

Evaluación de la resistencia adquirida a colistina mediada por el gen *mcr-1* en aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp., provenientes de materia fecal de porcinos en una planta de beneficio de Medellín, Antioquia (Colombia)

Carlos Arturo Palacio Arias
Médico Veterinario

Directora
Laura Vásquez Jaramillo
Médica Veterinaria, Magister en Ciencias Veterinarias

Miembros del comité asesor
Astrid Vanessa Cienfuegos G., MSc, PhD
Jorge Arturo Fernández Silva., MV, MSP, Dr. Med. Vet

Maestría en Ciencias Veterinarias
Línea profundizante en Salud Pública Veterinaria

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Agrarias
Medellín
2021

Contenido

Lista de tablas	4
Lista de figuras	5
Resumen	6
Introducción.....	8
Objetivos.....	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
Marco teórico.....	15
Polimixinas.....	17
Farmacorresistencia microbiana a colistina.....	19
Gen de resistencia móvil a colistina (<i>mcr</i>)	20
Genes <i>mcr</i> en el mundo.....	22
Genes <i>mcr</i> en Colombia	23
Genes <i>mcr</i> en microorganismos de porcinos y su impacto en salud publica	24
Metodología	27
Diseño metodológico	27
Población.....	27
Obtención de especímenes	28
Tamización de aislamientos resistentes a colistina	29
Detección del gen <i>mcr-1</i>	30
Conservación de los aislados.....	31
Identificación bacteriana	31
Susceptibilidad antimicrobiana.....	32
Análisis de datos	32
Resultados	34
Características de la población	34
Aislados resistentes a colistina.	34
Características de aislados portadores del gen <i>mcr-1</i>	35
Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana en aislados de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp., portadores del gen <i>mcr-1</i>	38
Discusión.....	41

Referencias bibliográficas	48
Anexos	63
Anexo 1. Formato de recolección de datos.....	63
Anexo 2. Protocolo PCR para la detección de <i>mcr-1</i>	64

Lista de tablas

Tabla 1. Caracterización de aislados con farmacorresistencia fenotípica a colistina y portadores del gen *mcr-1*.

Tabla 2. Identificación bacteriana de aislados bacterianos positivos al gen *mcr-1*.

Tabla 3. Perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp., portadores del gen *mcr-1*.

Lista de figuras

Figura 1. Distribución de *E. coli* y *Salmonella* spp., portadoras del gen *mcr-1*.

Resumen

Antecedentes: El aumento y la diseminación de genes de resistencia móvil a colistina (*mcr*), ha generado preocupación mundial debido a las reducidas opciones terapéuticas disponibles, para el manejo de infecciones causadas por bacterias Gram negativas, con resistencia a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación. La colistina ha sido ampliamente utilizada como promotor de crecimiento y como terapéutico en la especie porcina. La identificación de genes tipo *mcr* en esta especie supone un fracaso en el uso de este antibiótico para tratar infecciones por enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp., y una potencial diseminación a través del ambiente y los alimentos de origen animal, hacia los seres humanos. En Colombia hay limitada información acerca de la epidemiología de la resistencia a colistina en producción porcina. **Objetivo:** Evaluar aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp., con resistencia adquirida a colistina provenientes de muestras de materia fecal de porcinos con destino a consumo humano en una planta de beneficio animal de Medellín, Antioquia (Colombia). **Métodos:** Se llevó a cabo un estudio transversal, en un total de 190 muestras de materia fecal de porcinos, seleccionados mediante un muestreo aleatorio sistemático, en una planta de beneficio durante el mes de marzo del 2020. Para la tamización de enterobacterias resistentes a colistina se utilizó un agar cromogénico. Para la selección de las especies de interés (*E. coli* y *Salmonella* spp.) se usó agar MacConkey suplementado con sulfato de colistina (2mg/l). Los aislados seleccionados fueron analizados mediante PCR para identificar la presencia del gen *mcr-1*. Se realizó identificación bacteriana y perfil de susceptibilidad antibiótica a los aislados positivos al gen *mcr-1*. La información relacionada con cada una de las muestras tomadas fue registrada y analizada mediante estadística descriptiva. **Resultados:** La frecuencia de porcinos con aislados resistentes a colistina en la prueba de tamización fue del 70,52% (134/190). De 49 aislados con crecimiento inicial en subcultivo en agar McConkey-colistina, 30 (61,22%) fueron positivos al gen *mcr-1*, de las cuales el 6,66% (2/30) fueron *Salmonella enterica*, el 23,66% (8/30) *E. coli*. Se identificaron aislados con resistencia a múltiples antibióticos y una *E. coli* positiva

para BLEEs. La mayoría de los cerdos con enterobacterias portadoras del gen *mcr-1* provenían de granjas ubicadas en el departamento de Antioquia, y todos pertenecían a la etapa de levante y ceba. **Conclusión:** Este estudio evidencia la circulación del gen tipo *mcr-1* en cerdos, representando un riesgo potencial para la salud pública, lo que genera la necesidad de fortalecer los sistemas de vigilancia en resistencia antimicrobiana, en bacterias de origen animal destinados para consumo humano.

Introducción

La farmacorresistencia microbiana es un problema que ha sido reconocido a nivel mundial como una de las mayores amenazas para la salud humana y animal; el incremento de los microorganismos resistentes ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas como consecuencia del uso y el abuso de antibióticos (Camou et al., 2017). Los patógenos multirresistentes, definidos como aquellos que no poseen susceptibilidad al menos a un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012), representa un grave riesgo a la salud, siendo responsables de un aumento en la morbi-mortalidad de los pacientes ingresados en hospitales, ocasionando un gran aumento en los costos de salud, por la prescripción de medicamentos más costosos y prolongada estancia hospitalaria (OPS/OMS, 2020).

El uso de antibióticos en producción pecuaria ha sido utilizado tradicionalmente diferentes propósitos: para el tratamiento directo de infecciones, como profiláctico o metafiláctico en la prevención de infecciones en forma individual o grupal y, como promotor de crecimiento para mejorar la conversión alimenticia (Barton, 2014); pero su uso no controlado a partir de prácticas empíricas, podría representar un riesgo de contaminación, ya sea a través de la cadena cárnica, mediante el consumo de alimentos de origen animal contaminados, o a través del ambiente, con la diseminación de antibióticos o bacterias resistentes provenientes de granjas, a través de fuentes hídricas o en el uso de abono para diferentes cultivos, pudiendo generar infecciones por patógenos resistentes en el ser humano (Arenas y Moreno, 2018). La identificación *Salmonella* spp. (Arcos et al., 2013) y de *E. coli* (Jiratchaya et al., 2021) en canales de porcinos, puede representar un riesgo en la presentación de enfermedades transmitidas por alimentos y, diseminación de bacterias con mecanismos de farmacorresistencia.

La colistina como antibiótico veterinario se emplea en la Unión Europea desde la desde 1950 (INS, 2016), utilizado especialmente en porcinos como promotor de crecimiento (Liu et al., 2016) y para el tratamiento infecciones entéricas como

colibacilosis, causadas por *Escherichia coli*, que cursan con signos como diarrea, y septicemia (Olaitan et al., 2106). Este se ha convertido en uno de los antibióticos de último recurso para el tratamiento de infecciones críticas causadas por patógenos gramnegativos multirresistentes en humanos (Yu et al., 2016), principalmente, aquellos resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación, los cuales fueron listados en el grupo de antibióticos de prioridad crítica por la OMS (OMS, 2017). Adicionalmente, El uso no regulado de colistina en animales destinados para el consumo humano, se cree es una fuerza impulsora importante para la aparición y transmisión de microorganismos resistentes al antibiótico, que pueden diseminarse y afectar a poblaciones humanas, ya sea por contacto directo mediante la transmisión entre personas portadoras de bacterias con mecanismos de resistencias, a través de la cadena alimenticia con el consumo de alimentos de origen animal contaminados con microorganismos resistentes, o indirectamente por la contaminación del medio ambiente a través del suelo o el agua (Sun et al., 2018).

La colistina posee una afinidad específica por algunas bacterias gramnegativas debido a la carga catiónica del antibiótico, y la carga aniónica del lípido A presente en estos microorganismos, generándose una atracción de tipo electrostático como primer paso en su mecanismo de acción (Aguayo et al., 2016). Así, la farmacorresistencia microbiana a colistina se da principalmente por la modificación de éste sitio blanco mediante el cambio de carga del lípido A, para este fenómeno se han descrito dos mecanismos principales: (i) el mecanismo cromosómico, que genera mutaciones en el sistema regulatorio de PhoPQ-PmrAB, tanto en MgrB como en la quinasa PmrB, (Aguayo et al., 2106) y, (ii) el mecanismo plasmídico, mediado por el gen de resistencia móvil a colistina (*mcr*) que codifica una etanol-aminotransferasa, encargada de modificar la carga negativa del lípido A y, por lo tanto, disminuye la afinidad de la colistina por su sitio blanco (Sun et al., 2018). El descubrimiento del gen *mcr* tiene implicaciones significativas en la salud pública, pues al ser un gen albergado en plásmidos transferibles, su diseminación se da a una velocidad mucho mayor y puede ser adquirido por bacterias patógenas mediante transferencia horizontal dejando por fuera a la colistina como posible opción terapéutica (Yu et al., 2016).

