



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

*Enterococcus* como indicadores de contaminación de agua y alimentos.

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciado en Laboratorio  
Clínico**

**Autor:**

Bejarano Llangari, Jhonyfer Orlando  
Manobanda Muzo Willian Vinicio

**Tutor:**

Dra. María del Carmen Cordovez Martínez

**Riobamba, Ecuador. 2024**

## DECLARATORIA DE AUTORÍA

Yo, Jhonyfer Orlando Bejarano Llangari, con cédula de ciudadanía 0604953463, autor del trabajo de investigación titulado: ***Enterococcus* como indicadores de contaminación de agua y alimentos.**, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 02 de mayo del 2024.



---

Jhonyfer Orlando Bejarano Llangari  
C. I: 0604953463

## DECLARATORIA DE AUTORÍA

Yo, Willian Vinicio Manobanda Muzo, con cédula de ciudadanía 1850018100, autor del trabajo de investigación titulado: ***Enterococcus* como indicadores de contaminación de agua y alimentos**, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 01 de julio del 2024.



---

Willian Vinicio Manobanda Muzo  
C. I: 1850018100

## DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, Dra. María del Carmen Cordovez Martínez catedrático adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: *Enterococcus* como indicadores de contaminación de agua y alimentos, bajo la autoría de Jhonyfer Orlando Bejarano Llangari; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación. Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, 18 de febrero del 2024



---

Dra. María del Carmen Cordovez Martínez

C.I: 1757161482

## DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, Dra. María del Carmen Cordovez Martínez catedrático adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: *Enterococcus* como indicadores de contaminación de agua y alimentos, bajo la autoría de Willian Vinicio Manobanda Muzo; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, 18 de febrero del 2024



---

Dra. María del Carmen Cordovez Martínez

C.I: 1757161482

## CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

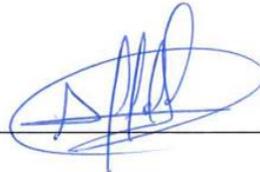
Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación *Enterococcus* como **indicadores de contaminación de agua y alimentos**, presentado por **Jhonyfer Orlando Bejarano Llangari**, con cédula de ciudadanía 0604953463, bajo la tutoría de Dra. María del Carmen Cordovez Martínez; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 02 de mayo del 2024.

Mgs. Mercedes Balladares Saltos  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO**



MSc. Félix Falconí Ontaneda  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**



MSc. Yisela Ramos Campi  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**



## CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación ***Enterococcus* como indicadores de contaminación de agua y alimentos**, presentado por **Willian Vinicio Manobanda Muzo**, con cédula de ciudadanía 1850018100, bajo la tutoría de Dra. María del Carmen Cordovez Martínez; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

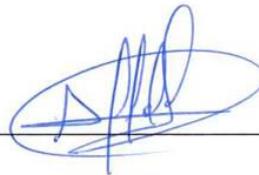
De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 01 de julio del 2024.

Mgs. Mercedes Balladares Saltos  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO**



---

MSc. Félix Falconí Ontaneda  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**



---

MSc. Yisela Ramos Campi  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**



---

## CERTIFICADO ANTIPLAGIO



Dirección  
Académica  
VICERRECTORADO ACADÉMICO



## CERTIFICACIÓN

Que, **Bejarano Llangari Jhonyfer Orlando** con CC: **0604953463**, estudiante de la Carrera Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado “*Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos”, cumple con el 9%, de acuerdo al reporte del sistema Antiplagio **Turnitin**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente, autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 14 de febrero de 2024

Mgs. María del Carmen Cordovéz Martínez  
**TUTORA**



Dirección  
Académica  
VICERECTORADO ACADÉMICO

*en movimiento*



UNACH-RGF-01-04-08.17  
VERSIÓN 01: 06-09-2021

## CERTIFICACIÓN

Que, **Manobanda Muzo Willian Vinicio** con CC: **1850018100**, estudiante de la Carrera Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado “*Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos”, cumple con el 9 %, de acuerdo al reporte del sistema Antiplagio **Turnitin**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente, autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 14 de febrero de 2024

Mgs. María del Carmen Cordovéz Martínez  
**TUTORA**

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a Dios por ser pilar fundamental en mi vida, por hacerme la persona de bien que soy hoy en día. A mi amada madre María Hortencia Llangari Cabay, quien siempre ha sido mi fuente inagotable de inspiración y apoyo incondicional.

Dedico con palabras sinceras a mi hermano mayor Luis Alberto Llangari Cabay, quien ha desempeñado un papel fundamental en mi vida, no solo como un hermano, sino como una figura paterna, momentos significativos en los que su influencia se hizo evidente, desde su dedicación en enseñarme lecciones valiosas de vida hasta su compromiso inquebrantable en protegerme de cualquier adversidad. A través de anécdotas y recuerdos, ilustrado cómo su presencia constante ha sido un faro de estabilidad en tiempos de incertidumbre y confusión. Además, explorando la naturaleza única de nuestra relación, destacando la complicidad, el respeto mutuo y el profundo afecto que compartimos, su ejemplo de integridad, responsabilidad y sacrificio ha influido en mis propias aspiraciones y valores, moldeando mi visión del mundo y mi camino hacia el crecimiento personal.

A mis 2 hermanos Jhudin Alexandra y Wilmer David cuya presencia y ánimo han sido mi fortaleza en cada desafío. A mi querido primo Alex Jhoel Llangari, por compartir risas, alegrías y experiencias inolvidables a lo largo de nuestra vida juntos.

A mi increíble novia Karen Vanessa Ron Ormaza, quien ha sido mi compañera constante, brindándome amor, paciencia y aliento durante este arduo viaje académico.

Y a mis amigas Andrea Inca y Alexandra Guzmán, cuyo apoyo y amistad han sido un regalo invaluable en mi vida. Su presencia y ánimo han sido una constante fuente de inspiración y alegría.

Este logro no habría sido posible sin el amor, el aliento y el respaldo de cada uno de ustedes. Gracias por ser mi inspiración y mi razón para alcanzar nuevas alturas.

***Jhonyfer Orlando Bejarano Llangari***

## **DEDICATORIA**

Ante Dios quien me dio la vida y me permitió culminar mi carrera profesional. A mis padres Hugo y Paulina por su apoyo, fortaleza, esfuerzo, sacrificio y brindarme la oportunidad de formarme como profesional sin dudar de la situación que se esté pasando quienes a lo largo de mi vida han velado por mí. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presenta, sin dudar ni un solo momento en mí, brindado su comprensión, cariño y amor, y siempre ser el motivo e inspiración para poder mejorar cada día y luchar por un futuro mejor.

A seres con quien comparto memorias de infancia y ahora sueños de adulto a mi hermano Henry por su compañía mutua ante momentos difíciles luchando por sueños que de pequeño anhelábamos, que con sus palabras de ánimo y aliento me ayudaron a seguir y culminar mi carrera profesional

A mis amigos que gracias a cada una de las enseñanzas que se vivió dentro y fuera de la universidad se supo valorar el significado de una amistad por las enseñanzas los triunfos y las derrotas que nos conllevó hasta el fin de la carrera universitaria.

***Willian Vinicio Manobanda Muzo***

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecer a Dios por la salud que nos otorga cada día. A mis familiares y amigos que con su constante aliento y apoyo me enseñaron que el querer es poder.

A la Universidad Nacional de Chimborazo por enseñarme y permitirme cumplir con mi meta propuesta de ser un laboratorista de mi querido y apreciado país.

A mis amigos de la universidad, quienes estuvieron a mi lado durante todo este viaje académico. En especial, quiero agradecer a Cristian Andrés Ortiz Apaja, Cristóbal Javier Aroca Espín, y Mónica Gabriela Moncayo Romero, por su constante apoyo, ánimo y comprensión.

Su amistad ha sido un regalo invaluable que ha enriquecido mi vida más allá de las aulas.

También quiero agradecer a mi primo en Luis Alberto Llangari Tzaqui más que mi primo ha sido mi mentor por su valiosa contribución, sus comentarios constructivos y su motivación durante todo el proceso. Sus aportes fueron esenciales para enriquecer este trabajo.

A la Dra. María del Carmen Cordovéz, tutora de este proyecto de investigación, por su dedicación, esfuerzo y enseñanzas impartidas.

*Jhonyfer Orlando Bejarano Llangari*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco infinitamente a Dios por ser mi guía y compañero en el transcurso de mi vida, brindándome sabiduría, paciencia y comprensión para culminar con éxito mi objetivo propuesto, a mi familia que han sido el pilar fundamental para llegar a una meta más, agradecido por haberme apoyado incondicionalmente en los peores momentos de mi vida, y quienes con su ejemplo de trabajo y honradez me motivaron a cumplir un sueño más.

A mi tutora Dra. María del Carmen Cordovéz por haberme orientado, no solo en la elaboración de este proyecto de investigación, sino a lo largo de mi carrera universitaria.

Agradezco a los docentes, autoridades, personal administrativo y todos quienes son parte de la prestigiosa Universidad nacional de Chimborazo.

***Willian Vinicio Manobanda Muzo***

## ÍNDICE GENERAL

DECLARATORIA DE AUTORÍA	
DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR	
CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	
CERTIFICADO ANTIPLAGIO	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
CAPÍTULO I.....	20
1. INTRODUCCIÓN.....	20
CAPÍTULO II.....	22
2. MARCO TEÓRICO .....	23
GÉNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	23
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DEL GÉNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	25
INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD DEL AGUA.....	26
USO DE ENTEROCOCOS COMO BACTERIAS INDICADORAS FECALES.....	27
PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE ENTEROCOCOS EN AGUA .....	28
BACTERIAS INDICADORAS FECALES (FIB) .....	29
NORMA ISO 7899.....	30
PRUEBAS PARA DETERMINACIÓN DE <i>ENTEROCOCOS</i> EN ALIMENTOS .....	30
METODOLOGÍAS PARA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>ENTEROCOCCUS</i> . EN LOS ALIMENTOS .....	31
ELECTROFORESIS EN GEL EN CAMPO PULSADO (PFGE) EN ALIMENTOS .....	32
EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE RIESGOS MICROBIANOS.....	33
CAPÍTULO III .....	34
3. METODOLOGÍA.....	34
TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	34
TÉCNICA Y PROCEDIMIENTO .....	34
POBLACIÓN .....	34

MUESTRA.....	34
MÉTODO DE ESTUDIO.....	35
PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO.....	35
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	35
CAPÍTULO IV .....	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
CAPÍTULO V.....	50
5. CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA .....	50
ANEXOS.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies aisladas de Enterococcus como indicador de contaminación de agua y alimentos.....	38
<b>Tabla 2.</b> Métodos de laboratorio utilizados en la determinación de Enterococcus como indicador de contaminación de agua .....	42
<b>Tabla 3.</b> Métodos de diagnósticos empleados en el aislamiento de Enterococcus como indicador de contaminación de alimentos .....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> ESPECIES DE ENTEROCOCCUS.....	56
<b>ANEXO 2:</b> TINCIÓN DE GRAM: ENTEROCOCCUS .....	56
<b>ANEXO 3:</b> AGAR BILIS ESCULINA.....	56
<b>ANEXO 4:</b> CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ESPECIES DE ENTEROCOCCUS..	57
<b>ANEXO 5:</b> ARTÍCULOS SELECCIONADOS SEGÚN EL ALGORITMO. ....	58

## RESUMEN

El *Enterococcus* es un microorganismo inmerso en infecciones nosocomiales y de la comunidad, pero cuando se aísla de aguas y alimentos es considerado como un contaminante fecal en la microbiología sanitaria. Esta investigación se realizó mediante revisión bibliográfica, con el objetivo de recopilar información científica sobre el *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos. Es un estudio de tipo descriptivo, documental y no experimental, retrospectivo, donde se revisaron 85 artículos científicos y quedaron seleccionados 30 artículos por medio de los criterios de inclusión y exclusión. La información fue buscada en bases de datos importantes como PubMed, MDPI, Elsevier, Springer, Scielo, Medigraphyc, Redalyc, Science Direct y ProQuest y repositorios. Con el análisis y discusión de los diferentes autores se concluyó el estudio, lográndose los objetivos propuestos, en el cual se evidenció que las especies de *Enterococcus* aisladas fueron *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*. Como métodos utilizados para el diagnóstico de esta bacteria en aguas y alimentos se utilizaron la detección analítica colorimétrica electroquímica basada en transparencia y en papel para el primer caso y para ambos se observó la aplicación de métodos microbiológicos convencionales, Reacción en Cadena de la Polimerasa, el análisis de los colifagos, además de la Norma ISO-7899-1. Con estos estudios se puede conocer si hay contaminantes bacterianos que pueden afectar negativamente el estado sanitario de los productos alimenticios y el agua, lo que permite tomar acciones en caso necesario, para así brindar mayor seguridad a los consumidores.

