



**Determinación de la presencia
de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como grupo trazador de
resistencia a agentes antimicrobianos en porcinos.**

Laura Camila Melo Alfaro

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Carrera de Microbiología Industrial
Bogotá, D.C.
2018**



**Determinación de la presencia
de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como grupo trazador de
resistencia a agentes antimicrobianos en porcinos.**

Laura Camila Melo Alfaro

Dra. Concepción Puerta, PhD
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Dra. Marcela Franco Correa, PhD
Directora de Carrera
Carrera Microbiología Industrial

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Microbiología Industrial
Bogotá D.C
2018



**Determinación de la presencia
de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como grupo trazador de
resistencia a agentes antimicrobianos en porcinos.**

Laura Camila Melo Alfaro

APROBADO

Ana Karina Carrascal Camacho, M. Sc

Directora

Deyci Rocío Rodríguez Cordero, M.Sc

Jurado

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Microbiología Industrial

Bogotá D.C

2018

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23 DE LA RESOLUCIÓN N° 13 DE JULIO DE 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Reglamento de la Pontificia Universidad Javeriana

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre, hermanos y sobrinas por ser siempre un apoyo y motivación para lograr cada uno de mis objetivos.

A Ana Karina Carrascal, por darme la confianza y permitirme realizar este proyecto bajo su dirección, siguiendo sus consejos y lecciones.

A Iliana e Irina por sus consejos, apoyo y disposición.

A mis amigos, por brindarme siempre los mejores consejos y palabras de aliento, especialmente a Juan Sebastián Sandoval por su colaboración y compromiso indispensables en la realización de este proyecto.

A PorkColombia por la financiación de este trabajo.

A la planta de beneficio por permitirnos realizar el muestreo.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN	10
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4. MARCO TEÓRICO.....	13
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos	16
6. METODOLOGÍA.....	17
6.1 Obtención de muestras y pre-enriquecimiento.....	17
6.2 Aislamiento e identificación de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i>	17
6.3 Confirmación de las cepas positivas por medio de PCR Multiplex.	18
6.3.1 Extracción de ADN	18
6.3.2 PCR Múltiplex.....	19
6.3.3 Electroforesis.....	19
6.4 Pruebas de susceptibilidad.	20
7. RESULTADOS.....	21
7.1 Aislamiento de <i>Enterococcus spp.</i>	21
7.2 Identificación de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> por PCR Múltiplex.....	21
7.2 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos	23
8. DISCUSIÓN.....	26
9. CONCLUSIONES	30
10. RECOMENDACIONES.....	30
11. BIBLIOGRAFÍA.....	31
12. ANEXOS.....	36

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Aislamiento de <i>Enterococcus</i> spp. en agar Slanetz & Bartley	19
Figura 2. Electroforesis de PCR Múltiple	20
Figura 3. Porcentaje de resistencia a antibióticos	21
Figura 4. Perfiles de multiresistencia	22

1. RESUMEN

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública a nivel mundial que actualmente mantiene en alerta a organismos como la Organización Mundial de la Salud debido a la limitación de nuevos agentes que puedan ser usados. El incremento de la resistencia a agentes antimicrobianos requiere programas de detección y monitoreo. La resistencia por parte de los microorganismos se ha asociado a la presencia de genes constitutivos en algunas cepas, o de elementos móviles que permiten un intercambio génico, así como la adquisición de mecanismos de resistencia en microorganismos que se encuentren en el mismo entorno. Algunos de los patógenos resistentes pueden vehiculizarse a través de animales destinados al consumo humano, entre ellos el cerdo. La detección e identificación de estos patógenos en carne de cerdo toma relevancia debido al aumento de la producción y consumo de este producto en Colombia durante los últimos años. La presencia de algunos patógenos se puede determinar por medio de microorganismos indicadores que comparten ciertas características y se desarrollan en el mismo entorno como los *Enterococcus*. En este estudio se llevó a cabo un protocolo desarrollado por la Comisión Europea para la detección de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como grupo trazador de resistencia a antibióticos de bacterias Gram positivas. Para el estudio se tomaron 100 muestras de contenido cecal de cerdos, las cuales fueron procesadas y se recuperaron 24 cepas presuntivas como *Enterococcus* spp en agar Slanetz & Bartley. Para identificar si pertenecían a las especies *E. faecalis* o *E. faecium* se realizó una PCR múltiple en la que encontraron 12 cepas con la presencia de una banda de 941bp correspondiente al gen *ddl* específico para la especie *E. faecalis* y ninguna cepa con la presencia de la banda de 550 bp correspondiente a *E. faecium*. Las 12 cepas de *E. faecalis* fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad con antibióticos como Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Daptomicina, Eritromicina, Gentamicina, Linezolid, Tetraciclina y Vancomicina. Se encontró que todas las cepas probadas fueron susceptibles a al menos cinco de los antibióticos probados, con una resistencia del 100% de las cepas a la Vancomicina y a la Tetraciclina. No se observó resistencia al cloranfenicol por parte de ninguna de las cepas analizadas.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, resistencia a antibióticos, genes de resistencia

2. INTRODUCCIÓN

El consumo de carne de cerdo en Colombia se ha duplicado en los últimos siete años. La variación en el uso de estos productos como parte de la cocina diaria de los colombianos ha presentado un aumento de más del 56% en los últimos años [1]. En 2010 el consumo “per cápita” fue de 4,8 kilos por habitante, mientras que en 2017 se alcanzó un consumo de hasta 9,3 kilos por habitante. Debido al crecimiento en este sector y teniendo en cuenta que la producción no solo incluye el mercado local, sino que los productos pueden ser llevados a mercados de exportación, se deben fortalecer algunos puntos en la cadena de producción, entre los cuales es indispensable el monitoreo de resistencia a antibióticos [2].

El monitoreo de resistencia a antibióticos incluye la detección e identificación de microorganismos resistentes a antibióticos para el desarrollo de medidas correctivas ante la presencia de estos. La detección de estos microorganismos cobra importancia debido a que el uso indebido de antibióticos en la crianza de cerdos como promotores de crecimiento y como método de control de bacterias patógenas, ha favorecido el desarrollo de diversos mecanismos de resistencia, convirtiéndose en un problema de salud pública en todo el mundo [3][4]. El aumento de la resistencia a múltiples antibióticos puede resultar en la carencia de antibióticos eficaces para el tratamiento en humanos, por lo que una detección e identificación de estos microorganismos puede proveer la información pertinente para tomar medidas de prevención y control [5]

Los *Enterococcus* son resistentes a diversos agentes antimicrobianos, incluidos los aminoglucósidos, además pueden adquirir genes de resistencia de otras bacterias mediante mecanismos de transformación que incluyen bacteriófagos o conjugación para la integración de plásmidos o transposones en la mayoría de los casos [6], por tanto, este género bacteriano es útil como trazador de resistencia de bacterias patógenas. El protocolo establecido por la Comisión Europea en 2017 describe a *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como grupo trazador de bacterias Gram positivas [7], al estar presentes en las muestras indica que probablemente las bacterias que se encuentran en el mismo ambiente pueden ser portadoras de los genes de resistencia.

En Colombia, se busca implementar el protocolo del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (Resistencia Antimicrobiana) como método de detección en la cadena de producción porcina. Los resultados obtenidos permitirán tener un panorama actual de la situación en una planta de beneficio ubicada en la ciudad de Bogotá y tomar medidas preventivas ante el problema de salud pública que representa la presencia estos microorganismos.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a antibióticos por parte de microorganismos patógenos es un problema de salud pública a nivel mundial, que ha tomado importancia en los últimos años y genera preocupación por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que con el tiempo se han desarrollado nuevos mecanismos de resistencia que representan un riesgo en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas comunes [8]. El desarrollo de resistencia se ha asociado al uso incorrecto de antibióticos como profilaxis o para promoción de crecimiento en granjas destinadas a la crianza de animales [9].