El gen *mcr-1* fue reportado por primera vez en China por Liu y colaboradores en el 2015, quienes encontraron una frecuencia de *Escherichia coli* portadora del gen *mcr-1* en el 21% en cerdos, el 15% en carne cruda y, el 1% en pacientes humanos con infecciones causadas por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Debido a las diferencias entre la proporción de muestras positivas en animales y seres humanos, los autores plantearon la posibilidad de que el gen móvil se hubiera originado en los porcinos y posteriormente, se haya diseminado a los humanos (Liu et al., 2016). Más adelante, otro estudio realizado en China demostró una tasa sorprendentemente alta (76,2%) de *mcr-1*, en muestras nasales e hisopados anales de cerdos, dando lugar a preocupaciones sobre el riesgo de transmisión del gen y/o bacterias portadoras de gen *mcr-1* de animales productores de alimento a los humanos (Tong et al., 2018).

Este gen se ha detectado en diferentes países de los cinco continentes tanto en humanos como en animales (Hille et al., 2018; Ellem et al., 2017; Saavedra et al., 2017, Emmanuel et al., 2020, Liu et al., 2016.), lo que sugiere que el potencial de progresión de enterobacterias ampliamente resistentes a fármacos, que son aquellas susceptibles sólo a una o dos categorías de antibióticos, a resistentes a todos los fármacos, en donde se identifica la no susceptibilidad en todas la categorías de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012); podría ser global (Liu et al., 2016).

Diferentes estudios a nivel mundial han demostrado que el gen *mcr-1* ha sido el más identificado de la totalidad de los genes tipo *mcr* a través del tiempo, en bacterias comunes a los humanos y los animales (Qixia et al., 2020), con frecuencias en porcinos que oscilan desde el 77,5% (31/40) en aislados de *E. coli* en Bélgica (Timmermans et al., 2021), del 9,9% (43/436) en muestras de *E. coli* donde se buscaron los genes *mcr-1* y *mcr-2*, no identificando este último (Roschanski et al., 2017) o, a nivel de granja en China, donde encontraron diferencias en la detección de genes *mcr-1* y *mcr-3* en *E. coli*, con 49,2% (32/65) y 7,7% (5/65) respectivamente (Wang et al, 2019).

En *Salmonella enterica*, se han reportado tasas más altas de detección del gen *mcr-1* que en especies como *Klebsiella pneumoniae*, tanto en humanos como animales, debido posiblemente a que *Salmonella* spp., es un patógeno importante que puede ser transmitido por los alimentos de origen animal (Qixia et al., 2020), ocupando el segundo lugar después de *E. coli* (Lima et al., 2019). En *Salmonella* spp., se ha reportado ampliamente la identificación del gen *mcr-1* con prevalencias a nivel de planta de beneficio de bovinos y porcinos en Europa del 0,1% (El Garch et al., 2018) e identificación en canales de cerdo en Bélgica del 1,90% (2/105) (García-Graells et al., 2018).

De igual manera, en Colombia, el gen *mcr-1* de resistencia móvil ha sido reportado por investigadores como Saavedra y colaboradores, que en el 2017 identificaron doce aislados portadores del gen *mcr-1* en aislados clínicos gramnegativos de origen humano, de los cuales ocho pertenecían a la especie *E. coli* y tres a *Salmonella enterica*, estas muestras fueron obtenidas de forma retrospectiva desde el año 2002 hasta el año 2016. No obstante, para nuestro conocimiento, hasta la fecha no hay estudios publicados sobre la presencia de genes tipo *mcr* en porcinos destinados para consumo humano en Colombia, aunque se ha reportado la presencia del gen en aislados de *Salmonella enterica* en alimentos de origen animal como chorizos y carne cruda (INVIMA, 2017). Debido a que el gen *mcr-1* ha sido el más frecuentemente reportado a nivel mundial lo que lo hace que sea más probable de detectar, a que es el único que ha sido reportado tanto en humanos como alimentos de origen animal a nivel nacional, a las implicaciones en salud pública humana y animal, representada en el fracaso terapéutico y en el impacto económico por mortalidades a nivel de granjas, tratamientos prolongados y uso de medicamentos más costosos, se seleccionó este gen como punto de partida para identificar la circulación de genes tipo *mcr* en porcinos a nivel de planta de beneficio, lo que permitirá brindar herramientas para futuras investigaciones que intenten ilustrar la epidemiología de la resistencia a colistina mediada por genes tipo *mcr* en la cadena cárnica y posible impacto en la salud humana.

Ante la detección en varios países de la Región de las Américas, de microorganismos con mecanismos de farmacorresistencia microbiana a la colistina a través de plásmidos aislados tanto en animales como en humanos, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) / Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda a los estados miembros que implementen y fortalezcan la vigilancia e investigación epidemiológica para detectar la presencia de microorganismos portadores de este tipo de farmacorresistencia microbiana, a fin de efectuar medidas oportunas de prevención y control (OPS, 2016). Como se mencionó anteriormente, se enfatiza la necesidad de la vigilancia integrada, tanto en humanos como en animales, así como la necesidad de acciones coordinadas entre ambos sectores de salud humana y animal, para la prevención y control de la diseminación de microorganismos con farmacorresistencia microbiana transferible a colistina (OPS, 2016). En consecuencia, y de acuerdo a los reportes de circulación del gen *mcr-1* en Colombia, y a la importancia que representa la colistina como antibiótico de último recurso en humanos, el Instituto Agropecuario Colombiano (ICA) mediante la Resolución 00022747 del año 2018 prohibió la importación, fabricación, registro, comercialización y uso de aditivos que contengan colistina y polimixina B como promotores de crecimiento en especies animales productoras de alimentos para el consumo humano, no obstante su uso como terapéutico, profiláctico y metafiláctico sigue permitido (ICA, 2018).

Especialmente la carne de origen porcino es una fuente de proteína animal muy importante para la alimentación en el departamento de Antioquia. De acuerdo a lo reportado por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2012) el consumo per cápita de carne de cerdo para el 2011 fue de 17,2 Kg/hab, siendo el departamento de mayor consumo. Así mismo, el departamento representó la mayor producción en el 2020, aportando el 43,41% del total de cerdos beneficiados a nivel nacional, de acuerdo a lo reportado por el Sistema Nacional de Recaudo (Porkcolombia, 2020). Lo anterior motiva a que los sistemas productivos de porcinos en la región sean más eficientes, favoreciendo el cumplimiento de normas estatales relacionadas con buenas prácticas pecuarias como el adecuado uso de medicamentos veterinarios (INVIMA, 2019). Sin embargo, debido a los pocos

reportes relacionados con farmacorresistencia microbiana en animales productores de alimentos en el país, se hace difícil justificar la implementación de restricciones en el uso de antibióticos, así como el establecimiento de programas de vigilancia epidemiológica, o actividades encaminadas a disminuir el riesgo de aparición de bacterias multirresistentes que puedan afectar la salud humana.

En consecuencia, conocer el estado actual del fenómeno de la farmacorresistencia microbiana en la especie porcina en Colombia es relevante, principalmente, por el riesgo que puede representar la diseminación de mecanismos de farmacorresistencia microbiana, a antibióticos de importancia en humanos, ya sea por contacto directo, o a través de la cadena alimenticia o el ambiente, dado que enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp., son habitantes normales de la microbiota intestinal de los porcinos, que pueden albergar diferentes mecanismos de farmacorresistencia microbiana y, llegar a los productos cárnicos cuando existen deficiencias en los procesos de transformación en plantas de beneficio, o al ambiente cuando se usa la materia fecal como abono de diferentes cultivos (Tham et al., 2012). Las especies *E. coli* y *Salmonella* spp., a nivel de salud pública son relevantes ya que han sido identificadas en el tercer y cuarto puesto respectivamente, cómo agentes etiológicos en ETAS reportados por el Instituto Nacional de Salud, (INS, 2020)

Con el presente estudio se pretende determinar la presencia de genes móviles de farmacorresistencia microbiana a colistina en enterobacterias aisladas de porcinos, con el fin de esclarecer el papel de los animales productores de alimentos en el fenómeno de la farmacorresistencia microbiana, además de establecer un punto de partida para futuras investigaciones. Para realizar este trabajo, la planta de beneficio Sociedad Central Ganadera S.A fue escogida por alcanzar los beneficios más altos del departamento con 2600 cerdos al día, además de contar con altos estándares de calidad y postularse como una de las más grandes del país (Central Ganadera S.A, 2020).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la resistencia adquirida a colistina mediada por el gen *mcr-1* en aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp., provenientes de muestras de materia fecal de porcinos con destino a consumo humano en una planta de beneficio animal de Medellín

Objetivos específicos

1. Identificar la presencia del gen *mcr-1* en aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp., provenientes de muestras de materia fecal de porcinos
2. Determinar el perfil de sensibilidad de los aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp., portadores del gen *mcr-1* provenientes de muestras de materia fecal de porcinos.

