

**Prevalencia de *Enterococcus spp* resistente a antibióticos en ensalada de vegetales fresca  
en la ciudad de Bogotá**

**SANDRA VIVIANA LÓPEZ BERMÚDEZ**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito para optar el título de Microbióloga**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Bogotá D.C**

**2011**

**Universidad de los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Ciencias Biológicas**

**Prevalencia de *Enterococcus spp* resistente a antibióticos en ensalada de vegetales fresca  
en la ciudad de Bogotá**

**Tesis para optar el título de Microbióloga**

**Sandra Viviana López Bermúdez  
200611621**

**Director: María Consuelo Vanegas López**  
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes

**Codirector:** No aplica

**Asesor:** No aplica

Bogotá, diciembre de 2011

**Resumen:** Mediante metodología clásica se realizó el aislamiento e identificación de *Enterococcus* spp, a partir de muestras de ensaladas de vegetales frescas adquiridas en diferentes zonas de la ciudad de Bogotá. Los resultados de la identificación clásica fueron confirmados mediante la secuenciación del gen 16S rRNA logrando la identificación de diferentes especies de *Enterococcus* y encontrando además otros géneros de bacterias ácido lácticas. Se evaluó la resistencia de las cepas aisladas a aminoglucósidos, carbapenems, glucopéptidos,  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y otros grupos de antibióticos, encontrando un alto porcentaje de resistencia al co-trimoxazol, la nitrofurantoína, la rifampicina y la vancomicina.

## **AGRADECIMIENTOS**

Por su acompañamiento en la dirección del presente trabajo agradezco a María Consuelo Vanegas López, directora del Laboratorio de Ecología Microbiana y de Alimentos (LEMA) de la Universidad de los Andes.

A las asistentes graduadas Angélica Garzón y María Isabel Pérez y demás compañeros del LEMA por su apoyo y compañía durante mi estancia en el laboratorio.

A mis padres Elber Marino López y María Carmenza Bermúdez y a mi hermana Ayda Janeth López Bermúdez a quienes con su esfuerzo, ejemplo, dedicación y paciencia me permitieron alcanzar este logro.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	8
1. Objetivos.....	10
1.1. Objetivo general .....	10
1.2. Objetivos específicos .....	10
2. Marco teórico.....	10
2.1. Ensaladas, frutas y vegetales.....	10
2.2. Antibióticos .....	11
2.3. Problemática de resistencia a antibióticos.....	14
2.4. <i>Enterococcus</i> spp .....	15
3. Materiales y métodos.....	18
3.1. Muestreo.....	18
3.2. Aislamiento .....	18
3.3. Identificación por métodos clásicos.....	19
3.4. Identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA.....	19
3.4.1. Extracción de ADN por lisis.....	19
3.4.2. Amplificación.....	19
3.4.3. Preparación del gel de agarosa al 2% .....	20
3.4.4. Montaje del gel de agarosa y electroforesis.....	20
3.4.5. Secuenciación y análisis bioinformático .....	21
3.5. Evaluación de la resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar .....	21
3.5.1. Preparación del inóculo .....	21
3.5.2. Inoculación de las placas de agar .....	21
3.5.3. Aplicación de los discos .....	21
3.5.4. Medición de las zonas de inhibición e interpretación.....	22

4.	RESULTADOS .....	22
4.1.	Muestreo y aislamiento .....	22
4.2.	Identificación por métodos clásicos .....	25
4.3.	Identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA .....	27
4.4.	Evaluación de la resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar .....	29
5.	DISCUSIÓN .....	32
5.1.	Muestreo y aislamiento .....	32
5.2.	Identificación molecular y clásica.....	33
5.3.	Resistencia a antibióticos .....	36
6.	Conclusiones .....	40
7.	Anexos .....	42
7.1.	ANEXO 1:Características y origen de las muestras .....	42
7.2.	ANEXO 2: Características diferenciales de bacterias ácido lácticas .....	46
7.3.	ANEXO 3: Resultados de la identificación de los aislamientos por técnicas clásicas	47
7.4.	ANEXO 4: Resultados identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA....	53
7.5.	ANEXO 5: Tabla para la interpretación de los diámetros de inhibición obtenidos por el método de difusión en agar .....	54
7.6.	ANEXO 6: Diámetros de inhibición obtenidos por el método de difusión en agar....	55
8.	REFERENCIAS .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> mecanismo de acción de diferentes grupos de antibióticos.....	12
<b>Tabla 2:</b> reactivos y cantidades necesarios para la amplificación por PCR .....	20
<b>Tabla 3:</b> programación del termociclador para la amplificación por PCR.....	20
<b>Tabla 4:</b> procedencia de las ensaladas consideradas en el estudio .....	22
<b>Tabla 5:</b> valores mínimo, máximo y promedio para los recuentos de cada categoría de ensaladas .....	23
<b>Tabla 6:</b> valor p para la prueba de normalidad .....	25
<b>Tabla 7:</b> número de cepas descartadas en cada una de las pruebas aplicadas para la identificación por métodos clásicos.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> esquema de diluciones de la muestra .....	18
<b>Figura 2:</b> crecimiento en agar enterococcosel .....	23
<b>Figura 3:</b> diferencias en los recuentos de ensaladas adquiridas en diferentes tipos de establecimiento .....	24
<b>Figura 4:</b> morfología microscópica de los aislamientos.....	25
<b>Figura 5:</b> morfología de colonias descartadas.....	26
<b>Figura 6:</b> morfología típica de las colonias aisladas .....	27
<b>Figura 7:</b> electroforesis de productos de amplificación .....	27
<b>Figura 8:</b> electroforesis de productos de amplificación .....	28
<b>Figura 9:</b> resultado de la identificación por secuenciación del gen 16S rRNA.....	28
<b>Figura 10:</b> porcentaje de cepas susceptibles y con resistencia a uno o más antibióticos .....	29
<b>Figura 11:</b> número, género y especie de aislamientos resistentes a cada antibiótico.....	30
<b>Figura 12:</b> cepa con resistencia simultánea a co-trimoxazol y nitrofurantoína.....	32

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la resistencia de los microorganismos a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, como resultado del uso indiscriminado de estos compuestos en el tratamiento médico y veterinario (Martínez, 2009). Los *Enterococcus* spp han tomado gran importancia en la anterior problemática, debido a que son ubicuos, patógenos oportunistas, intrínsecamente resistentes a varios antibióticos y capaces de intercambiar información genética por conjugación (Gomes et al., 2008). Estas bacterias se encuentran especialmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, sin embargo, también pueden encontrarse en el suelo, agua, plantas, vegetales y alimentos, en especial aquellos de origen animal (Girafa, 2002; Martins, Oliveira, Bica, Vaz, & Bernardo, 2007).

*Enterococcus* spp ha sido tradicionalmente considerado como un patógeno oportunista y no existe consenso sobre las implicaciones de la presencia de esta bacteria en productos alimenticios (Girafa, 2002). Sin embargo, se considera que los *Enterococcus* spp asociados a alimentos pueden actuar como reservorio de elementos genéticos de factores de virulencia, como la producción de hemolisina y citolisina, la capacidad para la adhesión, la modulación del sistema de defensa y la resistencia a antibióticos (Eaton & Gasson, 2001; Girafa, 2002). Como resultado a esta problemática, se han realizado varios estudios sobre la presencia de cepas resistentes en alimentos especialmente en productos cárnicos, lácteos y vegetales.

En Brasil se realizó un estudio sobre la prevalencia de *Enterococcus* spp en leche, productos cárnicos, quesos y vegetales encontrado estos microorganismos en el 52.5% de las muestras procesadas. Se observó que las muestras de cárnicos y quesos presentaban recuentos más altos y que las especies aisladas con mayor frecuencia en estos alimentos fueron *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. En el caso de los vegetales *Enterococcus casseliflavus* fue la especie más frecuente. Los aislamientos de *Enterococcus faecalis* fueron resistentes a tetraciclina (31%), gentamicina (22.5%) eritromicina (10%) y en el caso de *Enterococcus faecium* se encontraron tres aislamientos resistentes a la vancomicina. Además de la resistencia a antibióticos se evaluó la presencia de otros factores de virulencia encontrando cepas formadoras de biopelículas y con capacidad de adhesión a células Caco-2 (Gomes et al., 2008). En otro estudio en Argentina Ronconi et al. estimaron la presencia de *Enterococcus* spp con



resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y glucopéptidos en lechuga, con el fin de evaluar su papel como reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos. La especie aislada con mayor frecuencia fue *Enterococcus faecium* seguida por *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii* y otras. En este caso se encontró únicamente resistencia intrínseca a glucopéptidos, pero se aislaron cepas resistentes a gentamicina y estreptomina. Se concluyó que las cepas aisladas de lechuga presentaban perfiles de resistencia similares a los perfiles de cepas hospitalarias. En plantas de alfalfa analizadas en un estudio en España se aisló con mayor frecuencia la especie *Enterococcus mundtii* (79.5%) seguida por *Enterococcus faecalis* (10.2%), *Enterococcus hirae* (5.1%), *Enterococcus casseliflavus* (2.6%) y *Enterococcus faecium* (2.6%). En este caso todas las cepas aisladas fueron sensibles a glucopéptidos, penicilina, ampicilina y aminoglucósidos (Tejedor, González, Lupiola, Mendoza, & Palacios, 2009). En Portugal se analizaron muestras de cereales utilizados en la fabricación de alimento para aves de corral encontrando *Enterococcus* spp en el 66% de las muestras. 27.9% de las cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos. Se halló resistencia a rifampicina (59.8%), eritromicina (21.6%), nitrofurantoina (21.2%), tetraciclina (18.0%) y ciprofloxacina (6.9%). Abriouel et al. realizó un estudio comparativo sobre la presencia de especies de *Enterococcus* en muestras aisladas de frutas y vegetales, agua y suelo y muestras clínicas encontrando diferencias en el número de especies y abundancia. En muestras clínicas y de agua *Enterococcus faecalis* mostró una mayor prevalencia, mientras que en frutas y vegetales *Enterococcus faecium* se aisló con mayor frecuencia. También se encontró una menor incidencia de bacterias resistentes en las muestras de vegetales que en las muestras clínicas. Por último, MacGowan et al. investigaron la prevalencia y resistencia a antibióticos de *Enterococcus* spp. aislados de frutas, vegetales y cárnicos encontrando una mayor prevalencia en tomate y rábano. En cárnicos la especie más frecuente fue *Enterococcus faecalis* mientras que *Enterococcus casseliflavus* fue la especie predominante en frutas y vegetales. No se encontraron cepas resistentes a vancomicina pero se encontró resistencia a lincomicina, bacitracina, salinomina, penicilina y nitrofurantoína.

En Colombia, la investigación sobre cepas de *Enterococcus* spp resistentes ha estado enfocada hacia el área clínica, por lo que no hay reportes sobre la prevalencia de estos microorganismos en alimentos. En 1999 se realizó el primer reporte de *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina en un hospital de Medellín. En los aislamientos también se detectaron altos niveles de resistencia a la ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, penicilina, estreptomina y

teicoplanina. En estudios posteriores se reportaron *Enterococcus* spp resistentes a la vancomicina en hospitales en Bogotá, con una prevalencia del 10% de los aislamientos clínicos (Panesso et al., 2002). Lo anterior muestra que los *Enterococcus* spp resistentes a los antibióticos están emergiendo en el campo de los patógenos nosocomiales en Colombia, y que existe un total desconocimiento sobre el papel que pueden estar desempeñando los alimentos como vía de dispersión de estas bacterias resistentes en la comunidad.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo general

- Caracterizar la resistencia a antibióticos de cepas de *Enterococcus* spp aisladas de ensaladas de vegetales fresca en diferentes establecimientos de la ciudad de Bogotá.

### 1.2. Objetivos específicos

- Aislar, cuantificar e identificar *Enterococcus* spp mediante metodología clásica.
- Identificar las cepas de *Enterococcus* spp aisladas por medio de la secuenciación del gen rRNA 16s.
- Evaluar la resistencia de las cepas aisladas a diferentes antibióticos por medio de la técnica de difusión en agar.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Ensaladas, frutas y vegetales

Las frutas y vegetales son componentes esenciales en la dieta de seres humanos y existe evidencia de los beneficios nutricionales asociados con su consumo. Los cambios en estilo de vida y la preferencia de los consumidores por alimentos más nutritivos, saludables y de fácil preparación han incrementado la popularidad de las barras de ensaladas y de las ensaladas empacadas listas para el consumo (Abadias, Usall, Anguera, Solsona, & Viñas, 2008). En España el consumo de frutas y vegetales cortados es aproximadamente 1.5 Kg/año/persona, en el Reino Unido es de 12 Kg/año/persona, en Francia 6 Kg/año/persona y en Estados Unidos 30

Kg/año/persona. En Colombia no existe una cifra disponible sobre el consumo de ensaladas, sin embargo se estima que el consumo de hortalizas sin ningún tipo de procesamiento es 38 Kg/año/persona y en el caso de las frutas es de 32 Kg/año/persona (Vallejo, 2007).

En frutas y vegetales, gracias a la diferencia entre la morfología superficial, la composición interna de los tejidos y la actividad metabólica de hojas, tallos, frutos y raíces, existe una amplia diversidad de nichos ecológicos que albergan grupos específicos de microorganismos. Así mismo, la supervivencia de estos microorganismos depende de factores ecológicos asociados a los procesos de producción, procesamiento, distribución, preparación y al sitio de consumo (Beuchat, 2002). Las ensaladas frescas favorecen el crecimiento de microorganismos debido a su alta humedad y al gran número de superficies que se generan por los cortes de la materia prima. En ensaladas frescas es común encontrar bacterias de los géneros *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Pantoea* spp. y *Rahanelia* spp. que provienen del suelo y la superficie de las plantas en el cultivo. Adicionalmente, es posible encontrar bacterias ácido lácticas, como *Enterococcus* spp, y algunas especies de levaduras.(Beuchat, 2002; Little & Gillespie, 2008). La prevalencia de *Enterococcus* spp ha sido principalmente estudiada en alimentos de origen animal, sin embargo la superficie del suelo, las plantas y vegetales también pueden ser fuente de esta bacteria, lo cuál tiene implicaciones en la contaminación de ensaladas (Fisher, Phillips, & McWatt, 2009). Además, el agua utilizada en la irrigación y la fertilización con estiércol de animales puede ser fuente de *Enterococcus* spp y otros microorganismos (Beuchat, 2002; Ijabadeniyi, Debusho, Vanderlinde, & Buys, 2011).

En el estudio de Abriouel et al. además de vegetales también se estudiaron ensaladas de vegetales frescas listas para el consumo, encontrando cepas de *Enterococcus faecium* en ensalada mediterránea y ensalada primavera. En contraste, en el estudio de MacGowan et al. no se encontraron *Enterococcus* spp en las ensaladas analizadas.

## 2.2. Antibióticos

Los antibióticos son moléculas de origen natural o sintético que permiten bloquear algunos procesos cruciales en la célula bacteriana actuando como bactericidas o bacteriostáticos (Bryskier, 2005; Walch, 2003). Estos compuestos poseen diferentes mecanismos de acción como la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, la activación de enzimas que atacan la pared, la inhibición de la síntesis proteica, la producción de proteínas anormales por medio de

la unión irreversible al ribosoma bacteriano, la disrupción de la membrana celular, la inhibición de la síntesis de nucleótidos y la inhibición del metabolismo celular (Marion, Ferguson, & Webber, 2010). Los antibióticos se clasifican en varios grupos de acuerdo a su composición química y mecanismo de acción. Los grupos que se utilizan con mayor frecuencia son:  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, sulfanoamidas, quinolonas, tetraciclinas y polipéptidos (Walch, 2003). En la tabla 1 se describe el mecanismo de acción de los grupos de antibióticos de mayor relevancia para el presente trabajo.