Actualmente se realiza monitoreo de antibióticos en toda la cadena de producción. El protocolo usado en este estudio fue establecido por la Comisión Europea para consolidar los sistemas de control de resistencia antimicrobiana que se llevan a cabo en la actualidad. La legislación denominada “Decisión de ejecución de la comisión sobre el seguimiento, control y notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antimicrobianos”, incluye el control obligatorio de *E. faecium* y *E. faecalis* como grupo trazador de resistencia a antibióticos.

El género *Enterococcus* se han relacionado directamente como donantes de genes de resistencia a la vancomicina de algunas cepas de *Staphylococcus aureus*. Se ha asociado la resistencia a la vancomicina con la aparición y distribución de *Staphylococcus aureus* Meticilin Resistente (SAMR) [10]. Además, la relación entre algunas especies de *Enterococos* y SAMR está dada por algunos genes en común que codifican para enzimas necesarias en el desarrollo de mecanismos de resistencia a antibióticos. Algunas de las enzimas reconocidas en el genoma de género *Enterococcus* son las mismas que en SAMR como las de resistencia a glucopéptidos y aminoglucósidos (aph 37, ant47 y la enzima bifuncional aac67-aph 277) [11].

Actualmente en Colombia no ha sido implementado el protocolo de *E. faecium* y *E. faecalis* como grupo trazador, sin embargo, han sido descritos casos de pacientes con enfermedades producidas por microorganismos Gram positivos patógenos como SAMR con aumentos en los mecanismos de resistencia a antibióticos haciendo inefectivas las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) establecidas para el tratamiento [12].

El monitoreo de resistencia a antibióticos de *E. faecalis* y *E. faecium* es importante debido a que el aumento de la tolerancia a antimicrobianos favorecería la supervivencia de cepas resistentes a antibióticos y aumentaría el riesgo de transferencia de genes que codifican para diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos [13].

4. MARCO TEÓRICO

El cerdo es una de las principales fuentes de proteína en la alimentación diaria, ya que la mayoría de sus partes son comercializadas para el consumo humano en diferentes productos, como embutidos, filetes, tocino y costillas entre otros [14]. En Colombia, el aumento del consumo de carne de cerdo en los últimos años ha posicionado a la industria porcina como uno de los pilares en la economía del país, con movimientos de hasta 4.2 billones de pesos por la comercialización de carne de cerdo en el año 2017 [2].

En la industria porcina es frecuente el uso de antibióticos como tratamiento terapéutico, profilaxis y como promotores de crecimiento ya que se ha demostrado que mejoran la eficiencia en la asimilación de alimento y reducen la mortalidad por enfermedades [3]. El uso generalizado de antibióticos en el sector porcino genera problemas de resistencia por el uso inadecuado como el suministro de concentraciones incorrectas e interrupción del tratamiento, entre otros [15]. Además, estudios previos han descrito los productos alimenticios de origen animal incluyendo al cerdo, como reservorio de microorganismos resistentes a antimicrobianos, lo cual los convierte en una fuente de transferencia de genes de resistencia [6][16].

Debido al crecimiento exponencial de la industria porcina y las prácticas realizadas en la crianza de cerdos, es posible que la presencia de microorganismos patógenos resistentes a antimicrobianos haya aumentado en los últimos años. La detección e identificación de estos patógenos se puede hacer por medio de microorganismos trazadores de resistencia a antimicrobianos. Estos microorganismos son indicadores que se caracterizan por su resistencia a diferentes antibióticos y su detección e identificación permiten obtener información sobre otros microorganismos que se encuentren en el mismo entorno y que posiblemente hayan adquirido resistencia a los mismos antimicrobianos [17].

El monitoreo de resistencia a antimicrobianos permite determinar el riesgo que se puede presentar en una industria de alimentos, en este caso la industria porcina. La OMS y la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) han implementado en las últimas

décadas, programas de vigilancia y control de microorganismos resistentes debido al aumento de dichas resistencias y con este, la reducción de tratamientos efectivos para infecciones comunes que representan una amenaza cada vez mayor para la salud pública a nivel mundial [18][19].

Enterococcus es un género de bacterias Gram positivas que se encuentran naturalmente en el tracto gastrointestinal de animales y humanos, además de estar ampliamente distribuidos en el ambiente (agua, suelos y plantas) [20]. Estas bacterias son ubicuas, por tanto, pueden aislarse y cultivarse fácilmente, por lo cual se hace uso de este género como microorganismos trazadores, específicamente indicador de bacterias Gram positivas patógenas [21].

Naturalmente las bacterias pertenecientes a este género presentan resistencia a una amplia gama de antibióticos usados en la actualidad para el tratamiento de infecciones bacterianas como la vancomicina y la ciprofloxacina [22] [23]. *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies de interés clínico aisladas con mayor frecuencia, estas dos son causantes de infecciones nosocomiales que incluyen bacteremia, infecciones intraabdominales e infecciones del tracto urinario, entre otras [6]. *E. faecium* posee genes constitutivos de resistencia a algunas penicilinas y en los últimos años se ha demostrado un aumento en la resistencia a cefalosporinas, vancomicinas y aminoglicósidos [24], mientras que, en estudios previos realizados por Hidalgo y colaboradores, 2008 se demostró que además de la resistencia reportada previamente a la vancomicina, *E. faecalis* es resistente a algunas fluoroquinolonas como ciprofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacino [23].

La resistencia a antibióticos por parte de las bacterias puede ser constitutiva o adquirida a lo largo del tiempo por medio de mecanismos que incluyen las mutaciones, la transferencia horizontal de genes intra o inter-especie con otras bacterias y la adquisición de elementos con información génica como transposones o plásmidos [25]. En el caso de *Enterococcus*, la resistencia a múltiples antibióticos es intrínseca, por la presencia de genes *van*, *aph* y *pbp5* que le confieren resistencia a la vancomicina, gentamicina y penicilinstapha, respectivamente [26].

En otros casos se ha reportado que la resistencia de algunas especies de *Enterococcus* se deben a mutaciones. La adquisición de resistencia a algunas quinolonas como la ciprofloxacina se ha

asociado a cambios aleatorios en el gen *parC* que desencadenan alteraciones en la enzima girasa aumentando los niveles de resistencia al antibiótico [27].

Los elementos móviles como transposones y plásmidos han sido ligados al desarrollo de resistencia de algunas cepas de enterococos. La baja sensibilidad a oxazolidinonas como el linezolid se encuentra mediada por la presencia de genes transferibles tipo *cfr* [26]. Este gen codifica para una metiltransferasa que además confiere resistencia a la meticilina y algunos fenicoles y ha sido encontrado en cepas aisladas de brotes con SAMR [28].

Aunque comúnmente *Enterococcus spp.* no es patógeno por vía alimentaria, la presencia de este microorganismo en una muestra podría indicar que SAMR también se encuentra en el ambiente debido a su relación por la presencia de genes en común que les confieren resistencia a antibióticos [29]. Estudios han relacionado directamente la resistencia de SAMR a varios antibióticos por la presencia de genes previamente identificados en cepas de *Enterococcus spp* como los *van*, *aph* y *pbp* [11].

Al igual que otros microorganismos resistentes a antibióticos, SAMR es un problema de salud pública [30]. Algunos estudios han determinado su presencia en varias de las etapas de producción de carne de cerdo [31]. Aunque enfermedades producidas por SAMR rara vez se han asociado al consumo de carne de cerdo, este microorganismo es uno de los más reportados comúnmente asociados a brotes por consumo de ciertos alimentos, ya que puede crecer en la superficie del producto y diseminarse por contaminación cruzada [32][33].

En el estudio realizado por Montúfar y colaboradores, se encontró que el tratamiento con vancomicina contra SAMR requirieron CMI más altas a las usadas en tratamientos anteriores. La pérdida de la actividad antibiótica se ha relacionado a la adquisición de genes de resistencia provenientes de otros microorganismos presentes en el ambiente [12].