Marco teórico

Farmacorresistencia microbiana

El descubrimiento fortuito de la penicilina por el científico escocés Alexander Fleming en el año 1928, dio inicio a una época conocida como la era dorada para los antibióticos, en la que la investigación y el desarrollo de estos fármacos crecieron de una manera acelerada, y en donde se creyó que la batalla contra las enfermedades infecciosas ya estaba ganada (Manrique, 2012). No obstante, el mismo Fleming en 1945 al recibir el premio Nobel expresó que el uso inadecuado de los antibióticos podría exponer a los microorganismos a cantidades no letales del medicamento y hacerlos resistentes (Fleming, 1945).

La farmacorresistencia microbiana surge cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos, lo que hace más difícil el tratamiento de las infecciones e incrementa el riesgo de propagación de enfermedades, de aparición de formas graves de enfermedades y de muerte (OMS, 2020). La evolución en la producción de antimicrobianos se ha acompañado de un incremento marcado de la farmacorresistencia de bacterias, hongos y parásitos, por tal razón, la OMS ha designado la farmacorresistencia microbiana como una de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo al constituir una de las mayores amenazas para la salud mundial (OMS, 2016). De acuerdo al economista británico James O'Neill, la farmacorresistencia microbiana genera graves impactos de forma directa en la salud, principalmente porque reduce la eficacia de la terapia antimicrobiana y tiende a aumentar la gravedad, la incidencia y el costo de la infección, agravándose en el tiempo, convirtiéndose en una causa importante de muerte, con una proyección para el año 2050 de 10.000.000 de muertes al año, superando enfermedades como la diabetes y el cáncer, y en el aspecto económico, elevando de manera considerable los costos de atención en los sistemas de salud (O'Neill, 2016).

En cualquier lugar donde se utilicen antimicrobianos, existirán reservorios de resistencia antimicrobiana, tanto en humanos, cómo hospitales, animales, entornos de granjas, el agua, el suelo, la vida silvestre y muchos otros nichos ecológicos (Huijbers et al., 2015). La mayoría de los antimicrobianos usados para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos también son usados en animales, debido a esta interdependencia en conjunto con la dimensión ambiental, enfoques como el de el de Una Sola Salud, orientada en describir el papel de cada uno estos actores (animales, ambiente y humanos) en los fenómenos de salud y enfermedad, toma gran relevancia pues permite conocer a detalle los puntos críticos en la generación de fenómeno de salud, y posteriormente, específicamente en la farmacorresistencia microbiana, poder implementar medidas efectivas para preservar el uso en el tiempo de los antibióticos existentes (McEwen y Collignon, 2018). En el momento existe suficiente evidencia que demuestra que el uso de los antibióticos en los animales es un factor que contribuye a la aparición de resistencias en patógenos humanos cómo *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. y *E. coli* (McEwen y Collignon, 2018). Debido a la preocupación por el uso de promotores de crecimiento en animales y su papel en la generación de la farmacorresistencia microbiana, la OMS aboga por la terminación de dicha práctica la cual se ha eliminado de Europa y países como Canadá y Estados Unidos (EU, 2015) (FDA, 2013).

Existen diferentes mecanismos de farmacorresistencia microbiana, entre los que destacan, la síntesis de enzimas que hidrolizan antibióticos, la modificación del sitio blanco que disminuye la afinidad de unión al antimicrobiano, la disminución de la permeabilidad de la pared celular que bloquea el ingreso del antibiótico a la bacteria y, las bombas de eflujo, que transportan el antibiótico afuera de la bacteria sin que este ejerza su función (Moreno et al., 2009). Como consecuencia de estos diferentes mecanismos de farmacorresistencia, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces (OMS, 2020), reconociéndose como una amenaza para la salud pública, porque estos microorganismos limitan la elección de los agentes antimicrobianos disponibles para el tratamiento, que se usan comúnmente como tratamiento de primera línea (Liebana et al., 2013).

La OMS publicó en el 2017 la lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyeron las enterobacterias resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación, en el grupo de prioridad crítica por su capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y transmitir mecanismos de farmacorresistencia microbiana (OMS, 2017). Reportes relacionados con infecciones en humanos por *E. coli* con diversos mecanismos de farmacorresistencia microbiana, han informado que la infección con dicha bacteria ha llevado a la muerte de pacientes, debido a que los tratamientos tradicionales no fueron efectivos (Sánchez-Benito et al., 2017). Situaciones como la anterior, ha generado la necesidad de usar antibióticos de último recurso como la colistina, para tratar infecciones por bacterias Gram negativas resistentes a múltiples fármacos, principalmente a antibióticos como los carbapenémicos (Mendelson et al., 2018).

Polimixinas

Las polimixinas son lipopéptidos cíclicos, caracterizados por una cadena peptídica que se encuentra unida a un ácido graso y pueden ser divididos en lineales y cíclicos. Como molécula principal del grupo, las polimixinas corresponden a un decapeptido unido a una cadena de ácidos grasos; esta mezcla de grupos hidrófilos y lipofílicos las hacen moléculas anfipáticas, que es una propiedad físico-química esencial para el mecanismo de acción de este antimicrobiano, que permite la unión del antibiótico al sitio blanco de acción, el cual es el lípido A del lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Aguayo et al., 2016).

La colistina se introdujo en la práctica clínica en la década de los 50, pero se discontinuó debido a sus efectos adversos, principalmente a su toxicidad renal, seguido de neurotoxicidad, y se empezaron a desarrollar otros agentes antimicrobianos que se asociaban a menores efectos de toxicidad, sin embargo, el incremento de bacilos gramnegativos ampliamente resistentes, es decir, resistentes a carbapenémicos y otros agentes antimicrobianos y, solo susceptibles a colistina y tigeciclina, motivó la reintroducción de la polimixina E, como terapia de última línea en humanos (Aguayo et al., 2016).

Los antibióticos son utilizados en animales para la producción de alimentos, como terapéuticos, profilácticos en la prevención de infecciones y, como promotores de crecimiento (INS, 2016). La colistina es uno de los pocos péptidos antimicrobianos catiónicos comercializados tanto en medicina humana como en veterinaria (Quiroga et al, 2019), para el 2011 la agencia Europea de Medicamentos y de vigilancia europea de Consumo de antimicrobianos Veterinarios, identificó que en 25 países de la Unión Europea, el grupo de las polimixinas fue el quinto grupo más vendido con un 7% (EMA/ESVAC, 2012). En china, el mayor productor de cerdos a nivel mundial, se estimó que se utilizaron 11942 toneladas de colistina destinada para agricultura a finales del año 2015 (Liu et al, 2016). Para el 2016 existían en Colombia, 11 medicamentos que contenían colistina, los cuales pertenecían al listado de medicamentos veterinarios autorizados dentro del régimen de libertad vigilada por el ICA principalmente para uso en aves y porcinos, aunque también se registra uno de los medicamentos para uso en bovinos, equinos, felinos, caprinos, ovinos y caninos (INS, 2016). A la fecha y cómo se mencionó anteriormente, el ICA prohibió el uso de promotores de crecimiento que contengan polimixinas cómo la colistina, aunque su importación y comercialización cómo terapéutico aún es permitida (ICA, 2018), a nivel nacional existen algunas empresas que distribuyen preparados con colistina cómo terapéutico en presentaciones inyectables y orales.

Diferentes estudios han demostrado que la colistina se utiliza principalmente para cerdos, en tratamientos grupales y cómo profiláctico en la prevención de diarrea causada por *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., y como tratamiento de primera elección para la diarrea neonatal causada por *E. coli* en lechones (Timmerman et al., 2006). A parte de su uso como terapéutico y profiláctico, su uso como promotor de crecimiento en porcinos y aves principalmente, ha sido muy extendido en países como Estados Unidos y Brasil (Fernández et al., 2016).

En humanos, la colistina se ha reintroducido cómo antibiótico de último recurso, en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos (Olaitan et al., 2106).

Farmacorresistencia microbiana a colistina

La colistina no es efectiva en el tratamiento de infecciones con bacterias Gram positivas, anaerobias y algunos bacilos Gram negativos como (*Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp., y *Burkholderia cepacia*), pues son intrínsecamente resistentes, por lo que generalmente se dice que las polimixinas son antimicrobianos de espectro reducido (Aguayo et al., 2016). La farmacorresistencia microbiana a la colistina puede ocurrir por mutaciones cromosómicas o por adquisición de genes a través de plásmidos (Quiroga et al, 2019). La colistina es un péptido antimicrobiano catiónico que daña la membrana celular bacteriana al atacar el lípido A del lipopolisacárido (LPS); por lo tanto, la susceptibilidad a la colistina generalmente se ve alterada por mutaciones que resultan en la modificación o pérdida completa de LPS (Yu et al., 2016).

