ajustado a 0.5 en la escala de McFarland y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó crecimiento de colonias.

3.8 Sensibilidad a antibióticos

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) en todas las cepas mediante el método de diluciones seriadas para ampicilina, tetraciclina y vancomicina, según las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute CLSI- VET (2021), y para teicoplanina se utilizaron las recomendaciones del CLSI para antimicrobianos de uso humano (2021). La sensibilidad a los antibióticos se evaluó por el método de dilución en agar Mueller-Hilton, las placas se incubaron a 37 °C durante 20-24 h y se utilizó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 como microorganismo de control.

La CIM se definió como la menor concentración de antibiótico que produjo la inhibición completa del microorganismo y se interpretó cada resultado como sensible, intermedio o resistente de acuerdo con los puntos de corte estipulado para cada antibiótico según el CLSI (2021).

3.9 Extracción de ADN

Las cepas identificadas mediante ensayos fenotípicos se incubaron en caldo TS a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Millar *et al.* (2000). Los cultivos se centrifugaron a 13.000 g durante 5 min, los pellets se resuspendieron en 500 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl y 1mM EDTA a pH 8) y se incubaron a 95 °C durante 15-20 min. Posteriormente, se centrifugaron y los sobrenadantes conteniendo el ADN extraído se almacenaron a -20 °C.

3.9.1 Amplificación de genes de resistencia a tetraciclina y vancomicina

Todas las cepas que presentaron resistencia a tetraciclina y/o vancomicina se evaluaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para tal fin se

utilizaron los cebadores y protocolos propuestos por Aarestrup *et al.* (2000) y Kariyama *et al.* (2000) (PCR múltiple), que se detallan en la tabla 2. Como controles se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 (TetM) y *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VanA, B y C), estas últimas provistas por la Dra. Blanco del Hospital de Pediatría “Juan P. Garrahan”. En cada ensayo se realizó un control negativo conteniendo todos los reactivos excepto el ADN.

La reacción se realizó en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (Tabla 3). La electroforesis producto de la amplificación se realizó en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA, pH 8) a 70 V durante 1 h. Finalizada la corrida el gel se colocó durante 20 min en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio de 0,5 µg/mL; y posteriormente se lo visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó.

3.9.2 Identificación genotípica

La identificación genotípica de las cepas de ERV se confirmó mediante PCR. Los cebadores y protocolos utilizados para la amplificación de los genes específicos de especies y la identificación de género corresponden a una PCR múltiple y son los descritos por Kariyama y col. (2000) (Tabla 2). Como controles de especie se utilizaron las cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* Tw6 perteneciente al Cepario del LBB. En cada ensayo se realizó un control negativo conteniendo todos los reactivos excepto el ADN.

Tabla 2: Primers y condiciones de PCR utilizadas en este estudio

Referencia	Condiciones PCR			Primers	Secuencia (5' a 3')	Tamaño (pb)
	Temperatura ¹	Tiempo	Ciclos			
(Kariyama <i>et al.</i> , 2000)	D.I 94 °C	5 min	1	VanA	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1030
	D 94 °C	1 min	30	VanB	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	433
	A 54 °C	1 min	30	VanC	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822
	E 72 °C	1 min	30	rrs(16S ARNr)	GGATTAGATACCCTGGTAGTCC TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC	320
	E.F 72 °C	10 min	1	<i>E. faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCTTATTAG ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAG	941
				<i>E. faecium</i>	TTGAGGCAGACCAGTTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	658
(Aarestrup <i>et al.</i> , 2000)	D.I 94 °C	5 min	1			
	D 94 °C	1 min	30			
	A 54 °C	1 min	30	TetM	GTAAATAGTGTTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	657
	E 72 °C	1 min	30			
	E.F 72 °C	10 min	1			

¹ D.I: Desnaturalización inicial. D: Desnaturalización. A: Apareamiento. E: elongación. E.F: Elongación final.

Tabla 3: Componentes, volúmenes y concentraciones de la mezcla de PCR estándar utilizados en este estudio

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (µl)	Concentración final
Agua bidestilada estéril	-----	C.S.P. ¹	-----
Buffer STR de PCR ²	5X	4 µl	1X
Cebador directo e inverso ³	10 µM	1 µl	0,5 µM
Taq ADN polimerasa	5 U/ µl	0,2 µl	2U/20 µl
MgCl ₂	25mM	0,8 µl	
ADN muestra		1 µl	~20-50 ng

¹ Con el agua se enrasa la mezcla hasta el volumen final de 20 µl; ² El buffer STR de PCR 5X contiene: 250 mM KCl, 50 mM TRIS, 7,5 mM MgCl, 0,5% tritón X100 y 1 mM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). ³ Para PCR múltiple, se usa 1µl de cada cebador.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Históricamente la producción porcina en la provincia de Chubut fue de baja escala, de tipo familiar, en zonas bajo riego y destinada básicamente a la producción de lechones estacionales, elegida como secundaria a otras actividades agropecuarias. Sin embargo, desde el año 2014 se observa un crecimiento de la actividad porcina en toda la provincia, especialmente en la zona del VIRCh (Albertoli,2016).

Durante este trabajo, se procesaron un total de 154 muestras de materia fecal de ganado porcino proveniente de tres establecimientos diferentes. Dos ubicados en las ciudades de Rawson y Dolavon, que pertenecen a productores de gran escala empresarial con un sistema completo de cría intensiva, faenado y comercialización propia. El tercero, ubicado en la zona de Treorcky, es un establecimiento del tipo familiar con producción pequeña para cría y engorde de cerdos, de consumo propio y local.

Se aislaron en total 97 cepas, tanto de ejemplares adultos como crías de destete, 37 pertenecientes al establecimiento de Rawson, 28 al de Dolavon y 32 cepas correspondientes a la chacra de la zona de Treorcky. El total de cepas aisladas de cerdos, junto con las 28 cepas aisladas de pacientes aportadas por el Hospital y la clínica San Miguel, presentaron los rasgos fenotípicos que distinguen al género *Enterococcus* de otros cocos Gram positivos: actividad catalasa y oxidasa negativa, crecimiento a 10 y 45°C y Pirrolidonil-beta-naftilamina (Pyr) positivo.

La identificación a nivel especie se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas siguiendo la descripción propuesta por el Manual de Microbiología Clínica (Lopardo *et al.*, 2015). Del total de aislamientos, 93 cepas resultaron identificadas como *E. faecium*, 10 como *E. faecalis*, 3 como *E. durans*, y 19 cepas no fueron posible identificar a nivel especie por fenotipia (Tabla 4). Analizando las especies se observa que la más frecuente fue *E. faecium* y en menor proporción *E. faecalis*, tanto en cepas

clínicas como en las de origen porcino. Previamente, otros estudios también fueron coincidentes con estos hallazgos, reportando a *E. faecium* como la más frecuente, seguida por *E. faecalis* (Aarestrup *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2013; Sharifi *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2018).

Estos resultados revelan la alta frecuencia de este género en estos ambientes, demostrando su naturaleza ubicua, siendo los causantes de infecciones nosocomiales y desempeñándose, además, como indicadores de contaminación ambiental de origen fecal (Byappanahalli *et al.*, 2012).