**Tabla 1:** mecanismo de acción de diferentes grupos de antibióticos

	<b>Descripción</b>
<b>Aminoglucósidos</b>	Dentro de este grupo se encuentran la estreptomina, kanamicina, gentamicina, amikacina, espectinomicina, entre otros. El mecanismo de acción de los aminoglucósidos consiste en la inhibición de la síntesis proteica por medio de la unión a la subunidad 30S (estreptomina) o a las subunidades 30S y 50S (resto de los aminoglucósidos) del ribosoma. De esta forma se producen proteínas anómalas impidiendo la multiplicación de la bacteria (Castells & Hernández, 2007).
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Este grupo de antibióticos se encuentra conformado por penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenems. Se caracterizan por tener en común un anillo $\beta$ -lactámico al cual se debe su actividad antibacteriana. El mecanismo de acción de este tipo de antibióticos consiste en la inhibición de la síntesis de pared por la unión a proteínas blanco específicas denominadas proteínas de unión a penicilina (PBP) localizadas en la membrana citoplasmática (Claesson, 2010; Marion et al., 2010).
<b>Glucopéptidos</b>	Los glucopéptidos consisten en un anillo peptídico al cual varios azúcares se encuentran unidos covalentemente. El gran tamaño de esta molécula impide su penetración a través de la membrana de bacterias gram negativas, por lo que su uso terapéutico se encuentra limitado a infecciones causadas por bacterias gram positivas. El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis del peptidoglicano por la unión al C-terminal-D-alanil-D-alanina de los precursores. La formación de

	este complejo impide la unión de las transpeptidasas que se encargan del ensamblaje del peptidoglicano, deteniendo la síntesis de la pared celular (Claesson, 2010; Klare, Konstabel, Badsubner, Werner, & Witte, 2003).
<b>Tetraciclinas</b>	Son compuestos con un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados que actúan contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las tetraciclinas son agentes principalmente bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al evitar la unión del sitio aminoacil del ácido ribonucleico (ARN) de transferencia a la subunidad 30S ribosomal (Pérez & Iglesias, 2003).
<b>Quinolonas</b>	Las quinolonas son un grupo químicamente heterogéneo de antimicrobianos sintéticos cuyo blanco son la ADN girasa en organismos Gram negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos. La ADN girasa induce superenrollamientos negativos en el ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción. Por otro lado, la topoisomerasa IV presenta actividad decatenante por lo que la actividad de estas enzimas es esencial para la supervivencia celular. Mediante modificaciones estructurales de las quinolonas como el ácido nalidíxico se lograron mejoras en la actividad biológica y en las propiedades farmacocinéticas obteniendo a la segunda generación de quinolonas, como la ciprofloxacina (Martinez & Sánchez, 2007).
<b>Otros</b>	<p><b><u>Nitrofuranos:</u></b> los derivados de los nitrofuranos, como la nitrofurantoina y la furazolidona, parecen actuar en la síntesis proteica y en los mecanismos reparadores del ADN bacteriano. Estos antibióticos se unen a proteínas del ribosoma y bloquean la traducción (Martinez &amp; Sánchez, 2007).</p> <p><b><u>Sulfamidas y trimetoprim:</u></b> Las sulfamidas y el trimetoprim inhiben la síntesis de ácido fólico interfiriendo a la vez con la producción de nucleótidos, en especial la timina. El producto más utilizado es la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol (co-trimoxazol)</p>

	<p>(Claesson, 2010).</p> <p><b><u>Rifamicinas:</u></b> Las rifamicinas bloquean la enlongación del mRNA uniéndose a la subunidad <math>\beta</math> de la ARN polimerasa dependiente de ADN. Este mecanismo de acción es compartido por todos los antibióticos de este grupo, por lo que generalmente se presenta resistencia cruzada (Martinez &amp; Sánchez, 2007).</p>
--	---

### 2.3. Problemática de resistencia a antibióticos

Uno de los mayores problemas del siglo XXI a nivel de salud pública es el desarrollo de bacterias cada vez más resistentes a los antibióticos de uso común, causando infecciones más severas y de difícil diagnóstico que requieren tratamientos más largos, complejos y costosos. Adicionalmente, el problema de la resistencia a antibióticos ha pasado de ser únicamente una preocupación a nivel hospitalario, a ser un problema en la comunidad por la presencia de bacterias resistentes en el ambiente (Alanis, 2005).

El desarrollo de la resistencia a antibióticos se ha atribuido principalmente a su uso en medicina humana, donde estos compuestos han sido utilizados para tratar infecciones triviales, inclusive algunas de origen no bacteriano (Alanis, 2005; Bryskier, 2005). En el área veterinaria los antibióticos han sido utilizados en la profilaxis y tratamiento de enfermedades pulmonares, entéricas, abscesos en piel y órganos. Los antibióticos se han utilizado además para incrementar la eficiencia de la alimentación y como promotores de crecimiento en animales de granja, lo que ha sido altamente cuestionado (Teuber, 2001). La avoparcina y la virginiamicina son ejemplos de agentes antimicrobianos que han sido utilizados como aditivos para promover el crecimiento de animales, creando resistencia cruzada a antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones en humanos. El uso de estos compuestos fue prohibido en la Unión Europea, mientras que en Estados Unidos algunos antibióticos utilizados en medicina humana son administrados a animales con propósitos como la promoción del crecimiento. Como resultado de lo anterior se ha encontrado evidencia de la asociación entre el uso de gentamicina en animales de consumo con aislamientos de *Enterococcus* spp con alto nivel de gentamicina en humanos (Girafa, 2002; Heuer, Hammerum, Collignon, & Wegener, 2006).

Los antibióticos utilizados en veterinaria no se absorben completamente y son expulsados en la orina y heces, dispersándose en el ambiente y contribuyendo al desarrollo de resistencia en microorganismos y a la producción de alergias. Por lo anterior, el uso de residuos de la producción ganadera como fertilizante en agricultura puede dar una explicación a la presencia de microorganismos con resistencia a antibióticos en frutas y vegetales (Venglovsky, Sasakova, & Placha, 2009). Además de ser una herramienta terapéutica en medicina humana y veterinaria, los antibióticos también han sido utilizados a nivel agrícola para el tratamiento de enfermedades en plantas. Por lo tanto, la presión de selección ejercida por el uso en veterinaria y agricultura hace de las plantas y animales un potencial reservorio y vía de transmisión de microorganismos resistentes (Teuber, 2001).

#### 2.4. *Enterococcus* spp

Este género pertenece al filo de los firmicutes con bajo contenido de G-C. Los *Enterococcus* spp son cocos gram positivos, catalasa (-), anaerobios facultativos, que se presentan solos, en parejas o cadenas cortas (Facklam, Cravalho, & Texeiro, 2002). El género fue creado en por Schleifer y Kilpper-Bälz para agrupar inicialmente a las bacterias *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* que fueron separadas del género *Streptococcus* spp como resultado de estudios basados en hibridación DNA-DNA y DNA-RNA. Posteriormente, otros *Streptococcus* spp con características similares fueron transferidos al nuevo género (Devriese, Baele, & Butaye, 2006; Facklam et al., 2002). Actualmente se encuentran 23 especies: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus sulfureus* y *Enterococcus asini*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus villorum*, *Enterococcus porcinus*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus haemoperoxidus* (Facklam et al., 2002).

*Enterococcus* spp es un género de gran importancia en microbiología ambiental, clínica y de alimentos. Estos microorganismos se encuentran en una gran variedad de ambientes debido a su capacidad para crecer en amplios rangos de temperatura (10°C - 45°C) y pH (4.4-10.6) (Facklam et al., 2002; Lawley, Curtis, & Davis, 2008). Sin embargo, son principalmente comensales del intestino de humanos y animales (Shepard & Gilmore, 2002). En alimentos

pueden encontrarse como contaminante, en procesos de fermentación de quesos y cárnicos o como probióticos (Salminen, Wright, & Ouwehand, 2004).

En los últimos años *Enterococcus* spp se ha convertido en uno de los patógenos nosocomiales más comunes causando endocarditis, bacteremia, infecciones mucocutáneas y abdominales e infección del sistema nervioso y el tracto urinario en personas inmunosuprimidas (Gomes et al., 2008). Las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las especies de este género que se encuentran involucradas con mayor frecuencia en este tipo de infecciones en humanos (Shepard & Gilmore, 2002). El tratamiento de las infecciones causadas por este género consiste en la combinación de un aminoglucósido con un antibiótico que inhiba la síntesis de pared celular como la ampicilina, la penicilina o la vancomicina (Shepard & Gilmore, 2002). Sin embargo, *Enterococcus* spp es intrínsecamente resistente a un amplio rango de antibióticos como las cefalosporinas, penicilinas y bajas concentraciones de aminoglucósidos. Adicionalmente, a través de la transferencia de plásmidos y transposones, el intercambio de cromosomal y las mutaciones *Enterococcus* spp ha adquirido resistencia adicional a altas concentraciones de  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y glicopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina (Shepard & Gilmore, 2002).

En el caso de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, además de la resistencia intrínseca, se ha evidenciado la producción de proteínas de unión a penicilina (PB5) en la mayoría de aislamientos clínicos de *Enterococcus faecium* con alto nivel de resistencia. En aislamientos de *Enterococcus faecalis* se ha identificado la producción de  $\beta$ -lactamasas y se ha encontrado evidencia genética de la adquisición del operón  $\beta$ -lactamasa de *Staphylococcus aureus*, debido a la habilidad de *Enterococcus* spp para intercambiar determinantes de resistencia con otras bacterias gram positivas (Shepard & Gilmore, 2002).

En *Enterococcus* spp la resistencia intrínseca a bajos niveles de aminoglucósidos se debe a que la entrada de estos antibióticos a la célula es dependiente de energía. *Enterococcus* spp no posee enzimas citocromo y por lo tanto no está en capacidad de producir la energía necesaria para metabolizar los aminoglucósidos (Klare et al., 2003). Adicional a este mecanismo intrínseco, *Enterococcus* spp. ha adquirido genes que le confieren mecanismos de resistencia a altos niveles de esta clase de antibióticos. Uno de estos mecanismos consiste en la producción de enzimas modificadoras, como la enzima 6'-aminoglucósido acetiltransferasa 2''-



aminoglucósido fosfotransferasa [AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia], que le proporciona a *Enterococcus* spp alto nivel de resistencia a la mayoría de aminoglucósidos disponibles, con excepción de la estreptomicina. De forma similar, la resistencia a un amplio rango de aminoglicósidos es mediada por la producción de la enzima aminoglucósido [APH(3')-IIIa] la cual promueve la fosforilación dependiente de ATP de varios aminoglucósidos (Shepard & Gilmore, 2002).

Con el desarrollo de cepas de *Enterococcus* spp con resistencia a altos niveles de  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos se incrementó el uso de la vancomicina para el tratamiento de infecciones causadas por este y otros cocos gram positivos (Shepard & Gilmore, 2002). Los glucopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina son alternativas terapéuticas importantes en el tratamiento de infecciones por *Enterococcus* spp resistentes a la penicilina (Klare et al., 2003). Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de la pared formando complejos con la terminación peptidil-D-alanil-D-alanina de los precursores del peptidoglicano impidiendo la formación de la pared bacteriana. El desarrollo de la resistencia a glucopeptidos reduce las alternativas terapéuticas en el tratamiento de infecciones por *Enterococcus* spp. El mecanismo de resistencia a los glucopéptidos consiste en la síntesis de precursores del peptidoglicano modificados, que no poseen la terminación típica D-alanil-D-alanina sino D-alanil-D-lactato o D-alanil-D-serina y por lo tanto poseen afinidad reducida por el antibiótico (Claesson, 2010). Los genes que se encuentran involucrados en el desarrollo de la resistencia adquirida a vancomicina incluyen vanA, vanB, vanD y van E, que son adquiridos mediante intercambio de transposones, y van-C que se encuentra codificado cromosomalmente y no es transferible (Shepard & Gilmore, 2002). Los genes vanC-1 y van C-2 son responsables de la resistencia intrínseca en *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus* respectivamente, aunque este tipo de resistencia no se transfiere a otros organismos y no se encuentra asociado con infecciones serias. El gen vanA confiere resistencia a altas concentraciones de vancomicina y teicoplanina y se encuentra asociado a las especies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus mundtii*, *enterococcus raffinosus* y *Enterococcus avium*. El gen vanB confiere resistencia varias concentraciones de vancomicina pero no a teicoplanina y se presenta en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Patel, 2003).

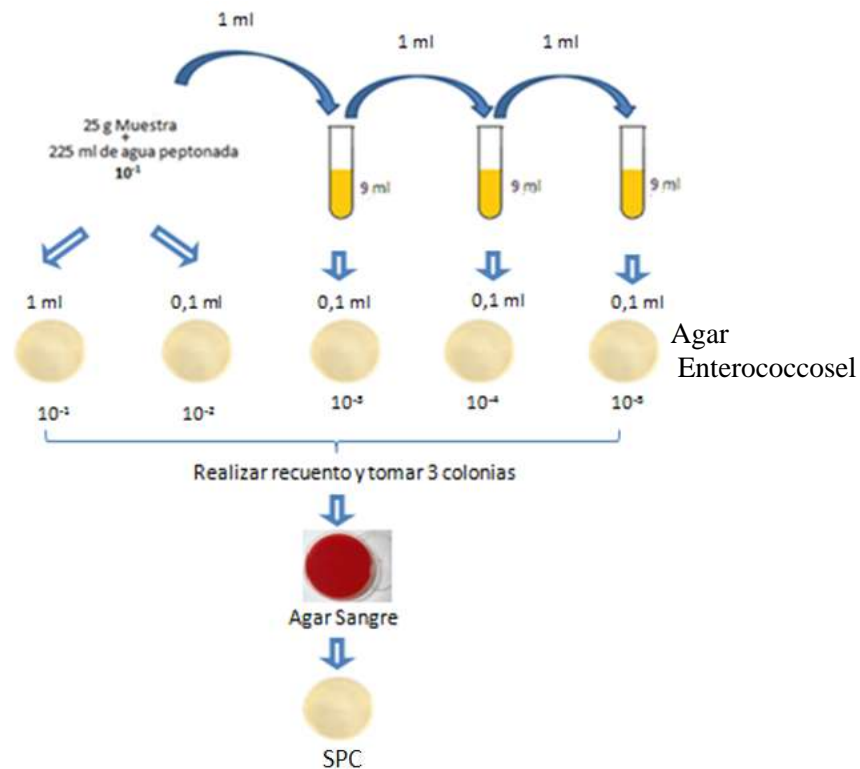
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestreo

Se recolectaron 30 muestras de ensaladas de vegetales disponibles para la venta de 21 establecimientos ubicados en diferentes zonas de la ciudad de Bogotá. En la tabla 4 se resume la procedencia de las ensaladas.

#### 3.2. Aislamiento

Se mezclaron 25g de la muestra en 225 ml de agua peptonada (0,1% p/v) con ayuda de un homogeneizador. A partir de la muestra anterior ( $10^{-1}$ ) se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ) en agua peptonada (0,1% p/v). Se sembraron en fondo 1000  $\mu$ l de la dilución  $10^{-1}$  y 100  $\mu$ l en superficie de las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  en agar enterococcosel (figura 1). Las cajas fueron incubadas a 37°C por 48h. Se seleccionaron las cajas que contenían entre 25 y 250 colonias para realizar el recuento presuntivo de *Enterococcus* spp y se tomaron 3 colonias típicas de cada muestra que fueron transferidas a agar sangre y posteriormente a SPC para realizar las pruebas de caracterización fenotípica y genotípica (Gomes et al., 2008).



**Figura 1:** esquema de diluciones de la muestra

Mediante el programa R se realizó una prueba shapiro-wilk con el fin de determinar si los datos de los recuentos mostraban una distribución normal. Dado que los datos no presentaron distribución normal se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para analizar si existían diferencias entre los recuentos obtenidos en las ensaladas procedentes de almacenes de cadena, plaza, restaurantes u otros establecimientos. El valor crítico  $\alpha$  utilizado para ambas pruebas fue 0.05.