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar *Enterococcus* como grupo trazador de resistencia a antimicrobianos en muestras de origen porcino.

5.2 Objetivos específicos

Estandarizar una PCR Multiplex para la detección de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

Realizar prueba de susceptibilidad antimicrobiana a las cepas identificadas como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

6. METODOLOGÍA

Este proyecto hace parte del proyecto “Prevalencia de *Salmonella*, perfil de susceptibilidad y factores de riesgo, en granjas porcícolas de 3 regiones de Colombia”. SIAP: Proyecto 000000000007855

6.1 Obtención de muestras y pre-enriquecimiento

Se tomaron muestras aleatoriamente en una planta de beneficio ubicada en la ciudad de Bogotá, Colombia. Se realizaron 5 muestreos para obtener un total 100 muestras de contenido cecal recolectadas en el cuarto de vísceras rojas posterior a la etapa de eviscerado. Las muestras se obtuvieron realizando un corte con un bisturí estéril en la primera porción del intestino grueso, el ciego. Se depositaron aproximadamente 20 g de contenido cecal en bolsas estériles previamente rotuladas. El transporte de las muestras al Laboratorio de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana se realizó en neveras de poliestireno expandido en condiciones de refrigeración.

Las muestras fueron procesadas y analizadas según el protocolo establecido por la Comisión Europea en el 2014 [7]. Para el pre-enriquecimiento se realizó una suspensión de 1g (± 0.1 g) del contenido cecal en 9 mL de Agua Peptonada Bufferada en una bolsa Whirlpack® y se homogenizó en Stomacher durante 10 segundos.

6.2 Aislamiento e identificación de *E. faecium* y *E. faecalis*.

Una vez homogenizado, se tomó una muestra con asa estéril de 10 μ L y se realizó siembra por agotamiento en Agar Slanetz – Bartley. Posteriormente se llevó a incubación a 44°C \pm 0.5 por 48 horas. Además de las muestras analizadas se sembraron las cepas control *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* BM 4147 (ATCC 700221).

Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron tres (3) colonias presuntivas para *E. faecium* y *E. faecalis*, se realizó prueba de catalasa (-) y se aislaron en agar Sangre. Se llevaron a incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 18- 22 horas y luego se revisó el tipo de hemólisis que presentaron. Se realizó tinción de Gram. Las colonias identificadas fueron sembradas en agar Tripticasa de soya (TSA) e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 18-22 horas y se realizó suspensión de una colonia en caldo BHI para extracción de ADN [34].

6.3 Confirmación de las cepas positivas por medio de PCR Multiplex.

6.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de las cepas presuntivas para *E. faecium* y *E. faecalis* se realizó con el Kit Wizard® Genomic DNA Purification.

Se tomaron las cepas previamente crecidas en caldo BHI, se tomó 1 ml del tubo, se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se llevó a centrifugar a 15.000 gravedades por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 480 μL de EDTA 50mM. Se adicionaron 120 μL de lisozima y se llevó a incubar a 37°C por 1 hora, posteriormente se centrifugó a 15.000 gravedades durante 5 minutos y se extrajo el sobrenadante.

Una vez retirado el sobrenadante se adicionaron 600 μL de solución de lisis Nuclei (Ref A7941) y se incubó por 5 minutos a 80°C . Pasado el tiempo de incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 3 μL de RNAsa (4mg/ml). Se mezcló por inversión y nuevamente se incubó a 37°C por 1 hora, dejando enfriar a temperatura ambiente.

Posterior al tiempo de incubación se agregaron 200 μL de la solución de precipitación de proteínas se mezcló por inversión y se pasó a hielo durante 5 minutos. Después del tiempo de refrigeración se centrifugó a 15.000 gravedades por 8 minutos. Para la precipitación de proteínas y rehidratación del ADN se transfirieron 300 μL del sobrenadante a un tubo Eppendorf con 600 μL de isopropanol (1:2) y se mezcló por inversión hasta observar que las hebras de DNA formaron masa visible (20 veces).

Se centrifugó nuevamente a 15.000 gravedades por 6 minutos y luego de esto se retiró el sobrenadante y se dejó secar sobre una toalla de papel a temperatura ambiente aproximadamente de 10 a 15 minutos. Transcurrido el tiempo de secado se adicionaron 600 μL de etanol al 70% y se mezcló por inversión varias veces. Se llevó a centrifugar a 15.000 gravedades por 6 minutos.

Se descartó el sobrenadante de etanol, se dejó secar a temperatura ambiente y se adicionaron 100 μ L solución de Rehidratación de DNA. Se guardó toda la noche a 4°C y posteriormente se almacenó en criocajas a -20°C.

6.3.2 PCR Múltiplex

Control de PCR: Se usó ADN extraído de las cepas control *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* BM 4147 (ATCC 700221).

Los primers utilizados se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Primers para PCR Multiplex [7].

Target gene	Nombre	Secuencia	Tamaño de fragmento
ddl _{E.faecalis}	E1 (1551) Forward	5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3'	941 bp
ddl _{E.faecalis}	E2 (1552) Reverse	5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'	
ddl _{E.faecium}	F1(1553) Forward	5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3'	550 bp
ddl _{E.faecium}	F2(1554) Reverse	5'-CATCGTGTAAAGCTAACTTC-3'	
16S	16Sprimer804RX (442)	5'-GACTACCNGGGTATCTAATCC-3'	800 bp
16S	16Sprimer 10FX (444)	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTNAG-3'	

Para la preparación de primers se usaron 0,25 μ L de cada primer a una concentración de 130mg/mL (10pmol) [7].

La reacción de PCR se llevó a cabo en las condiciones descritas en la Tabla 2

Tabla 2. Condiciones de PCR

	Tiempo	Temperatura
Inicial	5 min	94°C
30 ciclos		
Denaturación	30 seg	94°C
Hibridación	90 seg	50°C
Elongación	60 seg	72°C
-		
Extensión	10 min	72°C
Mantener a		4°C

6.3.3 Electroforesis

La corrida se realizó con un marcador de peso molecular de escala 100 pb en un gel de agarosa 2% en Buffer TBE 1X, con un tiempo de corrida de 110 minutos a 110 V. Se adicionaron 5 μ L

del producto de PCR. Pasado el tiempo de corrida el gel se tiñó en bromuro de etidio alrededor de 20 minutos en agitación constante y posteriormente se observó el gel en un transiluminador bajo luz U.V

6.4 Pruebas de susceptibilidad.

A las cepas seleccionadas como *E. faecium* y *E. faecalis*, se les realizó prueba de susceptibilidad antimicrobiana con base en la tabla de Decisión de ejecución de la comisión UE sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos (2013/652/UE). La prueba se realizó por medio del panel MicroScan ® PC-34, además se realizó una prueba de susceptibilidad a Cloranfenicol mediante test de difusión en agar [26] y los resultados se analizaron por medio de la herramienta WhoNet, software creado por la OMS, para gestionar y estudiar los resultados de pruebas de resistencia a antibióticos realizadas en laboratorios de microbiología.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento de *Enterococcus* spp.

De las 100 muestras procesadas, 24% fueron positivas en el primer aislamiento en agar Slanetz & Bartley. En la *figura 1*, se pueden observar aislamientos característicos de las cepas control de *E. faecalis* y *E. faecium*., en estos se obtuvieron colonias pequeñas, color vino tinto brillante con brillo metálico, características de este género en este medio de cultivo [35].