Tabla 4: Especies de *Enterococcus* estudiadas de cerdos y humanos

Origen	Total de Aislados	Especies Bacterianas			
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
Cerdos	97	74	2	3	18
Humanos	28	19	8	0	1
Total	125	93	10	3	19

4.1 Factores de virulencia

La mayor prevalencia de los factores de virulencia estudiados correspondió a la producción de exopolisacáridos (Figura 1 y 2), tanto en cepas humanas (28/28) como en cepas de cerdos (76/97), coincidiendo con los trabajos de diferentes autores (Sánchez Cabrera *et al.*, 2021; Caraffini *et al.*, 2009; Tsikrikonis *et al.*, 2012). La especie *E. faecium* fue la más frecuente para este factor, resultado que coincide con lo hallado por Tsikrikonis y col. (2012) para aislados clínicos y porcinos y Sánchez Cabrera y col. (2021) para aislados de alimentos de origen animal.

Los enterococos tienen la capacidad de formar biopelículas, que consisten en bacterias adheridas a superficies de seres vivos como también superficies inertes, contenidas dentro de una matriz hidratada de sustancias como pueden ser

exopolímeros, proteínas o polisacáridos (Lopardo *et al.*, 2015). De esta manera es posible su adherencia a dispositivos y superficies utilizados en el ambiente hospitalario, lo cual favorece su diseminación, aumento de la resistencia, persistencia de la infección y contaminación del ambiente. Sin embargo, sería prematuro clasificar a una cepa de enterococo como patógena sólo evaluando este rasgo, en todo caso se debería vincular esta característica con la sustancia de agregación (agg) y la presencia de proteínas de superficie (esp), entre otros factores, que promueven la colonización y transmisión de genes de resistencia.

La actividad gelatinasa se presentó en 7/28 cepas humanas (Figura 1) y en solo 3/97 cepas porcinas (Figura 2), y coincide con lo expuesto por Caraffini y col. (2009), quienes presentaron a la gelatinasa como una de las actividades más frecuentes en aislamientos clínicos. La especie *E. faecium* también fue la más frecuente para este factor y coincide con lo hallado por Tsirikonis y col. (2012), afirmando que la actividad gelatinasa se presenta en mayor proporción en cepas provenientes de humanos que en cepas aisladas de cerdos.

Ledesma y col. (2015), en cambio, encontraron una alta frecuencia de enterococos aislados de aves salvajes y de cría en nuestra región con actividad de gelatinasa (57/128), si lo comparamos con lo hallado en las cepas porcinas de este estudio. La gelatinasa contribuye a la patogénesis, promoviendo la llegada de neutrófilos a los tejidos colonizados por los enterococos y modificando, de esta forma, las defensas del huésped (Caraffini *et al.*, 2009), por lo que se lo considera como uno de los factores de virulencia más estudiados para este género y su presencia contribuye a la gravedad de la infección (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2016).

La actividad hemolítica se presentó con mayor frecuencia en cepas humanas (17/28) (Figura 1), mientras que sólo 2/97 cepas de origen porcino exhibieron β -hemólisis (Figura 2), en ambos casos, las especies productoras de citolisina fueron *E. faecium* y *E. faecalis*. Los resultados obtenidos sobre actividad hemolítica en las cepas

aisladas de cerdos resultó baja, pero concuerda con la poca frecuencia observada por Tsirikonis y col. (2012) para aislados porcinos y Ledesma y col. (2015) para enterococos aislados de aves salvajes y de cría en nuestra región.

La alta proporción de cepas β -hemolíticas en aislamientos clínicos coinciden con trabajos previos (Caraffini *et al.*, 2009; Eaton & Gasson, 2001; Padilla *et al.*, 2012; Semedo *et al.*, 2003; Tsirikonis *et al.*, 2012; Zaheer *et al.*, 2020), evidenciando la prevalencia de este rasgo relacionado con la patogenicidad, la expresión y el aumento de la toxicidad de *Enterococcus* (Zaheer *et al.*, 2020). La citolisina tiene un rol importante en la primera fase de la infección, involucrándose en la penetración bacteriana en los tejidos intestinales humanos, provocando un daño tisular y posterior lisis de la célula (Garza-Velasco *et al.*, 2005). De esta forma, contribuye a la severidad del proceso inflamatorio y cuando los enterococos invaden el tracto gastrointestinal logran desarrollar bacteriemias y endocarditis con la presencia de esta enzima, como fue registrado por Padilla y col. (2012) para muestras de pacientes hospitalarios en Chile y Caraffini y col. (2009) en aislados clínicos de enterococos en Córdoba, Argentina.

Según bibliografía, la falta de actividad hemolítica puede ser el resultado de la ausencia o inactivación de algunos de los genes que conforman el operón *cyl*, necesarios para su expresión (Gilmore, 2014). Por lo tanto, la determinación de la actividad hemolítica en placa sigue siendo la regla de oro para demostrar este rasgo de virulencia en *Enterococcus*.

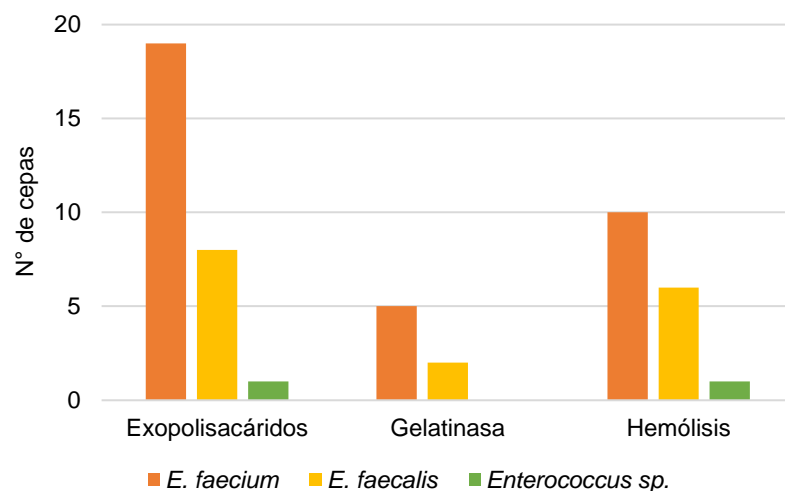


Figura 1: Número de cepas clínicas que presentaron factores de virulencia, diferenciado por especie de *Enterococcus spp.*

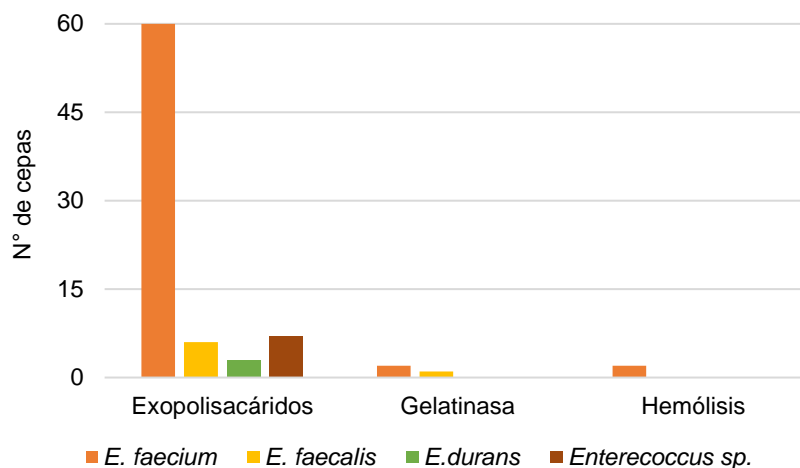


Figura 2: Número de cepas aisladas de cerdos que presentaron factores de virulencia, diferenciado por especie de *Enterococcus spp.*

4.2 Resistencia a cobre y zinc

Mediante la técnica de dilución en agar se evaluó la resistencia a MP para todas las cepas aisladas, tomando como referencia los puntos de corte propuestos por Aarestrup y col. (2004) y por Hasman y col. (2006). Las cepas provenientes de pacientes resultaron en su mayoría sensibles al cobre (21/28), mientras que 7

presentaron un patrón de resistencia intermedio (4 mM) (Tabla 5). Para el zinc, en cambio, la frecuencia de resistencia resultó mayor (17/28). Estos resultados coinciden con lo hallado por Sharifi y col. (2015), quienes determinaron que aislados de *E. faecium* y *E. faecalis* provenientes de fuentes humanas y ganaderas en Irak resultaron resistentes al zinc.