El mecanismo principal de la resistencia cromosómica a colistina es a través de modificación del sitio blanco del antimicrobiano, en este caso del LPS, específicamente del lípido A, el cual está mediado por mutaciones en los genes del sistema regulador de PhoPQ-PmrAB, tanto en MgrB (regulador negativo de PhoQ) como en la quinasa PmrB, que finalmente producen un aumento en la transcripción de complejos-*arn*, permitiendo la biosíntesis de moléculas catiónicas que cambian la carga neta del LPS y, por tanto, disminuyen la unión de las polimixina (Giske, 2015)

La aparición de farmacorresistencia microbiana a colistina en pacientes humanos, ha sido principalmente asociada con su uso en tratamientos de infecciones por bacterias gramnegativas, pero también ha sido asociada al contacto directo con enterobacterias resistentes, que se podrían encontrar en productos para consumo humano como la carne (Liu et al., 2016), en el ambiente y diseminarse a través de fuentes como el agua (Yang et al., 2018) o, en animales y llegar al humano por contacto directo durante las actividades propias del sector pecuario (Olaitan et al., 2015).

La posibilidad de la aparición de patógenos resistentes a la colistina en seres humanos sin exposición previa al antibiótico, como se ha identificado en la resistencia cruzada con los antimicrobianos catiónicos humanos LL-37 y la lisozima, crea serias preocupaciones clínicas y microbiológicas con respecto al manejo efectivo de las infecciones con este medicamento (Olaitan et al., 2106). El LL-37 es un péptido antimicrobiano humano que se encuentra típicamente en sitios de inflamación, donde es una defensa primaria contra bacterias Gram negativas (Vandamme et al., 2012), y la lisozima es un antimicrobiano del hospedero que se encuentra en múltiples células inmunes, así como en secreciones como lágrimas, leche materna y moco, y es importante por su actividad contra los microbios invasores (Düring et al, 1999). Por lo tanto, la exposición bacteriana previa del hospedero de sustancias inmunitarias innatas podría también ser responsable de provocar la resistencia a colistina (Olaitan et al., 2106).

La aparición de resistencia a múltiples fármacos en bacterias gramnegativas ha aumentado la necesidad del uso de la colistina para tratar infecciones graves y potencialmente mortales en humanos, opción terapéutica que se ha visto en riesgo debido al uso excesivo de este antimicrobiano, para tratamientos grupales o promotor de crecimiento en animales destinados para consumo humano, en donde se pueden llegar a generar altos niveles de resistencia que pueden migrar hacia el humano a través del ambiente o la cadena cárnica, impactando de forma negativa a la salud pública humana (McEwen y Collignon, 2018).

Gen de resistencia móvil a colistina (*mcr*)

En el estudio de Liu y colaboradores en el 2016, se demostró de forma exitosa la capacidad del plásmido pHNSHP45 que alberga el gen *mcr-1*, para transferirse mediante conjugación desde una *E. coli*, a bacterias de la misma especie y otras diferentes como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este gen de resistencia móvil a colistina (*mcr*), es un gen que se transfiere a través de elementos genéticos móviles como plásmidos principalmente, que codifica una transferasa fosfoetanolamina que confiere farmacoresistencia microbiana a las Polimixinas (Poirel et al., 2016), mediante la modificación del sitio blanco disminuyendo la

afinidad electrostática del antibiótico por el lípido A de la bacteria gramnegativa (Aguayo et al., 2016).

El primer reporte oficial de la detección de mecanismos de farmacorresistencia microbiana a polimixinas mediada por plásmidos tuvo lugar en China, a través de un estudio que se realizó para dar respuesta a un aumento significativo de farmacorresistencia microbiana a colistina en *Escherichia coli* aislada de alimentos de origen animal durante una vigilancia de rutina (Liu et al., 2016). En dicho estudio se tomaron muestras de aislados clínicos humanos (902 *E. coli* y 420 *K. pneumoniae*), 804 hisopados rectales de cerdos al momento del sacrificio y 523 aislados de carne cruda; como resultado la prevalencia del gen *mcr-1* en *E. coli* fue del 1%, del 21% y del 15% respectivamente. La diferencia en las prevalencias encontradas generó la hipótesis sobre el posible origen del gen *mcr-1* en granjas porcinas, y posteriormente su diseminación hasta ser humano (Liu et al., 2016). Sun y colaboradores en el 2018 reportaron que la tasa global de detección de *mcr-1* en enterobacterias de humanos es relativamente más baja que en aislados de origen animal apoyando la hipótesis del posible origen de este gen. De igual manera, el gen *mcr-1* ha sido identificado en fuentes de agua, desempeñando un papel importante en una vía de diseminación del gen entre animales y humanos (Zineb et al., 2021).

El descubrimiento de este gen tiene implicaciones relevantes, porque el gen *mcr-1* podría ser adquirido por bacterias patógenas mediante transferencia horizontal (Yu et al., 2016), generando gran preocupación, por el aumento en la identificación de enterobacterias multirresistentes, y a los reportes de infecciones en humanos con *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* (Zurfluh et al., 2016). La posterior identificación de *mcr-1* en ganaderías, plantas de beneficio y en ventas minoristas de carne, y su capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal humano y causar infección, ha puesto de relieve las consecuencias del uso compartido de antibióticos en la salud humana y animal (Al-Tawfiq et al., 2017).

Al momento se han identificado 11 variantes genéticas del gen *mcr-1*, designadas del *mcr-1.2* al *mcr-1.12* detectadas en diferentes países, esto sugirió la posibilidad

de una evolución continua de *mcr-1* bajo alguna presión selectiva desconocida en el medio ambiente, los animales o los seres humanos (Sun et al., 2018). Los estudios epidemiológicos han sugerido que *mcr-1* está restringido principalmente a algunas Enterobacterias, entre las que se incluyen: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Shigella sonnei*, *Kluyvera* spp., *Citrobacter* spp., y *Raoultella ornithinolytica* (Sun et al., 2018).

Genes mcr en el mundo

Hasta el año 2020 se reportaron diferentes variantes del gen *mcr*, que van desde el gen *mcr-1* (Liu et al., 2016), hasta el gen *mcr-10* (Wang et al., 2020). Estos genes y sus variantes, se han encontrado en plásmidos de enterobacterias de animales de producción como cerdos, aves y ganado bovino (Dalmolin et al., 2018).

El gen *mcr-1* se ha detectado en múltiples especies de enterobacterias, tanto de humanos como de animales productores de alimentos, en los cinco continentes y en más de 40 países, en la mayoría de estos casos, el gen *mcr-1* está asociado con elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, que permiten la diseminación de este determinante de farmacorresistencia microbiana entre enterobacterias (Wang et al., 2018). La especie *E. coli* se ha identificado como un reservorio importante de plásmidos portadores del gen *mcr-1*, esto debido al ser un habitante normal de la microbiota del humano y de la mayoría de especies productoras de alimentos, lo que puede generar que su movilización entre diferentes ambientes, acelere la transmisión y diseminación del gen entre diferentes especies de enterobacterias (Wang et al., 2018).

El gen *mcr-2*, se identificó por primera vez en *E. coli* aislada de materia fecal de porcinos y bovinos con diarrea en Bélgica, mostrando un 80,6% de identidad de aminoácidos con *mcr-1* (Xavier et al., 2016). El gen *mcr-3* fue identificado en China en un aislado de *E. coli* aislada de materia fecal de un cerdo aparentemente sano, que mostraba farmacorresistencia microbiana a colistina pero en la que no se logró identificar ni el *mcr-1*, ni el *mcr-2* (Yin et al., 2017). El gen *mcr-4* se reportó en un

aislado de *Salmonella enterica*, de un cerdo en Italia, y en aislado de *Escherichia coli* recolectadas durante un diagnóstico de rutina de diarrea post destete en cerdos de España y Bélgica, entre los años 2015 y 2016 (Carattoli et al., 2017). El *mcr-5* se encontró inicialmente en 14 aislados de *Salmonella paratyphi* que provenían de muestras de origen aviar en Alemania, el análisis de secuencia reveló que este gen podría haber sido transferido desde una bacteria ambiental de *Cupriavidus gilardii* (Borowiak et al., 2017).

El gen *mcr-8* se han detectado en *Klebsiella pneumoniae* de origen animal (Wang et al., 2018), el gen *mcr-9* en *Salmonella enterica* de origen humano (Carroll et al., 2019), y el último reportado fue el gen *mcr-10*, el cual muestra una amplia distribución encontrándose en 4 continentes (Wang et al., 2020). La distribución tan amplia de estos genes, ha sido una preocupación al quedar en evidencia la forma tan rápida en que han evolucionado y se han diseminado.

Otra de las preocupaciones y que ha podido influir en la amplia diseminación de estos genes, es que parece probable que la vida silvestre tenga un papel en la diseminación mundial de genes como el *mcr-1*, un ejemplo de esto es el hallazgo realizado en Ushuaia-Argentina, donde se logró detectar la presencia de éste gen en materia fecal de gaviotas (Liakopoulos et al., 2016).

En suma, adicional a los mecanismos diversificados para la diseminación de la farmacorresistencia microbiana a la polimixina transferible por genes similares al *mcr*, ésta se ha visto incrementada por: (i) la rápida propagación de *mcr-1* a diferentes nichos ecológicos (incluidos suelo, agua, vida silvestre, aves de corral / ganado, carne, verduras, seres humanos) ; (ii) la transferencia de *mcr-1* por varios reservorios de plásmidos que cubren casi diez tipos diferentes de replicones; y (iii) al aumento de la acumulación de genes similares a *mcr* y sus variantes (Sun et al., 2018).