### 3.3. Identificación por métodos clásicos

Se realizó una lámina de coloración gram y prueba de producción de catalasa a las colonias presuntivas. Siguiendo la metodología propuesta en el ANEXO 2, las colonias negativas para la prueba de catalasa y con morfología de cocos gram positivos fueron sometidas a crecimiento en BHI a 45°C, pH 4,4 y pH 9,6 con el fin de diferenciar las colonias de *Enterococcus* spp de otras bacterias ácido lácticas. Adicionalmente se realizó una prueba de formación de tétradas y de producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa (Salminen et al., 2004).

### 3.4. Identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA

Los procedimientos de extracción de ADN, amplificación y electroforesis se realizaron siguiendo el Manual de Procedimientos del Laboratorio de Ecología Microbiana y de Alimentos (LEMA) de la Universidad de los Andes.

#### 3.4.1. Extracción de ADN por lisis

Cada una de las cepas a analizar se sembró en 3ml de BHI y se incubó 37°C por 24h. Se transfirió 1 ml de BHI a un tubo eppendorf y se centrifugó 5 minutos a 1300 rpm. El sobrenadante fue descartado y se repitió el procedimiento dos veces más hasta agotar el BHI disponible. El pellet fue resuspendido en 1 ml de agua destiladas estéril con ayuda de un vortex y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante fue descartado y se repitió el proceso de lavado. El pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ l de agua destilada estéril y se sometió a calentamiento por 20 minutos a 100°C en baño de María.

#### 3.4.2. Amplificación

Se realizó una mezcla de los reactivos según las cantidades indicadas en la tabla 2. Las secuencias de los primers fueron las siguientes: F27: 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3', R1492: 5' TAC GGYTACCTT ACG ACT T 3'. Las mezclas fueron llevadas al

termociclador y sometidas a un programa de 35 ciclos con la temperatura y duración resumidas en la tabla 3.

**Tabla 2:** reactivos y cantidades necesarios para la amplificación por PCR

Reactivo	Cantidad ( $\mu$ l)
Go Taq	25
F27	2
R1492	2
Agua desionizada	18
ADN	3

**Tabla 3:** programación del termociclador para la amplificación por PCR

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
94	2 minutos
94	45 segundos
53	45 segundos
72	1 minuto
72	10 minutos

#### 3.4.3. Preparación del gel de agarosa al 2%

Se mezclaron 1,4 gramos de agarosa y 70 ml de TBE 1X en un beaker que se llevó al microondas hasta disolver la agarosa. Se agregaron 4  $\mu$ l de bromuro de etidio y se sirvió en una cubeta. Se colocó un peine para marcar los pozos, el gel se dejó solidificar y el peine fue retirado. La cubeta con el gel se colocó en una cámara Wide Mini Subcell y se cubrió totalmente con buffer TBE 1X.

#### 3.4.4. Montaje del gel de agarosa y electroforesis

En el primer pozo se colocaron 4 $\mu$ l del marcador de peso molecular y en los pozos siguientes 3 $\mu$ l de la muestras a analizar. La cámara fue conectada a una fuente de poder y se corrió el gel por 1 hora a 400A y 80 V.

#### 3.4.5. Secuenciación y análisis bioinformático

Los productos de PCR que mostraron buena amplificación luego de realizar la electroforesis fueron enviados a MacroGen Inc en Korea para ser secuenciados. Luego de obtener las secuencias se eliminaron los fragmentos iniciales y finales que no mostraban una calidad aceptable mediante el programa BioEdit. Se realizó un BLAST en la página de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project).

#### 3.5. Evaluación de la resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar

Las pruebas de susceptibilidad por el método de difusión en agar se realizaron siguiendo la metodología propuesta por la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) (Andrews, 2009).

##### 3.5.1. Preparación del inóculo

La cantidad de inóculo se estandarizó con el fin de evitar la reducción o el aumento de las zonas de inhibición como resultado de un inóculo muy denso o muy ligero. Cada una de las cepas a analizar fue transferida a medio SPC en tubo y se dejó incubar 48h a 37°C. Posteriormente se añadieron 1000 µl de agua destilada estéril en el tubo y se homogenizó con ayuda de un vórtex. La mezcla fue transferida a un vial de vidrio estéril y diluida en agua hasta alcanzar una turbidez similar a la del patrón 0,5 de McFarland.

##### 3.5.2. Inoculación de las placas de agar

A partir de la suspensión se inocularon placas de Mueller Hinton con un escobillón estéril removiendo el exceso de líquido presionando contra la pared del vial. El inóculo fue distribuido homogéneamente en la superficie de la placa.

##### 3.5.3. Aplicación de los discos

Los discos con los antibióticos a evaluar (amikacina, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, nitrofurantoína, imipenem, kanamicina, meropenem, penicilina, rifampicina, tetraciclina y cotrimoxazol) se colocaron firmemente sobre la superficie del agar, sin exceder de 5 discos por placa. Se incubó a 35-37°C por 24h. Se utilizó como control la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

#### 3.5.4. Medición de las zonas de inhibición e interpretación

Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición al milímetro más cercano y se compararon con los datos reportados en la literatura (ANEXO 5) para determinar la susceptibilidad o resistencia del aislamiento.

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Muestreo y aislamiento

La procedencia de las ensaladas que fueron analizadas se resume en la tabla 4. Se tomaron muestras en restaurantes, almacenes de cadena, plazas y otro tipo de establecimientos. Al momento de adquirir cada muestra se observaron aspectos relevantes respecto a los sitios de distribución, condiciones de almacenamiento, manipulación y operarios (ANEXO 1).

**Tabla 4:** procedencia de las ensaladas consideradas en el estudio

	<b>Restaurante</b>	<b>Almacén de cadena</b>	<b>Plaza</b>	<b>Otro</b>
<b>Ensalada empacada lista para el consumo</b>	2	1	6	5
<b>Barra de ensaladas</b>	3	4	-	-
<b>Ensalada de almuerzo</b>	9	-	-	-

Los ingredientes que se encontraron con mayor frecuencia en las muestras fueron: lechuga, cebolla, zanahoria, tomate, repollo y espinaca.

Luego de procesar las muestras por medio de diluciones, sembrarlas en agar enterococcosel e incubar las placas se observó crecimiento en 28 de las 30 muestras (93%). El crecimiento fue identificado por la presencia de colonias rodeadas por halo negro similares a las mostradas en la figura 2. Únicamente en las muestras 12 y 14 no se observó crecimiento. La muestra 12 procedía de la barra de ensaladas de un almacén de cadena cuyos ingredientes eran pepino, cebolla, tomate, zanahoria y pimentón. En el establecimiento se observó que la barra de ensaladas se encontraba en condiciones de refrigeración. La ensalada se encontraba fresca y al analizar la muestra se observó que se encontrara acompañada por algún tipo de aderezo, posiblemente vinagre, lo que puede estar relacionado con la ausencia de crecimiento en agar enterococcosel. La muestra 14 procedía de la barra de ensaladas de un restaurante. Los

ingredientes de esta ensalada eran raíces chinas y arvejas, lo que sugiere que estos ingredientes sufrieron algún tipo de cocción. Lo anterior explica la ausencia de crecimiento en las placas de enterococcosel luego de procesar la muestra.



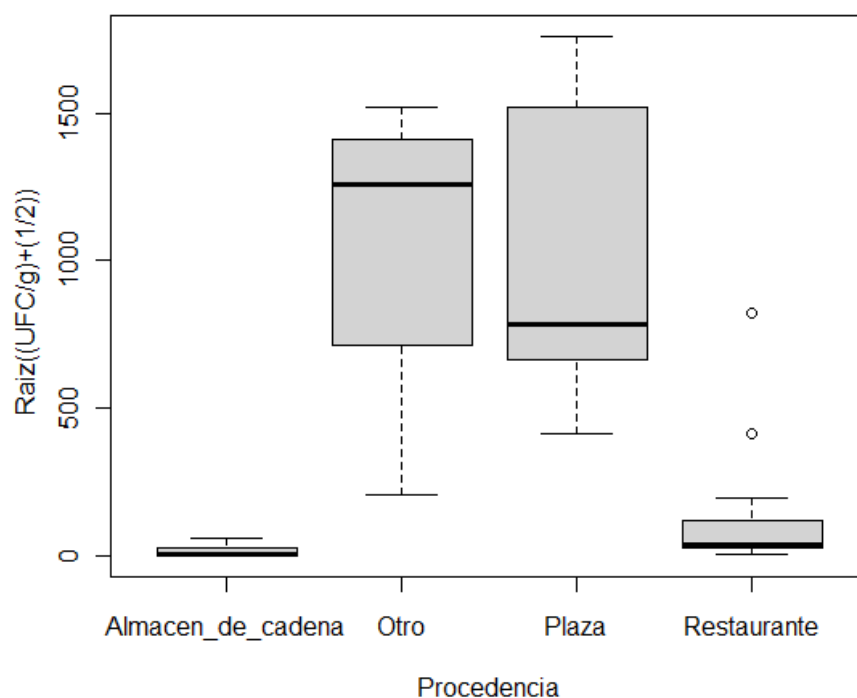
**Figura 2:** crecimiento en agar enterococcosel

Los recuentos de las 28 muestras en las que se observó crecimiento se encuentran en el ANEXO 1. Se puede observar que el valor más bajo fue 10 UFC/g en una muestra de ensalada adquirida en un almacén de cadena (m-13). El recuento más alto fue  $33 \times 10^6$  y se presentó en una muestra adquirida en una plaza de mercado (m-28). Lo anterior sugiere que pueden existir diferencias en los recuentos dependiendo de la procedencia de las ensaladas analizadas. Por lo tanto, en la tabla 5 se resume el valor mínimo, el valor máximo y el promedio de los recuentos para cada una de las categorías. Esta misma información puede apreciarse gráficamente en la figura 3.

**Tabla 5:** valores mínimo, máximo y promedio para los recuentos de cada categoría de ensaladas

<b>Procedencia</b>	<b>Mínimo (UFC/g)</b>	<b>Máximo (UFC/g)</b>	<b>Promedio (UFC/g)</b>
<b>Almacén de cadena</b>	0	$38 \times 10^2$	$77 \times 10^1$
<b>Plaza</b>	$17 \times 10^4$	$33 \times 10^6$	$66 \times 10^5$
<b>Restaurante</b>	20	$68 \times 10^4$	$70 \times 10^3$
<b>Otro</b>	$42 \times 10^3$	$16 \times 10^6$	$43 \times 10^5$

En la figura 3 se evidencia que los recuentos en el agar enterococcosel fueron más bajos en las muestras adquiridas en almacenes de cadena y restaurantes que en las muestras de plazas y otro tipo de establecimientos. Para confirmar estadísticamente esta diferencia se realizó en el programa R una prueba Shapiro-Wilk, para evaluar la normalidad de los datos de los recuentos para cada categoría. Dado que los valores P obtenidos para la prueba fueron menores que el valor crítico ( $\alpha=0.05$ ), se realizó una transformación cuadrática de los datos obteniendo nuevamente valores inferiores a  $\alpha$  (tabla 6). Por lo anterior, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis obteniendo un valor P de 0.0001228. Dado que el valor P obtenido en la prueba es menor a 0.05 se concluye que existen diferencias significativas entre las medias de los recuentos de las ensaladas provenientes de almacenes de cadena, plaza, restaurante y otro tipo de establecimientos.



**Figura 3:** diferencias en los recuentos de ensaladas adquiridas en diferentes tipos de establecimiento

Luego de realizar los recuentos en agar enterococcosel se seleccionaron colonias translucidas, pequeñas a medianas y rodeadas por halo negro para ser identificadas por métodos clásicos y por secuenciación. En total 82 colonias fueron seleccionadas y transferidas a agar sangre y SPC.

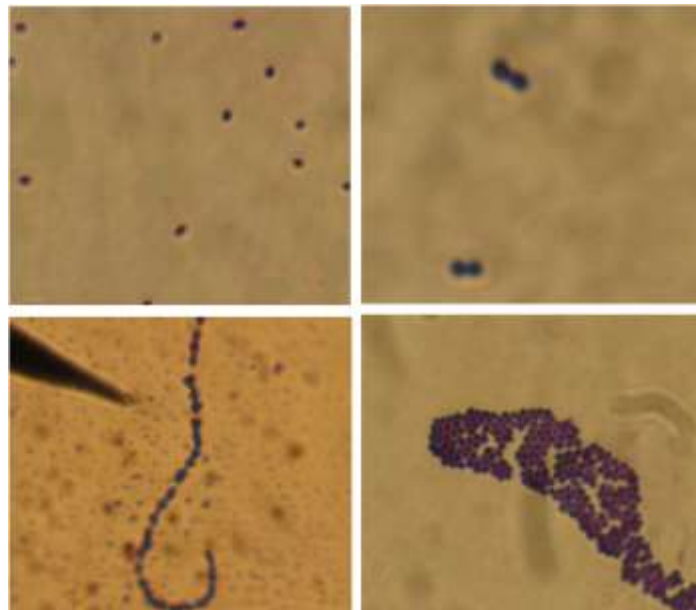


**Tabla 6:** valor p para la prueba de normalidad

	Valor P en datos sin transformar	Valor P en datos transformados
<b>Almacenes de cadena</b>	0.0007708	0.01546
<b>Plaza</b>	0.0002231	0.01173
<b>Restaurante</b>	3.489E-6	8.565E-5
<b>Otro</b>	0.004735	0.1898

#### 4.2. Identificación por métodos clásicos

Se realizó una lámina de coloración gram para las 82 cepas. 63 de los aislamientos mostraron ser cocos gram positivos generalmente organizados en pares, pero en otras ocasiones solos, en cadenas o grupos (figura 4). 19 de los aislamientos resultaron ser bacilos gram (+) por lo que fueron descartados.



**Figura 4:** morfología microscópica de los aislamientos

De las 63 cepas de cocos, 3 fueron positivos para la prueba de catalasa. Estas cepas presentaban como característica común la presencia de pigmentos y un diámetro de colonia significativamente grande en comparación con otros aislamientos figura 5.



**Figura 5:** morfología de colonias descartadas

Las colonias negativas para la prueba de catalasa y con morfología de cocos gram (+) fueron sometidas a pruebas de crecimiento de BHI a 45°C, pH 4,4 y pH 9,6, formación de tétradas y producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa. Se esperaba que las pruebas fueran positivas para el crecimiento en BHI a 45°C, pH 4,4 y pH 9,6 y negativas para la prueba de formación de tétradas y producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa. Los resultados obtenidos se muestran en detalle en el ANEXO 3. Sin embargo, el número de cepas que fueron descartadas por cada una de las pruebas se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 7:** número de cepas descartadas en cada una de las pruebas aplicadas para la identificación por métodos clásicos

Cepas aisladas inicialmente	Bacilos gram (+)	Catalasa (+)	Sin crecimiento a 45°C	Sin crecimiento a pH 4,4	Sin crecimiento a pH9,9	Formación de tétradas	Producción de CO <sub>2</sub> a partir de glucosa	Total cepas al final
82	19	3	23	3	1	2	0	31

Finalizada la etapa de identificación se obtuvieron 31 cepas. En general, estas cepas mostraban una morfología circular, de bordes redondeados, de tamaño pequeño a mediano y coloración translúcida a blanca (figura 6). Únicamente un aislamiento (m15-2) mostró una pigmentación ligeramente amarilla.