Tabla 5: Resistencia a cobre y zinc en cepas de *Enterococcus* spp. aislados de muestras clínicas

Metal Pesado	N° de aislamiento con CIM (mM)				Resistencia n/N
	2	4	8	12	
Cobre (≤ 2 - ≥ 28)^a					
<i>E. faecium</i> (19)	13	6			0/19
<i>E. faecalis</i> (8)	7	1			0/8
<i>Enterococcus</i> sp. (1)	1				0/1
Zinc (≤ 4 - ≥ 12)^b					
<i>E. faecium</i> (19)	9			10	10/19
<i>E. faecalis</i> (8)	2			6	6/8
<i>Enterococcus</i> sp. (1)				1	1/1

^a Puntos de corte según Hasman *et al* (2006); ^a ≤ 2 : sensible, 4-24: intermedio, ≥ 28 : resistente

^b Punto de corte según Aarestrup (2004); ^b ≤ 4 : sensible; ≥ 12 : resistente

Para las cepas provenientes de ganado porcino se decidió un patrón de evaluación según establecimiento de procedencia. Los aislamientos de las tres localidades presentaron valores de resistencia intermedia para el cobre (Tabla 6), mientras que la frecuencia de cepas resistentes al zinc varió según el tipo de cría del establecimiento. Todos los aislamientos provenientes de las localidades de Dolavon y Rawson resultaron resistentes al zinc (≥ 12 mM), mientras que solo 10 cepas provenientes del establecimiento de Treorcky exhibieron resistencia.

Los establecimientos de Dolavon y Rawson cuentan con un sistema de cría intensiva y ciclo completo, por lo tanto el ganado está destinado exclusivamente a la producción de carne para la comercialización siguiendo normas de higiene y calidad

alimentaria impuestas por Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), y en estos casos el tipo de alimento que se le provee al ganado es clave para el tipo de producto que se desea comercializar. En esta práctica es habitual el uso de suplementos alimentarios que contienen sales de cobre y zinc, a diferencia del tipo de cría familiar.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Nezhad Fard y col. (2011) y Aarestrup & Hasman (2004), quienes relacionan ambas resistencias con elementos genéticos móviles. Tanto el cobre como el zinc son ampliamente utilizados como promotores del crecimiento en la cría intensiva de cerdos en diferentes concentraciones (Hasman *et al.*, 2006). En consecuencia, como una respuesta natural, muchas especies bacterianas han desarrollado mecanismos de resistencia para sobrevivir en presencia de estos MP.

Tabla 6: Resistencia a cobre y zinc en cepas de *Enterococcus* spp. determinado por la localidad del establecimiento porcino

Metal	Pesado	Origen	Especie	N° de aislamiento con CIM (mM)								Resistencia			
				1	2	4	8	12	16	20	24	28	32	n/N	
Cobre (≤ 2 - ≥ 28) ^a	Dolavon	<i>E. faecium</i> (18)		1	10	7								0/18	
								1						0/1	
					3										0/3
					3	3									0/6
	Rawson	<i>E. faecium</i> (28)			6	4	18							0/28	
					1									0/1	
					3	3	2							0/8	
	Treorcky	<i>E. faecium</i> (28)		1	1	26								0/28	
					1	3								0/4	
	Zinc (≤ 4 - ≥ 12) ^b	Dolavon	<i>E. faecium</i> (18)							1		1	4	12	18/18
														1	1/1
						3								3	
					6						1		5		6/6
Rawson		<i>E. faecium</i> (28)									4	2	11	11	28/28
														1	1/1
					8						1	1	6		8/8
Treorcky		<i>E. faecium</i> (28)		18			10								10/28
					4										0/4

^a Puntos de corte según Hasman *et al* (2006); a ≤ 2 : sensible, 4-24: intermedio, ≥ 28 : resistente

^b Punto de corte según Aarestrup (2004); b ≤ 4 : sensible; ≥ 12 : resistente

4.3 Sensibilidad a antibióticos

Los perfiles de RAM de las cepas aisladas de pacientes se presentan en la Tabla 7. Del total de aislamientos, 18 cepas de *E. faecium* y una sin identificar exhibieron resistencia a ampicilina (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$), 16 cepas (9 *E. faecium* y 7 *E. faecalis*) resultaron resistentes a tetraciclina, mientras que solo 6 cepas de *E. faecium* presentaron resistencia a teicoplanina y vancomicina.

Estos resultados coinciden con los hallados por Udo y col. (2002), quienes encontraron resistencia para estos cuatro antibióticos analizados en enterococos aislados de un hospital de Kuwait. Por otra parte, Rodríguez y col. (2013) evaluaron la resistencia a antimicrobianos entre los años 1996 y 2010 de 1873 enterococos

aislados de infecciones intrahospitalarias en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y detectaron un 95% de resistencia a ampicilina en *E. faecium*, especie que, además ha aumentado su presencia desde 2007 en estos ambientes (Schell *et al.*, 2020), mientras que todos los aislados de *E. faecalis* resultaron sensibles.

Las proteínas de unión a penicilina (PBP) son enzimas que catalizan la síntesis de la mureína, peptidoglicano o pared de las bacterias, estructura que les brinda protección contra los cambios de presión exterior. Las PBP catalizan la polimerización glicano (transglicosilación) y la unión entre cadenas de glicanos (transpeptidación). Los beta lactámicos se unen a las PBP inhibiendo selectivamente el proceso de transpeptidación. En este último caso no hay hiperproducción de la PBP5, pero las cepas presentan sustituciones de aminoácidos cerca del sitio activo de las PBP que son las responsables del aumento de la resistencia (Cercenado, 2012).

Otro mecanismo de resistencia, menos frecuente, se presenta en cepas productoras de betalactamasas que se caracterizan por ser resistentes a penicilina, aminopenicilinas (ampicilina) y ureido-penicilinas (piperacilina), siendo sensibles a imipenem y a las combinaciones de beta-lactámicos con inhibidores de beta-lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam) (Cercenado, 2012).

En la actualidad las tetraciclinas no se utilizan con frecuencia para el tratamiento de infecciones humanas, sin embargo en este trabajo se detectó un porcentaje alto de resistencia, si lo comparamos con los trabajos de Zaheer y col. (2020) donde 32% de los enterococos resultaron resistentes, y Rodríguez y col. (2013) quienes no hallaron bacterias resistentes a tetraciclina.

El aumento de infecciones hospitalarias causadas por enterococos es un fenómeno observado globalmente y su diseminación tiene lugar, en mayor medida, por contacto a través de las manos y material inerte contaminado (Rodríguez *et al.*, 2013). La multirresistencia dificulta su tratamiento y tiene impacto en la sobrevida de los

pacientes, días y costos de internación, lo que refuerza la idea que sólo las adecuadas y permanentes políticas de control de infecciones permitirán controlar su diseminación.