Genes mcr en Colombia

En mayo de 2016, Colombia informó sobre la detección del gen *mcr-1* en tres aislados de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium de pacientes procedentes de

Antioquia, Bogotá y Boyacá; y un aislado de *E. coli* en una paciente de Santander. El hallazgo se produjo como parte de un estudio retrospectivo con aislados obtenidos desde el año 2014 a mayo de 2016 (INS, 2016). De acuerdo al anterior hallazgo, el grupo de microbiología del instituto nacional de salud (INS), creó unas directrices en el marco de los seguimientos a eventos de importancia en salud pública, dirigidas a los laboratorios de Salud Pública Departamentales (LSPD) y a las Secretarías Distritales de Salud, quienes deben enviar al INS todos los aislados de bacterias Gram negativas de acuerdo a 2 criterios: (i) Cualquier Enterobacteria con farmacorresistencia microbiana adquirida a colistina /CIM colistina > 2µg/ml y (ii) *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., y *Acinetobacter* spp., con CIM a colistina ≥ 4 µg/ml, de acuerdo a lo establecido por la Circular Externa Conjunta No 000027 del 14 de agosto de 2017.

Por otro lado, en el año 2017 el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), identificó el gen *mcr-1* en dos aislados de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, y *Salmonella enterica* serovar Give, provenientes de carne cruda y chorizo en la ciudad de Bogotá, siendo este el primer reporte del gen en muestras de alimentos de origen animal en Colombia (INVIMA., 2017).

Finalmente, en un estudio donde se recolectaron 908 aislados clínicos resistentes a colistina de diferentes países con el objetivo de identificar los genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*; se detectó en un aislado de *E. coli* de un paciente colombiano el gen *mcr-5*, siendo identificando por primera vez este gen en el país (Wise et al., 2018).

Genes mcr en microorganismos de porcinos y su impacto en salud pública

La cadena alimentaria ha atraído una atención considerable en los últimos años con respecto al riesgo de transferencia de farmacorresistencia de animales a humanos, muchos de los plásmidos que contienen genes de farmacorresistencia microbiana, se han identificado en bacterias zoonóticas comensales y patógenas, de animales vivos y alimentos (Liebana et al., 2013), y algunos de estos elementos genéticos

móviles podrían ser portadores de genes tipo *mcr*, y circular entre ambientes, animales y humanos (Wang et al., 2018).

La colistina es antimicrobiano comúnmente empleado para controlar y tratar las enfermedades diarreicas neonatales y post-destete, causadas por *Escherichia coli* enterotoxigénica y productora de toxina Shiga (García et al., 2018), y como promotor del crecimiento (Rhouma et al., 2017). La aparición de farmacorresistencia microbiana a la colistina está asociada al consumo excesivo de colistina en medicina veterinaria, se estima que entre el año 2005 y 2015, se usaron anualmente en promedio de 6 a 16 toneladas de este antibiótico en animales productores de alimentos en Corea del Sur (Belaynehe et al., 2018), en China se registró una demanda para el sector agrícola de aproximadamente 11942 toneladas para finales del 2015 (Liu et al., 2016), y la Unión Europa y Norteamérica importaron 480 y 700 toneladas de colistina respectivamente, de acuerdo a lo reportado por QYResearch Medical Research Centre en el 2015.

Varias evidencias sugieren que el reservorio del gen *mcr-1* está en los animales por lo siguiente: **(i)** el uso intensivo de polimixinas en animales como promotor del crecimiento, profilaxis y metafilaxis, y su uso curativo principalmente en cerdos, pollos y ganado, constituyen una fuerza impulsora para la selección de bacterias productoras del gen *mcr-1*; **(ii)** la identificación del gen *mcr-1* se ha realizado principalmente en aislados de animales (en China entre 2011 y 2014, el 20% de los aislados animales contenían el gen *mcr-1*, en comparación con un 1% en aislados humanos); **(iii)** la identificación del gen de farmacorresistencia microbiana al florfenicol (floR), en microorganismos productores del gen *mcr-1*, cuando el florfenicol se administra solo a los animales; **(iv)** la asociación genética del gen *mcr-1* con la secuencia de inserción ISAp11 procedente de *Pasteurella multocida*, un patógeno común para los animales; y **(v)** la asociación de *mcr-1* con cefalosporinasas mediada por plásmidos, CMY-2, que se sabe que está muy extendida en aislamientos de animales (Nordmann y Poirel, 2017).

A pesar de las acciones de control sobre el uso de la colistina, siendo prohibida formalmente en China desde el año 2017 para uso en alimentación animal, la alta

identificación del gen (45,1%) en *E. coli* aislada de cerdos enfermos, sugiere que la exposición previa al agente antimicrobiano está fuertemente asociada con la presencia de los genes móviles (Li et al., 2018).

En Austria se realizó un estudio en 257 muestras tomadas del ciego de porcinos obtenidas de plantas de beneficio, en este se logró identificar una muestra positiva que albergaba el gen *mcr-1*, el aislado mostró una concentración inhibitoria mínima de 8mg/l a colistina y la presencia de genes de farmacorresistencia microbiana a diferentes antibióticos (Jelovcan et al., 2016). De 636 aislados de *E. coli* recuperados de muestras fecales obtenidas de animales clínicamente sanos (341 de bovinos, 265 de cerdos y 30 de pollos) durante un estudio de vigilancia nacional en Corea del Sur, realizado entre 2014 y 2017 sobre susceptibilidad a los antimicrobianos, se encontraron nueve aislados que mostraron farmacorresistencia microbiana a la colistina, y tres de ellos albergaban el gen *mcr-1*, y dos el gen *mcr-3*; todos los aislados resistentes a la colistina fueron resistentes a múltiples fármacos (Belaynehe et al., 2018).

En otro estudio realizado en Japón en aislados de *E. coli* de cerdos enfermos y sanos, se observó una alta prevalencia de farmacorresistencia microbiana mediada por plásmidos en cerdos enfermos (cerdos con diarrea post destete), en donde se lograron identificar los genes, *mcr-1*, *mcr-3* y *mcr-5* (Fukuda et al., 2018). Así mismo, en un estudio realizado en Laos, se identificaron aislados de *E. coli* resistentes a colistina, en la que dos de los aislados con características de virulencia, secuencias y lectura de la electroforesis en campo pulsado (PFGE) fueron iguales; una pertenecía a un porcino y otra a un joven de 15 años. Al investigar este caso en específico, se encontró que el porcino era alimentado por este joven sin ningún tipo de protección aparte del uso de botas, y que este último no tenía antecedentes de exposición a colistina. Con este hallazgo se plantea la alta posibilidad que existe de transferencia de infecciones con enterobacterias resistentes a colistina, desde el porcino directamente al humano (Olaitan et al., 2015).

Metodología

Diseño metodológico

El presente es un estudio descriptivo (Dohoo et al., 2009) realizado durante el mes de marzo de 2020 en una planta de beneficio animal ubicada en el municipio de Medellín, Antioquia. La planta seleccionada alcanza beneficios de hasta 2600 cerdos al día, lo que la postula como una de las más grandes del país. Además, cuenta con un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control que asegura el control de la inocuidad en las diferentes etapas del proceso (Central Ganadera S.A, 2020).

El tamaño de muestra se calculó utilizando la fórmula para estimar tamaños de muestra de poblaciones finitas (Thrusfield, 2007), utilizando una prevalencia esperada del 25,5% (Li et al., 2018), con un nivel de confianza del 95% y una tasa de error máxima aceptable de 0,05:

$$n = Z_{\alpha/2}^2 \times p \times q / e^2.$$

Dónde: $Z_{\alpha} = 1,96$ con un nivel de confianza del 95%, $p =$ Proporción estimada = 25,5%, $q = 1 - p$ y $e =$ error del estudio del 5%

$$n: 1.962 \times 0.255 \times (1-0.255) / 0.052$$

$$n: 0.72 / 0.0025$$

$$n: 292 (\text{efecto de diseño} \times 1.1) = 321$$

Se tomaron 190 muestras de materia fecal de cerdo directamente del ciego, cada una de las muestras se consideró como la unidad de análisis. Se estableció como definición de caso, los aislados de *E. coli* o *Salmonella* spp., fenotípicamente resistente a colistina y que albergaba el gen *mcr-1*.

Población

Para la selección de los animales, se realizó un muestreo aleatorio sistemático (Thrusfield, 2007). La planta de beneficio posee una velocidad de línea de aproximadamente 120 porcinos por hora, con esta velocidad, se definieron 5 horas como tiempo para la recolección de muestras, para un promedio 600 animales. La cantidad de muestras al día se definió en 30 ($600/30=20$), el primer individuo a muestrear se tomó aleatoriamente entre los primeros 10 porcinos, y a partir de éste, un individuo cada 20 animales hasta completar el total de las muestras programadas por día.

Al ingreso de los animales, los empleados de la planta realizan la verificación de las guías sanitarias de movilización interna de animales (ICA, 2016), documento legal que ampara el transporte de los animales y que incluye los datos de procedencia. Los animales fueron sometidos a inspección ante mortem por el médico veterinario de la planta de beneficio e identificados con la marca del lote mediante tatuaje, el cual permaneció visible durante todo el proceso, permitiendo identificar exactamente la procedencia de cada uno, mediante la correlación de la marca con la guía sanitaria de movilización interna de animales.