**Palabras claves:** agua, alimentos, contaminación, *enterococcus*, métodos microbiológicos.

### **Abstract**

Enterococcus is a microorganism involved in nosocomial and community infections, but when isolated from water and food, it is considered a fecal contaminant in sanitary microbiology. This research was carried out using a bibliographic review to gather scientific information on Enterococcus as an indicator of water and food contamination. It is a descriptive, documentary, non-experimental, retrospective study where 85 scientific articles were reviewed, and 30 articles were selected employing inclusion and exclusion criteria. The information was searched in essential databases such as PubMed, MDPI, Elsevier, Springer, Scielo, Medigraphyc, Redalyc, Science Direct, and ProQuest and repositories. With the analysis and discussion of the different authors, the study was concluded, achieving the proposed objectives, in which it was evidenced that the Enterococcus species isolated were *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, and *E. hirae*. As methods used for the diagnosis of this bacterium in water and food, colorimetric, electrochemical analytical detection based on transparency and on paper was used for the first case, and for both, the application of conventional microbiological methods, Polymerase Chain Reaction, the analysis of coliphages, in addition to the ISO-7899-1 Standard was observed. With these studies, it is possible to know if bacterial contaminants can negatively affect the sanitary status of food products and water, allowing action to be taken if necessary, thus providing greater safety to consumers.

**Keywords:** water, food, contamination, Enterococcus, microbiological methods.



Reviewed by:  
Lic. Jenny Alexandra Freire Rivera  
**ENGLISH PROFESSOR**  
C.C. 0604235036

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

El agua es crucial en la vida humana. Se necesita un suministro adecuado, accesible y seguro para estar disponible para los consumidores. Al mejorar el acceso al agua potable, se obtendrán importantes beneficios para la salud. Se deben hacer esfuerzos para lograr que la calidad del agua sea lo más limpia posible para beber. En la situación actual, las personas luchan por obtener acceso a agua potable. En general, existen riesgos infecciosos que se vinculan con la ingestión de agua que se contamina con heces humanas o de animales <sup>1</sup>.

A nivel mundial, en el 2020, aproximadamente 2000 millones de personas (26 %) carecían de agua potable segura, 3600 millones de personas (46%) carecían de saneamiento gestionado de forma segura, es decir, acceso a un inodoro o letrina que permita el tratamiento o la eliminación segura de los excrementos y 2300 millones personas (29%) no tenían acceso en casa a una instalación para lavarse las manos con agua y jabón. Las enfermedades transmitidas por el agua representan una grave carga para la salud en todo el mundo debido a la presencia de contaminación fecal y patógenos entéricos humanos en el agua <sup>2</sup>.

Algunos de los principales riesgos para la salud son causados por microorganismos como bacterias y otros patógenos, etc. porque pueden vivir, reproducirse y dispersarse en los sistemas acuáticos. Aproximadamente 1700 millones de niños menores de cinco años en los países en desarrollo murieron debido a la diarrea, principalmente por beber agua contaminada, según lo informado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2011. Además, 525 000 niños murieron al año en el 2018 en todo el mundo, debido a las malas condiciones de calidad del agua, saneamiento e higiene, principalmente por diarrea infecciosa. A nivel mundial, 1900 millones de personas utilizan agua contaminada con heces<sup>1</sup>.

La falta de agua potable segura impide las prácticas de higiene diaria y puede comprometer la salud. Por lo tanto, los brotes transmitidos por el agua asociados con la contaminación del agua potable se relacionan con un problema de salud pública mundial<sup>3</sup>. La calidad microbiana del agua es un problema importante en la salud animal, humana y ambiental<sup>4</sup>. El consumo de agua contaminada con heces que contienen microorganismos patógenos, conlleva a un riesgo tanto para humanos como para animales porque puede aumentar la incidencia de enfermedades zoonóticas<sup>5</sup>.

Asimismo, la tasa de mortalidad y la tasa de enfermedades son causadas por enfermedades transmitidas por los alimentos. La infección y el envenenamiento son las enfermedades más comunes causadas por (bacterias dañinas, gusanos, mohos, protozoos y virus). Esto, a su vez, provoca irritaciones o infecciones del tracto gastrointestinal<sup>6</sup>.

Hay dos formas en que los patógenos pueden ser dañinos para los humanos, primero: el humano puede ingerir el propio patógeno a través del alimento contaminado que se llama (infección alimentaria), segundo: el humano puede ingerir el veneno producido por el propio

patógeno que se llama (intoxicación alimentaria) que también conduce al síndrome de intoxicación. Las enfermedades transmitidas por los alimentos proceden de muchas fuentes, tales como el del suelo, aguas residuales, animales o de manos de trabajadores durante la fabricación de alimentos)<sup>6</sup>.

Especialmente en los países en desarrollo, las aguas residuales y de actividades socioeconómicas sin tratar se vierten en las corrientes superficiales naturales, que son fuentes importantes para el riego de cultivos. Como resultado, los agricultores y los consumidores están regularmente expuestos a una contaminación química y biológica desconocida<sup>7</sup>.

El monitoreo, la eliminación y la inactivación de patógenos transmitidos por este líquido preciado y los indicadores bacteriológicos de contaminación fecal se consideran críticos para los sistemas de acueductos en todo el mundo<sup>3</sup>. Por lo tanto, es necesario analizar esta situación e implementar estrategias preventivas para la gestión de la calidad, para así prevenir y controlar los brotes de infecciones, considerándose el *Enterococcus* como uno de ellos. La calidad de las fuentes de agua debe garantizar la seguridad de los suministros de la misma, mediante la evaluación de indicadores legales, como el enterococo<sup>8</sup>.

El estudio de las características microbiológicas, físicas y químicas en el marco de la vigilancia sanitaria permite avanzar en la identificación de los problemas de la calidad del agua, información valiosa para la búsqueda de soluciones que permitan mejorar los sistemas de abastecimiento y aumentar el acceso al agua potable<sup>8</sup>.

El *Enterococcus* está recibiendo una amplia aceptación como indicador muy útil en la determinación de la calidad microbiológica del agua, debido a que siempre están presentes en las heces de los animales de sangre caliente, son incapaces de multiplicarse en las aguas y sobreviven largos períodos en condiciones adversas de la naturaleza<sup>2</sup>. Algunos estudios realizados con aguas recreativas y potables consideran que los enterococos son indicadores más estables que *Escherichia coli* y los coliformes fecales<sup>4</sup>.

Existen múltiples enfermedades transmitidas por alimentos y aguas contaminadas, las cuales pueden ser el resultado de contagio de estos, con heces humanas o de animales dentro de todo el sistema de suministro de agua. Lo cual puede suceder por contaminación de productos agrícolas en los sembrados y que a la vez se consumen crudos o semicrudos, mientras que el agua (vía de transmisión más común de patógenos entéricos) se debe a baja concentración de cloro residual o por roturas en las tuberías del acueducto<sup>3</sup>.

La contaminación por patógenos de las aguas superficiales y subterráneas es un riesgo importante para la salud y el mantenimiento de la vida. Por lo cual se hace necesario implementar por los gobiernos y los Ministerios de Salud Pública controles periódicos de pruebas de calidad<sup>9</sup>. Los *Enterococcus*, debido a su presencia en las heces humanas o de animales, hace que persistan en el medio ambiente, lo que ha llevado a ser definidos como indicadores de contaminación fecal del agua cuando están presentes y a la vez contaminan alimentos si existe disposición de materia fecal en los sembríos<sup>5</sup>.

Los factores antropogénicos y naturales pueden causar un aumento en el nivel de contagio de las fuentes de abasto de agua dulce. Las actividades como los asentamientos humanos, la industrialización, agricultura y ganadería han afectado negativamente la calidad de la mayoría de los ríos, arroyos y represas a nivel mundial <sup>2</sup>.

Aunque existen legislaciones para proteger las masas de agua superficial de la contaminación, como el principio de pago por contaminación (que apenas se aplica), ha llevado a que los cuerpos de agua superficiales se encuentren contaminados con frecuencia y estos son a menudo tienen uso doméstico, agrícola, ocupacional y recreación para muchos de los que viven a lo largo de su curso <sup>2</sup>.

Lo antes expuesto puede tener un impacto negativo en la salud humana, así como en la calidad del medio ambiente, incluidos los suelos y los cultivos. Las aguas residuales suelen contener patógenos relacionados con las excretas (bacterias, virus, protozoos y helmintos) y productos químicos tóxicos, como metales pesados y micro contaminantes como pesticidas, productos químicos domésticos, residuos farmacéuticos, etc.<sup>7</sup>.

El género *Enterococcus* es uno de los microorganismos considerado como indicador de contaminación fecal del agua, pues puede provenir del intestino humano o animal y es capaz de sobrevivir fuera del tracto gastrointestinal. Esta problemática hace necesario conocer de esta bacteria, sus características y cómo buscar su presencia en aguas y alimentos. Lo que será útil para que estudiantes y profesionales, puedan implementar medidas de educación para la salud a la población expuesta y así disminuir el riesgo de infecciones sobre todo a personas que tienen su sistema inmunológico deficiente<sup>9</sup>.

La presente investigación es analizar el *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos, mediante revisión bibliográfica, de diferentes publicaciones como: estudios experimentales, bibliográficos, analíticos comparativos. Describiendo la temática en tres acápites como:

- Identificar las especies aisladas de *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos.
- Analizar los métodos de laboratorio utilizados en la determinación de *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua, según la literatura publicada.
- Describir los métodos de diagnóstico empleados en el aislamiento de *Enterococcus* como indicador de contaminación de alimentos, descritos en bases de datos científicos.

## CAPÍTULO II

## 2. MARCO TEÓRICO

### Género *Enterococcus*

Los enterococos habían sido clasificados por Rebeca Lancefield en 1930 en el grupo serológico D, pero mediante los estudios de estudios de hibridación genética de ADN y ARN Schleifer y Kilpper-Balz en 1984, quedaron clasificados como un género aparte “*Enterococcus*” dentro de la familia *Enterococcaceae* <sup>10,11</sup>.

Este género está compuesto por 18 especies (Anexo 1), el *E. faecalis* causante del 85 al 95% de las infecciones, es la más significativa y a la vez se divide en 3 subespecies: *faecalis*, *liquefaciens* y *zimogenes*, mientras que el *E. faecium* produce del 5 al 10 % de las afecciones clínicas <sup>10,11</sup>.

Estos son células esféricas u ovoides que miden de 0,6 a 2,0 x 0,6 a 2,5  $\mu\text{m}$ , no poseen cápsula, anaerobios facultativos, son cocos grampositivos en pares o cadenas cortas en medios líquidos, inmóviles, crecen bien a temperatura entre 35-37°C, además pueden tolerar temperaturas > de 60°C. Catalasa negativa, fermentan gran variedad de carbohidratos con elaboración de ácido láctico, algunas cepas son capaces de producir una pseudocatalasa como algunas cepas de *E. faecalis* que dan catalasa positiva cuando crecen en medios que contienen sangre <sup>11</sup>.

Presentan beta ( $\beta$ ), alfa ( $\alpha$ ) y gamma ( $\gamma$ ) hemólisis en agar sangre de carnero, siendo esta la más frecuente. Crecen en presencia de bilis e hidrolizan la esculina por lo que dan bilis esculina positiva y a temperaturas entre 10 y 45°C se desarrollan bien. Constituyen parte de la microflora intestinal normal. El *E. faecium* se aísla entre 5 a 10% y el *E. faecalis* entre un 85 a 90%, La actividad enzimática I-pirrolidonilarilamidasa (PYR) es positiva, pero también crecen en cloruro de sodio al 6,5% y son resistentes a la Penicilina G <sup>11</sup>.

El género *Enterococcus* se disemina en el ambiente hospitalario fácilmente debido a los factores de virulencia que posee como <sup>10</sup>:

#### 1. Adhesinas de superficie:

- Biofilms o sustancia de agregación: es una proteína de la membrana citoplásmica que facilita el intercambio de plásmidos y la unión a las células epiteliales, sobre todo en células vesicales, resistentes a la antibioticoterapia, lo que lleva a pacientes tratados previamente a riesgo de infecciones enterocócicas.
  - Proteína enterocócica de superficie: adhesina de unión al colágeno que se observa en el *E. faecalis*.
  - Actividad citocromo C reductasa: es uno de los productos extracelulares relacionados con la virulencia del enterococo y ha sido observada en *E. faecalis*.

#### 2. Factores secretados:

- Feromona: son sustancias quimioatrayentes para los neutrófilos que ayuda a regular la reacción inflamatoria.
- Citolisina: es una bacteriocina proteica que impide el crecimiento de microorganismos grampositivos provocando daño tisular local, pero, además está asociada con un mayor riesgo de muerte en bacteriemias intrahospitalarias y favorece la diseminación del enterococo en la sangre.
- Gelatinasa: enzima encargada de hidrolizar la gelatina, el colágeno, la hemoglobina y otros péptidos pequeños.

### 3. Resistencia a antibióticos

- ✓ Presencia de numerosos plásmidos y genes cromosómicos: estos elementos le confieren la característica de ser resistente a aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos y vancomicina.

Estos microorganismos presentan una resistencia intrínseca, debido a sus características, con la mayoría de los aminoglucósidos y una mediana resistencia a todas las cefalosporinas, penicilinas (penicilinas), a trimetoprim/sulfametoxazol, clindamicina. Mientras que tienen una susceptibilidad intermedia o resistencia a las fluoroquinolonas y son menos susceptibles que los estreptococos a la ampicilina y a la penicilina. En el ambiente hospitalario pueden transmitirse entre los pacientes por las manos de los trabajadores de la salud, pero también pueden encontrarse en equipos médicos <sup>10,11</sup>.