Tabla 7: Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de muestras clínicas

Antibiótico	N° de aislamiento con CIM (µg/mL)				Resistencia
	4	8	16	32	n/N
Ampicilina¹ (≤8- ≥16) ^a					
<i>E. faecium</i> (19)		1	18		18/19
<i>E. faecalis</i> (8)		8			0/8
<i>Enterococcus</i> sp (1)			1		1/1
Teicoplanina² (≤8- ≥32) ^a					
<i>E. faecium</i> (19)		13		6	6/19
<i>E. faecalis</i> (8)		8			0/8
<i>Enterococcus</i> sp (1)		1			0/1
Tetraciclina³ (≤4- ≥16) ^a					
<i>E. faecium</i> (19)	9	1	9		9/19
<i>E. faecalis</i> (8)	1		7		7/8
<i>Enterococcus</i> sp (1)	1				0/1
Vancomicina⁴ (≤4- ≥32) ^a					
<i>E. faecium</i> (19)	13			6	6/19
<i>E. faecalis</i> (8)	8				0/8
<i>Enterococcus</i> sp (1)	1				0/1

^a Punto de corte según CLSI (2021); ¹ ≤8: sensible, ≥16: resistente; ² ≤8: sensible, 16: intermedio, ≥32: resistente; ³ ≤4: sensible, 8: intermedio, ≥16: resistente; ⁴ ≤4: sensible, 8-16: intermedio, ≥32: resistente.

El uso de agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento fue prohibido en todos los países de la Unión Europea (UE) en el año 2006, sin embargo, todavía se los utiliza para el tratamiento en animales (Hammerum, 2012). En particular, la tetraciclina se utiliza para el tratamiento de enfermedades en cerdos,

práctica que induce la proliferación de resistencia (Hao *et al.*, 2016; Novais *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2018; Tremblay *et al.*, 2012).

Ante la importancia del uso responsable de antibióticos en animales, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) creó el Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en animales destinados al consumo humano con el objetivo de prevenir la generación y difusión de bacterias que resisten la acción de los antibióticos.

En nuestro país, en el año 2010 se realizó el primer estudio sobre los patrones de RAM en bacterias indicadoras y zoonóticas provenientes de muestras fecales de animales sanos. En el caso particular de los porcinos no se encontró resistencia a ampicilina (Pantozzi *et al.*, 2010), a diferencia de lo hallado en este estudio donde 47/74 cepas exhibieron una CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 8); coincidiendo estos resultados con el estudio de Novais y col. (2013). Este antimicrobiano es muy utilizado, se suministra a cerdos sometidos a castraciones y cortes de cola, situaciones que provocan estrés y que promueven el uso excesivo y rutinario de antimicrobianos en la producción animal, generando la propagación de bacterias multirresistentes (World Animal Protection, 2020).

Los resultados obtenidos sobre resistencia a tetraciclina (75/97) son similares con los de Pantozzi y col. (2010), donde encontraron que de 43 aislamientos de *Enterococcus* spp. el 92,8 % resultó resistente, y de estudios previos realizados en otras regiones (Aarestrup *et al.*, 2000; Nazhard Fard *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2018; Vahjen *et al.*, 2015) .

En este estudio solo se detectaron 4 cepas de *E. faecium* y una cepa sin identificar resistentes a vancomicina y teicoplanina (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) de origen porcino. No obstante, la baja frecuencia hallada resulta de interés para realizar una vigilancia

permanente de esta evolución debido a que son antimicrobianos que se utilizan como última opción después del fracaso con tratamientos de rutina.

En Europa, se han publicado numerosos estudios que han demostrado la presencia de enterococos resistentes a múltiples antimicrobianos, particularmente a vancomicina y teicoplanina (Chajęcka *et al.*, 2016; Hammerum, 2012; Werner *et al.*, 2012). Esta resistencia se desencadenó como producto del uso de una molécula análoga (avoparcina) empleada como promotor de crecimiento en la cría de ganado y aves de corral. Su aplicación se prohibió en toda la Unión Europea en 1997 y en consecuencia la prevalencia de ERV provenientes de animales de cría declinó rápidamente (Nilsson, 2012). Sin embargo, los animales de granja aún actúan como reservorio de esta resistencia, con el peligro potencial de difundirse a través de la cadena alimentaria.

No obstante a la iniciativa del SENASA implementada mediante la resolución 591/2015 (SENASA, 2015) y dirigida a la concientización y control de RAM en animales destinados al consumo humano, la Argentina no cuenta con un programa de vigilancia permanente en establecimientos agropecuarios.

Tabla 8: Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de cerdos

Antibiótico	Origen	Especie	N° de aislamiento con CIM (µg/mL)				Resistencia n/N	
			4	8	16	32		
Ampicilina ¹ (≤8 - ≥16) ^a	Dolavon	<i>E. faecium</i> (18)		13	5		5/18	
		<i>E. faecalis</i> (1)		1			0/1	
		<i>E. durans</i> (3)				3		3/3
		<i>Enterococcus</i> sp. (6)				6		6/6
	Rawson	<i>E. faecium</i> (28)		16	12		12/28	
		<i>E. faecalis</i> (1)		1			0/1	
		<i>Enterococcus</i> sp. (8)		5	3		3/8	
	Treorcky	<i>E. faecium</i> (28)		13	15		15/28	
		<i>Enterococcus</i> sp. (4)		1	3		3/4	
	Teicoplanina ² (≤8 - ≥32) ^b	Dolavon	<i>E. faecium</i> (18)		14	2	2	2/18
			<i>E. faecalis</i> (1)		1			0/1
			<i>E. durans</i> (3)			3		
<i>Enterococcus</i> sp. (6)					5		1	1/6
Rawson		<i>E. faecium</i> (28)		27			1	1/28
		<i>E. faecalis</i> (1)		1				0/1
		<i>Enterococcus</i> sp. (8)		8				0/8
Treorcky		<i>E. faecium</i> (28)		24	3		1	1/28
		<i>Enterococcus</i> sp. (4)		4				0/4
Tetraciclina ³ (≤4 - ≥16) ^a		Dolavon	<i>E. faecium</i> (18)			18		18/18
			<i>E. faecalis</i> (1)			1		1/1
			<i>E. durans</i> (3)			3		3/3
	<i>Enterococcus</i> sp. (6)				6		6/6	
	Rawson	<i>E. faecium</i> (28)			28		28/28	
		<i>E. faecalis</i> (1)			1		1/1	
		<i>Enterococcus</i> sp. (8)			8		8/8	
	Treorcky	<i>E. faecium</i> (28)	14	6	8		8/28	
		<i>Enterococcus</i> sp. (4)	2		2		2/4	
	Vancomicina ⁴ (≤4 - ≥32) ^a	Dolavon	<i>E. faecium</i> (18)	14	1	1	2	2/18
			<i>E. faecalis</i> (1)	1				0/1
			<i>E. durans</i> (3)	3				0/3
<i>Enterococcus</i> sp. (6)			5			1	1/6	
Rawson		<i>E. faecium</i> (28)	27				1	1/28
		<i>E. faecalis</i> (1)	1					0/1
		<i>Enterococcus</i> sp. (8)	8					0/8
Treorcky		<i>E. faecium</i> (28)	27				1	1/28
		<i>Enterococcus</i> sp. (4)	4					0/4

^a Puntos de corte según CLSI-VET; ^b Punto de corte según CLSI; ¹ ≤8: sensible, ≥16: resistente; ² ≤8: sensible, 16: intermedio, ≥32: resistente; ³ ≤4: sensible, 8: intermedio, ≥16: resistente; ⁴ ≤4: sensible, 8-16: intermedio, ≥32: resistente.