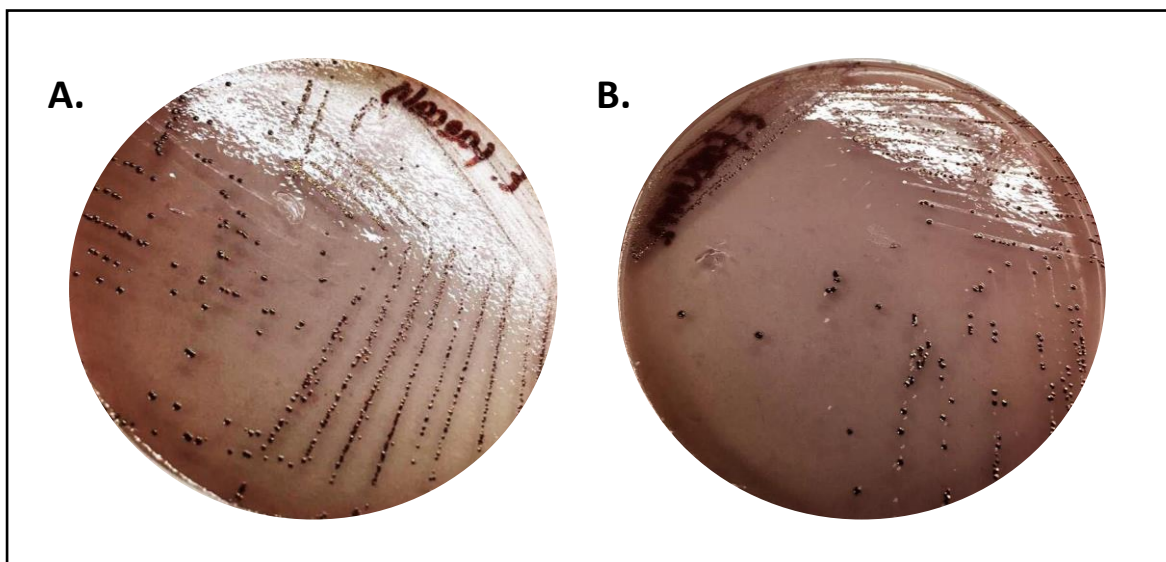


Figura 1. Aislamiento de *Enterococcus* spp. en agar Slanetz & Bartley. **1A.** Colonias aisladas de cepa *E. faecalis* ATCC 29212. **1B.** Colonias aisladas de *E. faecium* ATCC 700221

Las colonias purificadas en agar TSA presentaron ausencia de la enzima catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno. Además, en todos los aislamientos en agar sangre se observó hemólisis de tipo γ .

7.2 Identificación de *E. faecalis* y *E. faecium* por PCR Múltiplex

Las 24 muestras presuntivas obtenidas en el primer aislamiento se confirmaron por PCR Múltiplex. En el 100% de las muestras analizadas se encontró la presencia del fragmento 16S del

genoma de *Enterococcus spp.* que se puede observar en la *figura 2* como una banda de 800pb. Para *E. faecalis* se detectó la presencia del gen *ddl_{E. faecalis}* en 12 de las cepas analizadas, observando un patrón de bandas (una banda de 941 pb para el gen *ddl_{E. faecalis}*) igual a la del control positivo para *E. faecalis* ubicado en el carril 3 de la electroforesis.

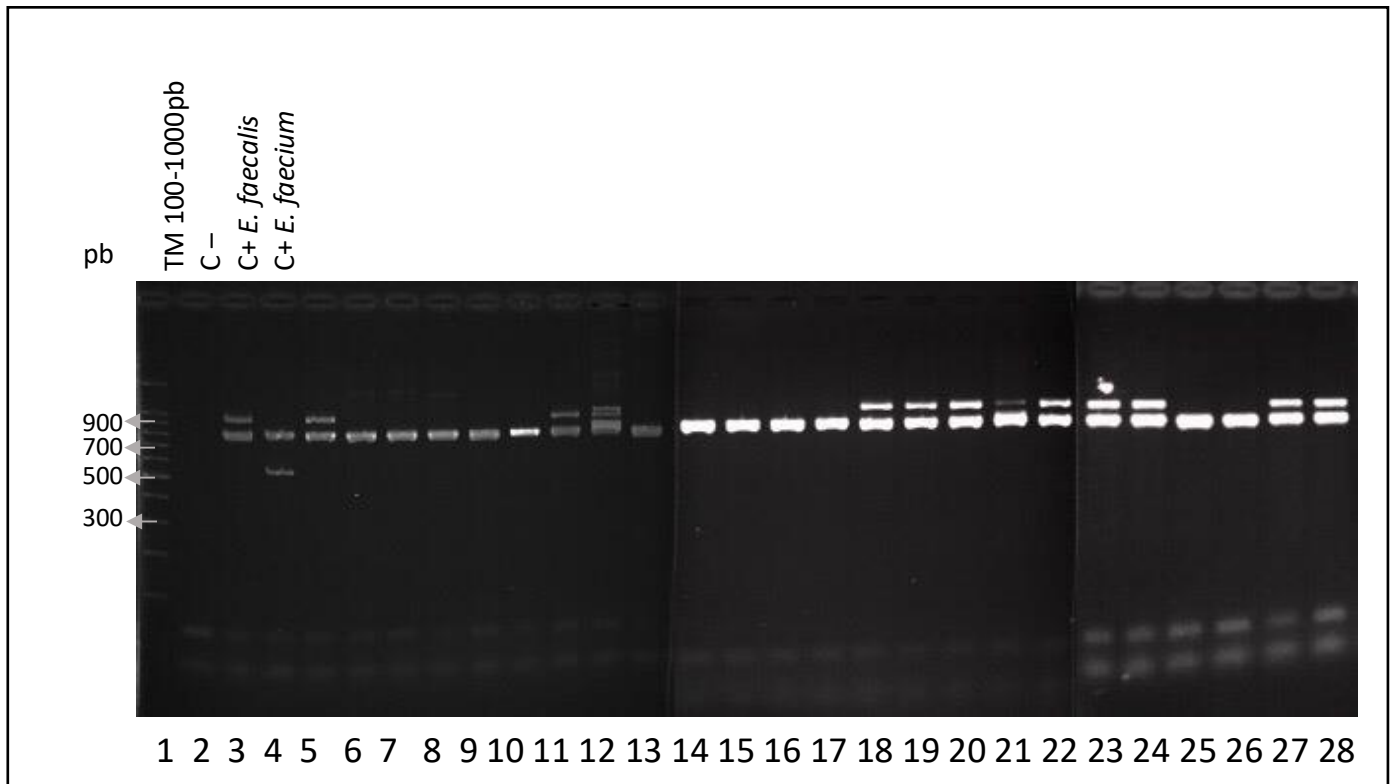


Figura 2. Electroforesis de PCR Múltiplex para identificación de *E. faecalis* y *E. faecium*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular escala 100pb, seguido de los controles en los carriles 2, 3 y 4 correspondientes al control negativo (agua estéril desionizada) y los controles positivos para *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente.

No se detectó la presencia del gen *ddl_{E. faecium}*, en ninguna de las cepas analizadas, por lo tanto, no se logró confirmar la presencia de *E. faecium*. Aunque el control positivo para *E. faecium* presentó el patrón de dos bandas correspondientes al gen *ddl_{E. faecium}* (550pb) y al fragmento 16S (800pb) (carril 5).

7.2 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

Los resultados correspondientes a la prueba de susceptibilidad microbiana corresponden al 100% de las muestras identificadas como *E. faecalis*, que representan un 12% del muestreo total. En la **figura 3**, es posible observar el comportamiento de todas las cepas de *E. faecalis* frente a los antibióticos evaluados a través de Whonet. Se puede evidenciar un porcentaje de resistencia del 100% de las cepas a la vancomicina y a la tetraciclina. Seguido de una resistencia del 92% de las cepas a gentamicina, ciprofloxacina, daptomicina, eritromicina y linezolid. Además, se observó una susceptibilidad del 100% de las cepas al cloranfenicol.