Se definió como criterio de inclusión todos los animales de levante y ceba destinados para beneficio, y como criterio de exclusión los animales que llegaran sin guía sanitaria de movilización de animales y, aquellos que no superaran satisfactoriamente la etapa de inspección antemortem y postmortem por parte de los veterinarios de la planta.

La información relacionada con cada una de las muestras recolectadas fue registrada el mismo día del muestreo usando un formato de recolección de datos (Anexo 1). La información demográfica de los animales muestreados como el sexo, la etapa productiva y el lugar de procedencia fueron registrados.

El presente estudio contó con aval expedito otorgado por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia mediante acta N° 127 del año 2019.

Obtención de especímenes

Se recolectaron muestras de material fecal directamente del ciego de los porcinos sacrificados. Para esto se realizó una incisión utilizando un cuchillo, el cual fue esterilizado entre cada toma utilizando un esterilizador térmico a más de 82,5°C. Una vez realizada la incisión, un gramo de materia fecal fue recolectado y depositado en un recipiente estéril, e inmediatamente diluido en 2 ml de solución salina, siguiendo las recomendaciones del fabricante del CHROMID Colistina R agar (COLR)® (BioMérieux, Francia).

Una vez finalizada la recolección en la planta de beneficio, las muestras fueron almacenadas y transportadas en refrigeración a la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, para su procesamiento inmediato

Tamización de aislamientos resistentes a colistina

Para la etapa de aislamiento selectivo y diferencial de bacterias fenotípicamente resistentes a colistina, se tomó 50 µl de cada muestra y se diluyó en 9 ml de caldo de enriquecimiento Brain and Heart Infusion (BHI, Merk, Alemania) que contenía un disco de colistina (COL 10 µg) (Oxoid, Reino Unido) y, luego pasaron a incubación a 35 +/- 2 °C de 4 a 5 horas.

Posteriormente, 50 µl del caldo previamente incubado fue sembrado por agotamiento en el agar cromogénico CHROMID Colistina R agar (COLR)® (BioMérieux, Francia), y llevados nuevamente a incubación a 35 +/- 2 °C durante 18 a 24 horas. De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, para las muestras de origen veterinario las especies de interés a evaluar son *Escherichia coli*, reconocibles como colonias con coloraciones de rosa-burdeos, y *Salmonella* spp, de color blancas o incoloras. La cepa de referencia *E. coli* American Type Culture Collection ATCC® 25922® fue usada como control negativo, y la cepa *E. coli* National Type Culture 13846 como control positivo.

De cada agar cromogénico se seleccionaron máximo dos colonias por morfotipo de interés, que posteriormente fueron sembradas en agar Mac Conkey (Merk, Alemania) suplementado con sulfato de colistina asegurando una concentración mínima de 2mg/l, de acuerdo a las recomendaciones de preparación de diluciones de trabajo de la ISO 20776-1: 2006 (ISO, 2006) y, posteriormente fueron incubadas a 35 +/- 2 °C durante 18 a 24 horas.

De acuerdo con la morfología identificada en el agar Mac Conkey, se seleccionaron los crecimientos con mayor similitud a las especies de interés, tomando como crecimientos compatibles con *E. coli*, aquellos aislamientos que fermentaran lactosa observándose colonias de color rosa-rojo, y como *Salmonella* spp, colonias incoloras incapaces de fermentar lactosa. Posteriormente, las colonias que cumplían con algunas de las características anteriores, y que crecieran de forma que permitieran una selección de colonias aisladas, fueron resembradas en 3ml de caldo BHI suplementado con sulfato de colistina a 2mg/l e incubadas nuevamente a 35 +/- 2 °C durante 18 a 24 horas.

Detección del gen *mcr-1*

Las actividades de la etapa molecular que incluían la extracción de ADN y la identificación del gen *mcr-1* mediante PCR, se realizaron en la línea EPIMOL del grupo MICROBA de la Universidad de Antioquia. Se realizó la extracción de ADN de los aislados presuntivos de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., resistentes a colistina, para la posterior amplificación del gen *mcr-1*. Para la extracción de ADN se utilizó el Kit Wizard® Genomic DNA Purification para extracción de ADN de bacterias Gram negativas, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega, Estados Unidos).

La presencia de gen *mcr-1* fue evaluada por PCR utilizando el protocolo estandarizado en la línea EPIMOL (Anexo 2), utilizando los cebadores descritos por Liu y colaboradores en el 2016 (CLR5-F: CGGTCAGTCCGTTTGTTC y CLR5-R: CTTGGTCGGTCTGTAGGG) con un peso de 309 pares de bases. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes **i)** desnaturalización inicial a 95°C

por 15 minutos, 1 ciclo, **ii**) desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y, extensión a 72°C por 1 minuto, todo por 30 ciclos y, **iii**) extensión final a 72°C por 5 minutos 1 ciclo. Mediante electroforesis en agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio se identificaron los aislados en que albergaban el gen *mcr-1*. Se utilizó como control positivo la cepa BK47554 (aislado *mcr-1* positivo).

Conservación de los aislados

Todos los aislados que fueron incubados en el caldo BHI, fueron congelados a -80 °C en una suspensión de 300 µl de glicerol al 50% y 700 µl de caldo BHI, siguiendo el protocolo desarrollado por la línea de Epidemiología Molecular de la escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia.

Identificación bacteriana

Las actividades de identificación bacteriana y de susceptibilidad antimicrobiana, se realizaron con el laboratorio SIRIO Investigación y Análisis Veterinario, para los aislados que resultaron positivos al gen *mcr-1*. Para esta etapa se utilizaron los paneles CIM gramnegativos/paneles combinados y paneles NC 72 específicos para bacterias gramnegativas (Beckman Coulter, Estados Unidos), de punto de corte deshidratados Microscan®, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Beckman Coulter, Estados Unidos).

El sistema Microscan® utiliza pruebas convencionales y cromogénicas modificadas, que se basan en la detección de cambios de pH, la utilización de sustratos y el crecimiento en presencia de antimicrobianos en incubación. Para la preparación de los inóculos se utilizó el sistema Prompt. Posteriormente, la rehidratación e inoculación se realizó mediante el sistema RENOK®, para luego ser transferidas las suspensiones a los paneles Microscan® e incubadas mínimo durante 16 horas a 35°C.

La lectura se realizó manualmente a través del visor de microdilución. Para la lectura de los sustratos de identificación, se leyeron todos los sustratos siguiendo las recomendaciones de interpretación para cada uno, dadas por el fabricante.

Susceptibilidad antimicrobiana

Para la lectura de las sensibilidades antimicrobianas se utilizaron los paneles NC 72 específicos para bacterias Gram negativas (Beckman Coulter, Estados Unidos), se registró como CIM (concentración mínima inhibitoria), la concentración más baja que muestra inhibición de crecimiento. Primero se prepararon los paneles verificando que estuvieran en condiciones adecuadas para el procesamiento, se realizó la preparación del inóculo utilizando el sistema Prompt™ para la inoculación de los bacilos Gram negativos, la prueba de oxidasa, rehidratación de paneles, para finalmente pasar los paneles a incubación mínimo por 16 horas a 35°C en una incubadora sin CO₂.

Una vez realizada la incubación de los paneles, se realizó la lectura del crecimiento de los inóculos en presencia de los siguientes antibióticos: ampicilina, ampicilina/sulbactam, aztreonam, cefalozina, cefoxitina, ticarciclina/ácido clavulánico, cefotaxima, cefepima, colistina, piperacilina/tazobactam, cefotaxima/ácido clavulánico, ceftazidima, ampicacina, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, ceftazidima/ácido clavulánico, ciprofloxacina, levofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefuroxima, imipenem, meropenem, ertapenem y ácido nalidíxico. Se establecieron los aislados como resistentes o sensibles de acuerdo a los puntos de corte indicados por la CLSI (CLSI, 2012). Como control de calidad se utilizó la cepa *E. coli* 25922 ATCC.

Análisis de datos

Los datos fueron introducidos, almacenados y procesados en Excel 2003 (Microsoft Office, Redmond, Washington). Se analizó la distribución de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y medidas de resumen de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas. Variables con más del 30% de valores

perdidos no fueron analizadas. Se estimó la frecuencia de porcinos con aislados resistentes a colistina y portadores del gen *mcr-1*.

Resultados

Características de la población

La planta de beneficio Sociedad Central Ganadera S.A.S recibe porcinos de diferentes departamentos del país, pero principalmente provenientes del departamento de Antioquia. Los animales muestreados provenían de 40 granjas diferentes, 38 de ellas localizadas en 15 municipios del departamento de Antioquia, y dos del departamento de Caldas. La mayoría de los porcinos provenían de los municipios de Donmatías, Yolombó y Medellín, todos del departamento de Antioquia (Tabla 1).