4.4 Amplificación de genes de resistencia

Todos los aislamientos que resultaron resistentes a vancomicina y tetraciclina fueron examinados mediante PCR, utilizando cebadores específicos (Tabla 2) para determinar el tipo de resistencia (VanA, VanB, VanC y TetM). Los aislamientos de cerdo exhibieron una alta frecuencia de resistencia a tetraciclina (Tabla 8), donde 68/75 cepas presentaron banda de 657 pb compatible con el gen de resistencia a tetraciclina *TetM* según Aarestrup y col. (2000) (Figura 3). Para las muestras hospitalarias, 16 cepas resultaron ser resistentes a tetraciclina y todas amplificaron el gen *TetM* (tabla 9). Estos resultados son comparables con los encontrados por otros autores (Aarestrup *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2018; Tremblay *et al.*, 2012; Zaheer *et al.*, 2020) tanto para cepas porcinas como humanas, demostrándose la alta frecuencia del genotipo *TetM* en enterococos, aunque su distribución alcanza a muchas otras especies (Agga *et al.*, 2020).

El número de aislamientos resistentes a tetraciclina es preocupante, ya que la mayoría tiene su origen en granjas de amplia producción y distribución de carne porcina. Hace algunos años entró en vigencia la normativa que regula los niveles máximos permitidos de residuos de antibióticos de la familia de tetraciclinas en producción de carnes para exportación con destino Europeo (SENASA, 2018). Si bien los establecimientos que abarca esta investigación son de producción y distribución local, es importante hacer un seguimiento y evitar la resistencia antimicrobiana que se puede desencadenar, debido a la transferencia de cepas resistentes hacia los humanos que puede darse a través de la cadena alimentaria, y puede ocurrir por diferentes rutas (alimento, trabajadores agrícolas, manejo de desechos, fuentes de aguas, entre otras). En los últimos años se han desarrollado diversos estudios que demostraron la presencia de bacterias resistentes a tetraciclina en alimentos de origen animal (Sánchez Cabrera *et al.*, 2021; Choi, 2015; Delpech *et al.*, 2012), y el gen *TetM* resulta ser de los más frecuentes en este tipo de aislados (Choi, 2015).

Otro de los factores importantes que se observó y se destacó anteriormente fue la relación de resistencia a tetraciclina y a zinc, tanto en las cepas de origen porcino como de pacientes. Del total de aislados de cerdos resistentes a tetraciclina (75), 69 presentaron co-resistencia a zinc, mientras que de las 16 cepas hospitalarias 10 resultaron también resistentes a este metal (datos no mostrados). Estos resultados están en coincidencia con lo hallado por otros autores (Aarestrup & Hasman, 2004; Nazhad Fard *et al.*, 2011; Nemergut *et al.*, 2004), quienes afirman que ambas resistencias estarían vinculados en los mismos elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones), desarrollando una presión de selección debido al uso de los agentes antimicrobianos y/o sales de MP, provocando de esta manera la diseminación de resistencia a nuevas cepas.

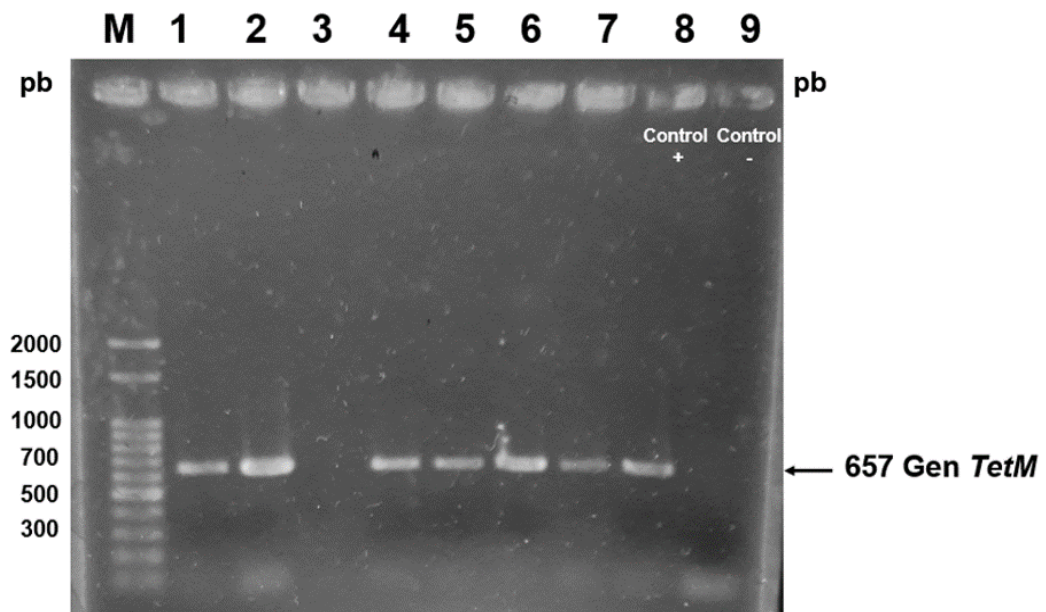


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa del producto de la amplificación del gen *TetM*. M: Marcador de peso molecular. Carril 1-7 cepas resistentes a tetraciclina. Carril 8: Control positivo *E. faecalis* ATCC 29212. Carril 9: Control negativo. La presencia de bandas visualiza la existencia del gen *TetM*. El carril 3 no presenta banda, no amplificó el gen.

Tabla 9: Presencia de gen *TetM* de cepas aisladas de cerdos y humanos resistentes a tetraciclina

Origen	Aislamientos	Tetraciclina Resistentes	Gen <i>TetM</i>
Cerdos	97	75	68
Humanos	28	16	16

Del total de aislados clínicos, seis cepas resultaron resistentes a vancomicina y teicoplanina (CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), compatible con el fenotipo de resistencia VanA (Ahmed & Baptiste, 2018), pero solo 3 presentaron una banda de 1030 pb cuando se utilizaron los cebadores propuestos por Kariyama y col. (2000) (Figura 4).

En nuestro país está documentada la presencia de ERV con genotipo *vanA* y *vanB* en cepas aisladas de pacientes a causa de infecciones intrahospitalarias (Pourcel *et al.*, 2017; Schell *et al.*, 2020; Zárata *et al.*, 2007).

En el caso de las cepas porcinas sólo cinco resultaron resistentes a los glicopéptidos y dos presentaron una resistencia intermedia a vancomicina (sensibles a teicoplanina), fenotipo compatible con resistencias del tipo VanB o VanC (Ahmed & Baptiste, 2018). Sin embargo, al evaluar la presencia de los genes *vanB/C* en estos aislamientos no se detectaron productos de amplificación en ninguna de las cepas.

En el futuro debería corroborarse en estos aislamientos (clínicos y porcinos) si corresponden con cepas portadoras de resistencias transferibles (VanG, VanM y VanN), debido a la relevancia epidemiológica por la posibilidad de su transferencia horizontal hacia otras bacterias a través del mecanismo de conjugación bacteriana (Werner *et al.*, 2013).

4.5 Identificación genotípica

La identificación genotípica de género y especie se realizó por PCR a las cepas de ERV, utilizando los cebadores específicos propuestos por Kariyama (2000) (Tabla

2). De las seis cepas resistentes provenientes de humanos, cinco lograron identificarse como *E. faecium* y coinciden con las pruebas bioquímicas realizadas (Figura 4). Para las cepas aisladas de cerdos, solo 1 de las 5 resistentes se logró identificar genotípicamente como *E. faecium*. Los resultados obtenidos revelan discrepancias entre la identificación de especies entre los métodos fenotípicos y genotípicos. La forma de revertir esa discrepancia sería secuenciando el gen del ARNr 16S, lo cual excedía los objetivos de este trabajo. Sin embargo, en la actualidad las pruebas fenotípicas se siguen utilizando en forma rutinaria como un método de diagnóstico rápido.