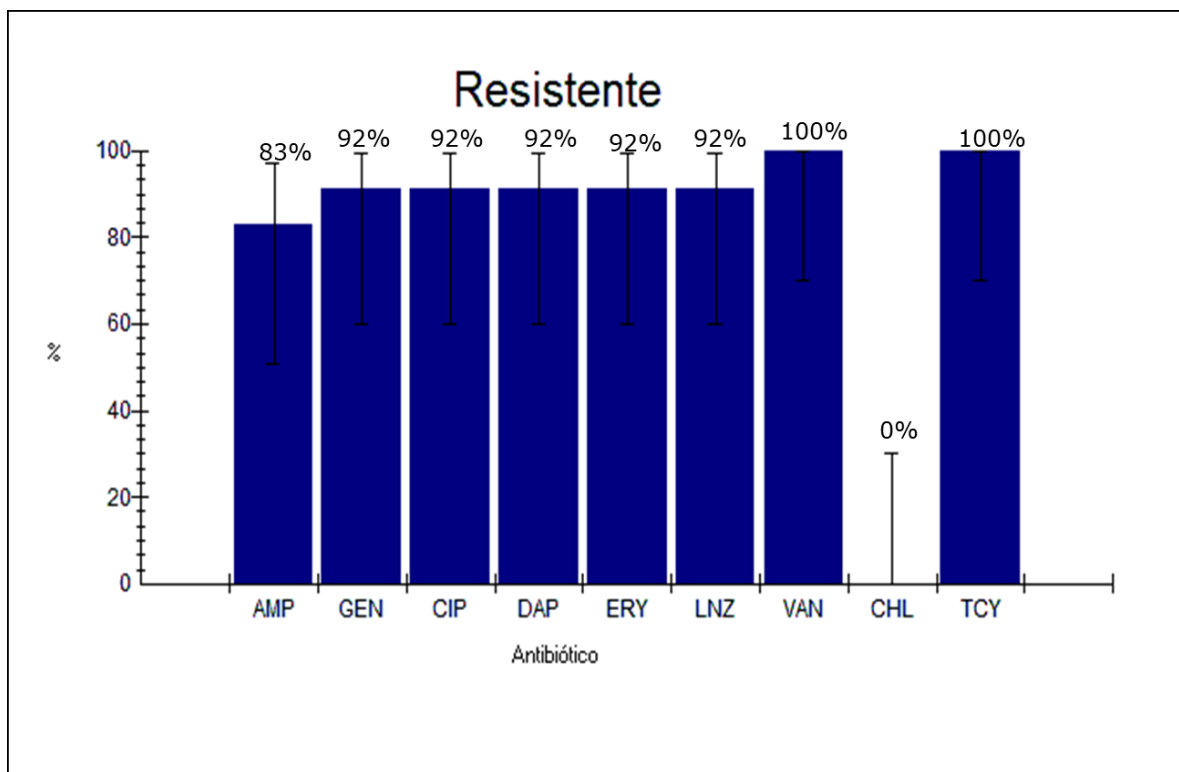


Figura 3. Porcentaje de resistencia de cepas a antibióticos. Distribución generada por la herramienta de análisis WhoNet. AMP= Ampicilina GEN=Gentamicina CIP=Ciprofloxacina DAP= Daptomicina ERY=Eritromicina LNZ= Linezolid VAN=Vancomicina TCY= Tetraciclina

En la **tabla 3** se pueden observar los perfiles de resistencia para cada cepa, en estos se obtuvieron múltiples resistencias a un mínimo de 6 antibióticos por cepa. Se puede observar que el 83% de las cepas presentan resistencia a gentamicina, eritromicina y vancomicina. Además, se determinó

que el 75% de las cepas fueron resistentes tanto a la ampicilina como a la eritromicina y tetraciclina.

Tabla 3. Perfiles de resistencia a antibióticos por parte de *E. faecalis*

Nº de muestra	Perfil	Perfil de resistencia	Nº de clases probadas	Nº de clases no sensibles	GEN	CHL	AMP	VAN	ERY	TCY	LNZ	DAP	CIP
1	GVETLDC	GEN VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	6	R	S	S	R	R	R	R	R	R
47	GVETLDC	GEN VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	6	R	S	S	R	R	R	R	R	R
49	GAVTDC	GEN AMP VAN TCY DAP CIP	8	5	R	S	R	R	S	R	S	R	R
75	GAVETLC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ CIP	8	6	R	S	R	R	R	R	R	S	R
76	GAVETLDC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	7	R	S	R	R	R	R	R	R	R
77	GAVETLDC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	7	R	S	R	R	R	R	R	R	R
78	GAVETLDC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	7	R	S	R	R	R	R	R	R	R
88	GAVETLDC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	7	R	S	R	R	R	R	R	R	R
89	GAVETLDC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	7	R	S	R	R	R	R	R	R	R
91	GAVETLDC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	7	R	S	R	R	R	R	R	R	R
99	GAVETLDC	GEN AMP VAN ERY TCY LNZ DAP CIP	8	7	R	S	R	R	R	R	R	R	R
100	AVETLD	AMP VAN ERY TCY LNZ DAP	8	6	S	S	R	R	R	R	R	R	S

Todas las cepas de *E. faecalis* analizadas presentaron resistencia a mínimo 5 de los 9 antibióticos probados. En la *figura 4*, se pueden observar los perfiles de multiresistencia. En estos perfiles se ve que el 58,33% de las cepas fueron resistentes a 8 antibióticos y solo mostraron susceptibilidad al cloranfenicol.

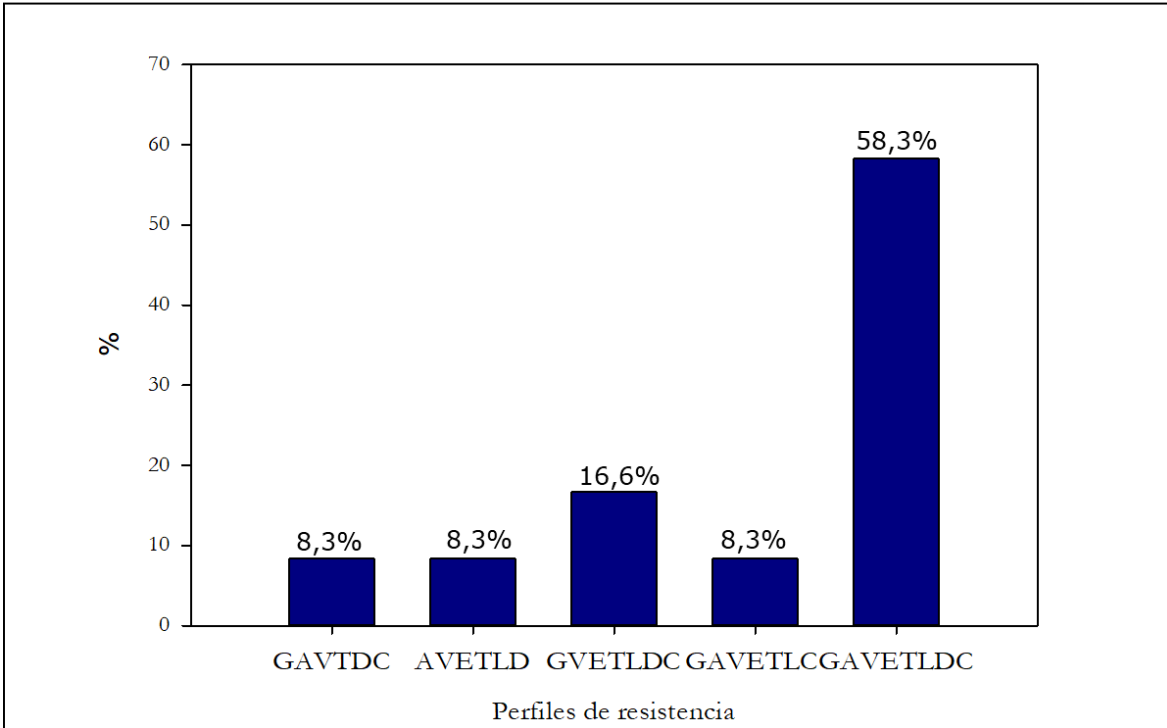


Figura 4. Perfiles de multiresistencia. Distribución generada por la herramienta de análisis WhoNet. G=Gentamicina A=Ampicilina V=Vancomicina T=Tetraciclina L=Linezolid E=Eritromicina D=Daptomicina C=Ciprofloxacina

En todos los perfiles de multiresistencia de la figura 4 se puede observar la resistencia a vancomicina y tetraciclina. No se encontraron cepas con resistencia a menos de 6 de los antibióticos probados.