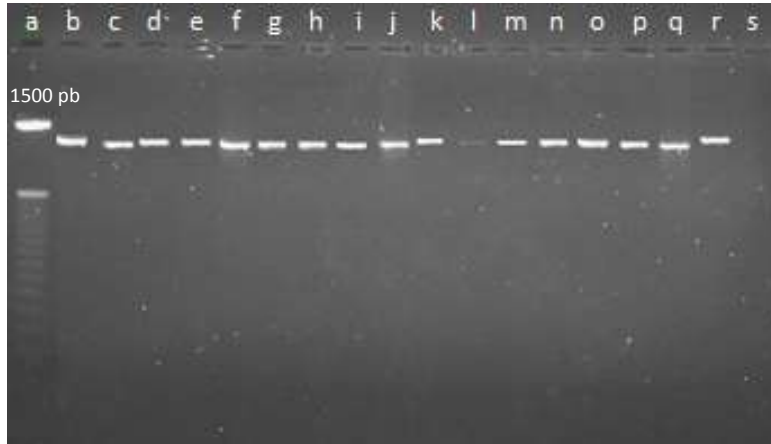
**Figura 6:** morfología típica de las colonias aisladas

#### 4.3. Identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA

Los resultados de la amplificación fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa (figuras 7 y 8). El tamaño de banda esperado utilizando los primers F27 y R1492 para la ampliación del gen 16s rRNA se encuentra dentro del rango 1424pb – 1549pb, siendo 1465pb el tamaño aproximado más probable (Howeler, Ghiorse, & Walker, 2003). Lo anterior concuerda con lo obtenido en la electroforesis donde se obtuvieron tamaños de banda cercanos a 1500 pb.

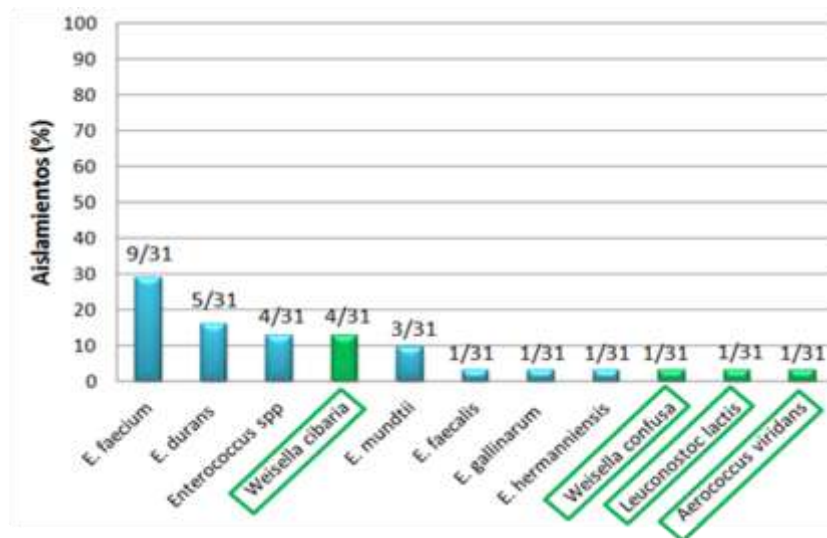


**Figura 7:** a. Marcador de peso molecular b. control positivo c. m3-1 d. m3-2 e. m8-1 f. m10-2 g. m11-1B h. m15-1 i. m15-2 j. m15-3A k. m15-3B l. m16-1 m. m16-2 n. m16-3 o. control negativo



**Figura 8:** a. Marcador de peso molecular b. control positivo c. m17-1 d. m19-1 e. m20-3 f. m21-1 g. m22-1 h. m22-2 i. m22-3 j. m23-2 k. m23-3 l. m24-3 m. m25-2 n. m26-1 o. m26-2 p. m26-3B q. m27-1B r. m28-1B s. control negativo

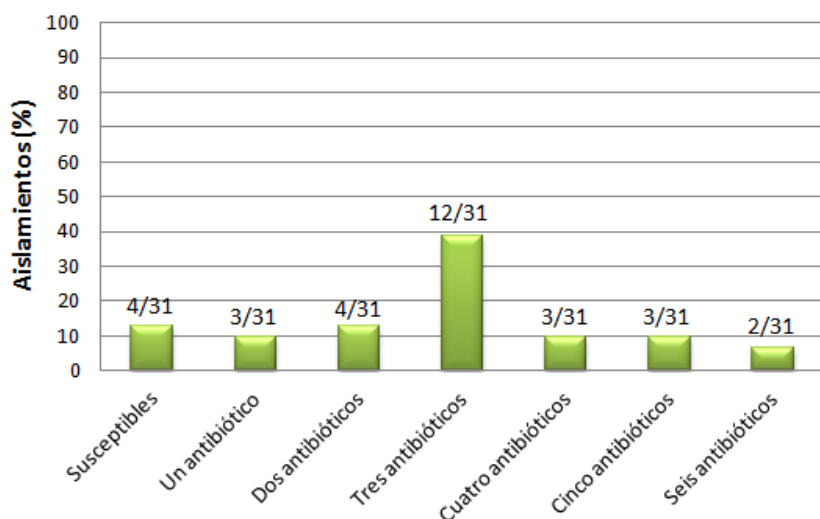
Luego del análisis bioinformático utilizando la herramienta BLAST se encontró que 24 de los 31 aislamientos correspondían a especies de *Enterococcus* spp. De los aislamientos anteriores 4 no pudieron ser identificados hasta especie. *Enterococcus faecium* fue la especie aislada con mayor frecuencia (29%), seguida por *Enterococcus durans* (16.1%), *Enterococcus mundtii* (9.7%), *Enterococcus faecalis* (3.2%), *Enterococcus gallinarum* (3.2%) y *Enterococcus hermanniensis* (3.2%). Adicionalmente se encontraron otros géneros diferentes a *Enterococcus* spp en una proporción considerable; *Weissella cibaria* (12.9%), *Weissella confusa* (3.2%), *Leuconostoc lactis* (3.2%) y *Aerococcus viridans* (3.2%) (Figura 9). Los resultados de identificación molecular de cada uno de los aislamientos se muestran en el ANEXO 4.



**Figura 9:** resultado de la identificación por secuenciación del gen 16S rRNA

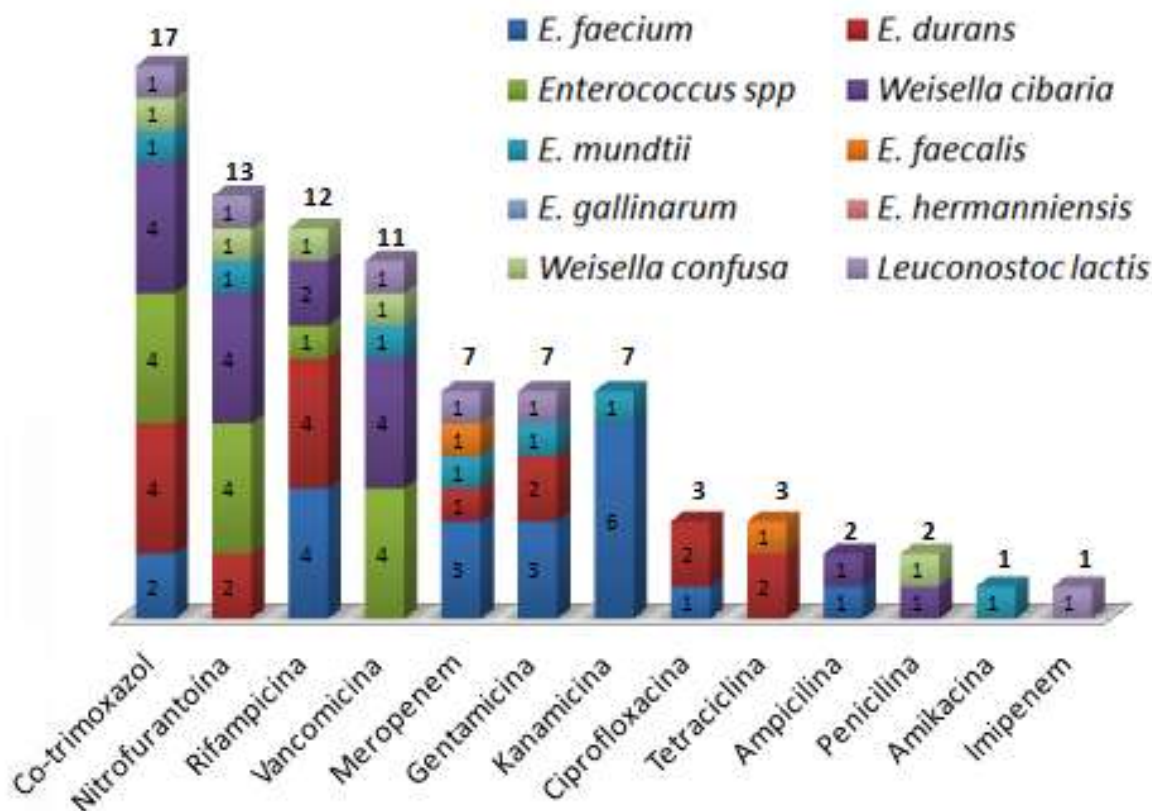
#### 4.4. Evaluación de la resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar

Posterior a la caracterización por métodos clásicos y moleculares de las cepas aisladas se evaluó la resistencia a antibióticos por medio de la técnica de difusión en agar. Luego de la incubación de las placas de Mueller Hinton se midieron los halos de inhibición y se compararon con la tabla en el ANEXO 5. En resumen se evaluó la resistencia de las 31 cepas aisladas a 13 antibióticos (amikacina, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, nitrofurantoína, imipenem, meropenem, kanamicina, penicilina, rifampicina, tetraciclina, vancomicina y cotrimoxazol). Se encontró que 4 cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos (12.90%), 3 fueron resistentes a un antibiótico (9.68%), 4 fueron resistentes a dos antibióticos (12.90), 12 fueron resistentes a tres antibióticos (38.71%), 3 fueron resistentes a cuatro antibióticos (9.68%), 3 fueron resistentes a cinco antibióticos (9.68%) y 2 fueron resistentes a 6 antibióticos (6.45%) (figura 10).



**Figura 10:** porcentaje de cepas susceptibles y con resistencia a uno o más antibióticos

La cepa control *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 presentó resistencia a amikacina, gentamicina, kanamicina, meropenem y vancomicina. Los resultados detallados de resistencia para cada una de las 31 cepas se encuentran en el ANEXO 6. En la figura 11 se muestra el número total de aislamientos con resistencia a cada uno de los antibióticos en la parte superior de las barras. Adicionalmente se relacionan los datos de resistencia con el género y la especie de los aislamientos.



**Figura 11:** número, género y especie de aislamientos resistentes a cada antibiótico

De la gráfica anterior es importante resaltar que en todos los antibióticos evaluados se encontró al menos una cepa con resistencia. El mayor porcentaje de aislamientos resistentes se encontró en los antibióticos co-trimoxazol (54.84%), nitrofurantoina (41.94%) y rifampicina (38.71%).

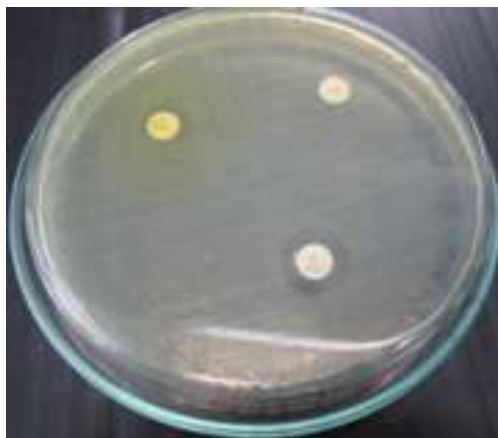
También se observó un porcentaje de resistencia significativo a la vancomicina (35.48%), el meropenem (23.33%), la gentamicina (22.58%) y la kanamicina (22.58%). Los antibióticos hacia los cuales hubo un menor porcentaje de cepas resistentes fueron: ciprofloxacina (9.68%), tetraciclina (9.68%), penicilina (6.45%), ampicilina (6.45%), imipenem (3.23%) y amikacina (3.23%). El antibiótico al cual se presentó mayor susceptibilidad fue el imipenem lo que se evidencia por el bajo porcentaje de cepas resistentes y además por la producción de halos de inhibición con un amplio diámetro en la mayoría de las cepas.

Respecto a la resistencia en relación con las especies aisladas del género *Enterococcus* spp se obtuvo que las cepas de *Enterococcus hermanniensis* y *Enterococcus gallinarum* no

presentaron resistencia a ninguno de los antibióticos evaluados. En las tres cepas de *Enterococcus mundtii* se encontró resistencia a co-trimoxazol, nitrofurantoína, vancomicina, meropenem, gentamicina, kanamicina y amikacina. De los cuatro aislamientos de *Enterococcus* spp que no pudieron ser identificados hasta especie, todos presentaron resistencia al cotrimoxazol, la nitrofurantoína y la vancomicina y uno a la rifampicina. En el caso de los cinco aislamientos de *Enterococcus durans*, cuatro fueron resistentes al co-trimoxazol y a la rifampicina, dos a la nitrofurantína, gentamicina, ciprofloxacina y tetraciclina y uno al meropenem. El único aislamiento de *Enterococcus faecalis* fue resistente a la tetraciclina y el meropenem. Por último, en los nueve aislamientos de *Enterococcus faecium* seis mostraron resistencia a la kanamicina, cuatro a la rifampicina, tres al meropenem y a la gentamicina y dos al co-trimoxazol.

En el caso de los aislamientos que no pertenecen al género *Enterococcus* spp se encontró un alto nivel de resistencia, a excepción del aislamiento de *Aerococcus viridans* el cual fue susceptible a todos los antibióticos. El aislamiento de *Weissella confusa* mostró resistencia simultánea a penicilina, vancomicina, rifampicina, nitrofurantína y cotrimoxazol. Así mismo, el aislamiento de *Leuconoctoc lactis* mostró resistencia a imipenem, gentamicina, meropenem, vancomicina, nitrofurantoína y co-trimoxazol. De los cuatro aislamientos de *Weissella cibaria* todos fueron resistentes a co-trimoxazol, nitrofurantína y vancomicina, dos resistentes a rifampicina, uno resistente a penicilina y uno resistente a ampicilina.

Adicionalmente, se observaron con frecuencia patrones de resistencia muy particulares. Por ejemplo en 5 aislamientos (m10-1, m15-1, m15-2 y m16-2) y en la cepa control se observó resistencia simultánea a la gentamicina y la kanamicina. También se observó resistencia simultánea a la penicilina y la ampicilina en la cepa m 24-3. Por último se observó resistencia simultánea a co-trimoxazol y nitrofurantoína en 13 cepas (m17-1, m19-1, m20-3, m22-1, m22-2, m23-2, m23-3, m24-3, m25-2, m26-1, m26-2, m28-1V, m30-2) (figura 12). . Adicionalmente, 11 de los 13 aislamientos anteriores (m17-1, m19-1, m20-3, m22-1, m23-2, m23-3, m24-3, m26-1, m26-2, m28-1V, m30-2) no solo mostraron resistencia al co-trimoxazol y nitrofurantoína, sino que además mostraron resistencia a la vancomicina.



**Figura 12:** cepa con resistencia simultánea a co-trimoxazol y nitrofurantoína

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Muestreo y aislamiento

Se observaron diferencias significativas en los recuentos en agar enterococcosel dependiendo de la procedencia de la ensalada. En general los recuentos de las ensaladas procedentes de almacenes de cadena y restaurante mostraron recuentos más bajos que las muestras que provenían de plazas de mercado y otro tipo de establecimientos (almacenes de barrio, negocios callejeros). En el caso de los almacenes de cadena no se pudo observar la preparación de las ensaladas, pero si se observó que todas las muestras se encontraban bajo condiciones de refrigeración. Lo anterior puede estar relacionado con los bajos recuentos encontrados en las ensaladas de esta categoría. En contraste, en los establecimientos de la categoría “otro” y en las plazas de mercado ninguna de las ensaladas se encontraba refrigerada. En la mayoría de restaurantes se observó que los operarios contaban con la dotación adecuada como gorros y tapabocas.