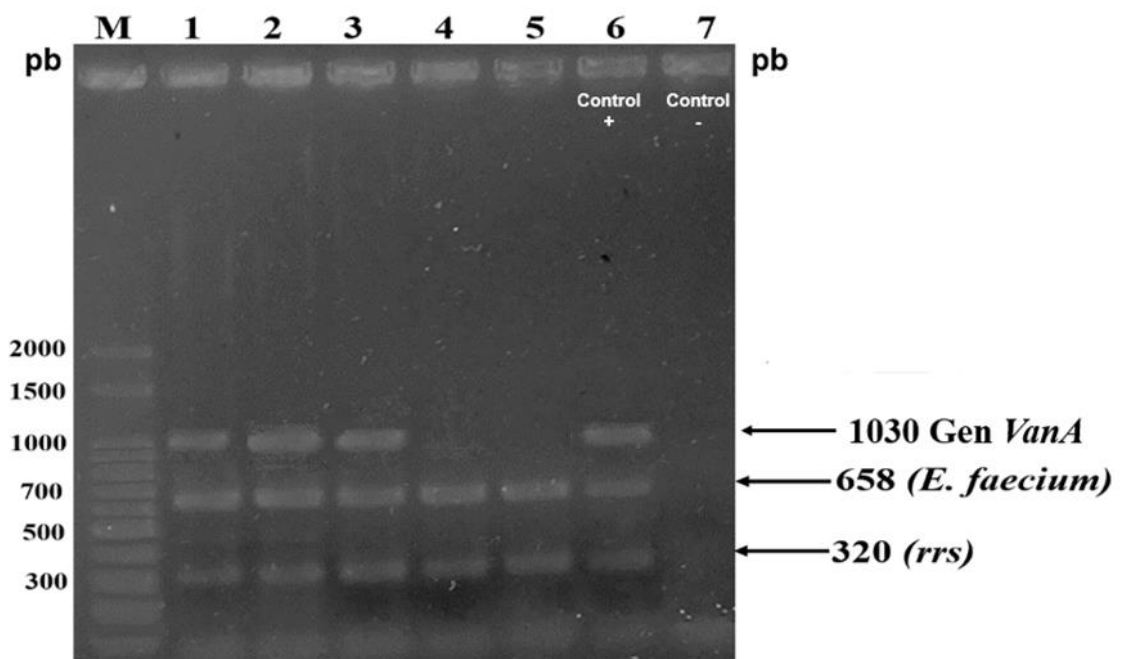


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR múltiple para identificación genotípica y amplificación del gen *VanA*. M: Marcador de peso molecular. Carril 1-5 Cepas resistentes a vancomicina. Carril 6: Control positivo *E. faecium* Van A. Carril 7: Control negativo. La presencia de bandas indica la existencia del gen *VanA*, la identificación de la especie *E. faecium*, y el ARNr 16S.

Los datos hallados aportan información sobre el tipo de resistencia y especies observadas en nuestra región, los cuales coinciden con los encontrados en otras investigaciones nacionales demostrando la alta frecuencia de *E. faecium* como ERV (Pourcel *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2013), en contraste con los aislados de *E.*

faecalis resistentes a vancomicina que han disminuido en los últimos años (Rodríguez *et al.*, 2013).

La resistencia a los antimicrobianos es un ejemplo que muestra que la salud humana está conectada a la de los animales y al medio ambiente; de manera que solo un esfuerzo multidisciplinario puede proporcionar una adecuada respuesta. En consecuencia, las nuevas recomendaciones tienen como finalidad preservar la eficacia de los antibióticos importantes para la medicina humana reduciendo su uso innecesario en animales, y solo administrarse en caso de enfermedad.

5. CONCLUSIÓN

La cantidad de cepas aisladas de muestras de materia fecal de los diferentes establecimientos porcinos y las cepas aportadas por el Hospital Zonal Trelew, indican la alta frecuencia de enterococos en estos ambientes demostrando ser un organismo de naturaleza ubicua, permitiéndole habitar en distintos medios, y proporcionando un reservorio de genes de resistencias.

Todos los aislamientos se identificaron a nivel de especie mediante pruebas bioquímicas, resultando la especie *E. faecium* como la más frecuente en ambos ambientes.

Las pruebas fenotípicas llevadas a cabo en este estudio revelaron que la producción de exopolisacáridos está ampliamente distribuida y es independiente de la especie. Los resultados obtenidos sobre actividad gelatinasa y hemolítica resultaron más frecuentes en cepas de origen clínico comparado con las de origen porcino.

Tanto el cobre como el zinc son ampliamente utilizados como promotores del crecimiento en la cría intensiva de cerdos en diferentes concentraciones. La resistencia a estos metales también es observable en este estudio, no solo en cepas provenientes de cerdos de cría sino también en muestras clínicas.

Los ensayos de susceptibilidad a antibióticos confirmaron que las cepas aisladas de diferentes orígenes exhibieron resistencia a los antimicrobianos evaluados, en mayor proporción a ampicilina y tetraciclina, ambos muy utilizados en la industria porcina. La amplificación por PCR confirmó la presencia en las cepas aisladas del gen *TetM* de resistencia a tetraciclina, y el gen de resistencia a vancomicina *VanA* en menor proporción.

Los resultados de este estudio demuestran la existencia de resistencia a zinc y a tetraciclina en cepas de enterococos de ambos orígenes. Si bien estas bacterias no son causa frecuente de infecciones en animales, pueden ser reservorios de genes de

resistencia y diseminarse a otras bacterias, las que sí pueden causar infecciones en animales y en el hombre.

Teniendo en cuenta la escasa o nula información en nuestro país y especialmente en la zona del VIRCh sobre RAM en bacterias indicadoras y zoonóticas en animales de cría, los resultados obtenidos en este estudio podrían considerarse como punto de partida en futuros programas de monitoreo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. M., Agero, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., & Jensen, L. B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 37(2), 127–137. doi:10.1016/S0732-8893(00)00130-9
- Aarestrup, Frank M., & Hasman, H. (2004). Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary Microbiology*, 100(1–2), 83–89. doi:10.1016/j.vetmic.2004.01.013
- Agga, G. E., Kasumba, J., Loughrin, J. H., & Conte, E. D. (2020). Anaerobic digestion of tetracycline spiked livestock manure and poultry litter increased the abundances of antibiotic and heavy metal resistance genes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 614424. doi:10.3389/fmicb.2020.614424
- Agro Chubut. (2020). Chubut promueve el consumo de carne de cerdo. Extraído el 20/9/2020, de <https://agrochubut.com.ar/chubut/tag/cerdos/>
- Ahmed, M. O., & Baptiste, K. E. (2018). Vancomycin-resistant enterococci: A review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microbial Drug Resistance*, 24(5), 590–606. doi:10.1089/mdr.2017.0147
- Albertoli, S. (2016). Investigación de la potencialidad económica y agroalimentaria del Valle Inferior del Río Chubut. *EEA INTA Chubut-Facultad de Ciencias Económicas- UNPSJB*.
- Ardonio, S., Toso, R., & MS, T. (2017). Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones. *Ciencia Veterinaria*, 19, 50–66. doi:http://dx.doi.org/10.19137/cienvet-20171914
- Armendáriz Rubio, C., Revert Gironés, C., Marrero, S. A., Hardisson de laTorre, A., & González Weller, D. (2004). Zn, Mn, Cu, Se, Cr: Nutrición y suplementación. *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de Los Alimentos*, 353, 37–44.
- Badillo, T. (2016). Utilización de fuentes orgánicas y fuentes inorgánicas de cobre en lechones