8. DISCUSIÓN

La detección de *Enterococcus* spp. genera un interés particular debido a su adquisición de resistencia transferible a antibióticos como la vancomicina, un antibiótico de gran importancia en el manejo de infecciones por diferentes bacterias patógenas a nivel hospitalario [22]. El monitoreo de resistencia a antibióticos de algunas cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* es importante debido a que el aumento de la tolerancia a antimicrobianos genera altas tasas de supervivencia de cepas resistentes a antibióticos y aumenta el riesgo de transferencia de genes de resistencia a antibióticos a otras cepas [13].

Las cepas analizadas en este estudio fueron aisladas directamente del contenido cecal de los cerdos, posterior a la etapa de eviscerado, lo cual indica que la presencia de *Enterococcus* spp proviene desde la granja y que la colonización por parte de estos microorganismos no fue por contaminación cruzada. Se obtuvo un total del 24% de aislamientos positivos para *Enterococcus* spp, un porcentaje menor comparado con el 29% obtenido en el estudio realizado por Metiner y colaboradores, 2013 [17].

Los resultados obtenidos en el análisis por PCR Múltiple se deben a la presencia del gen *ddlE*. *faecalis* en 12 de las 24 cepas presuntivas, que además de ser específico para la especie, es importante porque codifica para ligasas de D-alanina, enzimas usadas como mecanismo de resistencia a glucopéptidos como la vancomicina [36].

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública que ha aumentado los niveles de alerta, debido a la disminución de opciones en el tratamiento de infecciones con bacterias capaces de generar resistencia a múltiples antibióticos que han sido utilizados a lo largo del tiempo y cada vez son menos efectivos [37].

Los mecanismos de resistencia a vancomicina por parte de *E. faecalis* han sido reportados por varios autores [38, 39, 40, 41]. Esta resistencia es causada por la presencia de genes *van* que pueden variar entre ABCDEGXYZ dependiendo de la especie [41]. En estudios previos se relacionó la adquisición de resistencia a vancomicina por parte de *E. faecalis* con el uso de avoparcina que a pesar de haber sido prohibido en países europeos y en Estados Unidos,

actualmente se encuentra en la lista de agentes microbianos importantes en la producción animal emitida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en mayo de 2018 [42][43]. El porcentaje de resistencia a vancomicina obtenido en este estudio podría indicar la presencia de genes *van* en el total de las cepas identificadas como *E. faecalis*.

Un porcentaje de resistencia de 91,3% a la tetraciclina realizado por Diarra et al., se ha asociado al uso de tetraciclina como promotor de crecimiento o como agente terapéutico [41]. El aumento en el uso de este antibiótico en la producción porcina para el tratamiento de septicemia e infecciones respiratorias ha generado un incremento en los porcentajes de resistencia y ha aumentado otros mecanismos de resistencia a macrólidos y aminoglucósidos por parte de algunos patógenos [43][44]. Esto se puede evidenciar debido que el porcentaje de resistencia de *E. faecalis* a la tetraciclina fue de un 100% y el 92% de las cepas mostraron una múltiple resistencia a la gentamicina y eritromicina.

E. faecalis pueden ser sensible a antibióticos como la ampicilina o algunos compuestos β -lactámicos [45]. Sin embargo, como se puede observar en la **figura 3**, la resistencia a ampicilina en este estudio fue del 83%, de acuerdo con lo reportado por O' Driscoll & Crank se da por la hiper producción de proteínas de unión a penicilina de baja afinidad (PBP), las cuales impiden que las moléculas del antibiótico se unan al sitio específico de acción y causen efecto alguno [26][46].

La presencia del gen *aph* permite la actividad acetiltransferasa y fosfotransferasa que afectan la actividad de la gentamicina y promueven la resistencia de las cepas al antibiótico hasta un 92% [10]. Según Terra et al., 2017 la expresión de *aph* en *E. faecalis* además de generar fenotipos resistentes al antibiótico, impide el sinergismo ampicilina/eritromicina [47].

La ciprofloxacina es una fluoroquinolona a la cual se observó que las cepas evaluadas presentaron una resistencia del 92%. Iweribor, Obi & Okoh, atribuyen al uso de danofloxacina, una fluoroquinolona comúnmente usada y aprobada por la OIE para el tratamiento de enfermedades respiratorias en cerdos, ser la causa principal de obtener un porcentaje de resistencia del 94,1% a la ciprofloxacina por parte de *E. faecalis* [48].

Una resistencia del 92% a la daptomicina por parte de *E. faecalis* se puede asociar con una mutación en genes que regulan el metabolismo de producción de fosfolípidos de membrana [49]. Esta mutación es generada por la delección de un aminoácido de la cadena que codifica para el gen *liaR* [50], que es parte del complejo *liaFSR* que genera cambios en la posición de algunos microdominios de cardiolipina en la membrana celular, posicionándolos en lugares distantes del septo celular, para que la daptomicina se movilice a sitios lejanos y no afecte una estructura indispensable para la división bacteriana [51]. Lozano & Torres, indicaron en su estudio que la resistencia a este antibiótico es más común en *E. faecium* que en *E. faecalis*, sin embargo, la falta de sensibilidad a daptomicina evidenciada en este estudio puede haber surgido por transferencia horizontal de otras cepas [52].

Enterococcus puede generar resistencia a cloranfenicol por la presencia del gen plasmídico o cromosomal *cat*, que codifica una acetiltransferasa, la cual puede alterar la estructura del antimicrobiano [47]. El porcentaje de sensibilidad de 100% al cloranfenicol por parte de los *E. faecalis* aislados de las muestras cecales podría indicar una ausencia o represión de la expresión del gen *cat*.

El comportamiento de algunas cepas de bacterias Gram positivas como *Enterococcus*, SAMR y *Staphylococcus epidermidis* frente al linezolid puede estar ligado a la presencia del gen *cfr*, que generalmente tiene características genéticas de movilidad como plásmidos o transposones [49]. El bajo porcentaje de sensibilidad al Linezolid puede asociarse a la presencia y expresión del gen *cfr* en el 92% de las cepas probadas.

Lozano & Torres, describen en su estudio que el mecanismo de resistencia de los enterococos a macrólidos como la Eritromicina es la presencia de genes *erm* [52]. Como se puede observar por los resultados obtenidos, el 92% de las cepas de *E. faecalis* tratadas con Eritromicina poseerían el gen *erm*. En Colombia se han encontrado cepas de *Streptococcus pneumoniae*, cuya resistencia a la Eritromicina se ha relacionado a la inserción de transposones *erm* que además contienen el gen de resistencia tetraciclina *tetM* [49]. Esta resistencia por parte de *S. pneumoniae* puede ser adquirida debido a los elementos móviles que caracterizan a *E. faecalis* que en el estudio demostró ser resistente tanto a la eritromicina como a la tetraciclina.

En la **figura 4**, se pueden observar los perfiles de resistencia obtenidos con el programa Whonet. El 83,33% de las cepas incluyen en su perfil de resistencia la Gentamicina, Tetraciclina y Eritromicina (**tabla 3**). Estos resultados se relacionan con el estudio realizado por Klibi et al., en el que se encontró que el 22% de las cepas de *E. faecalis* analizadas presentaron resistencia a los aminoglucósidos como la gentamicina. Además, el 100% de las cepas resistentes a ese tipo de antibióticos, mostraron resistencia a la tetraciclina y a la eritromicina. Indicando que los genes de resistencia a estos antibióticos pueden estar localizados en las mismas estructuras génicas y la expresión de uno de ellos podría generar resistencia a los demás funcionando como un complejo [53].