En el 93% de la muestras se evidenció crecimiento en el agar enterococcosel. Sin embargo como se comprobó en el presente estudio, este medio de cultivo no es suficientemente selectivo y puede permitir el crecimiento de otros géneros de bacterias, especialmente del grupo de bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas pueden encontrarse en varios tipos de plantas, frutas vegetales y en ensaladas mínimamente procesadas. En este último tipo de alimentos se ha encontrado a *Leuconostoc* spp como el género dentro de las bacterias ácido lácticas con mayor prevalencia, en ocasiones relacionado con deterioro (Morris, 1996). La



selectividad del medio enterococcosel se encuentra relacionada con la presencia de bilis de buey y azida sódica que permiten la inhibición de microorganismos gram negativos (Europe, 2009). La capacidad de *Enterococcus* spp para hidrolizar la esculina y formar esculetina y glucosa permite su diferenciación en el medio Enterococcosel. La esculetina reacciona con el citrato férrico del medio formando un complejo marrón a negro que permite identificar presuntas colonias de *Enterococcus* spp (Europe, 2009). Sin embargo, los géneros de bacterias ácido lácticas *Leuconostoc*, *Weissella* y *Aerococcus*, que se encontraron en el presente estudio, también hidrolizan la esculina lo que explica la presencia de estas bacterias en los aislamientos estudiados. Con el fin de mejorar la selectividad del medio se propone realizar una prueba de crecimiento a 10°C ya que, a diferencia de *Enterococcus* spp, géneros como *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* y *Aerococcus* no crecen a esta temperatura (Gilmore, 2002). Los géneros *Weissella* y *Leuconostoc* son variables respecto a esta característica, es decir que 16% a 49% podrían crecer a esta temperatura (Gilmore, 2002). Por lo anterior, se recomendaría realizar adicionalmente una prueba para la detección de la enzima pirrolidoniil arilamidasa en caldo de cultivo con L-pirrolidoniil-β-naftilamida (PYR). Como resultado de la hidrólisis de PYR se produce β-naftilamida que puede ser detectada mediante el colorante N,N-dimetilaminocinnamaldehído formando un complejo color rojo (Koneman & Winn, 2008). Esta prueba es positiva para el caso de *Enterococcus* spp y negativa para *Leuconostoc* y *Weissella* lo que permitiría descartar estos géneros. Adicionalmente, se recomendaría realizar la pruebas propuestas en la metodología (formación de tétradas, producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa y crecimiento a 45°C, pH 4.4 y pH9.6) con el fin de confirmar el diagnóstico.

## 5.2. Identificación molecular y clásica

Luego de la secuenciación del gen 16S rRNA y del análisis bioinformático se obtuvieron diferentes especies del género *Enterococcus* spp como *Enterococcus faecium* (29%), *Enterococcus durans* (16.1%), *Enterococcus mundtii* (9.7%), *Enterococcus faecalis* (3.2%), *Enterococcus gallinarum* (3.2%) y *Enterococcus hermanniensis* (3.2%). De las especies anteriores se conoce que *Enterococcus mundtii* es una bacteria asociada con plantas que posee un pigmento ligeramente amarillo (Devriese et al., 2006). Esta característica fue evidenciada especialmente en uno de los 3 aislamientos obtenidos (m15-2). De las otras especies obtenidas *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus durans* se encuentran con mayor frecuencia en el intestino de humanos y animales sin embargo también pueden ser aisladas de plantas y vegetales (Devriese et al., 2006). *Enterococcus gallinarum* se encuentra con una

menor frecuencia en aislamientos clínicos y se conoce que esta especie posee resistencia intrínseca de bajo nivel a la vancomicina por la presencia de los genes van-C1 (Patel, 2003). Esta resistencia intrínseca no fue evidenciada en el aislamiento de *Enterococcus gallinarum*, donde éste fue susceptible a la vancomicina y en general a todos los antibióticos evaluados. *Enterococcus hermanniensis* es una especie relativamente nueva y poco estudiada que fue reportada por primera vez en cárnicos empacados en atmósfera modificada (Koort, Coenye, Vandamme, Sukura, & Björkroth, 2004).

En estudios anteriores se ha encontrado diferencias significativas en el número y abundancia de especies de *Enterococcus* dependiendo del tipo de muestra de origen (cárnicos, frutas, vegetales, agua, suelo y muestras clínicas). Gomes et al encontraron las especies *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* asociadas con mayor frecuencia a alimentos de origen animal como cárnicos y productos lácteos. En el caso de vegetales, la especie hallada con mayor frecuencia fue *Enterococcus casseliflavus*. Otros estudios muestran a *Enterococcus mundtii* (Tejedor et al., 2009) y *Enterococcus casseliflavus* (McGowan, Jackson, Barrett, Heott, & Fedorka, 2006) como las especies con mayor prevalencia en muestras de vegetales. Lo anterior no es del todo consistente con lo encontrado en este estudio, donde la especie aislada con mayor frecuencia fue *Enterococcus faecium* a pesar de haber analizado muestras de origen vegetal. En contraste, en estudios en lechuga (Ronconi, Merino, & Fernández, 2002) y otros vegetales (Abriouel et al., 2008) *Enterococcus faecium* ha sido aislada con mayor frecuencia siendo consistente con el presente estudio. Otras especies reportadas en muestra de vegetales en menor frecuencia han sido *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus sacharolyticus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus malodoratus* (Abriouel et al., 2008; Ronconi et al., 2002; Tejedor et al., 2009) de las cuales *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus mundtii* fueron encontradas también en el presente estudio. Únicamente de *Enterococcus hermanniensis* no se encontró en reportes previos en alimentos de origen vegetal.

Cuatro de los aislamientos de *Enterococcus* spp no pudieron ser identificados hasta especie mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Lo anterior se debe a que identificación genotípica usando los genes 16S y 23S es precisa para la identificación del género, pero no permite diferenciar con suficiente exactitud entre especies de *Enterococcus*. Por ejemplo

*Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus* poseen un 98% de homología en la región 16S (Claesson, 2010; Ogier & Serror, 2008). Algunos métodos moleculares que permitirían discriminar hasta especie con mayor exactitud son la amplificación por PCR de los espaciadores intergénicos de rRNA o la amplificación de alguno de los genes *ddl*, *van*, *ace* y *sodA* (Ogier & Serror, 2008). Otra alternativa podría ser utilizar una combinación de técnicas moleculares y clásicas. La secuenciación del gen 16S rRNA permitiría clasificar hasta género y en algunos casos hasta especie y mediante pruebas clásicas de crecimiento y de azúcares se podría confirmar el género y obtener una aproximación de la especie en los casos donde no se obtuvo información mediante la técnica molecular.

Además de los aislamientos de *Enterococcus* spp también se encontraron otros género diferentes como *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Leuconostoc lactis* y *Aerococcus viridans*. Los géneros anteriores al igual que *Enterococcus* spp son cocos gram positivos y pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas. Su aislamiento pudo deberse a la baja selectividad del medio enterococcosel, a la cercanía filogenética y las similitudes fenotípicas de estos grupos (Garrity, 2005).

Las pruebas que se realizaron a los aislamientos para diferenciar *Enterococcus* spp de otros géneros de bacterias ácido lácticas fueron: formación de tétradas, producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa y crecimiento en BHI a 45°C, pH 4.4 y pH9.6 (ANEXO 2). Siguiendo esta metodología se esperaba que los aislamientos de *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* y *Leuconostoc lactis* fueran descartados al realizar las pruebas de crecimiento a 45°C y pH 9,6 al no obtener crecimiento en los tubos de BHI. Sin embargo, se han reportado cepas que pueden crecer hasta 45°C lo que pudo causar un resultado erróneo (Garrity, 2005). Adicionalmente, al tener un metabolismo heterofermentativo se esperaba observar producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa en los aislamientos de estos dos géneros, lo que no fue evidenciado. Siguiendo la misma metodología, *Aerococcus viridans* debió ser descartado por medio de las prueba de formación de tétradas, crecimiento a 45°C y pH4.4, ya que a diferencia de *Enterococcus* spp, *Aerococcus viridans* si forma tétradas y no crece a 45°C ni pH4.4 (Salminen et al., 2004). Lo anterior sugiere que las pruebas elegidas no permitieron discriminar con suficiente exactitud aislamientos de *Enterococcus* spp de otras bacterias ácido lácticas. Estos resultados pueden deberse a que en el caso de métodos clásicos existe variabilidad en la expresión de características fenotípicas y además la interpretación de las pruebas fenotípicas puede llegar a

ser subjetiva y con reproducibilidad limitada (Claesson, 2010). Con el fin de sobrellevar estos obstáculos se recomendaría realizar pruebas adicionales como crecimiento a 10°C y producción de pirrolidonil arilamidasa (PYR) como se propuso anteriormente.

Se obtuvieron dos especies del género *Weissella*; *Weissella cibaria* y *Weissella confusa*. El hábitat de este género de bacterias es variable pero las dos especies aisladas se encuentran principalmente asociadas a alimentos fermentados de origen vegetal. Otras especies se encuentran con frecuencia en productos cárnicos (Garrity, 2005). Estas bacterias han sido encontradas en muestras clínicas de origen animal y humano y se han reportado casos de bacteremia (Harlan, Kempker, Parekh, Burd, & Kuhar, 2011; Kumar et al., 2011) y endocarditis (Flaherty et al., 2003) causadas por *Weissella confusa*. Las bacterias del género *Weissella* presentan resistencia intrínseca a la vancomicina (Garrity, 2005), lo que explica el por qué en el presente estudio todos los aislamientos de este género presentaron resistencia a este antibiótico.

*Leuconostoc lactis* es una bacteria importante a nivel industrial donde ha sido utilizada en la fermentación de alimentos. Este género presenta resistencia intrínseca a la vancomicina, lo que concuerda con los resultados de resistencia obtenidos en el único aislamiento de *Leuconostoc lactis* en el presente estudio. Esta especie no se encuentra ampliamente distribuida, los aislamientos registrados son pocos y principalmente a partir de productos lácteos (Garrity, 2005).

*Aerococcus viridans* se encuentra en el aire, polvo, vegetación, fuentes marinas y salmueras de carnes curadas. Puede encontrarse en pequeñas cantidades como flora nativa en el tracto respiratorio superior y en piel. *Aerococcus viridans* se ha asociado con infecciones en humanos como endocarditis, infecciones de tracto urinario, artritis séptica y meningitis infantil (Garrity, 2005).

### 5.3. Resistencia a antibióticos

El tratamiento de elección en el caso de infecciones causadas por *Enterococcus* spp consiste en la combinación de un aminoglucósido con un antibiótico que inhiba la síntesis de pared celular como la ampicilina, la penicilina o la vancomicina (Shepard & Gilmore, 2002). Por lo anterior la resistencia a estos antibióticos en *Enterococcus* spp podría llegar a ser más preocupante, en

especial si se presenta en las especies que poseen mayor capacidad para causar enfermedad en humanos; *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

En el caso de los aminoglucósidos el mecanismo de resistencia consiste en la presencia de enzimas (fosfotransferasas y acetil transferasas) que modifican el antibiótico impidiendo la unión de éste a las subunidades 30S y 50S del ribosoma (Klare et al., 2003). Los genes *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aac(6')-Ie* podrían encontrarse implicados en la resistencia a aminoglucósidos de las cepas aisladas (Klare et al., 2003). Una cepa de *Enterococcus mundtii* mostró resistencia simultánea a amikacina, kanamicina y gentamicina, por lo que podría proponerse que el gen involucrado es *aac(6')-Ie* ya que este confiere resistencia simultánea a todos los aminoglucósidos, excepto la estreptomicina (Klare et al., 2003). Tres cepas de *Enterococcus faecium* mostraron resistencia simultánea a la gentamicina y la kanamicina (pero no a amikacina). Los genes *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* confieren resistencia simultánea a gentamicina, kanamicina y otros aminoglucósidos (a excepción de la amikacina). Por lo anterior algunos de estos genes podrían encontrarse involucrados en la resistencia simultánea a kanamicina y gentamicina en estos tres aislamientos de *Enterococcus faecium* (Klare et al., 2003). También se registró resistencia a la gentamicina en dos aislamientos de *Enterococcus durans* y uno de *Leuconostoc lactis*.

La resistencia a los  $\beta$ -lactámicos ampicilina y penicilina fue baja. Únicamente un aislamiento de *Enterococcus faecium* fue resistente a la ampicilina, un aislamiento de *Weissella cibaria* presentó resistencia simultánea a la ampicilina y la penicilina y un aislamiento de *Weissella confusa* presentó resistencia a la penicilina. El mecanismo de resistencia a estos antibióticos en *Enterococcus* spp consiste en la producción de proteínas de unión a penicilina modificadas codificadas por el gen *pbp5* (Klare et al., 2003). Otro mecanismo adquirido a partir de *Staphylococcus* consiste en la producción de  $\beta$ -lactamasas que inactivan el antibiótico y que se encuentran codificadas por el gen *blaZ* (Klare et al., 2003).

Respecto a la resistencia a antibióticos en *Enterococcus* spp, la resistencia a la vancomicina es una de las mayores preocupaciones a nivel mundial, debido a que éste antibiótico es una de las últimas alternativas terapéuticas en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria (Patel, 2003). En el presente estudio se encontró un número significativo de aislamientos con resistencia a la vancomicina; cuatro aislamientos de *Weissella cibaria*, un aislamiento de

*Weissella confusa*, cuatro aislamientos de *Enterococcus* cuya especie no pudo ser determinada, un aislamiento de *Enterococcus mundtii* y un aislamiento de *Leuconostoc lactis*. Sin embargo, de estos aislamientos se conoce que las bacterias de los géneros *Weissella* y *Leuconostoc* son intrínsecamente resistentes a la vancomicina. *Enterococcus mundtii* pertenece al grupo de especies de *Enterococcus* que posee resistencia a altas concentraciones de vancomicina y teicoplanina mediada por el gen *vanA* (Patel, 2003). Este gen se encuentra en el elemento transferible Tn1546, por lo que podría pasar a otras especies de *Enterococcus* u otros géneros de cocos gram positivos, contribuyendo a la dispersión de genes de resistencia a la vancomicina en el ambiente (Klare et al., 2003; Patel, 2003). Respecto a los aislamientos de *Enterococcus* cuya especie no pudo ser identificada, no se puede concluir sobre el carácter intrínseco o adquirido de la resistencia a vancomicina.

Además de los antibióticos que constituyen la primera alternativa terapéutica en el tratamiento de infecciones causadas por *Enterococcus* spp, se evaluó la resistencia a otros antibióticos como el co-trimoxazol, la nitrofurantína, la rifampicina, la tetraciclina y la ciprofloxacina.

A pesar de no ser el tratamiento de elección en infecciones causadas por *Enterococcus* spp el cotrimoxazol puede ser utilizado eventualmente en el tratamiento de infecciones urinarias. El co-trimoxazol inhibe la enzima dihidrofolato reductasa interfiriendo con la síntesis del ácido fólico y la producción de nucleótidos, en especial la timina (Claesson, 2010). La resistencia al co-trimoxazol puede darse por una baja concentración intracelular del antibiótico (debida a los cambios en la permeabilidad de la membrana y al flujo activo hacia el exterior de la célula) y por la alteración de en la enzima dihidrofolato reductasa. En organismos gram positivos se conocen cuatro genes involucrados en la producción de enzimas dihidrofolato reductasa modificadas; *dfrA*, *dfrD*, *dfrG* y *dfrF* (Cattoir, Huynh, Bourdon, Auzou, & Leclercq, 2009). En el presente estudio dos de los aislamientos de *Enterococcus faecium*, cuatro aislamientos de *Enterococcus durans*, cuatro aislamientos de *Enterococcus* spp, cuatro aislamientos de *Weissella cibaria*, un aislamiento de *Enterococcus mundtii*, un aislamiento de *Weissella confusa* y un aislamiento de *Leuconostoc lactis* presentaron resistencia al co-trimoxazol. Adicionalmente se observó con frecuencia la resistencia simultánea a co-trimoxazol, nitrofurantoína y vancomicina. La alta resistencia a co-trimoxazol en cepas resistentes a vancomicina fue reportado en un estudio previo, encontrando relación de los genes *vanB* con *dfrF* y *vanA* con *dfrG* (Cattoir et al., 2009).