El 100% de los porcinos objeto del muestreo fueron animales que cumplieron su etapa productiva en granja y que se les conoce como animales de levante - ceba, por alcanzar un peso adecuado para ser sacrificados en planta de beneficio animal, que se encuentran aproximadamente entre los 5 y los 6 meses de edad. Estos provenían en su gran mayoría de granjas con sistemas tecnificados que controlan el estatus sanitario, y aseguran un adecuado crecimiento de los animales mediante la implementación de planes veterinarios y zootécnicos. Del total de las muestras analizadas el 48,42% (92/190) fueron aisladas de hembras y 51,58% (98/190) fueron machos (Tabla 1).

Aislados resistentes a colistina.

La frecuencia de porcinos con crecimiento de aislados de interés en la prueba de tamización fue del 70,52% (134/190). La mayoría de morfotipos con farmacoresistencia a colistina fueron compatibles con *E. coli* (56,0%, 106/190), *Salmonella* spp. (39,0%, 75/190), y crecimientos de ambas especies (20,52%, 39/190). En el 7,8% (15/190) de las muestras no se observó ningún crecimiento con morfotipo de interés. La información relacionada con la procedencia de las muestras con resistencia fenotípica identificada mediante la prueba tamiz y, las positivas al gen *mcr-1*, se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de aislados con farmacorresistencia fenotípica a colistina y portadores del gen *mcr-1*.

Características de los animales muestreados	Aislados resistentes a colistina (prueba de tamización)			Aislados con farmacorresistencia adquirida a colistina (<i>mcr-1</i>)		
	Positivo (n=134)	Negativo (n=56)	Total n=190	Positivo (n=30)	Negativo (n=19)	Total n=49
Procedencia						
Barbosa	6	5	11	1	3	4
Bello	4	1	5	1	2	3
Belmira	4	0	4	0	1	1
Betania	7	0	7	2	2	4
Donmatías	54	25	79	10	4	14
El Retiro	1	1	2	0	0	0
Entrerriós	6	1	7	3	1	4
Fredonia	4	3	7	1	1	2
Maceo	4	1	5	0	1	1
Medellín	10	3	13	5	1	6
Neira*	3	0	3	1	0	1
Rionegro	5	7	12	3	0	3
San Andrés de Cuerquia	4	0	4	2	0	2
Santa Rosa de Osos	4	2	6	0	0	0
Santo Domingo	3	3	6	0	0	0
Viterbo*	3	0	3	0	0	0
Yolombó	12	4	16	1	3	4
Etapa productiva						
Levante-Ceba	134	56	190	30	19	49
Sexo						
Hembra	65	27	92	14	10	24
Macho	69	29	98	16	9	25
Especie						
<i>E. coli</i>	106	84	190	22	13	35
<i>Salmonella</i> spp.	75	115	190	8	6	14

*Municipio del departamento de Caldas, Colombia

Características de aislados portadores del gen *mcr-1*.

Con la prueba de tamizaje, 49 aislados mostraron características fenotípicas de farmacorresistencia microbiana a colistina, los cuales fueron procesados para la

detección molecular del gen *mcr-1*. De estos, treinta aislados albergaban el gen *mcr-1*, es decir, el 15,78 % (30/190) del total de las muestras procesadas (Tabla 1).

La identificación bacteriana de estos treinta aislados positivos al gen *mcr-1*, mostró que ocho correspondían a *E. coli*, dos a *Salmonella entérica* y cinco a *Providencia heimbachae*. No fue posible recuperar en cultivo los 13 aislados restantes para realizar identificación bacteriana, y en 2 de las muestras hubo crecimiento de bacterias Gram positivas, debido probablemente a contaminación de las muestras.

En la figura 1 la distribución por municipios de las especies de interés confirmadas en el laboratorio, que fueron positivas al gen *mcr-1*.

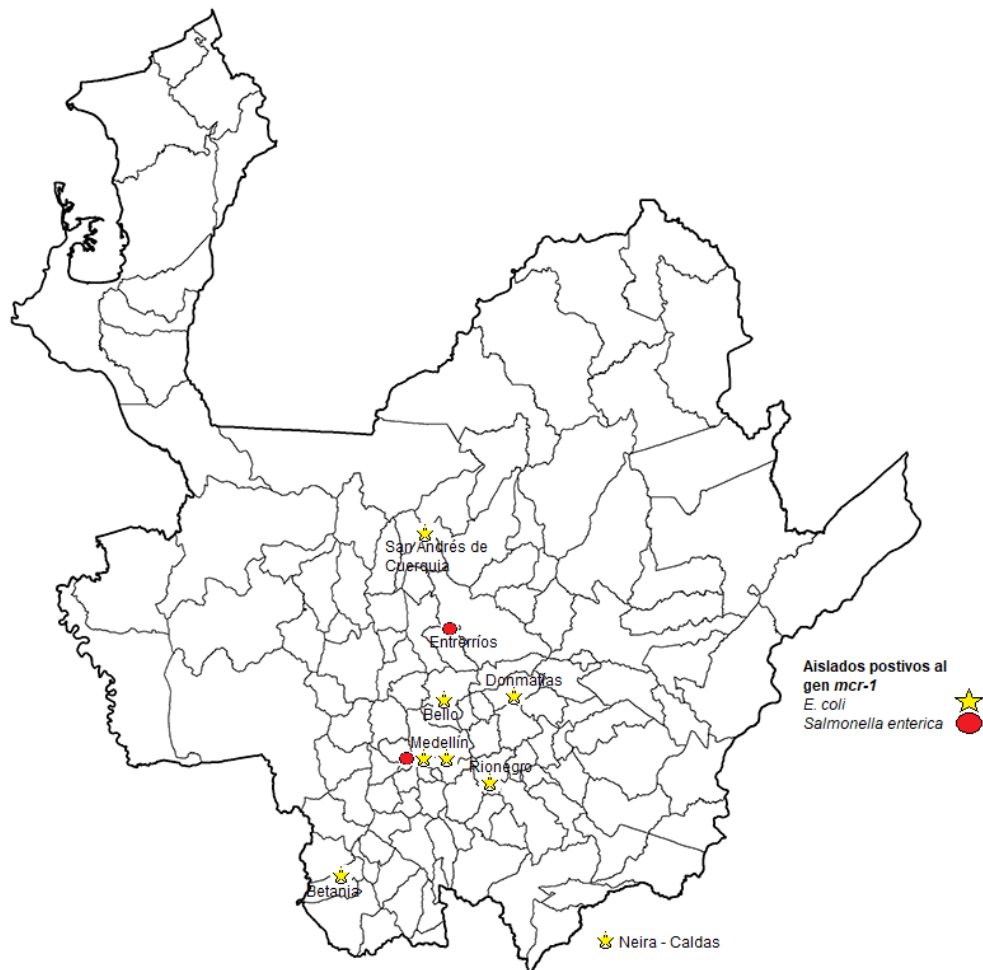


Figura 1. Distribución de *E. coli* y *Salmonella* spp., portadoras del gen *mcr-1*.

Tabla 2. Identificación bacteriana de aislados bacterianos positivos al gen *mcr-1*.

Código	Aislamiento	Departamento	Municipio	Sexo	Etapas productiva
4 S1	<i>Salmonella enterica</i> .	Antioquia	Medellín	Macho	levante- ceba
5 S1	<i>Providencia heimbachae</i>		Medellín	Macho	levante- ceba
6 S2	<i>Salmonella</i> spp.*		Don Matías	Hembra	levante- ceba
7 S1	<i>Providencia heimbachae</i>		Don Matías	Hembra	levante- ceba
16 E1	<i>E. coli</i> *		Don Matías	Hembra	levante- ceba
18 E1	<i>E. coli</i> *		Yolombó	Hembra	levante- ceba
34 E1	<i>E. coli</i> *		Barbosa	Hembra	levante- ceba
44 S2	<i>Providencia heimbachae</i>		Don Matías	Macho	levante- ceba
53 E1	<i>E. coli</i> BLEEs NEGATIVO		Rionegro	Macho	levante- ceba
54 E1	<i>E. coli</i> *		Rionegro	Macho	levante- ceba
55 E1	<i>E. coli</i> *		Entrerriós	Macho	levante- ceba
56 E2	<i>E. coli</i> *		Entrerriós	Hembra	levante- ceba
58 E1	<i>E. coli</i> BLEEs NEGATIVO		Bello	Macho	levante- ceba
60 E2	<i>E. coli</i> *		Medellín	Hembra	levante- ceba
79 S1	<i>Providencia heimbachae</i>		Don Matías	Hembra	levante- ceba
81 E2	<i>E. coli</i> *		Don Matías	Hembra	levante- ceba
105 S1	<i>Providencia heimbachae</i>		Don Matías	Macho	levante- ceba
109 E2	<i>E. coli</i> BLEEs POSITIVO		Don Matías	Hembra	levante- ceba
119 E1	<i>E. coli</i> BLEEs NEGATIVO		Betania	Macho	levante- ceba
120 E1	<i>E. coli</i> *		Betania	Macho	levante- ceba
145 E2	<i>E. coli</i> *	Don Matías	Macho	levante- ceba	

146 E1	<i>E. coli</i> *		Don Matías	Macho	levante- ceba
147 E1	Bacilo Gram positivo		Rionegro	Hembra	levante- ceba
153 S1	<i>Salmonella enterica</i> .		Entrerriós	Hembra	levante- ceba
176 E1	Bacilo Gram positivo		Fredonia	Hembra	levante- ceba
181 E2	<i>E. coli</i> BLEEs NEGATIVO		Medellín	Macho	levante- ceba
183 E1	<i>E. coli</i> BLEEs NEGATIVO		Medellín	Macho	levante- ceba
185 E1	<i>E. coli</i> *		San Andrés de Cuerquia	Macho	levante- ceba
187 E2	<i>E. coli</i> BLEEs NEGATIVO		San Andrés de Cuerquia	Macho	levante- ceba
167 E1	<i>E. coli</i> BLEEs NEGATIVO	Caldas	Neira	Hembra	levante- ceba

*Aislamientos no recuperados, identificación basada en el morfotipo

Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana en aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp., portadores del gen *mcr-1*.