Adicionalmente, en el resumen del monitoreo de resistencia a antibióticos del 2013 realizado por Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades se encontró que más del 90% de las cepas aisladas de cerdos e identificadas como *E. faecalis* presentaron resistencia a ampicilina, eritromicina y tetraciclina [54]

Finalmente, los perfiles de resistencia que presentaron las cepas de *E. faecalis* deben ser tomados como una alerta debido a que todos los antibióticos evaluados se encuentran en la lista de medicamentos esenciales publicada por la OMS en 2017 [55]. Se deben implementar estrategias de monitoreo de la resistencia a la daptomicina y linezolid ya que estos dos antibióticos son usados como opción reservada en el tratamiento de infecciones bacterianas con patógenos multirresistentes en las que el tratamiento con antibióticos convencionales ha fracasado [56].

9. CONCLUSIONES

No fue necesario realizar una estandarización de la PCR Múltiple debido a que con el protocolo establecido por la Comisión Europea se lograron identificar las especies de *E. faecalis* y *E. faecium*

Se recuperaron e identificaron 12 cepas de *E. faecalis* como grupo trazador de resistencia a antimicrobianos con el gen *ddl_{E.faecalis}* por medio de PCR Múltiple

Se determinó la resistencia de *E. faecalis* a antibióticos como Vancomicina, Tetraciclina, Ciprofloxacina, Daptomicina, Linezolid, Eritromicina, Gentamicina y Ampicilina.

El 100% de las cepas de *E. faecalis* presentaron multiresistencia a antibióticos, lo cual podría aumentar la transferencia de resistencia a bacterias patógenas, afectando la eficiencia de los tratamientos

10. RECOMENDACIONES

Es importante que en las granjas porcícolas se realice monitoreo de resistencia a antimicrobianos por medio de detección de microorganismos trazadores, para así tener un panorama de la situación y poder ejecutar medidas de control que sean efectivas contra los microorganismos patógenos resistentes a antibióticos.

El uso de antibióticos como la Vancomicina y la Tetraciclina debe reducirse en tratamientos de infecciones bacterianas. La resistencia de algunos microorganismos a estos antimicrobianos puede hacerlos inefectivos para uso terapéutico.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Vega JP. El consumo de carne de cerdo en Colombia creció 56% durante los últimos cinco años. La República, 2018; Disponible en: <https://www.larepublica.co/economia/consumo-de-carne-de-cerdo-en-el-pais-crecio-56-en-los-ultimos-cinco-anos-2710218>
2. Agroindustria. Sector porcicultor, uno de los más productivos del momento. Revista Dinero, Febrero, 2018. Disponible en: <https://www.dinero.com/edicion-impresa/negocios/articulo/balance-del-sector-porcicultor-en-colombia/255321>
3. Thacker PA. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: A review. J Anim Sci Biotechnol, 4(1):1–13, 2013.
4. Eloit M, Da Silva J, Chan M. Superbugs: Why We Need Action Now. World Health Organization . 2016. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/superbugs-why-we-need-action-now>
5. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica, 33(10):692–9, 2015. Disponible en: dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004
6. Chotinantakul K, Chansiw N, Okada S. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from Thai fermented pork in Chiang Rai Province, Thailand. Integr Med Res . 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.021>
7. DTU- National Food Institute. Protocol for PCR amplification of *E. faecium* and *E. faecalis* recommended by the EURL-AR, 5–8, 2014.
8. OMS. Resistencia a los antimicrobianos, 2018. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
9. Kumar D, Pornsukarom S, G.K S, Thakur S. Environmental Dissemination of Multidrug Methicillin- Resistant *Staphylococcus sciuri* After Application. Foodborne Pathog Dis, 15(4):210–7, 2018.
10. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Rev Anti Infect Ther, 12(10):1221–36, 2014.
11. Jeljaszewicz J, Mlynarczyk G, Mlynarczyk A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. Int J Antimicrob Agents, 16:473–8, 2000.
12. Montúfar Andrade FE, Madrid Muñoz CA, Villa Franco JP, Diaz Correa LM, Vélez Rivera JD, Vega Miranda J, et al. Bacteremia por *Staphylococcus coagulasa* negativo con concentración inhibitoria mínima para vancomicina ≥ 2 . Infectio, 20(1):3–8, 2016.
13. Rizzotti L, Rossi F, Torriani S. Biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the swine meat chain. Food Microbiol, 60:160–4, 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.009>
14. FAO. Cerdo y la nutrición humana . Organización de las Naciones Unidas para la

- Alimentación y la Agricultura, 2014. Disponible en: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/HH_nutrition.html
15. FAO. Cerdo y riesgos para la salud pública . Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2014. Disponible en: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/hh_risks.html
 16. Aarestrup FM, Hasman H, Jensen LB, Moreno M, Herrero IA, Domínguez L, et al. Antimicrobial Resistance among Enterococci from Pigs in Three European Countries. *Antimicrobial Resistance among Enterococci from Pigs in Three European Countries. Society*, 68(8):4127–9, 2002.
 17. Metiner K, Küçüker MA, Boral ÖB, Anđ Ö. First isolation of Enterococcus strains in pig faeces in Turkey and determination of antibiotic susceptibilities. *Acta Vet Brno*, 82(3):231–5, 2013.
 18. World Health Organization. Worldwide country situation analysis : Worldwide country situation analysis : WHO Libr Publ data, abril, 2015. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/documents/situationanalysis/en/>
 19. FAO. El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos Apoyo a los sectores de la alimentación y la agricultura en la aplicación del Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos para minimizar el impacto de la resistencia, 28, 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/3/b-i5996s.pdf>
 20. Boehm AB, Sassoubre LM. Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect* . 1–19, 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649503>
 21. Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, et al. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - A European study. *Int J Food Microbiol*, 88(2–3):133–45, 2003.
 22. Gordoncillo MJN, Donabedian S, Bartlett PC, Perri M, Zervos M, Kirkwood R, et al. Isolation and Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* from Swine in Michigan, USA. *Zoonoses Public Health*, 60(5):319–26, 2013. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/zph.12008>
 23. Hidalgo M, Reyes J, Cárdenas AM, Díaz L, Rincón S, Vanegas N, et al. Perfiles de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de cocos Gram positivos provenientes de hospitales colombianos, 1994-2004. *Biomédica*, 28(2):245–51, 2008. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572008000200013
 24. McGowan LL, Jackson CR, Barret JB, Hiott LM, Fedorka Cray PJ. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Retail Fruits, Vegetables, and Meats. *Journal of Food Protection*, 69(12):2976–82, 2006. Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-69.12.2976>
 25. Teuber M. Environmental spread of antibiotic resistance from farm animals. *Current Opinion Microbiology*, 4:493–9, 2001.