La nitrofurantoína fue el segundo antibiótico en el que se encontró mayor número de aislamientos resistentes. Se observaron dos aislamientos de *Enterococcus durans*, cuatro aislamientos de *Enterococcus* spp, cuatro aislamientos de *Weissella cibaria*, un aislamiento de *Enterococcus mundtii*, un aislamiento de *Weissella confusa* y un aislamiento de *Leuconostoc lactis* con resistencia a la nitrofurantoína. El mecanismo de acción de este antibiótico consiste en la reducción de la nitrofurantoína por la nitrofurano reductasa a un intermediario que ataca las proteínas ribosomales, el DNA y el metabolismo del piruvato. La resistencia a este antibiótico se produce por la inhibición de la nitrofurano reductasa y los genes que pueden estar implicados son *nfsA* y *nfsB* (Martinez & Sánchez, 2007). Zhanel et al proponen la nitrofurantoína como una alternativa para el tratamiento de *Enterococcus* spp resistentes a la vancomicina. Sin embargo, en el presente estudio se encontraron cepas con resistencia simultánea a la vancomicina y a la nitrofurantína (Zhanel, Hoban, & Karlowsky, 2001).

La rifampicina bloquea la elongación de mRNA por medio de la unión a la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa dependiente de DNA (Martinez & Sánchez, 2007). La resistencia a estos antibióticos resulta de la mutación en el gen *rpoB* que se encuentra involucrado en la síntesis de la RNA polimerasa generando una modificación en la sub unidad  $\beta$  y en baja afinidad por el antibiótico (Huang, Jin, Ma, Chen, & Zhuang, 2002). En el presente estudio se encontró resistencia a la rifampicina en cuatro aislamientos de *Enterococcus faecium*, cuatro aislamientos de *Enterococcus durans*, un aislamiento de *Enterococcus* spp, dos aislamientos de *Weissella cibaria* y un aislamiento de *Weissella confusa*.

La resistencia a la tetraciclina se presentó en pocos aislamientos; uno de *Enterococcus faecalis* y dos de *Enterococcus durans*. La detección de *Enterococcus* spp con resistencia a la tetraciclina es frecuente debido a la eficiencia en la transferencia de genes via plásmidos conjugativos y transposones. La resistencia a este antibiótico es conferida por los genes *tetM*, *tetL* y *tetS*.

## 6. CONCLUSIONES

- Las bacterias ácido lácticas, entre las cuales se encuentra *Enterococcus* spp, hacen parte de la microbiota normal de los vegetales y por lo tanto de las ensaladas. Sin embargo, se recomienda la implementación de buenas prácticas agrícolas y de manufactura con el fin de evitar el deterioro que algunos de estos géneros pueden causar en el alimento y la dispersión de bacterias resistentes en el ambiente.
- En ensaladas existe una alta prevalencia de bacterias del género *Enterococcus* spp y otros géneros de bacterias ácido lácticas con resistencia intrínseca y adquirida a vancomicina y otros antibióticos. Por lo anterior, es necesario esclarecer el papel que pueden jugar los alimentos como ruta de transmisión de microorganismos resistentes antibióticos, y cómo pueden estar involucrados en el incremento de infecciones a nivel hospitalario y en la comunidad.
- Dado la importancia que ha adquirido el género *Enterococcus* spp a nivel clínico, ambiental y en alimentos es esencial el desarrollo de técnicas estandarizadas que permitan un aislamiento más selectivo y una identificación más exacta.
- Las técnicas clásicas permitieron obtener una buena aproximación en el aislamiento e identificación del género *Enterococcus* spp. Sin embargo, se recomienda complementar la identificación con técnicas moleculares que permitan confirmar los resultados obtenidos mediante identificación clásica del género y obtener información acerca de la especie.
- La secuenciación de la región 16S rRNA permitió realizar la identificación molecular del género *Enterococcus* spp. Sin embargo, este no es el mejor blanco para discriminar entre especies de *Enterococcus* debido a la alta similitud en esta región. Por lo anterior, para obtener una mejor aproximación de la especie se recomendaría utilizar otros genes como el *sodA*.
- Con el fin de determinar el potencial patogénico de las cepas aisladas es necesario estudiar la presencia de factores de virulencia y comparar con los perfiles de cepas de origen clínico.





## 7. ANEXOS

### 7.1. ANEXO 1: Características y origen de las muestras

Cód. Muestra	Tipo de establecimiento	Zona	Ingredientes	Tipo de ensalada	Observaciones	Recuento(UFC/gr)
m-1	Almacén de cadena 1	Occidente	-Repollo blanco -Repollo morado -Zanahoria rallada (Ensalada Alemana)	Ensalada lista para el consumo	-La muestra fue analizada 8 días antes de la fecha de vencimiento que indicaba el empaque. - Se encontraba bajo refrigeración y en buenas condiciones de almacenamiento. Sin embargo, la ensalada no se encontraba fresca al momento de procesarla.	38 X 10 <sup>2</sup>
m-2	Almacén de cadena 2	Occidente	-Espinaca -Zanahoria	Barra de ensaladas	- La ensalada se encontraba fresca, bajo condiciones de refrigeración y protegida del ambiente. -Con vinagre (o algo similar)	80 X 10 <sup>1</sup>
m-3	Almacén de cadena 2	Occidente	-Lechuga -Espinaca	Barra de ensaladas	- La ensalada se encontraba fresca, bajo condiciones de refrigeración y protegida del ambiente. -Con vinagre (o algo similar)	20
m-4	Restaurante 1	Centro	-Cebolla -Tomate	Barra de ensaladas	-Sin refrigeración	20
m-5	Restaurante 2	Centro	-Lechuga -Tomate	Ensalada lista para el consumo	- La ensalada se encontraba fresca y fue preparada al momento de comprarla. - Operarios contaban con dotación adecuada.	85 X 10 <sup>1</sup>
m-6	Restaurante 3	Centro	-Lechuga -Zanahoria -Cebolla	Ensalada para almuerzo	- La cocina se encontraba cerca a la salida del restaurante, sin separación adecuada entre el interior y el exterior. - La ensalada no se encontraba bajo refrigeración y estaba cerca a la estufa. - Personal con gorro, sin tapabocas.	56 X 10 <sup>1</sup>
m-7	Restaurante 4	Centro	-Remolacha	Ensalada para almuerzo	-Personal con gorro. - No se pudo observar la preparación y almacenamiento de la muestra. - Se observaron paños para la limpieza en condiciones inadecuadas, que podrían generar contaminación cruzada.	17 X 10 <sup>4</sup>
m-8	Restaurante 4	Centro	-Pimentón	Ensalada	-Personal con gorro	46 X 10 <sup>2</sup>

			-Espinaca -Cebolla	para almuerzo	- No se pudo observar la preparación y almacenamiento.	
m-9	Restaurante 5	Centro	-Cebolla -Tomate	Ensalada para almuerzo	-Personal con gorro - No se pudo observar la preparación y almacenamiento.	51 X 10 <sup>1</sup>
m-10	Restaurante 6	Centro	-Lechuga -Tomate -Pepino	Ensalada lista para el consumo	-Personal con guantes y gorro. La persona encargada de la preparación prestó atención a la frescura de los ingredientes antes de preparar la ensalada. - Ingredientes bajo refrigeración. - La ensalada fue preparada al momento de la compra.	17 X 10 <sup>1</sup>
m-11	Restaurante 7	Occidente	-Cebolla -Zanahoria -Lechuga -Tomate	Ensalada para almuerzo	-Ensalada para almuerzo previamente preparada, almacenada bajo refrigeración. - La ensalada no se encontraba fresca. -Personal con gorro.	68 X 10 <sup>4</sup>
m-12	Almacén de cadena 3	Norte	-Pepino -Cebolla - Tomate -Zanahoria -Pimentón	Barra de ensaladas	- En condiciones de refrigeración - Expuesto al ambiente. - La ensalada se encontraba fresca. - Con vinagre (o algo similar)	Ausencia
m-13	Almacén de cadena 3	Norte	-Tomate -Espinaca -Pepino	Barra de ensaladas	- En condiciones de refrigeración - Expuesto al ambiente. - La ensalada se encontraba fresca.	10
m-14	Restaurante 8	Norte	-Arveja -Raíces chinas	Barra de ensaladas	-La ensalada se encontraba fresca. No se encontraba bajo condiciones de refrigeración y expuesta al ambiente.	Ausencia
m-15	Restaurante 8	Norte	-Zanahoria -Repollo verde -Repollo morado	Barra de ensaladas	-La ensalada se encontraba fresca. No se encontraba bajo condiciones de refrigeración y expuesta al ambiente.	20 X 10 <sup>2</sup>
m-16	Restaurante 9	Centro	-Lechuga - Pimentón -Cilantro -Cebolla	Ensalada para almuerzo	- Personal con dotación adecuada -Ensalada permanece sin refrigeración mientras se sirven los almuerzos, lo que puede ser un periodo de tiempo significativo.	14 X 10 <sup>3</sup>
m-17	Restaurante 10	Centro	-Tomate -Cebolla -Zanahoria	Ensalada para almuerzo	-No se pudo observar las condiciones de preparación y almacenamiento	98 X 10 <sup>1</sup>
m-18	Otro 1	Occidente	-Lechuga -Zanahoria	Ensalada lista para el	-La ensalada se exhibe en recipientes que no se encuentran refrigerados y posteriormente se empacan en bolsas dependiendo de la elección del consumidor.	17 X 10 <sup>5</sup>

				consumo	- Los pisos y paredes del local no son higiénicos -El personal encargado de distribuir la ensalada cuenta con guantes pero no con gorro y tapabocas.	
m-19	Otro 1	Occidente	-Tomate -Cebolla	Ensalada lista para el consumo	-La ensalada se exhibe en recipientes que no se encuentran refrigerados y posteriormente se empacan en bolsas dependiendo de la elección del consumidor. - Los pisos y paredes del local no son higiénicos -El personal encargado de distribuir la ensalada cuenta con guantes pero no con gorro y tapabocas.	16 X 10 <sup>6</sup>
m-20	Otro 1	Occidente	-Lechuga -Tomate -Cebolla	Ensalada lista para el consumo	-La ensalada se exhibe en recipientes que no se encuentran refrigerados y posteriormente se empacan en bolsas dependiendo de la elección del consumidor. - Los pisos y paredes del local no son higiénicos -El personal encargado de distribuir la ensalada cuenta con guantes pero no con gorro y tapabocas.	15 X 10 <sup>5</sup>
m-21	Plaza 1	Occidente	-Lechuga -Zanahoria -Pepino -Cebolla -Repollo morado -Cilantro -Rábano	Ensalada lista para el consumo	-La ensalada no se encontraba bajo refrigeración	17 X 10 <sup>4</sup>
m-22	Otro 2	Occidente	-Remolacha	Ensalada lista para el consumo	-La ensalada no se encontraba bajo refrigeración -El personal contaba con la dotación adecuada. -Los alrededores al local podrían representar un foco de insalubridad.	42 X 10 <sup>3</sup>
m-23	Otro 3	Occidente	-Lechuga -Zanahoria -Espinaca -Tomate -Pepino	Ensalada lista para el consumo	-La persona encargada de la distribución de las ensaladas no contaba con la dotación adecuada (sin bata, gorro, tapabocas y guantes). Adicionalmente tenía accesorios y maquillaje. -La ensalada no se encontraba bajo refrigeración	23 X 10 <sup>5</sup>
m-24	Restaurante 11	Occidente	-Cebolla -Tomate -Lechuga	Ensalada para almuerzo	-La cocina era demasiado pequeña y todos los enseres se encontraban amontonados pudiendo convertirse en un posible foco de contaminación cruzada.	12 X 10 <sup>2</sup>
m-25	Restaurante 12	Occidente	-Cebolla -Zanahoria -Lechuga	Ensalada para almuerzo	-Personal con dotación adecuada	39 X 10 <sup>3</sup>
m-26	Plaza 2	Centro	-Lechuga	Ensalada	-No se encontraba bajo refrigeración	62 X 10 <sup>4</sup>

			-Espinaca	lista para el consumo	-No tenia apariencia fresca	
m-27	Plaza 2	Centro	-Lechuga -Repollo morado -Zanahoria -Espinaca	Ensalada lista para el consumo	-No se encontraba bajo refrigeración	31 X 10 <sup>5</sup>
m-28	Plaza 2	Centro	-Repollo -Zanahoria -Cilantro -Cebolla	Ensalada lista para el consumo	-No se encontraba bajo refrigeración	33 X 10 <sup>6</sup>
m-29	Plaza 2	Centro	Lechuga cortada en trozos para ensalada	Ensalada lista para el consumo	-No se encontraba bajo refrigeración -No tenia apariencia fresca	44 X 10 <sup>4</sup>
m-30	Plaza 2	Centro	Repollo cortado en trozos para ensalada	Ensalada lista para el consumo	-No se encontraba bajo refrigeración	23 X 10 <sup>5</sup>

7.2. ANEXO 2: Características diferenciales de bacterias ácido lácticas

Característica	Bacilos		Cocos							
	<i>Carnob.</i>	<i>Lacto.</i>	<i>Aeroco.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc. Vagoc.</i>	<i>Leucon. Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetrage.</i>	<i>Weissella<sup>a</sup></i>
Formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO <sub>2</sub> a partir de glucosa <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Crecimiento a 6,5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Crecimiento 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	+
Crecimiento pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-

+,positivo; -, negativo;±, respuesta varía entre especies, ND, no determinado

<sup>a</sup> algunas cepas pueden tener forma de bacilo

<sup>b</sup> Test de glucosa homo- o heterofermentación de glucosa: negativo y positivo denotan homofermentativo y heterofermentativo respectivamente

<sup>c</sup> Pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> pueden producirse dependiendo del medio

(Salminen et al., 2004)