- como promotor de crecimiento. *Agroindustria*, 138, 20–33.
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685–706. doi:10.1128/membr.00023-12
- Cancho Grande, B., Garcia Falcon, M., & Simal Gandara, J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3:1, 39–47. doi:10.1080/11358120009487647
- Caraffini F, A., Nobile B, C., Figueroa L, M., Vargas C, M., & Tacchini A, M. (2009). Factores de virulencia de *Enterococcus* spp. y su relación con la resistencia a antibióticos. *Bioquímica y Patología Clínica*, 73(3), 34–39.
- Cercenado, E. (2012). *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(Supl 5), 59–65. doi:10.1016/S0213-005X(11)70045-3
- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C. G., Cetinkaya, Y., & Falk, P. (2000). Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 686–707. doi:10.1128/CMR.13.4.686-707.2000.Updated
- Chajecka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2016). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food Chaje. *Food Science and Technology*, 75, 670–676. doi:10.1016/j.lwt.2016.10.026
- Choi, J. M., & Woo, G. J. (2015). Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology*, 70(4), 476–484. doi:10.1007/s00284-014-0742-1
- Çiftci, A., Findik, A., Iça, T., Bas, B., Onuk, E. E., & Güngördü, S. (2009). Slime production and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from arthritis in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(6), 849–853. doi:10.1292/jvms.71.849
- Clinical and Laboratory Standards Institute-VET. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals, 5th ed. CLSI standard

- vet01. (2018). Extraído el 11/02/2021, de https://clsi.org/media/2325/vet01ed5_sample.pdf
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial Susceptibility testing; 23 th informational supplement. CLSI document M100-S17. Table 2D. Enterococcus spp. M7-A7-MIC Testing Wayne (PA): Clinical and Laboratory St. (n.d.). Extraído el 11/02/2021, de <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED30:2020&sbssok=CLSI M100 ED30:2020 TABLE 2D&format=HTML#CLSI M100 ED30:2020 TABLE 2D>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance, *74*(3), 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- Delpech, G., Pourcel, G., Schell, C., Luca, D., Basualdo, J., Bernstein, J., & Grenovero, S. (2012). Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from artisanal food of animal origin in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, *9*(10). doi:10.1089/fpd.2012.1192
- Delsol, A. A., Anjum, M., Woodward, M. J., Sunderland, J., & Roe, J. M. (2003). The effect of chlortetracycline treatment and its subsequent withdrawal on multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and commensal *Escherichia coli* in the pig. *Journal of Applied Microbiology*, 1226–1234. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02088.x
- Eaton, T. J., Gasson, M. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(4), 1628. doi:10.1128/AEM.67.4.1628
- Errecalde, J. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Euzéby, J. (2021). List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Extraído el 11/02/2021, de <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>
- Fonseca, A. C. (2018). Hay razones para prohibir el óxido de zinc en el destete. Extraído de <http://www.todocerdos.com.ar/notas.asp?nid=1489>

- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1–24.
- Garza-Velasco, R., Hernández-Acosta, K., & Mejía-Chávez, A. G. (2005). Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. Extraído de <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Enterococcus.pdf>
- Gaze, W. H., Zhang, L., Abdousslam, N. A., Hawkey, P. M., Calvo-bado, L., & Royle, J. (2011). Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *The ISME Journal*, 1253–1261. doi:10.1038/ismej.2011.15
- Gilmore, M., Clewell, D., & Ike, Y. (2014). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163–171.
- Hammerum, A. M. (2012). Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*, 1–7.
- Hao, H., Sander, P., Iqbal, Z., Wang, Y., & Cheng, G. (2016). The risk of some veterinary antimicrobial agents on public health associated with antimicrobial resistance and their molecular basis. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1626. doi:10.3389/fmicb.2016.01626
- Hasman, H., Kempf, I., Cariolet, R., Ersbøll, A. K., Houe, H., Christian, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the tcrB gene, is deleted by supplementation of pig feed with copper sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5784–5789. doi:10.1128/AEM.02979-05
- Holloway, Y., & Dankert, J. (1982). Penicillin tolerance in nutritionally variant streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(6), 1073–1075.
- Jara, M. A. (2007). Tetraciclinas: Un modelo de resistencia antimicrobiana. *Unidad de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile*, 49–55.
- Johnson. (2018). *Bacterial pathogens and their virulence factors* (Springer I). University of

Vermont Department of Microbiology & Molecular Genetics Burlington, VT, USA.
doi:10.1007/978-3-319-67651-7

Johnson, A. P. (1994). The pathogenicity of enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33, 1083–1089.

Jones, F. T., & Ricke, S. C. (2003). Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poultry Science Association*, 82, 613–617.

Kanemitsu, K., Nishino, T., Kunishima, H., Okamura, N., & Takemura, H. (2001). Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *Journal of Microbiological Methods*, 47, 11–16.

Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Chow, J. W., Clewell, D. B., & Kumon, H. (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 3092–3095. doi:10.1128/jcm.38.8.3092-3095.2000

Kariyama, Reiko, Mitsuhashi, R., Chow, J. W., Clewell, D. O. N. B., & Kumon, H. (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant Enterococci, 38(8), 3092–3095.

Ledesma, P., Parada, R., Vallejo, M., & Marguet, E. (2015). Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia. *Analecta Vet*, 35(1), 6–12.

Leng, Z., Riley, D. E., Berger, R. E., Krieger, J. N., & Roberts, M. C. (1997). Distribution and mobility of the tetracycline resistance determinant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 551–559.

Lopardo, H. A., Predari, S. C., & Vay, C. (2015). Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Bacterias de Importancia Clínica. Volumen I.

Marguet, E. R., Vallejo, M., & Olivera, N. L. (2008). Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(4), 543–548.

Marin, M., Vre, V., Correa, A. P., Coque, T. M., Stamboulian, D., & Murray, B. E. (1998). First

- Report of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated in Argentina. *Clinical Infection Diseases*, 26, 235–6. doi:1058–4838/98/2601–0065\$03.00
- Mendiratta, D., Kaur, H., Deotale, V., Thamke, D., Narang, R., & Narang, P. (2008). Status of high level aminoglycoside resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a rural hospital of Central India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 26, 369–371. doi:10.4103/0255-0857.43582
- Millar, B. C., Jiru, X., Moore, J. E., & Earle, J. A. P. (2000). A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*, 42(2), 139–147. doi:10.1016/S0167-7012(00)00174-3
- Miller, W. R., Munita, J. M., Arias, C. A., Santiago, A. De, & Unit, A. R. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 12(10), 1221–1236. doi:10.1586/14787210.2014.956092.
- Moore, P., Evenson, A., Luckey, T., McCoy, E., Elvehjem, C., & Hart, E. (1946). Use of sulfasuxidine, streptothricin and streptomycin in nutritional studies with the chick. *Departments of Biochemistry and Agricultural Bacteriology, College Agriculture, University of Wisconsin, Madison*.
- Morrison, D., Woodford, N., & Cookson, B. (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 89–99.
- Murray, B. E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1). doi:10.1128/CMR.3.1.46.
- Nazhad Fard, R., Heuzenroeder, M. W., & Barton, M. D. (2011). Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Veterinary Microbiology*, 148(2–4), 276–282. doi:10.1016/j.vetmic.2010.09.002
- Nemergut, D. R., Martin, A. P., & Schmidt, S. K. (2004). Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1160–1168. doi:10.1128/AEM.70.2.1160
- Nield, B. S., Holmes, A. J., Gillings, M. R., Recchia, G. D., Mabbutt, B. C., Nevalainen, H., &