En cuanto a las infecciones hay pacientes que son más propensos que otros, debido a factores de riesgo, como pueden ser:

- **Exógenos:** la infección ocurre a partir de otra fuente diferente a las personas como la hospitalización, el personal sanitario, el espacio hospitalario; causando así infecciones cruzadas provocadas por fuente de infección humana o inanimada, es decir transmitida de mano en mano, equipos médicos, etc<sup>12</sup>.
- **Endógenos:** los microorganismos proceden del mismo paciente susceptible, siendo su propia fuente de infección, a partir del microbiota tanto nasofaríngeo, rectal, del tracto digestivo o de la piel, etc. Cuando existen factores como heridas quirúrgicas, uso excesivo de antibióticos, instrumentación, estadía hospitalaria prolongada u otros esta flora comensal se vuelve oportunista y patógena <sup>12</sup>.

Existen varias condiciones del individuo que conllevan a la obtención de infecciones nosocomiales como la inmunosupresión, pero también la hospitalización prolongada y el uso de antibióticos de amplio espectro, además de procedimientos invasivos. Todo esto contribuye al desarrollo de infecciones enterocócicas, jugando un papel fundamental el huésped <sup>10</sup>.

Las infecciones por esta bacteria se ven con mayor frecuencia en el tracto genitourinario, el peritoneo y el tejido cardíaco, provocando una endocarditis, complicación considerada grave

de la bacteriemia enterocócica con una alta mortalidad. Con frecuencia se asocian a la formación de abscesos intraabdominales y de infección de heridas quirúrgicas debido a la localización intestinal de estos microorganismos, sobre todo en pacientes que han estado hospitalizados por períodos largos, pero además han recibido antibióticos de amplio espectro<sup>10</sup>.

### **Diagnóstico de Laboratorio del género *Enterococcus***

Para el diagnóstico de laboratorio del género *Enterococcus* existen diversos métodos, tales como:

**Examen microscópico:** la observación de cocos grampositivos dispuestos en cadenas cortas, parejas o tetradas en la coloración de Gram (Anexo 2)<sup>14</sup>.

**Cultivo:** existen varios medios de cultivos donde crece bien este microorganismo como agar sangre de carnero al 5%, agar Chocolate, Infusión Cerebro Corazón, Triptona Soya, agar Columbia y CLED entre otros. Además, existen medios selectivos como agar *Enterococcus*, Caldo FK (Kenner Fecal), SF (Caldo para *E. faecalis*) y Caldo buffer-azida-glucosa-glicerol que son los más utilizados cuando se requiere investigarlos a partir de aguas y alimentos. Crecen bien a una temperatura entre 35-37°C /24 horas<sup>14</sup>.

**Identificación de género y especies:** existen múltiples pruebas para su identificación, pero las más usadas son:

- **Hidrólisis de la bilis-esculina** (Anexo 3). En presencia de bilis al 40% es capaz de hidrolizar la esculina en esculetina y glucosa, por lo que se ennegrece la mitad o más del medio de cultivo contenido en el tubo de ensayo<sup>14</sup>.
- **Oxid Biochemical Identification System (O.B.I.S)-PYR** es una prueba colorimétrica rápida para la determinación de actividad PYRrolidonasa en estreptococos. La determinación de PYRrolidonasa se ha basado tradicionalmente en el uso de un péptido L-pirrolidonil-β-naftilamida, que es un potente carcinógeno. La Oxoid ha desarrollado un sistema nuevo que utiliza un sustrato no carcinogénico, el ácido L-piroglutámico-7 amino-4 metilcumarina (7AMC) y dimetilaminocinamaldehído. La hidrólisis enzimática del sustrato por los enterococos provoca la aparición de un color morado tras la adición de una solución de revelado<sup>15</sup>.
- **Clasificación en especies** (Anexo 4)

**Técnicas de Biología Molecular:** constituyen una herramienta en la tipificación y caracterización de cepas, además, pueden utilizarse para diagnóstico y estudios epidemiológicos. Entre estas técnicas se encuentran la Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE), Análisis por Endonucleasas de Restricción (REA), Secuenciación de genes de ARNr 16S de enterococos aplicada a la identificación de especies y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)<sup>15</sup>.

### **Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana:**

El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda las siguientes técnicas<sup>13</sup>:

- Pruebas de difusión con disco en agar Mueller-Hinton (Kirby-Bauer).
- Pruebas de dilución para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): método de dilución en agar y método de microdilución en caldo.
- Existen otros métodos como el Agar “Screening Plate” para la determinación de Alto Nivel de Resistencia a Aminoglucósidos y Resistencia a la Vancomicina, E-test y métodos automatizados como Micro Scan, Vitek GPS-TA y el GPS-101<sup>13</sup>.

### **Indicadores microbiológicos de calidad del agua**

Los parámetros del agua que normalmente se someten a evaluación son las propiedades físicas, químicas y bacteriológicas<sup>5</sup>. Los indicadores de la calidad del agua son organismos que presentan un comportamiento similar a microorganismos patógenos cuya origen, concentración, hábitat y la reacción a diferentes factores externos son muy similares entre sí, por los altos niveles de contaminación presentes<sup>16</sup>.

La aplicación de los indicadores microbiológicos establece la existencia de patógenos y ayuda a la comparación de reacciones a cambios de pH, temperatura, que puede darse durante la aplicación de métodos físicos o químicos de desinfección, con la ventaja de ser más fácilmente cultivables o identificables, y económicamente factibles por sus costos reducidos<sup>16</sup>.

Estos necesitan de la identificación y cuantificación de microorganismos por índices de diversidad, los cuales se encuentran ajustados a intervalos específicos que califican la calidad del agua, definidos y aprobados por organismos de control ambiental nacionales e internacionales, aunque la información microbiológica obtenida a partir de su análisis no reemplaza los análisis fisicoquímicos, reduce costos y aporta información en el monitoreo de la calidad del agua útil para las empresas e instituciones públicas encargadas de establecer el impacto de las actividades en la contaminación del agua<sup>16</sup>.

La Organización Mundial de la Salud recomienda utilizar como indicadores de contaminación fecal para aguas costeras a *Escherichia coli* y *Streptococos* fecales, debido a que *E. coli* es uno de los indicadores más sensibles del grado de contaminación en las cercanías de los desagües y los *Streptococos* fecales sobreviven más tiempo en agua de mar que los Coliformes fecales, simulando mejor las características de sobrevivencia de Rotavirus, el cual es uno de los agentes etiológicos de gastroenteritis de mayor prevalencia en niños pequeños<sup>17</sup>.

El género *Enterococcus* ha mostrado evidencia de una supervivencia más sólida contra los factores estresantes en ambientes acuáticos y los desinfectantes comúnmente utilizados en la industria del agua potable (cloro, monocloramina, luz ultravioleta [UV]), en comparación con *E. coli*. Además pueden persistir por más tiempo y transportarse más lejos en algunos

recursos hídricos y por lo tanto, pueden indicar deficiencias en la calidad del agua que posiblemente no se detecten con el monitoreo tradicional de indicadores fecales<sup>18</sup>.

Los enterococos se utilizan ampliamente como herramientas para evaluar la calidad del agua en muchas partes del mundo. Son abundantes en las heces humanas y de animales, se cultivan fácilmente en laboratorios y se han asociado con los resultados de evaluación de la calidad del agua destinada a la salud humana tanto de las aguas dulces y marinas. Se han utilizado como bacterias indicadoras fecales para aplicaciones en aguas usadas para la recreación, agua potable y reutilización<sup>18</sup>.

Se puede localizar en diferentes tipos de hábitats como: extraentéricos, en general fuera de los intestinos, considerándose como fuentes externas que incluyen suelo y sedimentos, arena de playa, vegetación acuática y terrestre y aguas ambientales (ríos, arroyos y riachuelos). También pueden considerarse hábitats heterotérmicos, en los que las temperaturas son variables, en contraste con el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, donde la temperatura es relativamente constante<sup>19</sup>.

Cuando se detectan en aguas o alimentos son considerados como indicadores fecales. Para su análisis se emplean pruebas de cultivo en de tubos con medio selectivo (caldo glucosa azida) para determinar el Número más Probable (MPN), siendo confirmado por repiques en agar bilis esculina u otro medio especial, además de la prueba de catalasa y la coloración de Gram. Estos ensayos permiten determinar el grado de la contaminación fecal humana una vez que se obtiene una relación  $> 4$  entre el # de coliformes termotolerantes y el de enterococos, mientras que si es  $< 1$  sugiere otra fuente<sup>20</sup>.

Asimismo, los enterococos se pueden emplear como indicador para proporcionar información útil sobre la calidad del agua potable, la idoneidad del tratamiento del agua potable y la condición microbiana del sistema de distribución del agua en una ciudad. Su aplicación favorece a añadir la información proporcionada por otros parámetros de control microbiológico como *E. coli* y coliformes totales. Las pruebas de enterococos también se pueden usar durante una auditoría de un sistema de agua potable para obtener más información sobre la calidad microbiológica en el sistema y si existen vulnerabilidades potenciales<sup>18</sup>.

### **Uso de enterococos como bacterias indicadoras fecales**

Durante más de un siglo, las bacterias indicadoras fecales (FIB) se han utilizado para evaluar la calidad del agua y proteger a los seres humanos de la gran cantidad de patógenos que se transmiten a través del agua. Las bacterias indicadoras fecales (FIB) son habitantes del tracto gastrointestinal de muchos animales y se eliminan en las heces en altas densidades; por tanto, se detectan fácilmente en aguas contaminadas<sup>19</sup>.

Ostrolenk et al. estuvieron entre los primeros en sugerir que los enterococos podrían ser las bacterias indicadoras fecales (FIB) más apropiados que *E. coli*, y los estudios realizados en la década de 1970 confirmaron los resultados por los altos niveles de contaminación del

agua. Más recientemente, múltiples estudios han demostrado una asociación entre las concentraciones elevadas de enterococos y los riesgos de enfermedades como la gastroenteritis durante el uso recreativo del agua (uso de piscinas, ríos con actividades de esparcimiento), particularmente cuando hay contaminación de fuente puntual<sup>19</sup>.

La concentración de enterococos en las heces del ganado varía, pero normalmente oscila entre  $10^4$  y  $10^5$  UFC/g (Unidad Formadora de Colonias) y la contaminación microbiana en alimentos. Por ejemplo, en la carne de res puede ocurrir durante la remoción de la piel y la evisceración en las instalaciones de procesamiento. Estudios anteriores han informado que *Enterococcus* spp. son prevalentes en muestras de carne en América del Norte, pero hay menos información disponible sobre la incidencia de estos en ambientes de procesamiento de reses<sup>21</sup>.

Los enterococos son habitantes normales como microflora normal y no dañina para los humanos. Sin embargo, se han convertido en los principales patógenos nosocomiales, lo que representa un problema alarmante para aquellos pacientes que tienen deficiencias en su sistema inmunológico<sup>22</sup>.

Actualmente, existen múltiples especies de *Enterococcus*, sobresaliendo de ellas el *E. faecalis* y *E. faecium*, los cuales se asocian con mayor frecuencia a la carne molida. Estas son consideradas microorganismos comensales en humanos; sin embargo, ciertas cepas de de las mismas son responsables de infecciones nosocomiales graves y las cepas que son resistentes a la vancomicina (ERV), son particularmente difíciles de tratar debido a las limitadas opciones de tratamiento antimicrobiano, sobre todo para aquellos individuos inmunodeficientes. Este grupo de bacterias son intrínsecamente resistentes a varios antimicrobianos y también pueden adquirir resistencia mediante transferencia horizontal de genes y mutaciones puntuales<sup>21</sup>.

### **Pruebas de determinación de enterococos en agua**

Los métodos para medir rápidamente bacterias indicadoras fecales como: coliformes, *E. coli* y *Enterococcus* spp. son vitales para monitorear la calidad microbiana del agua para consumo humano, recreación y producción de alimentos. Existen métodos de prueba para coliformes, *E. coli* y *Enterococcus* spp. en formatos que van desde pruebas de presencia-ausencia hasta ensayos de número más probable (MPN), filtración por membrana (MF) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>14</sup>.

Las pruebas de enterococos pueden ser una herramienta útil para complementar los indicadores de agua segura, ya que son resistentes a los agentes químicos (como el cloro), manteniéndose viables incluso cuando el contenido de cloro cumple con los parámetros legales<sup>3</sup>.

### **Prueba MTF (también llamada ensayo de fermentación en tubos múltiples) y el método MF (filtración por membrana)**

La prueba MTF (también llamada ensayo de fermentación en tubos múltiples) y el método MF se utilizan ampliamente como métodos estándar en la evaluación de la calidad del agua potable, de origen y recreativa en todo el mundo. Sin embargo, los métodos MTF y MF para medir coliformes, *E. coli* y *Enterococcus spp.* generalmente requieren dos pasos de pruebas presuntivas y confirmativas y toman al menos 72 horas. En comparación con los métodos basados en cultivo, los métodos basados en PCR son más rápidos, más sensibles y permiten la detección simultánea de múltiples bacterias, pero es imposible determinar las concentraciones de bacterias viables con PCR. La MPN-PCR es un método cuantitativo para determinar rápidamente la densidad de organismos viables en una muestra<sup>23</sup>.

### **Bacterias indicadoras fecales (FIB)**

Estudios recientes informan el uso de *E. faecalis* como el FIB más adecuado en agua. Una prueba de diagnóstico sensible y específica es fundamental para monitorear al mismo en agua reciclada y agua potable. Los métodos estándares actuales más usados para la detección de esta bacteria es la dilución en serie o filtración por membrana seguida de aislamiento selectivo en placa, la prueba Enterolert-E y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>2</sup>.