7.3. ANEXO 3: Resultados de la identificación de los aislamientos por técnicas clásicas

Muestra	Aislamiento	Catalasa	Morfología microscópica	Morfología macroscópica en agar Sangre	Morfología macroscópica en agar SPC	45°C	pH 4.4	pH 9.9	Tetradas	CO <sub>2</sub>	Cod. Cepario
Muestra 1	m1-1	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
	m1-2	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
	m1-3	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
Muestra 2	m2-1	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, planas, circulares, bordes redondeados, γ hemolisis.	---	<u>NO</u>					
	m2-2	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
	m2-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, γ hemolisis.	---	<u>NO</u>					
Muestra 3	m3-1	-	Cocos Gram (+)	---	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m3-2	-	Cocos Gram (+)	---	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
Muestra 4	m4-2		<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
Muestra 5	m5-1	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
	m5-2	-	Cocos Gram (+)	---	---	<u>NO</u>					
	m5-3	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
Muestra 6	m6-1	-	Cocos Gram (+) alargados	---	---	<u>NO</u>					
	m6-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, puntiformes, γ hemolisis.	---	<u>NO</u>					
Muestra 7	m7-1	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						
	m7-2	-	<u>Bacilos Gram (+)</u>	---	---						

	m7-3	-	<b>Bacilos Gram (+)</b>	---	---						
<b>Muestra 8</b>	m8-1	-	Cocos Gram (+)	---	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m8-2	-	<b>Bacilos Gram (+)</b>	---	---						
<b>Muestra 9</b>	m9-1	-	<b>Bacilos Gram (+)</b>	---	---						
	m9-2	-	Cocos Gram (+)	---	---	<b>NO</b>					
<b>Muestra 10</b>	m10-1	-	Cocos Gram (+)	---	---	SI	SI	SI	NO	NO	
<b>Muestra 11</b>	m11-1V	-	Cocos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, puntiformes, planas, $\alpha$ hemolisis.	---	SI	<b>NO</b>	SI	NO	NO	
	m11-1B	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, convexas, circulares, bordes redondeados, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, convexas	SI	SI	SI	NO	NO	
	m11-2		Bacilos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	---						
	m11-3		Bacilos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, puntiformes, $\alpha$ hemolisis.	---						
<b>Muestra 13</b>	m13-1	No creció en Agar Sangre									
<b>Muestra 15</b>	m15-1	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, planas, circulares, bordes redondeados, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, planas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m15-2	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, circulares, bordes redondeados, $\gamma$ hemolisis.	Colonias amarillas, puntiformes, circulares, borde redondeado.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m15-3A	-	Cocos Gram (+) un poco alargados	Colonias blancas, grandes, planas, circulares, bordes redondeados, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, puntiformes, circulares, borde redondeado, planas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m15-3B	-	Cocos Gram (+)	---	---	SI	SI	SI	NO	NO	
<b>Muestra 16</b>	m16-1	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas y medianas.	---	SI	SI	SI	NO	NO	
	m16-2	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas y medianas.	---	SI	SI	SI	NO	NO	
	m16-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas y	---	SI	SI	SI	NO	NO	



				medianas.							
<b>Muestra 17</b>	m17-1	-	Cocos Gram (+) un poco alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	SI	SI	SI	NO	NAR	
	m17-2	-	Cocos Gram (+) un poco alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
	m17-3	-	Cocos Gram (+) un poco alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
<b>Muestra 18</b>	m18-1	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
	m18-2	-	<b>Bacilos Gram (+)</b>	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis. s	---						
	m18-3	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
<b>Muestra 19</b>	m19-1	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias translucidas, puntiiformes, circulares, borde redondeado, planas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m19-2	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
	m19-3	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
<b>Muestra 20</b>	m20-1	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
	m20-2	-	<b>Bacilos Gram (+)</b>	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis. S	---						
	m20-3	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias traslucidas, puntiiformes, circulares, borde redondeado, planas.	SI	SI	SI	NO	NO	
<b>Muestra 21</b>	m21-1	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, planas, circulares, borde redondeado, $\alpha$ hemolisis.	Colonias blancas, puntiiformes, circulares, borde redondeado, planas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m21-2	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, planas, circulares, borde	---	SI	<b>NO</b>				

				redondeado, $\alpha$ hemolisis.							
	m21-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, planas, circulares, borde redondeado, $\alpha$ hemolisis.	---	SI			<b><u>SI</u></b>		
	m21-4	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, planas, circulares, borde redondeado, $\alpha$ hemolisis.	---	SI			<b><u>SI</u></b>		
<b>Muestra 22</b>	m22-1	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias translucidas, puntiformes, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NAR	
	m22-2	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, elevadas, circulares, bordes redondeados, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m22-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, medianas, planas, circulares, bordes redondeados, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, planas.	SI	SI	SI	NO	NO	
<b>Muestra 23</b>	m23-1	-	Cocos Gram(+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b><u>NO</u></b>					
	m23-2	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, puntiformes, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m23-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, puntiformes, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
<b>Muestra 24</b>	m24-1		<b><u>Bacilos Gram (+)</u></b>	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	---						
	m24-2	+	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, grandes	---						
	m24-3	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias translucidas, puntiformes, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	ROJO	
<b>Muestra 25</b>	m25-1	-	Cocos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiformes, $\alpha$ hemolisis.	---	<b><u>NO</u></b>					

	m25-2	-	Cocos Gram (+) muy pequeños	Colonias grandes, blancas	Colonias blancas, puntiformes, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m25-3		<b>Bacilos Gram (+)</b>	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiformes, $\alpha$ hemolisis.	---						
<b>Muestra 26</b>	m26-1	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias translucidas, puntiformes, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m26-2	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	Colonias blancas, puntiformes, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m26-3A	+	Cocos Gram (+)	Colonias amarillas, grandes, convexas.	---						
	m26-3B	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas	Colonias blancas, medianas, circulares, borde redondeado, elevadas.	SI	SI	SI	NO	NO	
	m26-3P		<b>Bacilos Gram (+)</b>	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	---						
<b>Muestra 27</b>	m27-1B	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas	---	SI	SI	SI	NO	NO	
	m27-1P	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
	m27-2B		<b>Bacilos Gram (+)</b>	---	---						
	m27-2P	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\gamma$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
	m27-3	+	Cocos Gram (+)	Colonias blancas y grandes	---	<b>NO</b>					
<b>Muestra 28</b>	m28-1B	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias blancas y medianas	---	SI	SI	SI	NO	NO	
	m28-1V	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiformes, $\alpha$ hemolisis.	Colonias translucidas, puntiformes, elevadas, borde redondeado	SI	SI	SI	NO	NO	
	m28-2	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas, grandes, planas, borde redondeado, $\alpha$ hemolisis.	---	<b>NO</b>					
	m28-3	-	Cocos gram (+)	Colonias translucidas,	---	<b>NO</b>					

			alargados	pequeñas, planas, puntiiformes, y hemolisis.							
<b>Muestra 29</b>	m29-1	-	Cocos Gram (+)	Colonias blancas y grandes	Colonias blancas, puntiiformes, planas, borde redondeado	SI	SI	SI	NO	NO	
	m29-2	-	Cocos Gram (+) alargados	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiiformes, y hemolisis.	---	<b><u>NO</u></b>					
	m29-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias grandes y blancas	---	SI	<b><u>NO</u></b>				
<b>Muestra 30</b>	m30-1	-	Cocos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, planas y puntiiformes, y hemolisis.	---	<b><u>NO</u></b>					
	m30-2	-	Cocos Gram (+) alargados y pequeños	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiiformes, y hemolisis.	Colonias translucidas, puntiiformes, planas, borde redondeado	SI	SI	SI	NO	NO	
	m30-3	-	Cocos Gram (+)	Colonias translucidas, pequeñas, planas, puntiiformes, y hemolisis.	---	<b><u>NO</u></b>					

7.4. ANEXO 4: Resultados identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA

<b>Código aislamiento</b>	<b>Resultado BLAST</b>
m3-1	<i>Enterococcus faecium</i>
m3-2	<i>Enterococcus faecium</i>
m8-1	<i>Enterococcus faecalis</i>
m10-1	<i>Enterococcus faecium</i>
m11-1B	<i>Enterococcus faecium</i>
m15-1	<i>Enterococcus faecium</i>
m15-2	<i>Enterococcus mundtii</i>
m15-3A	<i>Enterococcus gallinarum</i>
m15-3B	<i>Enterococcus faecium</i>
m16-1	<i>Enterococcus durans</i>
m16-2	<i>Enterococcus faecium</i>
m16-3	<i>Enterococcus faecium</i>
m17-1	<i>Weissella cibaria</i>
m19-1	<i>Weissella cibaria</i>
m20-3	<i>Weissella cibaria</i>
m21-1	<i>Aerococcus viridans</i>
m22-1	<i>Enterococcus spp.</i>
m22-2	<i>Enterococcus durans</i>
m22-3	<i>Enterococcus durans</i>
m23-2	<i>Leuconostoc lactis</i>
m23-3	<i>Enterococcus mundtii</i>
m24-3	<i>Weissella confusa</i>
m25-2	<i>Enterococcus durans</i>
m26-1	<i>Enterococcus sp</i>
m26-2	<i>Enterococcus sp</i>
m26-3B	<i>Enterococcus mundtii</i>
m27-1B	<i>Enterococcus durans</i>
m28-1V	<i>Weissella cibaria</i>
m28-1B	<i>Enterococcus faecium</i>
m29-1	<i>Enterococcus hermanniensis</i>
m30-2	<i>Enterococcus spp.</i>

7.5. ANEXO 5: Tabla para la interpretación de los diámetros de inhibición obtenidos por el método de difusión en agar

Antibiótico	Contenido del disco (µg)	Diámetro (mm)		
		Resistente ≤	Intermedio	Susceptible ≥
<b>Aminoglucósidos</b>				
Amikacina (J. Andrews, 2009) <sup>a</sup>	30	15	16-18	19
Gentamicina (J. Andrews, 2009) <sup>a</sup>	10	19	-	20
Kanamicina (J. Andrews, 2009) <sup>a</sup>	30	15	16-18	19
<b>Carbapenems</b>				
Imipenem (Jenny Andrews, 2011)	10	16	17-18	19
Meropenem (Jenny Andrews, 2011)	10	19	-	20
<b>Glicopéptidos</b>				
Vancomicina (Murray, 2007)	30	14	15-16	17
<b>Penicilinas</b>				
Ampicilina (Jenny Andrews, 2011)	10	19	-	20
Penicilina (Murray, 2007)	10	14	-	15
<b>Quinolonas</b>				
Ciprofloxacina (Murray, 2007)	5	15	16-20	21
<b>Otros</b>				
Co-trimoxazol (Jenny Andrews, 2011) <sup>b</sup>	1.25/23.75	16	17-19	20
Nitrofurantoina (Murray, 2007)	300	14	15-16	17
Rifampicina (Perú, 2002)	5	16	17-19	20
Tetraciclina (Murray, 2007)	30	14	15-18	19

<sup>a</sup>Se tomó como referencia los diámetros de inhibición propuestos para *Staphylococcus aureus*

<sup>b</sup>Se tomó como referencia los diámetros de inhibición propuestos para *Streptococcus pneumoniae*

7.6. ANEXO 6: Diámetros de inhibición obtenidos por el método de difusión en agar

Diámetros de inhibición (mm) y susceptibilidad a antibióticos													
Colonia	AK 30 µg	Amp 10 µg	CIP 5µg	CN 10 µg	F/M 300µg	IMI 10 µg	K 30 µg	MEM 10µg	P 10 µg	RA 5µg	TE 30 µg	SXT 1.25µg	Va 30 µg
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	<sup>10</sup> R	<sup>33</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>28</sup> S	<sup>43</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>18</sup> R	<sup>30</sup> S	<sup>25</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>11</sup> R
M 3-1	<sup>28</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>15</sup> R	<sup>26</sup> S	<sup>18</sup> S	<sup>43</sup> S	<sup>19</sup> S	<sup>19</sup> R	<sup>44</sup> S	<sup>18</sup> I	<sup>39</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>35</sup> S
M 3-2	<sup>25</sup> S	<sup>19</sup> R	<sup>18</sup> I	<sup>24</sup> S	<sup>21</sup> S	<sup>38</sup> S	<sup>18</sup> I	<sup>20</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>21</sup> S
M8-1	<sup>18</sup> I	<sup>22</sup> S	<sup>20</sup> I	<sup>21</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>39</sup> S	<sup>21</sup> S	<sup>19</sup> R	<sup>24</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>11</sup> R	<sup>25</sup> S	<sup>22</sup> S
M 10-1	<sup>18</sup> I	<sup>29</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>19</sup> R	<sup>22</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>28</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>11</sup> R	<sup>27</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>30</sup> S
M 11-1B	<sup>33</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>20</sup> I	<sup>29</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>40</sup> S	<sup>14</sup> R	<sup>19</sup> R	<sup>28</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>22</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>28</sup> S
M 15-1	<sup>24</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>16</sup> I	<sup>19</sup> R	<sup>23</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>16</sup> R	<sup>19</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>22</sup> S
M 15-2	<sup>12</sup> R	<sup>23</sup> S	<sup>22</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>24</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>15</sup> R	<sup>19</sup> R	<sup>29</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>29</sup> S
M 15-3A	<sup>17</sup> I	<sup>29</sup> S	<sup>25</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>44</sup> S	<sup>17</sup> I	<sup>28</sup> S	<sup>35</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>40</sup> S	<sup>23</sup> S
M 15-3B	<sup>18</sup> I	<sup>23</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>22</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>15</sup> R	<sup>21</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>20</sup> S
M 16-1	<sup>29</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>17</sup> I	<sup>21</sup> S	<sup>18</sup> S	<sup>35</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>31</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>21</sup> S

Colonia	AK 30 µg	Amp 10 µg	CIP 5µg	CN 10 µg	F/M 300µg	IMI 10 µg	K 30 µg	MEM 10µg	P 10 µg	RA 5µg	TE 30 µg	SXT 1.25µg	Va 30 µg
M 16-2	<sup>20</sup> S	<sup>33</sup> S	<sup>23</sup> S	<sup>18</sup> R	<sup>22</sup> S	<sup>41</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>30</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>27</sup> S	<sup>25</sup> S	<sup>23</sup> S
M 16-3	<sup>18</sup> I	<sup>33</sup> S	<sup>20</sup> I	<sup>20</sup> S	<sup>22</sup> S	<sup>42</sup> S	<sup>10</sup> R	<sup>28</sup> S	<sup>38</sup> S	<sup>16</sup> R	<sup>34</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>25</sup> S
M 17-1	<sup>29</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>17</sup> I	<sup>34</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>46</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>27</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>15</sup> R	<sup>22</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 19-1	<sup>36</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>48</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>35</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>21</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 20-3	<sup>33</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>20</sup> I	<sup>24</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>49</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>35</sup> S	<sup>9</sup> R	<sup>16</sup> R	<sup>20</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 21-1	<sup>22</sup> S	<sup>37</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>21</sup> S	<sup>18</sup> S	<sup>44</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>23</sup> S	<sup>35</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>24</sup> S
M 22-1	<sup>34</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>52</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>21</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 22-2	<sup>20</sup> S	<sup>28</sup> S	<sup>13</sup> R	<sup>22</sup> S	<sup>11</sup> R	<sup>39</sup> S	<sup>23</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>10</sup> R	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R	<sup>22</sup> S
M 22-3	<sup>17</sup> I	<sup>25</sup> S	<sup>23</sup> S	<sup>18</sup> R	<sup>16</sup> I	<sup>32</sup> S	<sup>19</sup> S	<sup>31</sup> S	<sup>27</sup> S	<sup>15</sup> R	<sup>0</sup> R	<sup>24</sup> S	<sup>19</sup> S
M 23-2	<sup>26</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>12</sup> R	<sup>0</sup> R	<sup>14</sup> R	<sup>16</sup> I	<sup>15</sup> R	<sup>24</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>17</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 23-3	<sup>28</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>25</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>44</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>23</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>9</sup> R
M 24-3	<sup>22</sup> S	<sup>18</sup> R	<sup>20</sup> I	<sup>21</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>27</sup> S	<sup>18</sup> I	<sup>21</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>15</sup> R	<sup>18</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 25-2	<sup>17</sup> I	<sup>24</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>18</sup> R	<sup>12</sup> R	<sup>34</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>22</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>24</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>21</sup> S



Colonia	AK 30 µg	Amp 10 µg	CIP 5µg	CN 10 µg	F/M 300µg	IMI 10 µg	K 30 µg	MEM 10µg	P 10 µg	RA 5µg	TE 30 µg	SXT 1.25µg	Va 30 µg
M 26-1	<sup>38</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>40</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>60</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>39</sup> S	<sup>31</sup> S	<sup>23</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 26-2	<sup>37</sup> S	<sup>33</sup> S	<sup>18</sup> I	<sup>36</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>50</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>27</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>12</sup> R	<sup>24</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 26-3B	<sup>21</sup> S	<sup>35</sup> S	---	<sup>23</sup> S	---	<sup>42</sup> S	<sup>24</sup> S	---	<sup>38</sup> S	---	<sup>36</sup> S	---	<sup>27</sup> S
M 27-1B	<sup>24</sup> S	<sup>35</sup> S	<sup>20</sup> I	<sup>28</sup> S	<sup>20</sup> S	<sup>49</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>13</sup> R	<sup>33</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>26</sup> S
M 28-1B	<sup>19</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>25</sup> S	<sup>22</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>40</sup> S	<sup>23</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>33</sup> S	<sup>10</sup> R	<sup>29</sup> S	<sup>27</sup> S	<sup>24</sup> S
M28-1V	<sup>29</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>32</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>48</sup> S	<sup>26</sup> S	<sup>22</sup> S	<sup>33</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>30</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R
M 29-1	<sup>28</sup> S	<sup>43</sup> S	<sup>24</sup> S	<sup>29</sup> S	<sup>17</sup> S	<sup>50</sup> S	<sup>32</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>50</sup> S	<sup>17</sup> I	<sup>36</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>35</sup> S
M 30-2	<sup>32</sup> S	<sup>30</sup> S	<sup>21</sup> S	<sup>36</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>44</sup> S	<sup>22</sup> S	<sup>33</sup> S	<sup>34</sup> S	<sup>19</sup> I	<sup>24</sup> S	<sup>0</sup> R	<sup>0</sup> R

## 8. REFERENCIAS

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, *123*, 121-129.