26. Cercenado E. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(5):59–65, 2011. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70045-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70045-3)
27. Kanematsu E, Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, Nishino Y, Kawada Y. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(2):433–5, 1998.
28. Filsner PHLN, Almeida LM De, Moreno M, Moreno LZ, Matajira CEC, Silva KC, et al. Identification of the cfr methyltransferase gene in *Enterococcus faecalis* isolated from swine: First report in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*, 8:192–3, 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.02.002>
29. Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods - A conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol*, 88(2–3):105–22, 2003.
30. Dubin K, Pamer EG. Enterococci and Their Interactions with the Intestinal Microbiome. *Microbiol Spectr*, 5(6):1–16, 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5691600/pdf/nihms914371.pdf%0A>
31. Baer AA, Miller MJ, Dilger AC. Pathogens of interest to the pork industry: A review of research on interventions to assure food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 12(2):183–217, 2013.
32. Lindblad M, Lindmark H, Lambertz St, Lindqvist R. Microbiological Baseline Study of Swine Carcasses at Swedish Slaughterhouses. *J Food Prot*, 70(8):1790–7, 2007. Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-70.8.1790>
33. Denayer S, Delbrassinne L, Nia Y, Botteldoorn N. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: High diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. *Toxins (Basel)*, 9(12):1–14, 2017.
34. Poutou R, Burbano M, Sierra S, Torres K, Carrascal A.K. Validación de la PCR Múltiple para Detectar *Listeria monocytogenes* En Queso , Leche , Carne. *Univ Sci*, 61–78, 2005.
35. Niemi RM, Ahtiainen J. Enumeration of intestinal enterococci and interfering organisms with Slanetz-Bartley agar, KF streptococcus agar and the MUST method. *Lett Appl Microbiol*, 20(2):92–7, 1995.
36. Bang K, An JU, Kim W, Dong HJ, Kim J, Cho S. Antibiotic resistance patterns and genetic relatedness of *enterococcus faecalis* and *enterococcus faecium* isolated from military working dogs in korea. *J Vet Sci*, 18(2):229–36, 2017.
37. Cota-rubio E, Hurtado-ayala L, Pérez-morales E, Alcántara-jurado L. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Rev Iberoam Ciencias*, 1(1):75–85, 2014.
38. Da Silva Fernandes M, Fujimoto G, de Souza LP, Kabuki DY, da Silva MJ, Kuaye AY. Dissemination of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Ricotta Processing Plant and Evaluation of Pathogenic and Antibiotic Resistance Profiles. *J Food Sci*. 80(4):M765–75, 2015.

39. Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H, Klein G, Ellerbroek L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol*, 88(2–3):311–4, 2003.
40. Kwon KH, Hwang SY, Kim SH, Moon BY, Park BK, Yoon JW, et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* Isolates from the Pork Meat Production Chain and Comparison with Human Clinical Isolates. *J Food Saf*, 33(2):190–6, 2013.
41. Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus spp.* and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 76(24):8033–43, 2010.
42. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture : History and Mode of Action Actual Usage of Antimicrobials in Denmark Voluntary and Legislated Bans. *Poultry Sci*, 84:634–43, 2005. Disponible en: <https://academic.oup.com/ps/article-abstract/84/4/634/1562300>
43. Organización Mundial de Sanidad Animal. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria, 33(0):1–10, 2018.
44. Aslam M, Diarra Ms, Masson L. Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Genotypes of *Enterococcus faecalis* Recovered from a Pork Processing Plant. *Journal of Food Protection*, 75 (8):1486–91, 2012. Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-11-524>
45. Kampf G, Höfer M, Wendt C. Efficacy of hand disinfectants against vancomycin-resistant enterococci in vitro. *J Hosp Infect*, 42(2):143–50, 1999.
46. O’ Driscoll T, Crank C. Temporal trends and risk factors for healthcare-associated vancomycin-resistant enterococci in adults. *J Hosp Infect*, 8:213–30, 2015.
47. Terra MR, Furlaneto MC, Furlaneto-maia L. Enterococcus Multirresistente A Antimicrobianos : Um Importante Patógeno Nosocomial Enterococcus Multiresistant The Antimicrobial : An Important Pathogen Nosocomial, 29:94–102, 2017.
48. Iweriebor BC, Obi LC, Okoh AI. Virulence and antimicrobial resistance factors of *Enterococcus spp.* isolated from fecal samples from piggery farms in Eastern Cape, South Africa Ecological and evolutionary microbiology. *BMC Microbiol*, 15(1):1–11, 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0468-7>
49. Rincón S, Panesso D, Díaz L, Carvajal LP, Reyes J, Munita JM, et al. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomédica*, 34(0):191, 2014. Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2210>
50. Reyes J, Panesso D, Tran TT, Mishra NN, Cruz MR, Munita JM, et al. A *liaR* deletion restores susceptibility to daptomycin and antimicrobial peptides in multidrug-resistant *enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, 211(8):1317–25, 2015.
51. Tran T, Panesso D, Mishra N, Mileykovskaya E, Guan Z, Munita J, et al. Phospholipids, Daptomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Diverts the Antibiotic Molecule from the Division Septum and Remodels Cell Membrane. *Am Soc Microbiology*, 4(4):1–10, 2013.

52. Lozano C, Torres C. Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 35(1):2–8, 2017. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(17\)30028-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(17)30028-9)
53. Klibi N, Said L Ben, Jouini A, Slama K Ben, López M, Sallem R Ben, et al. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Sci*, 93(3):675–80, 2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.020>
54. Control EFSAEC for DP and. European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA J*, 13(2), 2015.
55. World Health Organization (WHO). Model List of Essential Medicines. *Essent Medic Health Products*, Agosto:1–39, 2017. Disponible en: http://www.who.int/entity/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML2017_FINAL_amendedAug2017.pdf?ua=1
56. Agersø Y, Hald T, Helwigh B, Borck Høg B, Bogø Jensen L, Frøkjær Jensen V, et al. DANMAP 2011 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food, and humans in Denmark. *Danmap*, 140, 2011. Disponible en: http://www.danmap.org/~media/Projekt sites/Danmap/DANMAP reports/Danmap_2011.ashx

12. ANEXOS

Tabla 1. Fórmula Medio Slanetz & Bartley

Compuesto	g/L
Triptona	20
Extracto de levadura	5
Glucosa	2
Fosfato dipotásico	4
Azida sódica	0,40
TTC	0,10
Agar - agar	12
pH: 7,2 ± 0,2	

Tabla 2. Electroforesis PCR Múltiplex

TM 100-1000bp	C-	C+ <i>E. faecalis</i>	C+ <i>E. faecium</i>	1	4	5	9	33	39	47	49	50	52	58	66
941 pb	-	+	-	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>
800 pb	-	+	+												
550 pb	-	-	+												

TM 100-1000bp	C-	C+ <i>E. faecalis</i>	C+ <i>E. faecium</i>	68	75	76	77	78	88	89	91	96	97	99	100
941 pb	-	+	-	<i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
800 pb	-	+	+												
550 pb	-	-	+												

Tabla 3. Susceptibilidad a antibióticos *E. faecalis*

N° muestra	(c)Control negativo	(G) control positivo	Gentamicina	Gentamicina MIC	Ampicilina	Ampicilina MIC	Cloranfenicol	Cloranfenicol MIC	Linezolid	Linezolid MIC	Daptomicina	Daptomicina MIC	Vancomicina	Vancomicina MIC	Ciprofloxacina	Ciprofloxacina MIC	Eritromicina	Eritromicina MIC	Tetraciclina	Tetraciclina MIC
1	-	+	R	>8	S	<2	S	<30	R	>2	R	>4	R	>2	R	>2	R	>4	R	>8
47	-	+	R	>8	S	<2	S	<30	R	>4	R	>2	R	>2	R	>2	R	>4	R	>8
49	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	S	<1	R	>2	R	>1	R	>2	S	<0,5	R	>8
75	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>4	S	<0,5	R	>2	R	>2	R	>4	R	>8
76	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>4	R	>1	R	>1	R	>2	R	>4	R	>8
77	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>2	R	>2	R	>1	R	>2	R	>4	R	>8
78	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>4	R	>2	R	>1	R	>2	R	>4	R	>8
88	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>4	R	>4	R	>8	R	>2	R	>4	R	>8
89	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>2	R	>2	R	>2	R	>2	R	>4	R	>8
91	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>2	R	>2	R	>1	R	>2	R	>4	R	>8
99	-	+	R	>8	R	>8	S	<30	R	>4	R	>1	R	>1	R	>2	R	>4	R	>8
100	-	+	S	<4	R	>8	S	<30	R	>4	R	>4	R	>8	S	<1	R	>4	R	>8

R= Resistente S= Sensible MIC= Concentración Mínima Inhibitoria