Estos métodos de laboratorio son en gran medida precisos, proporcionan suficiente sensibilidad, especificidad y alto rendimiento. Sin embargo, su uso se ve obstaculizado por los costos asociados con la recolección de muestras y un tiempo significativo (hasta 6 días) para el análisis. Este tiempo de respuesta puede resultar en que se proporcionen al público consejos obsoletos en los programas de monitoreo de la calidad del agua recreativa. Los mismos desafíos enfrentan las autoridades del agua que advierten al público sobre derrames de alcantarillado en cuerpos de agua<sup>2</sup>.

Las metodologías actuales para detectar *E. faecalis* en aguas ambientales y aguas residuales tienen numerosos inconvenientes, incluido el tiempo necesario y la necesidad de entornos de laboratorio sofisticados<sup>2</sup>. Algunos estudios muestran la necesidad de monitorear indicadores microbiológicos complementarios para asegurar la calidad del agua, ya que se ha detectado contaminación fecal sólo cuando se han usado parámetros alternativos, haciendo énfasis en la inclusión de otros métodos más allá de lo que exige la legislación, para evaluar eficientemente el agua potable y salvaguardar la salud pública<sup>3</sup>.

Se pueden utilizar evaluaciones cuantitativas de riesgos microbianos para modelar la probabilidad de resultados de salud humana específicos de patógenos debido a la exposición recreativa en función de un indicador sustituto. Los datos de entrada para las QMRA incluyen la relación entre el indicador que se va a monitorear y el patógeno de interés, la concentración del indicador, la cantidad de agua ingerida y la probabilidad del resultado de salud basado en la cantidad estimada de patógeno consumido<sup>24</sup>.

Existen numerosas incógnitas sobre el comportamiento y la supervivencia de indicadores fecales y patógenos en aguas ambientales. Los métodos y tecnologías actuales para detectar

y cuantificar indicadores fecales y patógenos son limitados debido a la naturaleza rara y desigual de los patógenos. Los avances tecnológicos pueden ayudar a mejorar la sensibilidad para detectar y cuantificar patógenos<sup>24</sup>.

El FIB ideal tiene las siguientes características:

- Debe estar presente cuando hay cepas patógenas presentes y ausente donde no hay cepas patógenas.
- El número de recuentos de FIB se correlaciona con el grado de contaminación.
- El número de recuentos de FIB debe ser mayor que el de cepas patógenas.
- No debería haber más crecimiento de FIB en el agua.
- El tiempo de supervivencia de FIB debe ser mayor o igual que el de las cepas patógenas.
- La FIB debe detectarse fácil y rápidamente mediante pruebas de laboratorio.
- FIB debe tener características bioquímicas y de identificación constantes y debería ser inofensivo para los humanos<sup>1</sup>.

### **Norma ISO 7899**

El objetivo de la Norma ISO 7899 es enumerar los principales enterococos intestinales como: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*, que se encuentran frecuentemente en las heces de humanos y animales homeotérmicos. Ocasionalmente se pueden incluir otras especies fecales como *E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae* y *E. gallinarum*, y cepas de *Streptococcus bovis/equinus*, pero rara vez se encuentran en las muestras ambientales. Su recuperación tiende a ser baja. *E. casseliflavus* y *E. mundtii* son especies no fecales que, cuando están presentes en muestras de agua (por ejemplo, debido a la influencia del material vegetal y algunos efluentes industriales), se enumeran como enterococos fecales. Estas especies y otras especies raras no fecales tienden a producir pigmento amarillo en un medio no selectivo. Por lo tanto, se debe considerar la posible interferencia de especies de *Enterococcus* no fecales al interpretar los resultados<sup>25</sup>.

La Norma ISO 7899 es un método miniaturizado para la detección y enumeración de los principales enterococos intestinales en aguas superficiales y residuales mediante inoculación en un medio líquido. El método es aplicable a todo tipo de aguas superficiales y residuales, particularmente aquellas ricas en materia en suspensión. Este método no es adecuado para agua potable ni para ningún otro tipo de agua cuyo recuento recomendado sea inferior de 15 a 100 ml<sup>25</sup>.

### **Pruebas para determinación de *Enterococos* en alimentos**

El género en estudio incluye una amplia variedad de cepas que actúan como cultivos iniciadores en el desarrollo de las características organolépticas de los alimentos fermentados, incluyendo derivados cárnicos, lácteos y vegetales, así como, por su capacidad para producir bacteriocinas, ambas características son consideradas importantes desde el punto de vista tecnológico e higiénico, respectivamente. El uso de los enterococos, con esta finalidad, se está normalizando y se ha aceptado que forman parte del microbiota natural de ciertos alimentos, sin embargo, su capacidad para habitar en intestino y ambiente; así como,

su facilidad de propagación hace que exista cierto debate en cuanto a si su presencia en alimentos está asociada a infecciones en humanos por transmisión alimentaria<sup>23</sup>.

Las bacterias indicadoras revelan la posibilidad de que exista la presencia de contaminación por heces, lo cual puede estar relacionado con patógenos intestinales, que por sí sólo no son capaces de producir enfermedades, pero sí cuando son ingeridos a través de alimentos o agua contaminados<sup>6</sup>.

La detección de la calidad de los alimentos está relacionada con las bacterias indicadoras, aunque no todas las bacterias indicadoras son causantes de enfermedades, algunas de ellas son responsables de enfermedades transmitidas por los alimentos. Cuanto mayor sea el nivel de bacterias indicadoras, menor será la probabilidad de seguridad alimentaria. La mayoría de las bacterias patógenas se pueden obtener de los desechos de los animales. Enfermedades como (tifoidea, cólera, fiebre, disentería y gastroenteritis) pueden ocurrir debido al consumo de alimentos que contienen algunas bacterias patógenas como (*Vibrio*, *Salmonella* y *Shigella*)<sup>6,26</sup>.

La prueba fehaciente de la contaminación con materia fecal es la presencia algunos patógenos como *E. coli*, estreptococos fecales, *Enterococcus* sp, y coliformes fecales. Las organizaciones alimentarias utilizan experimentos bacteriológicos para estimar la higiene y la calidad de los alimentos y así también se limita el riesgo potencial de enfermedades producidas por patógenos transmitidos por los alimentos<sup>6,26</sup>.

La demanda de métodos de detección rápidos y precisos para estos patógenos en las distintas muestras clínicas sigue siendo alta, dado su impacto continuo en la salud humana y animal. Además, identificar las especies indicadoras más comunes, como *E. coli*, *Enterobacter* sp. y *Enterococcus* sp., es fundamental para la vigilancia, prevención y control de la contaminación de los alimentos. Una técnica de identificación rápida y precisa ayudaría a identificar las fuentes de su propagación a lo largo de la cadena alimentaria. El cultivo, el enriquecimiento selectivo y las pruebas bioquímicas son procedimientos comunes para detectar organismos indicadores, pero son laboriosos, ineficientes, costosos en mano de obra y requieren mucho tiempo<sup>26</sup>.

Las tecnologías avanzadas basadas en ADN, son pruebas basadas en ensayos y además son rápidas y sensibles. Debido a que dependen de la composición de ácidos nucleicos de las bacterias en lugar de sus expresiones fenotípicas, que pueden variar en condiciones de cultivo, esas técnicas podrían usarse para identificar organismos indicadores en todo el mundo. La PCR es un proceso más rápido con precisión diagnóstica. para la detección y caracterización de organismos indicadores específicos de diversas matrices alimentarias como detección individual (PCR monoplex) y (PCR multiplex) <sup>6</sup>.

### **Metodologías para caracterización molecular de *Enterococcus*. en los alimentos**

Las técnicas de tipificación bacteriana son utilizadas para discriminar entre cepas bacterianas, sirviendo como herramienta importante para la investigación de brotes,

vigilancia y estudios filogenéticos. Los primeros estudios de tipificación bacteriana se llevaron a cabo por medio del uso de pruebas bioquímicas, pero con la llegada de la biología molecular, los métodos de tipificación basados en DNA ganaron popularidad, ya que debido a la naturaleza estable del DNA estas técnicas son más reproducibles y generalmente más rápidas y menos laboriosas <sup>5</sup>.

Los avances recientes en las tecnologías de secuenciación de ADN y ARN pueden impulsar el campo hacia enfoques de metacodificación, donde se pueden detectar y cuantificar múltiples objetivos simultáneamente. Actualmente, la codificación de metabarras es más aplicable a las evaluaciones de bacterias y protozoos que a las evaluaciones virales basadas en la falta de marcadores de codificación de metabarras universales para virus. Las tecnologías innovadoras, como los biosensores y las nanotecnologías, pueden proporcionar herramientas más sensibles y precisas para detectar y cuantificar patógenos<sup>24</sup>.

Cuando un patógeno específico es motivo de preocupación para un cuerpo de agua recreativa, un enfoque práctico para estimar la probabilidad de resultados para la salud humana es la aplicación de evaluaciones cuantitativas de riesgos microbianos (QMRA). Los avances tecnológicos en secuenciación de ADN y ARN, biosensores y nanotecnología pueden ayudar en el futuro a caracterizar y monitorear patógenos en sistemas acuáticos <sup>24</sup>.

Se han utilizado diferentes indicadores, como marcadores de seguimiento de fuentes microbianas (MST) específicos de la fuente e indicadores fecales virales, como posibles sustitutos para aproximarse mejor a la abundancia de patógenos y los riesgos para la salud humana en aguas recreativas. El desempeño de estos indicadores alternativos ha sido mixto, con cierta promesa de que los indicadores virales se aproximan mejor a los patógenos virales que los indicadores fecales bacterianos, y la FIB generalmente se asocia más estrechamente con la presencia de patógenos bacterianos y protozoarios que los marcadores humanos de MST <sup>24</sup>.

Las especies de enterococos detectadas con mayor frecuencia en muestras clínicas y de alimentos de mayor importancia para la salud humana son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Ambas especies causan una variedad de infecciones en pacientes inmunocomprometidos. La transmisión de enterococos a través de los alimentos puede afectar a una mayor parte de la población a través del consumo y manipulación de carne de ave contaminada y otros alimentos que pueden sufrir contaminación cruzada en la cocina <sup>27</sup>.

### **Electroforesis en Gel en Campo Pulsado (PFGE) en alimentos**

Esta técnica ha demostrado ser una técnica con un elevado poder discriminatorio, muy útil en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos. Esta técnica permite detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, identificar la fuente de infección y reconocer y diferenciar cepas particularmente virulentas de otras. Mediante el análisis de los perfiles de PFGE se pueden determinar las similitudes genéticas entre los aislados, lo que permite dilucidar si dos aislados aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia

evolutiva aportando una información de gran utilidad para la identificación de reservorios en la cadena alimentaria y su implicación en la Salud Pública<sup>5</sup>.

Las técnicas para la detección de muchas cepas bacterianas patógenas aún no están disponibles; a veces se necesitan días o semanas para obtener los resultados. Para superar las dificultades, se requieren técnicas costosas y que requieren mucho tiempo para detectar, contar e identificar la presencia de una cepa bacteriana específica<sup>1</sup>.

### **Evaluación cuantitativa de riesgos microbianos**

El término evaluación cuantitativa de riesgos microbianos (QMRA) se refiere a un marco y proceso de análisis de riesgos para definir los tipos de peligro microbiano que es probable que se encuentren en una situación determinada y la magnitud del daño probable (riesgo), la misma se ha aplicado cada vez más a las estimaciones de peligros para la calidad del agua recreativa, y con frecuencia se emplean *Enterococos* en estos modelos. Las mediciones de los niveles de estos, mediante métodos de cultivo probablemente subestimen el riesgo de gastroenteritis causada por las bacterias entéricas en aguas donde la contaminación proviene de fuentes mixtas<sup>19</sup>.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### Tipo de investigación

La presente investigación “*Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos”, fue una investigación de revisión bibliográfica caracterizada por tener un:

- **Nivel:** descriptivo porque se realizó una recopilación y análisis de la información a partir de diferentes bases de datos científicos.
- **Diseño:** documental y no experimental pues el trabajo se enfocó en la búsqueda, análisis e interpretación de los datos e información obtenida a partir de la bibliografía revisada sin necesidad de manipulación de variables.
- **Secuencia temporal:** es transversal ya que se realizó en un bloque único de resultados y en un periodo de tiempo determinado de los años 2013 al 2023 (10 años)
- **Según la cronología de los hechos:** fue retrospectivo a partir de las publicaciones en diferentes bases de datos bibliográficos sobre el tema estudiado.

#### Técnica y procedimiento

Técnica: se utilizó la observación

Procedimiento: Se revisaron diferentes bases de datos bibliográficos con reconocido prestigio internacionalmente, para la recolección y tratamiento de la información descriptivamente.

#### Población

La población de esta investigación quedó constituida por 85 artículos que abordaban la temática relacionada con el *Enterococcus* como indicador de contaminación del agua y los alimentos. Además, de que fueron publicadas en bases de datos bibliográficas como PubMed (14), MDPI (14), Elsevier (4), Springer (4), Scielo (10), Medigraphyc (4), Redalyc (7), Science Direct (5) y ProQuest y repositorios (23).

#### Muestra

La muestra quedó conformada por las revisiones bibliográficas de 30 artículos relacionados con el de *Enterococcus* como indicador de contaminación del agua y los alimentos, con una vigencia entre 5 a 10 años que se encuentran disponibles en la base de datos de: Redalyc (2), Springer (4), Elsevier (4), Scielo (8), Science Direct (4), Pubmed (1), Medigraphyc (2), MDPI (3) y Repositorios Google académico (2).