Abriouel, H., Omar, N. B., Molinos, A. C., López, R. L., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P., . . . Galvez, A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, *123*(1-2), 38-49. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067

Alanis, A. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? . *Archives of Medical Research*, *36*, 697-705.

Andrews, J. (2009). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*, 454–489.

Andrews, J. (2011). BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing (Version 10.2). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35-47.

Beuchat, L. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, *4*, 413–423.

Bryskier, A. (2005). *Antimicrobial Agents: antibacterials and antifungals*.

Castells, S., & Hernández, M. (2007). *Farmacología en enfermería*. Madrid, España:: Elsevier España S.A.

Cattoir, V., Huynh, T. M., Bourdon, N., Auzou, M., & Leclercq, R. (2009). Trimethoprim resistance genes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from France. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *34*(4), 390-392. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.06.013

Claesson, C. (2010). *Staphylococci and Enterococci: Studies on activity of antimicrobial agents and detection of genes involved in biofilm formation*. Linköping, Sweden: Linköping University

Devriese, L., Baele, M., & Butaye, P. (2006). The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes*, *4*, 163-174.

Eaton, T., & Gasson, M. (2001). Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* *67*(4), 1628–1635.

Europe, B. D. S. (2009). BD Enterococcosel Agar. *Instrucciones de uso-Medios en placa listos para usar*, from <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8767>

Facklam, R., Cravalho, M., & Texeiro, L. (2002). History Taxonomy, Biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In M. Gilmore (Ed.), *The*

*Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance* (pp. 1-54): American Society for Microbiology.

Fisher, K., Phillips, C., & McWatt, L. (2009). The use of an antimicrobial citrus vapour to reduce *Enterococcus* sp. on salad products. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1748–1754.

Flaherty, J. D., Levett, P. N., Dewhirst, F. E., Troe, T. E., Warren, J. R., & Johnson, S. (2003). Fatal Case of Endocarditis Due to *Weissella confusa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2237-2239. doi: 10.1128/jcm.41.5.2237-2239.2003

Garrity, G. M. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume Two, Part C The proteobacteria, from <http://www.myilibrary.com?id=133459>

Gilmore, M. S. (2002). *The enterococci : pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, DC: ASM Press.

Girafa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 163-171.

Gomes, B., Esteves, C., Palazzo, I., Darini, L., Sechi, L., Franco, B., & De Martinis, E. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25.

Harlan, N. P., Kempker, R. R., Parekh, S. M., Burd, E. M., & Kuhar, D. T. (2011). *Weissella confusa* bacteremia in a liver transplant patient with hepatic artery thrombosis. *Transplant Infectious Disease*, 13(3), 290-293. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00579.x

Heuer, O., Hammerum, A., Collignon, P., & Wegener, H. (2006). Human Health Hazard from Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Food. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 911-916.

Howeler, M., Ghiorse, W. C., & Walker, L. P. (2003). A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. *Journal of Microbiological Methods*, 54(1), 37-45. doi: 10.1016/s0167-7012(03)00006-x

Huang, H., Jin, Q., Ma, Y., Chen, X., & Zhuang, Y. (2002). Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in China. *Tuberculosis*, 82(2-3), 79-83. doi: 10.1054/tube.2002.0326

Ijabadeniyi, O. A., Debusho, L. K., Vanderlinde, M., & Buys, E. M. (2011). IRRIGATION WATER AS A POTENTIAL PREHARVEST SOURCE OF BACTERIAL CONTAMINATION OF VEGETABLES. *Journal of Food Safety*, 31(4), 452-461. doi: 10.1111/j.1745-4565.2011.00321.x

Klare, I., Konstabel, C., Badsubner, D., Werner, G., & Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium* *International Journal of Food Microbiology*, 88, 269-290.

Koneman, E. W., & Winn, W. C. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico : texto y atlas en color*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

- Koort, J., Coenye, T., Vandamme, P., Sukura, A., & Björkroth, J. (2004). *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(5), 1823-1827. doi: 10.1099/ijms.0.63112-0
- Kumar, A., Augustine, D., Sudhindran, S., Kurian, A. M., Dinesh, K. R., Karim, S., & Philip, R. (2011). *Weissella confusa*: a rare cause of vancomycin-resistant Gram-positive bacteraemia. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(10), 1539-1541. doi: 10.1099/jmm.0.027169-0
- Lawley, R., Curtis, L., & Davis, J. (2008). *The Food Safety Hazard Guidebook* RSC Publishing.
- Little, C., & Gillespie, I. (2008). Prepared salads and public health. *Journal of Applied Microbiology*, *105*, 1729–1743.
- Marion, K., Ferguson, H., & Webber, K. C. (2010). *Clinical Drug Therapy for Canadian Practice* (Second Edition ed.). Canadá.
- Martínez, J. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, *157*, 2893–2902.
- Martinez, J., & Sánchez, F. (2007). Mecanismo de acción de los antibióticos. 28-34. Retrieved from JANO Medicina y Humanidades website: <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1660/28/1v0n1660a13108119pdf001.pdf>
- Martins, P., Oliveira, M., Bica, A., Vaz, P., & Bernardo, F. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Veterinary Microbiology*, *120*, 122–131.
- McGowan, L., Jackson, C., Barrett, J., Heott, L., & Fedorka, P. (2006). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Retail Fruits, Vegetables, and Meatst. *Journal of Food Protection*, *69*(12), 2976-2982.
- Morris, C. E. (1996). *Aerial plant surface microbiology : [proceedings of the Sixth International Symposium on the Microbiology of Aerial Plant Surfaces, held September 11-15, 1995, in Bandol, France]*. New York, NY [u.a.]: Plenum Press.
- Murray, P. (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed. Vol. 2): American Society for Microbiology.
- Ogier, J.-C., & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, *126*(3), 291-301. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017
- Panesso, D., Ospina, S., Robledo, J., Vela, C., Peña, J., Hernández, O., . . . Arias, C. (2002). First Characterization of a Cluster of VanA-Type Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium*, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, *8*(9), 961-965.
- Patel, R. (2003). Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*, iii13–iii21.

Pérez, E., & Iglesias, L. ((2003)). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* ,, 21(9), 520-529.

Perú, M. d. S. d. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión *Antibiograma para Enterococcus spp* (pp. 23-25).

Ronconi, C., Merino, A., & Fernández, G. (2002). Detección de *Enterococcus* resistentes a altos niveles de aminoglucósidos y resistentes a glucopéptidos en *Lactuca Sativa* (Lechuga). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 20(8), 380-383.

Salminen, S., Wright, A., & Ouwehand, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*.

Shepard, B., & Gilmore, M. (2002). Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4, 215-224.

Tejedor, M., González, M., Lupiola, P., Mendoza, V., & Palacios, D. (2009). Aislamiento, identificación y resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* aisladas de plantas de *Medicago sativa* regadas con agua convencional y depurada. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 9, 418-421.

Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 493-499.

Vallejo, F. (2007). Las hortalizas en Colombia. *Revista Horticultura Brasileira*, 27(1).

Venglovsky, J., Sasakova, N., & Placha, I. (2009). Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*, 100, 5386-5391.

Walch, C. (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance*.

Zhanel, G. G., Hoban, D. J., & Karlowsky, J. A. (2001). Nitrofurantoin Is Active against Vancomycin-Resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 324-326. doi: 10.1128/aac.45.1.324-326.2001



**SISTEMA DE BIBLIOTECAS  
IDENTIFICACIÓN TRABAJO DE GRADO**

FECHA DE ELABORACIÓN  
DD MM AAAA  
12 01 2012

NIT. 860.007.386-1

**1. IDENTIFICACIÓN AUTOR(ES) DEL TRABAJO DE GRADO**

CÓDIGO	DOCUMENTO DE IDENTIDAD		APELLIDOS	NOMBRES	CORREO ELECTRÓNICO
	TIPO	NÚMERO			
200611621	CC	1010180540	López Bermúdez	Sandra Viviana	sv.lopez56@uniandes.edu
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				

PROGRAMA Pregrado  
FACULTAD Facultad de Ciencias  
DEPARTAMENTO Departamento de Ciencias Biológicas

ENTREGÓ FORMATO:  
 SB-10 "Entrega trabajo de grado y autorización de uso a favor de la Universidad de los Andes".  
 Documento con el cual, el autor permite que su trabajo sea SB-10: utilizado por la Universidad, para fines de consulta y de mención en sus catálogos bibliográficos, tanto físicos como en línea.

**1.1 IDENTIFICACIÓN DE TRABAJO DE GRADO PARA DOBLE TITULACIÓN**

PROGRAMA No Aplica  
FACULTAD No Aplica  
DEPARTAMENTO No Aplica

TESIS PARA DOBLE TITULACIÓN:  
 Si el trabajo de grado presentado aplica para obtener dos (2) titulaciones, por favor marque esta casilla y diligencie la información de esta sección.

**2. INFORMACIÓN GENERAL DEL TRABAJO DE GRADO**

TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO:  
Prevalencia de Enterococcus spp resistente a antibióticos en ensalada de vegetales fresca en la ciudad de Bogotá

DESCRIPCIÓN FÍSICA	MATERIAL ACOMPAÑANTE (Cantidad):		FECHA DE ELABORACIÓN
Número de páginas: 62	Casetes Audio:	Discos compactos:	DD MM AAAA
Ilustraciones:	Casetes Video:	Diapositivas:	14 12 2011
	Disquetes:	Otros: ¿Cuáles?	

**\*RESUMEN DEL TRABAJO DE GRADO:**  
 Mediante metodología clásica se realizó el aislamiento e identificación de Enterococcus spp, a partir de muestras de ensaladas de vegetales frescas adquiridas en diferentes zonas de la ciudad de Bogotá. Los resultados de la identificación clásica fueron confirmados mediante la secuenciación del gen 16S rRNA logrando la identificación de diferentes especies de Enterococcus y encontrando además otros géneros de bacterias ácido lácticas. Se evaluó la resistencia de las cepas aisladas a aminoglucósidos, carbapenems, glucopéptidos, β-lactámicos, quinolonas y otros grupos de antibióticos, encontrando un alto porcentaje de resistencia al co-trimoxazol, la nitrofurantoina, la rifampicina y la vancomicina.

**OBJETIVOS DEL TRABAJO DE GRADO:**

Objetivo general

- Caracterizar la resistencia a antibióticos de cepas de Enterococcus spp aisladas de ensaladas de vegetales fresca en diferentes establecimientos de la ciudad de Bogotá.

Objetivos específicos

- Cuantificar, aislar e identificar Enterococcus spp mediante metodología clásica.
- Identificar las cepas de Enterococcus spp aisladas por medio de la secuenciación del gen rRNA 16s.
- Evaluar la resistencia de las cepas aisladas a diferentes antibióticos por medio de la técnica de difusión en agar.

**METODOLOGÍA DEL TRABAJO DE GRADO:**

- Muestreo
- Aislamiento
- Identificación por métodos clásicos
- Identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA
- Evaluación de la resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar

**CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE GRADO:**

- En ensaladas existe una alta prevalencia de bacterias del género *Enterococcus* spp y otros géneros de bacterias ácido lácticas con resistencia intrínseca y adquirida a vancomicina y otros antibióticos. Por lo anterior, es necesario esclarecer el papel que pueden jugar los alimentos como ruta de transmisión de microorganismos resistentes antibióticos, y cómo pueden estar involucrados en el incremento de infecciones a nivel hospitalario y en la comunidad.
- Dado la importancia que *Enterococcus* spp ha adquirido en diferentes ámbitos es necesaria la estandarización de técnicas que permitan un aislamiento más selectivo en muestras de alimentos.
- Las técnicas clásicas permitieron obtener una buena aproximación en el aislamiento e identificación del género *Enterococcus*, sin embargo es necesario el uso de técnicas moleculares que permitan confirmar los resultados de identificación del género y obtener una aproximación de la especie.
- La secuenciación de la región 16S rRNA permitió realizar la identificación molecular del género *Enterococcus* y en la mayoría de casos se obtuvo una aproximación de la especie. Sin embargo, este no es el mejor blanco para discriminar entre especies de *Enterococcus* debido a la alta similitud en esta región. Por lo anterior, para obtener una mejor aproximación de la especie se recomendaría la secuenciación otros genes como el *sodA*.
- Con el fin de determinar el potencial patogénico de las cepas aisladas es necesario estudiar la presencia de otros factores de virulencia y comparar con los perfiles de cepas de origen clínico.

**\*PALABRAS CLAVES (TEMAS) DEL TRABAJO DE GRADO:**

*Enterococcus* spp, resistencia a antibióticos, ensaladas de vegetales, bacterias ácido lácticas

ACUERDOS DE CONFIDENCIALIDAD:  NO TIENE ACUERDO(S)  TIENE ACUERDO(S)

Si selecciona tener acuerdo de confidencialidad, por favor diligencie el siguiente cuadro:

Persona natural o jurídica	Desde	Hasta				
	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA

**3. FIRMAS**

AUTORES (Nombre completo)

\*FIRMAS

Sandra Viviana López Bermúdez


*Sandra Viviana López B*

DIRECTORES / ASESORES (Nombre completo)

\*FIRMAS

María Consuelo Vanegas López

*M. Consuelo Vanegas López*  
 Departamento de Ciencias Biológicas  
 SECRETARIA

JURADO / LECTOR (Nombre completo)	*FIRMAS
 Departamento de Ciencias Biológicas SECRETARIA	
<p>Las firmas de Autor y Director/Asesor son obligatorias. Si tiene inconvenientes con el registro de la firma del Jurado/Lector, deberá tramitar ante la respectiva Facultad la autorización para registrar las firmas de pares o un sello que justifique la ausencia de la firma faltante.</p>	

SB-09

Verificar Información

Imprimir



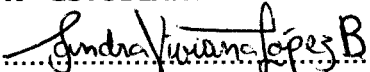
## ENTREGA EJEMPLAR TRABAJO DE GRADO Y AUTORIZACIÓN DE SU USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

Yo Sandra Viviana López Bermúdez, mayor de edad, vecino de Bogotá D.C., identificado con la Cédula de Ciudadanía N° 1010180540 de Bogotá, actuando en nombre propio, en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado: Prevalencia de *Enterococcus spp* resistente a antibióticos en ensalada de vegetales fresca en la ciudad de Bogotá, hago entrega del ejemplar respectivo y de sus anexos del ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, utilice y use en todas sus formas, los derechos patrimoniales de reproducción, comunicación pública, transformación y distribución (alquiler, préstamo público e importación) que me corresponden como creador de la obra objeto del presente documento. PARÁGRAFO: La presente autorización se hace extensiva no sólo a las facultades y derechos de uso sobre la obra en formato o soporte material, sino también para formato virtual, electrónico, digital, óptico, usos en red, internet, extranet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

EL AUTOR - ESTUDIANTES, manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y la realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es de su exclusiva autoría y tiene la titularidad sobre la misma. PARÁGRAFO: En caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, EL ESTUDIANTE - AUTOR, asumirá toda la responsabilidad, y saldrá en defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia se firma el presente documento en dos (02) ejemplares del mismo valor y tenor, en Bogotá D.C., a los dieciséis (16) días del mes de Enero de Dos Mil doce 2012.

### EL AUTOR - ESTUDIANTE.

(Firma)  .....

Nombre Sandra Viviana López Bermúdez

C.C. N° 1010180540 de Bogotá