- Stokes, H. (2001). Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiology Reviews*, 195, 59–65.
- Nilsson, O. (2012). Vancomycin resistant enterococci in farm animals—occurrence and importance. *Infection Ecology & Epidemiology*, 8686. doi:10.3402/iee.v2i0.16959
- Novais, C., Freitas, A. R., Silveira, E., Antunes, P., Silva, R., Coque, T. M., & Peixe, L. (2013). Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: An underestimated role for the pig farm environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2746–2754. doi:10.1093/jac/dkt289
- Padilla, C., Núñez, M., Padilla, A., & Lobos, O. (2012). Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29(1), 55–61. doi:10.4067/S0716-10182012000100010
- Pourcel, G., Sparo, M., Corso, A., Delpech, G., Gagetti, P., de Luca, M. M., & Basualdo, J. A. (2017). Molecular genetic profiling of clinical and foodborne strains of enterococci with high level resistance to gentamicin and vancomycin. *Clinical Microbiology: Open Access*, 06(01), 1–8. doi:10.4172/2327-5073.1000272
- 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(5), 2579–2586.
- Rayamajhi, N., Cha, S. Bin, & Yoo, H. S. (2010). Antibiotics resistances: past , present and future. *Journal of Biomedical Research*, 11(2), 65–80.
- Rearte, D. (2010). Documento programa nacional de carnes. Perfil de las Cadenas: Bovina, aves, cerdos, ovinios y caprinos. INTA.
- Rodríguez, C. H., García, S., Barberis, C., Saposnik, E., Weyland, B., Nastro, M., & Famiglietti, A. (2013). *Enterococcus* spp.: Resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(1), 155–160.
- Rovere, M. (2018). La Resistencia Antimicrobiana: Una perspectiva internacional e

- intersectorial. *Espacio Colegio*, 207–214.
- Saga, T., & Yamaguchi, K. (2009). History of antimicrobial agents and resistant. *Journal of the Japan Medical Association*, 137(3), 103–108.
- Sánchez Cabrera, A., Parada, R., Marguet, E., & Vallejo, M. (2021). Factores de virulencia, resistencia a los antimicrobianos y a metales pesados en *Enterococcus spp.* aislados de alimentos de origen animal, 55(2).
- Schell, C. M., Tedim, A. P., Rodríguez-Baños, M., Sparo, M. D., Lissarrague, S., Basualdo, J. A., & Coque, T. M. (2020). Detection of β -lactamase-producing *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in human invasive infections in the public hospital of Tandil, Argentina. *Pathogens*, 9(2). doi:10.3390/pathogens9020142
- Semedo, T., Santos, M. A., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., & Barreto Crespo, M. T. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569–2576. doi:10.1128/JCM.41.6.2569-2576.2003
- SENASA. (2015). Porcinos. Extraído de <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/porcinos>
- SENASA. (2015). Programa Nacional de Vigilancia de resistencia a los antimicrobianos en los animales destinados a consumo humano. Res. 591/2015. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Extraído de http://www.senasa.gov.ar/sites/default/files/normativas/archivos/res_591-2015.pdf
- SENASA. (2018). Normativa de la UEE por el uso de tetraciclinas. Decisión n° 28.
- Sharifi, Y., Abedzadeh, A., Salighe, A., Kalhor, N., Motlagh, M. K., & Javadi, A. (2015). Antibiotics and heavy metals resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteria isolated from the human and the livestock sources. *Environmental Health Engineering and Management*, 2(4), 199–202.
- Sparo, M., & Nun, G. G. (2008). Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food*

Microbiology, 25, 607–615. doi:10.1016/j.fm.2008.01.008

Tan, S. C., Chong, C. W., Teh, C. S. J., Ooi, P. T., & Thong, K. L. (2018). Occurrence of virulent multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the pigs, farmers and farm environments in Malaysia. *PeerJ*, 2018(8), 1–20. doi:10.7717/peerj.5353

Taylor, J. (1999). Antimicrobial use in animals and its consequences for human health. *European Society of Clinical Infectious Diseases*, 5(3), 119–124. doi:10.1111/j.1469-0691.1999.tb00523.x

Tremblay, C. L., Letellier, A., Quessy, S., Daignault, D., & Archambault, M. (2012). Antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* in abattoir pigs and plasmid colocalization and cotransfer of tet(M) and erm(B) genes. *Journal of Food Protection*, 75(9), 1595–1602. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-047

Tsikrikonis, G., Maniatis, A. N., Labrou, M., Ntokou, E., Michail, G., Daponte, A., & Pournaras, S. (2012). Microbial pathogenesis differences in bio film formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microbial Pathogenesis*, 52(6), 336–343. doi:10.1016/j.micpath.2012.03.003

Udo, E. E., Al-Sweih, N., John, P., & Chugh, T. D. (2002). Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43(3), 233–238. doi:10.1016/S0732-8893(02)00397-8

Vacca, C. (2016). Perfil productivo de Chubut. Secretaria de ciencia, tecnología e innovación productiva de la Provincia del Chubut. Extraído el 11/02/2021, de <http://ciencia.chubut.gov.ar/wp-content/uploads/2017/07/PERFIL-PRODUCTIVO-CHUBUT-v130517-compressed.pdf>

Vahjen, W., Pietruszyńska, D., Starke, I. C., & Zentek, J. (2015). High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut Pathogens*, 3–7. doi:10.1186/s13099-015-0071-3

Vallejo, M., Ledesma, P., Ibañez, C., Aguirre, L., Parada, R., Vallejo, B., & Marguet, E. (2016). Resistencia a metales pesados, antibióticos y factores de virulencia en cepas de

- Enterococcus* aisladas en la provincia del Chubut, Argentina. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36, 16–22.
- Vincent, M., Duval, R. E., Hartemann, P., & Engels-Deutsch, M. (2018). Contact killing and antimicrobial properties of copper. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1032–1046. doi:10.1111/jam.13681
- Wegener. (1998). Historical yearly usage of glycopeptides for animals and humans: The American-European paradox revisited. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(11), 4804.
- Werner, G., Coque, T. M., Franz, C. M. A. P., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., & Weaver, K. (2013). Antibiotic resistant enterococci-Tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 360–379. doi:10.1016/j.ijmm.2013.03.001
- World, A. P. (2020). World Animal Protection. La carne de cerdo y la crisis de las “superbacterias.” Extraído de razasporcinas.com
- Zaheer, R., Cook, S. R., Barbieri, R., Goji, N., Cameron, A., Petkau, A., & McAllister, T. A. (2020). Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. doi:10.1038/s41598-020-61002-5
- Zárate, M. S., Ana, G., Liliana, J.-V., Diego, Y., Silvia, R., Pablo, B., & Jorgelina, S. (2007). Contaminación ambiental durante un brote de enterococo resistente a vancomicina en un hospital de Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(8), 508–512. doi:10.1157/13109987
- Zea, O. M., & Vílchez, C. P. (2014). Efecto de la suplementación con fuentes de cobre sobre el comportamiento productivo, morfometría intestinal y nivel de cobre hepático en pollos de carne. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 25(1), 16–28. doi:10.15381/rivep.v25i1.8464