#### Criterios de inclusión y exclusión:

##### Criterios de inclusión:

- Estudios científicos realizados entre el año 2013 al 2023.

- Investigaciones con hallazgos específicos que evidencien la utilidad del *Enterococcus* como indicador de contaminación del agua y los alimentos.
- Que estuvieran en idioma español e inglés.
- Estudios publicados en las bases de datos como PubMed, Scopus, Elsevier, Springer, Scielo, Web of Science, Science Direct, Medigraphyc, Lilacs, Latindex, Britannica Academic, Redalyc, ProQuest y repositorios.
- Información relacionada al *Enterococcus* como indicador de contaminación del agua y los alimentos.
- Artículos científicos que investigaran al *Enterococcus* como indicador de contaminación del agua y los alimentos.

#### **Criterios de exclusión:**

- Artículos que tienen más de 10 años de antigüedad.
- Resúmenes de investigaciones experimentales sin accesibilidad a publicaciones completas.
- Artículos científicos que no aportaron a la temática investigada.
- Estudios experimentales sin hallazgos conclusivos.

#### **Método de estudio**

Se realizó un análisis y síntesis de los artículos científicos, libros, manuales, sitios web de diferentes organizaciones internacionales que estuvieron relacionados con la temática de investigación aplicando el método teórico.

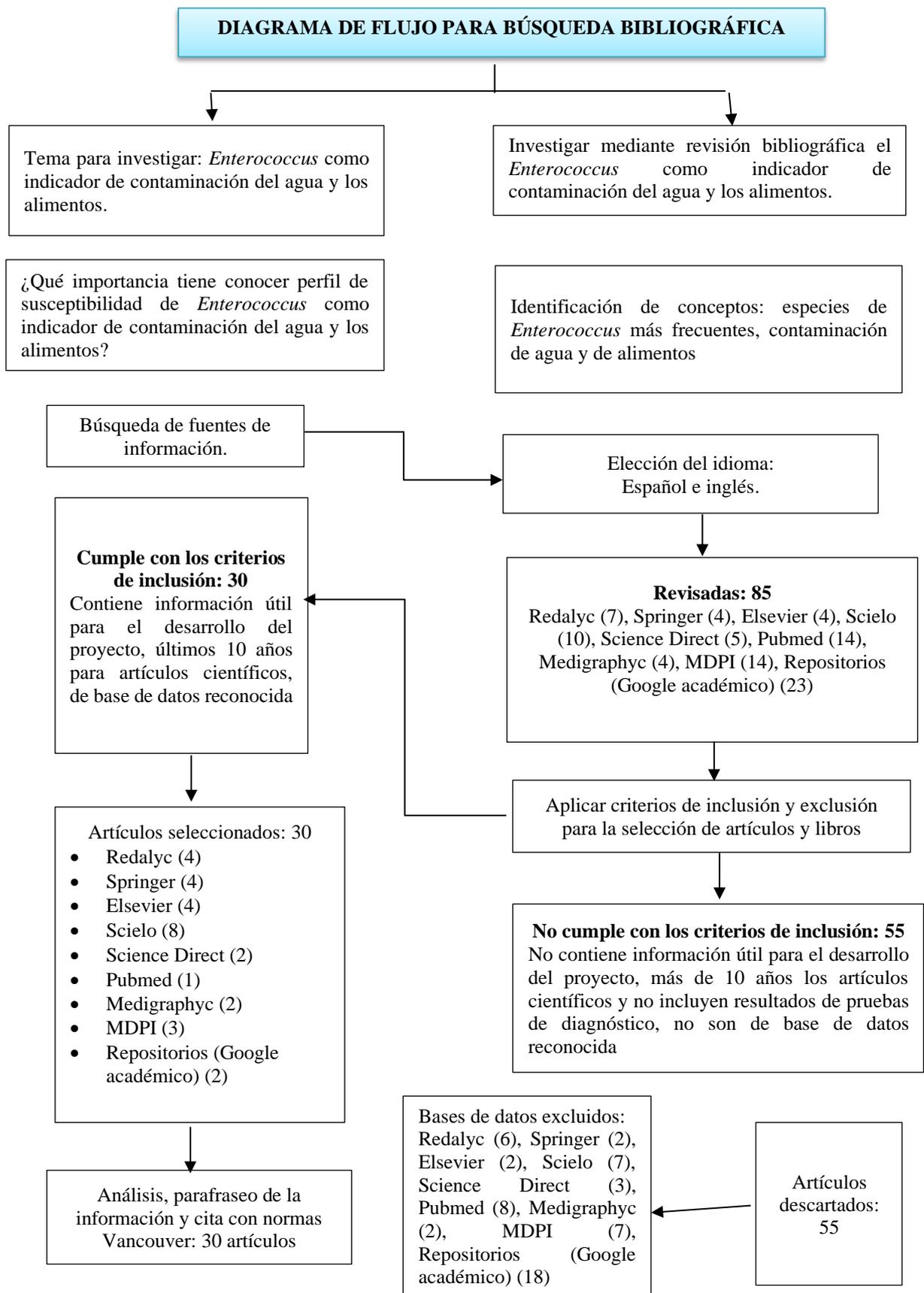
#### **Procesamiento Estadístico**

Fue realizado mediante el análisis de los contenidos e interpretando los resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica con la triangulación de la información.

#### **Consideraciones Éticas**

Al ser la muestra de origen no biológico no existieron conflictos bioéticos, respetando las normas éticas de la investigación científica y los resultados fueron empleados con fines no maleficentes.

La búsqueda bibliográfica se realizó según el algoritmo siguiente:



Los artículos seleccionados según el algoritmo se observan en el Anexo 5.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la presentación de los resultados se realizó la revisión bibliográfica de 85 artículos científicos preseleccionados de la base de datos descartándose 55 de los mismos, por el tipo de publicación, la falta de información útil, presentar resúmenes cortos que describen de forma general las variables. La muestra quedó establecida por 30 artículos revisados y analizados durante la investigación.

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos luego de la revisión y análisis de los artículos científicos referentes a la temática, lo cual se describe en tres acápite como:

- Especies aisladas de *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos.
- Métodos de laboratorio utilizados en la determinación de *Enterococcus* como indicador de contaminación del agua.
- Métodos de diagnóstico empleados en el aislamiento de *Enterococcus* como indicador de contaminación de alimentos.

En la tabla 1 se observan los resultados de las especies más aisladas de *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos.

**Tabla 1.** Especies aisladas de *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua y alimentos.

N°	Autor y Año	Población			Tipo de estudio	Muestra	Resultados
		N° población	Alimentos	Agua			
1.	Bick et al <sup>28</sup> .	58 muestras	41	17	Estudio exploratorio transversal.	Gachas de harina de maíz hervidas, verduras cocidas, ensalada, huevo frito y carne/pescado.	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>Enterococcus</i> spp
2.	Jokinen <sup>31</sup> .	4 muestras	0	4	Estudio experimental	Cuatro canales de riego diferentes en Alberta, Canadá	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
3.	Soares et al <sup>5</sup> .	128 muestras	36	92	Estudio experimental de la calidad del agua	Agua potable de granja ganadera	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecalis</i>
4.	Kim et al <sup>33</sup> .	75 muestras	26	49	Estudio experimental	Muestras lecheras en una granja	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. hirae</i>
5.	Tiwari et al <sup>34</sup> .	230 muestras	139	91	Estudio de análisis microbiano	Agua de baños en Finlandia	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecalis</i>

6.	Gołaś-Prądyńska & Rola <sup>35</sup> .	207 muestras	196	11	Estudio experimental de la calidad de los alimentos	Leche de cabra.	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>Enterococcus spp</i>
7.	Batra et al <sup>2</sup> .	2 muestras	0	2	Ensayo de laboratorio	Se recogieron muestras de aguas residuales de dos plantas municipales de tratamiento de aguas residuales	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
8.	Sanlibaba et al <sup>43</sup> .	122 muestras	97	25	Estudio experimental	Muestras de pollo.	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
9.	Tiwari et al <sup>44</sup> .	341 muestras	120	221	Estudio experimental de la calidad del agua	Muestras de agua de cinco zonas de baño del occidente de Finlandia en épocas de verano	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
10.	Osman et al <sup>6</sup> .	60 muestras	45	15	Estudio experimental de la calidad de alimentos	Queso Romí, Queso mozzarella, Queso triangular, Queso Tallaga, Queso feta.	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>Enterococcus spp.</i>

11.	Holman et al <sup>21</sup> .	128 muestras	119	9	Estudio de análisis microbiano	Se obtuvieron hisopados de las muestras de varios empaques de carne.	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. hirae.</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
12.	Saldanha et al <sup>51</sup> .	3 muestras	3	0	Estudio experimental de la calidad de alimentos	Muestras de Sururu.	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>Enterococcus spp.</i>
13.	Maia et al <sup>52</sup> .	36 muestras	11	25	Estudio experimental	Carne cruda de pollo, carne cruda de cerdo, productos procesados a base de carne de cerdo, productos cárnicos de pollo	<b>Microorganismos aislados:</b> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. hirae</i>

Los estudios realizados en agua, Tiwari et al.<sup>34</sup> encontró contaminación por *E. faecalis*, al igual que Soares y cols.<sup>5</sup>, indicando una mala calidad del agua. Por otro lado Kim et al.<sup>33</sup> y Holman et al.<sup>21</sup>, también obtuvieron *E. faecalis* y *E. faecium* en agua y alimentos, indicando que estos estaban contaminados.

Jokinen<sup>31</sup> y Osman et al.<sup>6</sup> mencionan que las concentraciones de *Enterococcus* fueron significativamente más altas en productos agrícolas cosechados agua de riego, que planteo que las cargas microbianas más altas se detectaron generalmente en el agua del río que sirve como regadío, pero además se conoce que estos pueden estar contaminados por aguas residuales, fecalismo al aire libre de humanos y de animales que puedan pastar en sus orillas.

Sin embargo, Sanlibaba y cols.<sup>43</sup> mencionan que existen más *E. faecium* que *E. faecalis* en muestras de pollos, deduciendo que estos no son procesados correctamente con una higiene adecuada. De igual forma Batra et al.<sup>2</sup> encontraron los mismos microorganismos, pero en contenedores de polipropileno estériles de tratamiento de aguas residuales municipales lo cual indica que estas plantas residuales no eliminan a esta bacteria y por ende se mantiene la contaminación fecal.

Saldanha et al.<sup>51</sup>. Nos menciona que las aguas de ríos, lagos y vertientes son contaminadas con *Enterococcus* contaminando a los alimentos como crustáceos que estas son recolectadas para la venta y el consumo humano mientras que Maia et al.<sup>52</sup>. Menciona que los *Enterococcus* son relativamente abundantes y resistentes a las adversidades ambientales las cuales son resistentes a los antimicrobianos de la calidad higiénica por este motivo se realizan estudios constantes para la determinación y eliminación de este microorganismo

Por otro lado, Gołaś et al.<sup>35</sup> obtuvo *E. faecalis* y *E. faecium* en agua y alimentos, también. Mientras que Tiwari et al.<sup>44</sup>, describe de manera particular el método ISO 7899-2 que es selectivo y eficiente para la enumeración de enterococos intestinales tanto en agua como en alimentos, puede considerarse un método fiable para el recuento de esta bacteria.

Las investigaciones han demostrado que *E. faecalis* suele ser la especie más frecuente de este género en agua, pero también de muestras clínicas en humanos. Cuando el *Enterococcus* es aislado en la microbiología sanitaria se traduce como indicador de contaminación fecal.

En la tabla 2 se describen los métodos de laboratorio utilizados en la determinación de *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua según la literatura consultada.

**Tabla 2.** Métodos de laboratorio utilizados en la determinación de *Enterococcus* como indicador de contaminación de agua

N°	Autor y Año	Población y resultados			Tipo de estudio	Muestra utilizada	Métodos utilizados
		N° población	Muestra Contaminada	Muestra no contaminada			
1.	Adkins et al <sup>36</sup> .	50 muestras	25	25	Estudio experimental	Brotos de alfalfa y agua de laguna	Detección analítica colorimétrica y electroquímica.
2.	Ademan et al <sup>3</sup> .	90 muestras	80	10	Estudio transversal, observacional y analítico	Bebedero utilizado por los estudiantes y grifo de la cocina.	Métodos microbiológicos convencionales
3.	McKee y Cruz <sup>24</sup> .	5 muestras	5	0	Revisión bibliográfica	Contaminación de aguas residuales, agua dulce, agua recreativa, agua ambiental.	PCR Secuencias de ácido nucleico
4.	Adeniji et al <sup>38</sup> .	67 muestras	42	25	Estudio experimental de monitoreo de la calidad del agua	Agua de playa, agua de canal, agua de piscina se recolecto en botellas estériles de 1 L cada uno mensualmente.	Técnica de filtración por membrana PCR
5.	Batra et al <sup>2</sup> .	2 muestras	2	0	Ensayo de laboratorio	Se recogieron muestras de aguas residuales de dos plantas municipales de tratamiento.	Amplificación de polimerasa recombinasa (RPA). Ensayo de flujo lateral (LFA).

							Lector de tiras de flujo lateral (RPA).
6.	Herrig et al <sup>39</sup> .	67 muestras	59	8	Estudio experimental de monitoreo de la calidad del agua	Agua fluvial	Métodos de filtración con membrana en filtros de ésteres de celulosa mixtos.
7.	Saingam et al <sup>42</sup> .	122 muestras	77	45	Estudio experimental	Agua y sedimentos de cinco sitios del canal Ala Wai	Técnica de filtración por membrana PCR
8.	Diaz et al <sup>4</sup> .	597 muestras	492	105	Estudio experimental	Agua industrial. Agua potable. Aguas recreacionales.	Técnica de FM utilizando el medio cromogénico alternativo m-CromoCen ENT
9.	Amanda et al <sup>46</sup> .	15 muestras	13	2	Estudio experimental	Aguas de arroyos de la ciudad de posadas, muestras en distintos puntos del río Paraná y arroyos de la ciudad.	Métodos microbiológicos convencionales PCR
10.	Tiwari et al <sup>44</sup> .	341 muestras	231	110	Estudio experimental de la calidad del agua	Agua de cinco zonas de baño del occidente de Finlandia en épocas de verano	Cultivo en medio de Slanetz y Bartley y aplicando método ISO 7899-2

En la tabla 2, encontramos en aguas no contaminadas de diferente punto geográfico. Se describen los métodos de diagnósticos usados en las diferentes investigaciones, según la bibliografía consultada, aunque difieren entre sí, pero sobresale la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Según Adkins et al.<sup>36</sup>, usaron plataformas de detección analítica colorimétrica y electroquímica mediante dispositivos analíticos basados en papel impreso y transparencias, presentándolos como métodos complementarios para la detección de bacterias transmitidas por alimentos y agua como el género enterococo y de ellos aislaron cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* dentro de las 4-8 h posteriores al enriquecimiento previo.

En cambio, Waideman y cols.<sup>3</sup>, utilizaron en su estudio los análisis de: dosificación de cloro libre; recuentos de colonias de bacterias heterótrofas y determinación de *Enterococcus* para conocer la calidad del agua. McKee y cols.<sup>24</sup> y Saingam et al.<sup>42</sup>, aplicaron pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa múltiple avanzada (PCR), para detectar y cuantificar indicadores fecales y patógenos.

Adeniji et al.<sup>38</sup>, desarrolló un proceso complejo en la cual las muestras de agua se sometieron a diluciones en serie de 10 veces, después de lo cual se filtraron alícuotas de 100 ml de cada dilución, utilizando filtros de membrana de nitrocelulosa siguiendo la técnica de filtración por membrana para el aislamiento y recuento de coliformes fecales y para la identificación confirmativa por PCR de enterococos usó cebadores específicos de género dirigidos al *gen tuf*.

Diaz et al.<sup>4</sup>, desarrollo dos metodologías la cual evalúa la sensibilidad y especificidad la cual al cabo de 24 horas se obtuvo una eficiencia y exactitud similar siendo una concordancia casi perfecta. Amanda et al.<sup>46</sup>, concluye que realizo métodos tradicionales detectando *Enterococcus faecalis* seguido por los *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans* las cuales son perjudicante para las familias que habitan en los alrededores.

Batra et al.<sup>2</sup> en sus hallazgos planteó la necesidad de un sistema de detección de *E. faecalis* simple, rápido y de bajo costo, a través del ensayo de amplificación de ADN. Herrig y cols.<sup>39</sup>, en su estudio, concluye que en general los organismos indicadores fecales como *E. coli*, enterococos y colifagos son importantes para la evaluación, monitoreo y predicción de la calidad microbiana del agua y los alimentos

Mientras que Tiwari et al.<sup>44</sup>, describe de manera particular el método ISO 7899-2 que es selectivo y eficiente para la enumeración de enterococos intestinales, puede considerarse un método fiable para el recuento de enterococos intestinales.

Los métodos de laboratorio se adaptan a los objetivos y tipos de muestras, para determinar los indicadores de evaluación. Estos ajustados a las recomendaciones de los organismos internacionales y las normas de evaluación de la calidad del agua, se ha convertido, en la actualidad, en un punto crítico para determinar la contaminación de los recursos hídricos.

En el análisis bibliográfico ha quedado demostrado que estos métodos diagnósticos han sido eficientes para cuando se requiere investigar el aislamiento de enterococos. Las normas ISO-7899-1 son adaptable a la evaluación de la calidad del agua, pero la mayoría de los autores prefieren estudios convencionales para obtener evidencias específicas.

En la tabla 3 se describen los métodos de laboratorio utilizados en la determinación de *Enterococcus* como indicador de contaminación de alimentos según la literatura consultada.

**Tabla 3.** Métodos de diagnósticos empleados en el aislamiento de *Enterococcus* como indicador de contaminación de alimentos

N°	Autor y Año	Población y resultados			Tipo de estudio	Muestra utilizada	Métodos utilizados
		Población estudiada	Contaminados	No contaminados			
1.	Mansour et al <sup>22</sup> .	300 muestras	36	264	Estudio experimental	Carne obtenida directamente de camal	Métodos microbiológicos convencionales PCR Caldo de infusión cerebro corazón Pruebas bioquímicas Agar Bilis Esculina Azida (BEA) Agar Müller Hinton
2.	Sanlibaba et al <sup>43</sup> .	122 muestras	97	25	Estudio experimental	Pollo	Métodos microbiológicos convencionales y moleculares. Caldo de soja trípico (TSB) Caldo de infusión de cerebro (BHI) Agar Triptona – Soja (TSA)
3.	Holman et al <sup>21</sup> .	300 muestras	206	94	Estudio de análisis microbiano	Se obtuvieron hisopos o muestras empaque de carne de res	Métodos microbiológicos convencionales. PCR. Caldo de infusión de cerebro (BHI) Agar Enterococcosel
4.	Osman et al <sup>6</sup> .	60 muestras	10	50	Estudio experimental de la calidad de alimentos	Queso Romi. queso mozzarella, queso triangular, queso Tallaga, queso feta.	Métodos microbiológicos convencionales PCR

5.	Gołaś-Prączyńska & Rola <sup>35</sup> .	207 muestras	196	11	Estudio experimental de la calidad de los alimentos	Leche de cabra.	Agar Slanetz y Bartley.
6.	Marguet et al <sup>45</sup> .	10 muestras	8	2	Estudio experimental	Quesos ovinos semiduros	Métodos microbiológicos convencionales PCR Caldo púrpura de bromocresol-azida Agar de Man Rogosa Sharpe Coloración de Gram Pruebas bioquímicas
7.	Jung & Koo <sup>27</sup> .	124 muestras	36	88	Estudio experimental	Carne de cerdo picada o sazonados con salsa de soya y productos cárnicos de cerdo procesados congelados tipo albóndiga	Normas ISO-7899-1 Métodos microbiológicos convencionales PCR Agar Bilis Esculina Azida (BEA) Agar Triptona – Soja (TSA) Pruebas bioquímicas
8.	Cabrera et al <sup>47</sup> .	97 muestras	76	21	Estudio experimental	Alimentos lácteos y cárnicos	PCR Caldo Soja Trypticaseína (TSB) Caldo de infusión cerebro corazón Agar Müller Hinton
9.	Quillama et al <sup>48</sup> .	14 muestras	8	6	Estudio experimental	Quesos artesanales	Pruebas bioquímicas Agar Bilis Esculina Azida (BEA)

							Agar Müller Hinton
10.	Delpecha et al <sup>49</sup> .	56 muestras	46	10	Estudio experimental	Queso de oveja	Métodos microbiológicos convencionales y moleculares. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Pruebas bioquímicas Coloración Gram Agar Müller Hinton
11.	Porto et al <sup>50</sup> .	100 muestras	96	4	Estudio experimental	Quesos Artesanales	Caldo púrpura de bromocresol-azida Agar de Man Rogosa Sharpe Pruebas bioquímicas Agar Müller Hinton

En la tabla 3 se realizó una descripción de los métodos de diagnósticos empleados en el aislamiento de *Enterococcus* como indicador de contaminación de alimentos. Mansour y cols.<sup>22</sup>, consideran que en la búsqueda de microorganismos indicadores de contaminación fecal bacteriana, los métodos microbiológicos convencionales y moleculares, mostraron mayor efectividad que aquellos de carácter viral

Por otro lado, Sanlibaba et al.<sup>43</sup>, para buscar contaminación por enterococos utilizaron métodos fenotípicos y moleculares. Mientras que Osman et al.<sup>6</sup> y Holman y cols.<sup>21</sup> utilizaron métodos microbiológicos convencionales y moleculares como el PCR.

Gołaś-Prądyńska & Rola<sup>35</sup>, utilizaron medios selectivos tradicionales como cultivo y antibiograma lo cual con ayuda de los genes de resistencia por el método de PCR se confirmó la presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* mientras que Marguet et al.<sup>45</sup> y Delpecha et al.<sup>49</sup>, realizaron métodos convencionales utilizando la PCR para detectar la presencia del gen *agg* la cual determinó la presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* siendo estas especies las más aisladas en el nicho ecológico.

Cabrera et al.<sup>47</sup>, concluye que existe una discrepancia en la determinación de las especies de *Enterococcus* ya que las pruebas bioquímicas son de baja confiabilidad y no detecta ciertas especies de *Enterococcus* actualmente existen equipos automatizados que nos permiten identificar este tipo de especies mientras que Quillama et al.<sup>48</sup> y Porto et al.<sup>50</sup>, nos mencionan que las pruebas de sensibilidad antimicrobiana implementando cepas en medio de agar M.R.S. y pruebas bioquímicas nos permite determinar la especie de *Enterococcus* como *E. faecium* y *E. faecalis*.

El estudio de Jung & Koo<sup>27</sup>, detecta niveles de contaminación de *Enterococcus spp.* en productos cárnicos de cerdo procesados, usando la norma ISO 7899-1 como método diagnóstico, pero refieren además que siempre se deben seguir las normas establecidas para llegar a un diagnóstico preciso.

En las investigaciones se recomienda el uso de múltiples volúmenes de muestra para alcanzar un rango de recuento confiable, incluso en casos de recuentos máximos de enterococos. Sin embargo, estos por sí solos llegan a ser insuficientes para evaluar la calidad del agua. Por lo tanto, es necesario identificar la presencia de otros patógenos fecales y de la fuente de contaminantes, para así desarrollar estimaciones del riesgo de infección microbiana, prevenir eventos de contaminación y proteger la salud pública<sup>5</sup>.

Los métodos diagnósticos para la detección de bacterias indicadoras de contaminación de aguas y alimentos se basan en normas internacionales, como es el caso de la Norma ISO-7899 con algunas modificaciones, la cual es recomendable y puede usarse como estándar en los laboratorios para recolección de muestras y su análisis final. Con estos estudios se puede conocer si hay contaminantes bacterianos que pueden afectar negativamente el estado sanitario de los productos alimenticios y el agua, para así brindar mayor seguridad a los consumidores.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES

Los enterococos se encuentran formando parte de la flora bacteriana intestinal de humanos y animales, que en ocasiones se encuentran presentes como contaminantes en aguas y alimentos. En la investigación realizada sobre el tema, en la literatura consultada, la especie de *Enterococcus* aislada con mayor frecuencia fue el *E. faecalis* seguido del *E. faecium* y en menor cuantía *E. durans*, *E. gallinarum* y *E. hirae*.

En el diagnóstico de *Enterococcus* como indicador de contaminación del agua, según la bibliografía revisada, se usaron la Reacción en Cadena de la Polimerasa, métodos microbiológicos convencionales, el número más probable (MPN), plataformas de detección analítica colorimétrica y electroquímica mediante dispositivos analíticos basados en papel impreso y transparencias, dosificación de cloro libre y las normas ISO-7899-1.

Los métodos de diagnósticos empleados en el aislamiento de *Enterococcus* como indicador de contaminación de alimentos, según lo encontrado en bases de datos científicos, fueron métodos microbiológicos convencionales y moleculares, como la amplificación de ADN isotérmico, además de análisis de los colifagos que pueden servir como un indicador alternativo de contaminación fecal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Khan FM. *Escherichia coli* (E. coli) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review. ICSDWE 2020 Environ Sci Eng Springer, Cham [Internet]. 2020;2:1–11. Available from: <https://www.preprints.org/manuscript/201910.0081/v2>
2. Batra AR, Cottam D, Lepesteur M, Dexter C, Zuccala K, Martino C, et al. Development of A Rapid, Low-Cost Portable Detection Assay for Enterococci in Wastewater and Environmental Waters. *Microorganisms* [Internet]. 2023;11(2). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/381>
3. Waideman MA, Teixeira VP, Uemura EH, Stamford TM, Guiguet Leal DA, Stangarlin-Fiori L, et al. Enterococci used as complementary indicator of fecal contamination to assess water quality from public schools in the city of Curitiba, Paraná, Brazil. *Brazilian J Food Technol* [Internet]. 2020;23:1–12. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/343752531\\_Enterococci\\_used\\_as\\_complementary\\_indicator\\_of\\_fecal\\_contamination\\_to\\_assess\\_water\\_quality\\_from\\_public\\_schools\\_in\\_the\\_city\\_of\\_Curitiba\\_Parana\\_Brazil](https://www.researchgate.net/publication/343752531_Enterococci_used_as_complementary_indicator_of_fecal_contamination_to_assess_water_quality_from_public_schools_in_the_city_of_Curitiba_Parana_Brazil)
4. Díaz Pérez M, Zhurbenko R, Rodríguez TL, Pérez DQ, Martínez CR. Determinación cuantitativa de enterococos en aguas utilizando un método cromogénico alternativo. *Rev Cuba Investig Biomédicas* [Internet]. 2014;33(1):1–11. Available from: <http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu>
5. Soares AS, Miranda C, Coelho AC, Trindade H. Occurrence of Coliforms and Enterococcus Species in Drinking Water Samples Obtained from Selected Dairy Cattle Farms in Portugal. *Agric* [Internet]. 2023;13(4):1–10. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/4/885/htm>
6. Osman N, Abou Dohara M, El-Sayed A, Zaky M. Survey of Hygiene Level by Indicator Bacteria in Some Cheese from Port-Said City. *Alfarama J Basic Appl Sci* [Internet]. 2022;3(2):273–82. Available from: [https://journals.ekb.eg/article\\_215463.html](https://journals.ekb.eg/article_215463.html)
7. Haldar K, Kujawa-Roeleveld K, Hofstra N, Datta DK, Rijnaarts H. Microbial contamination in surface water and potential health risks for peri-urban farmers of the Bengal delta. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2022;244(February):114002. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114002>
8. Guzmán BL, Nava G, Díaz P. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2511/2855>. *Biomedica* [Internet]. 2015;35(3):177–90. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2511/2855>
9. Price RG, Wildeboer D. *E. coli* as an Indicator of Contamination and Health Risk in Environmental Waters. In: Samie A, editor. *Escherichia coli* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2017. Available from: <https://doi.org/10.5772/67330>
10. Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. *Microbiología médica*. Octava. Madrid, España: MMVI Elsevier España S.A; 2017.
11. Riedel S, Hobden J, Mille S, Morse S, Mietzner T, Detrick B. *Microbiología médica*. Vigésima o. McGRAW-HILL interamericana editores, S.A. de C.V; 2020. 820 p.
12. Alvarado D, Finocchiaro C. Factores de riesgo influyen en la colonización por *Enterococcus vancomycin* resistente, en el paciente internado en una Unidad de

- Cuidados Intensivos de adultos, en un hospital público de modalidad polivalente en la provincia de Mendoza en el año 2017 [Internet]. Tesina de grado. Universidad Nacional de Cuyo; 2018. Available from: <https://bdigital.uncu.edu.ar/11797>
13. Performance Committe for Clinical Laboratory Standars. In: NCCLS document M100-S13. Villanova, Pensylvania; 2022.
  14. Campo J, Howard B. Streptococci and related organisms. In: Howard B, Keiser J, Smith T, Weissfeld A, Tilton R, editors. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. Segunda ed. Louis: Mosby; 1994. p. 257–69.
  15. Oxoid O.B.I.S. PYR. Oxoid limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG 24 8pw, England, 1999
  16. Ríos-Tobón S, Agudelo-Cadavid RM, Gutiérrez-Builes LA. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev Fac Nac Salud Pública* [Internet]. 2017;35(2):236–47. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>
  17. Huayanay Quevedo CM, Aldoradin Basilio V, Guerra Santa Cruz A. Presencia de *Escherichia coli* en la playa Pucusana, Lima, y su potencial efecto en la salud pública. *Acta Medica Peru*. 2022;39(1):31–9.
  18. Gobierno de Canadá. Guidance on the use of Enterococci bacteria as indicators in Canadian drinking water supplies – Guidance Document for Public Consultation. *Guid Doc Public Consult* [Internet]. 2019; Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/programs/consultation-enterococci-drinking-water/document.html>
  19. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the Environment. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2012;76(4):685–706. Available from: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/membr.00023-12>
  20. García L, Iannacone J. *Pseudomonas aeruginosa* un indicador complementario de la calidad de agua potable: análisis bibliográfico a nivel de Sudamérica. *Biol* [Internet]. 2014;12(1):133–52. Available from: <https://revistas.unfv.edu.pe/rtb/article/view/395>
  21. Holman DB, Klima CL, Gzyl KE, Zaheer R, Service C, Jones TH, et al. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* Spp. Isolated from a Beef Processing Plant and Retail Ground Beef. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2021;9(3):1–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8597637/>
  22. Mansour A, Nossair M, Soliman F, Rabah IM, Saleh N. Detection of *Enterococcus faecalis* as an indicator organism in abattoirs' environment as well as meat. *Matrouh J Vet Med*. 2022;0(0):0–0.
  23. Wang Z, Xiao G, Zhou N, Qi W, Han L, Ruan Y, et al. Comparison of two methods for detection of fecal indicator bacteria used in water quality monitoring of the Three Gorges Reservoir. *J Environ Sci* [Internet]. 2015;38:42–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074215003289>
  24. McKee AM, Cruz MA. Microbial and Viral Indicators of Pathogens and Human Health Risks from Recreational Exposure to Waters Impaired by Fecal Contamination. *J Sustain Water Built Environ* [Internet]. 2021;7(2):1–15. Available from: <https://ascelibrary.org/doi/epdf/10.1061/JSWBAY.0000936>
  25. ISO. ISO 7899-1:1998(en) Water quality — Detection and enumeration of intestinal

- enterococci — Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water. 1998; Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:7899:-1:ed-2:v1:en>
26. Saxena G, Bharagava RN, Kaithwas G, Raj A. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *J Water Health* [Internet]. 2015;13(2):319–39. Available from: <https://iwaponline.com/jwh/article/13/2/319/28316/Microbial-indicators-pathogens-and-methods-for>
  27. Jung H, Koo M. Diversity of *Enterococcus faecium* in Processed Pork Meat Products in Korea. *Foods*. 2020;9(1283):1–14.
  28. Bick S, Perieres L, D’Mello-Guyett L, Baker KK, Brown J, Muneme B, et al. Risk factors for child food contamination in low-income neighbourhoods of Maputo, Mozambique: An exploratory, cross-sectional study. *Matern Child Nutr* [Internet]. 2020;16(4):1–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/mcn.12991>
  29. Ge B, Domesle KJ, Gaines SA, Lam C, Bodeis Jones SM, Yang Q, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of indicator organisms *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Isolated from U.S. animal food, 2005–2011. *Microorganisms*. 2020;8(7):1–14.
  30. Kwong LH, Ercumen A, Pickering AJ, Arsenault JE, Islam M, Parvez SM, et al. Ingestion of Fecal Bacteria along Multiple Pathways by Young Children in Rural Bangladesh Participating in a Cluster-Randomized Trial of Water, Sanitation, and Hygiene Interventions (WASH Benefits). *Environ Sci Technol* [Internet]. 2020;54(21):13828–38. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/acs.est.0c02606>
  31. Jokinen CC, Cook SR, Reuter T, Tymensen L. Assessing enterococci as an alternative fecal indicator for irrigation water quality. *Agric Water Manag* [Internet]. 2020;233:106098. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377419322103>
  32. Solaiman S, Allard SM, Callahan T, Jiang C, Handy E, East C, et al. Longitudinal Assessment of the Dynamics of *Escherichia coli*, Alternative Irrigation Water Sources : a CONSERVE Study. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2020;86(20):1–15. Available from: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aem.00342-20>
  33. Kim S-H, Kim D-H, Lim H-W, Seo K-H. High prevalence of non-faecalis and non-faecium *Enterococcus* spp. in farmstead cheesehouse and their applicability as hygiene indicators. *LWT* [Internet]. 2020;126:109271. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820302590>
  34. Tiwari A, Kauppinen A, Pitkänen T. Decay of *Enterococcus faecalis*, vibrio cholerae and MS2 coliphage in a laboratory mesocosm under brackish beach conditions. *Front Public Heal* [Internet]. 2019;7:1–12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00269/full>
  35. Gołaś-Prądyńska M, Rola JG. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from goat’s milk. *J Vet Res*. 2021;65(3):449–55.
  36. Adkins JA, Boehle K, Friend C, Chamberlain B, Bisha B, Henry CS. Colorimetric

- and Electrochemical Bacteria Detection Using Printed Paper- and Transparency-Based Analytic Devices. *Anal Chem* [Internet]. 2017 Mar 21;89(6):3613–21. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05009>
37. Odonkor ST, Mahami T. *Escherichia coli* as a tool for disease risk assessment of drinking water sources. *Int J Microbiol* [Internet]. 2020;20. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2020/2534130/>
  38. Adeniji OO, Sibanda T, Okoh AI. Molecular detection of antibiotic resistance and virulence gene determinants of *Enterococcus* species isolated from coastal water in the Eastern Cape Province, South Africa. *Int J Environ Stud* [Internet]. 2020;78(2):1–20. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/00207233.2020.1785759?needAccess=true>
  39. Herrig I, Seis W, Fischer H, Regnery J, Manz W, Reifferscheid G, et al. Prediction of fecal indicator organism concentrations in rivers: the shifting role of environmental factors under varying flow conditions. *Environ Sci Eur* [Internet]. 2019;31(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0250-9>
  40. Safaie A, Weiskerger CJ, Nguyen TD, Acrey B, Zepp RG, Molina M, et al. Modeling the Photoinactivation and Transport of Somatic and F+ Coliphages at a Great Lakes Beach. *J Environ Qual* [Internet]. 2020;49(6):1612–1623. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7859910/>
  41. Wu Z, Greaves J, Arp L, Stone D, Bibby K. Comparative fate of CrAssphage with culturable and molecular fecal pollution indicators during activated sludge wastewater treatment. *Environ Int* [Internet]. 2020;136:105452. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412019336943>
  42. Saingam P, Li B, Yan T. Fecal indicator bacteria, direct pathogen detection, and microbial community analysis provide different microbiological water quality assessment of a tropical urban marine estuary. *Water Res* [Internet]. 2020;185. Available from: <https://par.nsf.gov/servlets/purl/10197952>
  43. Sanlibaba P, Tezel BU, Senturk E. Antimicrobial resistance of enterococcus species isolated from chicken in Turkey. *Korean J Food Sci Anim Resour* [Internet]. 2018;38(2):391–402. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5960835/>
  44. Tiwari A, Hokajärvi AM, Santo Domingo JW, Kauppinen A, Elk M, Ryu H, et al. Categorical performance characteristics of method ISO 7899-2 and indicator value of intestinal enterococci for bathing water quality monitoring. *J Water Health* [Internet]. 2018;16(5):711–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6698379/>
  45. Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2024 Jan 29];42(4):543–8. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572008000400005#:~:text=Los%20enterococos%20son%20utilizados%20en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000400005#:~:text=Los%20enterococos%20son%20utilizados%20en)
  46. Pucciarelli AB, Tessari A, von Specht MH. *Enterococcus* en aguas del arroyo Vicario: recuento, identificación y perfil de sensibilidad. *Revista de Ciencia y Tecnología*

- [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2023 Aug 12];2(21):20–6. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872014000100004](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872014000100004)
47. Cabrera AS, Parada R, Marguet E, Vallejo M. Factores de virulencia, resistencia a los antimicrobianos y a metales pesados en *Enterococcus* spp. aislados de alimentos de origen animal. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* [Internet]. 2021;55(2):127–35. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/535/53567968002/html/>
  48. Polo EQ, Pio LC, Navarro GG. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Enterococcus* CON POTENCIALIDAD ANTIMICROBIANA AISLADAS DE QUESOS DE ELABORACIÓN ARTESANAL. *Ecología Aplicada* [Internet]. 2020;19(1):25–34. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/341/34164093005/html/>
  49. Delpech G, Sparo M, Pourcel G, Schell C, De Luca MM, Basualdo JÁ. *Enterococcus* spp. aislados de queso de oveja: resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2024 Jan 29];33(2):129–33. Available from: [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562013000200008](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000200008)
  50. Porto BC, Fujimoto G, Borges M de F, Bruno LM, Carvalho JDG. Determinants of virulence in *Enterococcus* endogenous to artisanal cheese. *REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA*. 2016;47(1).
  51. Saldanha GKMS, Gomes KS, Silva RML, Lima RP, Soares ACB, Soares V da S. Coliformes e *Enterococcus* sp. em carne de Sururu (*Mytella* sp.) comercializada em Feiras de São Luís - MA / Coliforms and *Enterococcus* sp. in meat of Sururu (*Mytella* sp.) marketing Feiras de São Luís - MA. *Brazilian Journal of Development*. 2022 Jun 17;8(6):46760–79.
  52. Maia LF, Giraldo C, Terra MR, Furlaneto MC. Vancomycin and tetracycline-resistant enterococci from raw and processed meats: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *Ciência Animal Brasileira*. 2020;21(3).

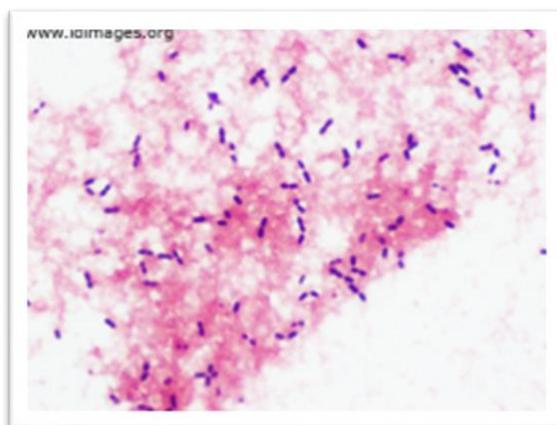
## ANEXOS

### Anexo 1: Especies de Enterococcus

<b>Familia:</b> <i>Streptococcaceae</i>		
<b>Género:</b> <i>Enterococcus</i>		
<b>Especies:</b>		
<i>E. faecium</i>	<i>E. solitarius</i>	<i>E. columbae</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. raffinosus</i>
<i>E. durans</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. mundtii</i>
<i>E. dispar</i>	<i>E. sulfureus</i>	<i>E. casseliflavus</i>
<i>E. avium</i>	<i>E. moladoratus</i>	<i>E. pseudoavium</i>
<i>E. hirae</i>	<i>E. seriolicida</i>	<i>E. saccharolyticus</i>

Fuente: Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. Microbiología médica. 5a. ed. Madrid. España: MMVI Elsevier España S.A; 2007.

### Anexo 2: Tinción de Gram: Enterococcus



Fuente: Campo J, Howard B. Streptococci and related organisms. In: Howard B, Keiser J, Smith T, Weissfeld A, Tilton R, editors. Clinical and Pathogenic Microbiology. Segunda ed. Louis: Mosby; 1994. p. 257–69.

### Anexo 3: Agar Bilis Esculina



Fuente: <https://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter12.htm>

#### Anexo 4: Características diferenciales de especies de Enterococcus.

**Cuadro 20.1** Características diferenciales de especies de enterococos

Pruebas de identificación	<i>E. faecium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. pseudotium</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. serotolida</i>	<i>E. solitarius</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. dipyer</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>
Motilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(-)	(-)	-	-
Crecimiento a:																
45°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50°C	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	+	+	(-)	(-)	+	+
Crecimiento en:																
6,5% NaCl	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
0,04% Telurito	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+	+	+	+
0,01% Tetrazolium	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	+	+	+	+
0,1% Leche azul de metileno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	+	+	+	+
Pigmentación Amarilla	-	+	α	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	ND	-	α	ND	-	-	-	α	ND	α	ND	α, β	β	ND	α, β	ND
Producción H <sub>2</sub> S	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amonio a partir de arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hidrólisis de Arginina	-	+	+	+	+	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de Hipurato	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	d	+	+	+	+
Reacción V-P	-	+	+	+	+	+	d	d	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	+
Acido de:																
D-Xilosa	d	+	ND	ND	-	-	-	-	+	-	ND	-	-	-	-	-
L-Ramnosa	+	(+)	ND	ND	-	-	-	-	(+)	-	ND	-	d	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	d	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Rafinosa	+	(+)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Melicitosa	-	-	ND	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Glicerol	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Adonitol	+	d	ND	ND	-	-	ND	+	-	-	ND	-	+	+	+	+
Sorbitol	+	d	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Mantol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Grupo serológico de Lancefield	D	D	ND	(D)	No D	No D	D	Q(D)	D	No D	No D	D	D	D	D	D

*Símbolos:* +, 90% de las cepas son positivas; (+), 80-89% de las cepas son positivas; d, 21-79% de las cepas son positivas; (-), 11-20% de las cepas son positivas; -, 90% de las cepas son negativas α, usualmente α-hemolíticas; (α), α veces α-hemolíticas; β, usualmente β-hemolítica; (β), α veces β-hemolíticas; α,β, puede ser α o β-hemolítica. D, determinado; ND, no determinado; Q(D), grupo G, pero puede reaccionar con grupo D.

Fuente: Bergey, s Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Baltimore. Editorial Williams & Wilkins

**Anexo 5:** Artículos seleccionados según el algoritmo.

N°	Año	Base de datos	Autor	Título en español	Título en inglés
1	2020	Material & child nutrition	Sarah Bick Lauren Perieres Lauren D'mello-Guyett Kelly K. Baker Joe Brown Bacelar Muneme Rassul Nala Robert Dreibelbis Oliver Cumming	Factores de riesgo de contaminación alimentaria infantil en los barrios pobres de maputo (mozambique)	Risk factors for child food contamination in low-incomeneighbourhoods of maputo, mozambique
2	2020	Elsevier	Cassandra C. Jokinen Shaun R. Cook Tim Reuter Lisa Tymensen	Evaluación de los enterococos como indicador fecal alternativo de la calidad del agua de riego	Assessing enterococci as an alternative fecal indicator for irrigation water quality
3	2023	Agriculture	Ana Sofia Soares Carla Miranda Ana Claudia Coelho Henrique Trindade	Presencia de coliformes y enterococos en muestras de agua potable obtenidas en explotaciones de vacuno de leche en Portugal	Occurrence of coliforms and <i>Enterococcus</i> species in drinking water samples obtained from selected dairy cattle farms in Portugal
4	2020	Foods	Hyun jung kim and Minseon koo	Presencia, resistencia a los antimicrobianos y diversidad molecular de <i>Enterococcus faecium</i> en productos cárnicos de cerdo procesados en corea	Occurrence, antimicrobial resistance, and molecular diversity of <i>Enterococcus faecium</i> in processed pork meat products in korea
5	2019	Frontiers in public health	Ananda Tiwari Ari Kauppinen Tarja Pitkänen	Descomposición de <i>Enterococcus faecalis</i> , vibrio cholerae y el colifago	Decay of <i>Enterococcus faecalis</i> , vibrio cholerae and ms2 coliphage in a laboratory mesocosm under brackish beach conditions

				ms2 en un mesocosmos de laboratorio en condiciones de playa salobre	
6	2021	Journal of veterinary research	Marlena Gołaś-Prądyńska Jolanta G. Rola	Presencia y resistencia a los antimicrobianos de enterococos aislados de la leche de cabra	Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from goat's milk
7	2023	Microorganisms	Alka Rani Batra Darren Cottam Muriel Lepesteur Carina Dexter Kelly Zuccala Caroline Martino Leadin Khudur Vivek Daniel Andrew S. Ball Sarvesh Kumar Soni	Desarrollo de un ensayo portátil de detección rápida y económica de enterococos en aguas residuales y ambientales	Development of a rapid, low-cost portable detection assay for enterococci in wastewater and environmental waters
8	2022	Alfarama journal of basic & applied sciences	Nada M. Osman Mohamed Ismail Abou-Dobara Ahmed Kassem El-Sayed Mahmoud M. M. Zaky	Estudio del nivel de higiene por bacterias indicadoras en algunos quesos de la ciudad de port-said	Survey of hygiene level by indicator bacteria in some cheese from port-said city
9	2017	Acs's publications most trusted most cited most read	Jaclyn A. Adkins Katherine Boehle Colin Friend Briana Chamberlain Bledar Bisha Charles S. Henry	Detección colorimétrica y electroquímica de bacterias mediante dispositivos analíticos basados en papel impreso y transparencias	Colorimetric and electrochemical bacteria detection using printed paper- and transparency-based analytic devices

10	2020	Brazilian journal of food technology	Mariana Amabile Waideman Vivian Plaça Teixeira Elisa Hizuru Uemura Tânia Montenegro Stamford Diego Averaldo Guiguet Leal Lize Stangarlin-Fiori Sila Mary Rodrigues Ferreira César Augusto Taconeli Márcia Regina Beux	<i>Enterococcus</i> como indicador complementar de contaminación fecal para avaliar a cualidades da agua de escolar en ciudades de Curitiba, Paraná, Brasil	Enterococci used as complementary indicator of fecal contamination to assess water quality from public schools in the city of Curitiba, Paraná, Brazil
11	2021	State-of-the-art review	Anna M. Mckee Marcella A. Cruz	Indicadores microbianos y virales de patógenos y riesgos para la salud humana derivados de la exposición recreativa a aguas contaminadas por materias fecales	Microbial and viral indicators of pathogens and human health risks from recreational exposure to waters impaired by fecal contamination
12	2021	International journal of environmental studies	O. O. Adenija, B. T. Sibandac and Ai Okoh	Detección molecular de la resistencia a los antibióticos y de los determinantes de los genes de virulencia de especies de <i>Enterococcus</i> aisladas en aguas costeras de la provincia del cabo oriental (sudáfrica)	Molecular detection of antibiotic resistance and virulence gene determinants of <i>Enterococcus</i> species isolated from coastal water in the eastern cape province, south africa
13	2019	Environmental sciences europe	Ilona Herrig Wolfgang Seis	Predicción de las concentraciones de organismos indicadores fecales en los ríos: el papel cambiante de los	Prediction of fecal indicator organism concentrations in rivers: the shifting role of

			Helmut Fischer Julia Regnery Werner Manz Georg Reifferscheid & Simone Böer	factores ambientales en condiciones variables de caudal	environmental factors under varying flow conditions
14	2018	National library of medicine	Ananda Tiwari Anna-Maria Hokajärvi, Jorge W. Santo Domingo Ari Kauppinen Michael Elk Hodon Ryu Balamuralikrishna Jayaprakash Tarja Pitkänen	Características categóricas de funcionamiento del método iso 7899-2 y valor indicador de los enterococos intestinales para el control de la calidad de las aguas de baño	Categorical performance characteristics of method iso 7899-2 and indicator value of intestinal enterococci for bathing water quality monitoring
15	2022	Matrouh journal of veterinary medicine	Alaa, M. Mansour Mohamed, A. Nossair Faten S. Soliman Ibrahim M. Rabah Nehad A. Saleh	Detección de <i>Enterococcus faecalis</i> como organismo indicador en el entorno de los mataderos y en la carne	Detection of <i>Enterococcus faecalis</i> as an indicator organism in abattoirs' environment as well as meat
16	2018	Food science of animal resources	Pınar Sanlibaba Basar Uymaz Tezel Esra Senturk	Resistencia antimicrobiana de las especies de <i>Enterococcus</i> aisladas de pollos en Turquía	Antimicrobial resistance of <i>Enterococcus</i> species isolated from chicken in turkey
17	2021	Microbiol spectr.	Devin B. Holman A Cassidy L. Klima B	Resistencia a los antimicrobianos en <i>Enterococcus</i> spp. Aislados de una planta de procesamiento de carne de	Antimicrobial resistance in <i>Enterococcus</i> spp. Isolated from a beef processing plant and retail ground beef.

			Katherine E. Gzyl, A Rahat Zaheer, B Cara Service, A Tineke H. Jones, A Tim A. Mcallister	vacuno y de carne picada de vacuno al por menor	
18	2020	Foods	Hyun jung kim and Minseon koo	Presencia, resistencia a los antimicrobianos y diversidad molecular de <i>Enterococcus faecium</i> en productos cárnicos de cerdo procesados en corea	Occurrence, antimicrobial resistance, and molecular diversity of <i>Enterococcus faecium</i> in processed pork meat products in korea
19	2014	Scielo	Leisy García José Iannacone	Pseudomonas Aeruginosa un indicador complementario de la calidad de agua potable	Pseudomonas Aeruginosa a complementary indicator of drinking water quality
20	2014	Scielo	Amada B. Pucciarelli, Alberto Tessari, Martha H. von Specht	<i>Enterococcus</i> en aguas del arroyo Vicario: recuento, identificación y perfil de sensibilidad	<i>Enterococcus</i> spp in water Vicario stream: Counts, identification, and sensibility profiles
21	2014	Scielo	Marilyn Díaz Pérez, Raisa Zhurbenko, Tamara Lobaina Rodríguez, Dianelys Quiñones Pérez, Claudio Rodríguez Martínez	Determinación cuantitativa de enterococos en aguas utilizando un método cromogénico alternativo	Quantitative determination of enterococci in water using an alternative chromogenic method
22	2015	Scielo	Emilio Rogelio Marguet, Marisol Vallejo, Nelda Lila Olivera	Factores de virulencia de cepas de <i>Enterococcus</i> aisladas de quesos ovinos	Virulence factors of <i>Enterococcus</i> strains isolated from ovine cheese

23	2014	Scielo	Amada B. Pucciarelli, Alberto Tessari, Martha H. von Specht	<i>Enterococcus</i> en aguas del arroyo Vicario: recuento, identificación y perfil de sensibilidad	<i>Enterococcus spp</i> in water Vicario stream: Counts, identification, and sensibility profiles
24	2020	BAFA	Azul Sánchez Cabrera, Romina Parada, Emilio Marguet	Factores de virulencia, resistencia a los antimicrobianos y a metales pesados en <i>Enterococcus spp.</i> aislados de alimentos de origen animal	Virulence factors, antimicrobials, and heavy metals resistance in <i>Enterococcus spp.</i> isolates from food of animal origin
25	2014	Scielo	Gastón Delpecha, Mónica Sparo, Gisela Pourcel, Celia Schell, María Marta De Luca, Juan Ángel Basualdob	<i>Enterococcus spp.</i> aislados de queso de oveja: resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica	<i>Enterococcus spp.</i> Sheep cheese isolates: resistance to antimicrobials in clinical use
26	2016	Scielo	Bruna Castro Porto Graciela Fujimoto Maria de Fatima Borges	Determinantes de la virulencia en <i>Enterococcus</i> endógenos a quesos artesanales	Determinants of virulence in <i>Enterococcus</i> endogenous to artisanal cheese
27	2022	Google Academica	Gleycy Kelly Moraes Santos Saldanha Karolynne Sousa Gomes Rejeana Márcia Lima Silva	Coliformes y <i>Enterococcus sp.</i> en carne de Sururu ( <i>Mytella sp.</i> ) comercializada en Feiras de São Luís - MA	Coliformes y <i>Enterococcus sp.</i> en carne de Sururu ( <i>Mytella sp.</i> ) comercializada en Feiras de São Luís - MA
28	2019	Scielo	Luciana Furlaneto Maia, Catia Giraldi, Márcia Regina Terra, Márcia Cristina Furlaneto	Enterococos resistentes a la vancomicina y a la tetraciclina procedentes de carnes procesadas: características fenotípicas y genotípicas de los aislados	Vancomycin and tetracycline-resistant enterococci from from raw and processed meats: phenotypic and genotypic characteristics of isolates