De forma general para las dos especies, los niveles más altos de farmacorresistencia microbiana se identificaron para los antibióticos colistina y tetraciclina, en donde todos los aislamientos evaluados mostraron farmacorresistencia (10/10), seguidos por el trimetoprim/sulfametoxazol en donde solo dos aislados de *E. coli* fueron sensibles (8/10) y, para ampicilina donde un aislado de *Salmonella enterica* fue sensible, y una de *E. coli* fue sensible intermedia (8/10). De forma específica para *E. coli*, se encontró en el grupo de los betalactámicos farmacorresistencia a ampicilina (7/8), ampicilina/ sulbactam (4/8), seguida por piperacilina/tazobactam (3/8), cefuroxima (2/8), aztreonam (1/8), ceftazidima (1/8) y cefotaxima (1); de igual forma, se identificó alta farmacorresistencia para trimetoprim/sulfametoxazol (6/8). En el grupo de los aminoglucósidos se observaron niveles más bajos de farmacorresistencia para la gentamicina (1/8), tobramicina (2/8) y, ninguna resistente para amicacina. Para las

fluoroquinolonas solo se observó farmacorresistencia para el ácido nalidíxico (2/8), y sensibilidad completa para la levofloxacin. Todos los aislados fueron sensibles para el grupo de los carbapenémicos imipenem, ertapenem y meropenem (Tabla 2).

Para el grupo de *Salmonella enterica*, se observó farmacorresistencia en los 2 aislados para trimetoprim/sulfametoxazol, en el grupo de los betalactámicos se observó farmacorresistencia para ampicilina (1/2), ampicilina/sulbactam (1/2) y aztreonam (1/2). En los aminoglucósidos se observó farmacorresistencia para gentamicina (1/2) y tobramicina (1/2) y, sensibilidad para ampicacina. Solo se observó para las fluoroquinolonas un aislado resistente al ácido nalidíxico, y las dos fueron sensibles a levofloxacin. Por el contrario, todos los aislados fueron sensibles para el grupo de las cefalosporinas y los carbapenémicos (Tabla 2).

Discusión

En el presente estudio utilizando un tamizaje, se identificó en el 70,52% (134/190) de las muestras, la presencia de enterobacterias de origen porcino con farmacorresistencia fenotípica a colistina, la que puede ser de origen cromosómica o plasmídica. Posteriormente, mediante la prueba PCR, se determinó la presencia del gen *mcr-1* en el 15,78 % (30/190) de los aislados. Para nuestras especies de interés se observó una frecuencia de detección del gen *mcr-1* del 1,05% (2/190) en *Salmonella enterica*, y del 4,21% (8/190) en *E. coli*.

Para la especie *E. coli* se han reportado diferentes frecuencias de identificación del gen *mcr-1*, cómo la encontrada en China por Liu y colaboradores en el 2016, en donde se identificó el gen en un 21% de aislados de *E. coli* de origen porcino en plantas de beneficio; la de Li y colaboradores en el 2018 del 25.5% en *E. coli* aisladas de porcinos en granjas del mismo país, siendo mucho mayores que las encontradas en el presente estudio para la especie *E. coli*, tal vez debido en parte por gran uso de colistina en el país asiático (.Liu et al, 2016). Por el contrario, comparado con Europa donde se reportó una frecuencia a nivel de planta de beneficio del 0,7% en *E. coli* y, del 0,1% en *Salmonella* spp., (El Garch et al., 2018) frecuencias menores a las encontradas en nuestro estudio. Ésta baja frecuencia reportada por el continente europeo, podría deberse a los estrictos controles establecidos en los diferentes reglamentos emitidos por la Unión Europea (European Commision, 2011), (Unión Europea, 2005), en relación al uso de antibióticos en producción primaria, demostrando que los programas de vigilancia y control adecuadamente implementados, pueden impactar los niveles de farmacorresistencia microbiana en bacterias de animales de producción.

La identificación de *Providencia heimbachae* como portadora del gen *mcr-1*, toma gran relevancia a la luz de dos consideraciones importantes en el ámbito de la salud pública, la primera, la afectación directa a la salud humana, pues este género ha sido reportado cómo agente etiológico casos de ETAS (Shah et al., 2015), y segundo, por su potencial de diseminación del gen a otras enterobacterias de

importancia en salud pública humana. La identificación del gen *mcr-1* en aislados de *Providencia heimbachae* y *Salmonella* spp., en una misma granja, podría indicar la transferencia horizontal del gen a través de elementos genéticos móviles entre diferentes especies de enterobacterias acelerando su diseminación (Wang et al., 2018); sin embargo, es necesario identificar el contexto genético de este gen para comprender mejor su potencial de diseminación.

Dentro de los hallazgos encontrados, se destaca la identificación de granjas con más de un animal con aislamientos que albergaban el gen *mcr-1*, la presencia de este gen en diferentes animales provenientes de un mismo predio, podría estar explicada por diferentes razones: **(i)** El uso de colistina como profiláctico para prevenir la presentación de infecciones (Nordmann y Poirel, 2017) permitiendo que se mantenga la presión selectiva sobre las enterobacterias y, que el gen circule dentro de las poblaciones animales, **(ii)** El posible uso del antibiótico como promotor de crecimiento (Zhangqi et al., 2016), a pesar de las restricciones generadas por el ICA mediante la Resolución No. 00022747 del 2018 para el uso de colistina como aditivo en promotores de crecimiento en Colombia; tal como lo reportado en China por Li y colaboradores en el 2018, quienes un año después de que empezaron las restricciones del uso de colistina en este país, encontraron una alta presencia del gen *mcr-1* (45,1%) en aislados de *E. coli* de porcinos enfermos, **(iii)** El contacto directo entre cerdos portadores y no portadores o exposición a un ambiente contaminado (Katja et al., 2018). La presencia del gen *mcr-1* en enterobacterias de origen porcino a nivel de granjas, podría ser el causante del fracaso terapéutico de la colistina para tratar colibacilosis por *Escherichia coli*, la cual cursa con diarrea y septicemia (Olaitan et al., 2106).

Basados en la hipótesis de Liu y colaboradores en el 2016, quienes plantearon que el posible origen del gen *mcr-1* fue a nivel de granjas porcinas, debido principalmente a su uso como promotor de crecimiento, y que a partir de allí se diseminó al ser humano; la identificación de genes *mcr-1* en enterobacterias aisladas de porcinos a nivel de planta de beneficio en este estudio, genera una gran preocupación a nivel de salud pública, pues éste gen podría diseminarse a través

de la cadena cárnica al consumidor, especialmente en Colombia donde de acuerdo a los datos nacionales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) reportados por el Instituto Nacional de Salud, especies bacterianas como *E. coli* y *Salmonella* spp., se encuentran en el tercer y cuarto puesto respectivamente, como agentes etiológicos implicados en este tipo de enfermedades (INS, 2020). De forma particular se observa en el informe de resultados de la vigilancia de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud del 2016 (INS, 2016), que el departamento de Antioquia junto con el de Santander, son en los que se identificó la mayor cantidad de aislamientos positivos al gen *mcr-1*.

La identificación del gen *mcr-1* en especies como *Salmonella* spp., es relevante, pues se ha demostrado que las excreciones fecales de animales de granja, pueden contaminar con este microorganismo, desde productos cárnicos, hasta frutas y verduras a través de diseminación ambiental (Hanning et al., 2009). La identificación de peligros derivados del uso de antibióticos en animales de producción, debe tener un enfoque amplio que permita identificar las vías de diseminación a través de la cadena alimenticia y el ambiente, alienándose con las directrices de que reconoce la estrecha interacción entre las actividades pecuarias, el humano y el ambiente (McEwen y Collignon, 2018).

La identificación de aislados multirresistentes en un 80% (8/10) y ampliamente resistentes en un 20% (2/10) de las bacterias portadoras del gen *mcr-1* identificadas en nuestro estudio, y pertenecientes a las especies *E. coli* y *Salmonella enterica*, genera una gran preocupación por la disminución de opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones con estos microorganismos tanto a nivel de granja, como en caso de presentarse una infección de origen alimentario. Son de resaltar los aislados de la especie *E. coli*, que fueron extensivamente resistentes, en donde el aislado 109E2 fue solo susceptible a los grupos de los carbapenémicos y fluoroquinolonas y, el aislado 107E1 sólo al grupo de los carbapenémicos. A razón de estos hallazgos, se enfatiza la problemática de estas bacterias con un amplio espectro de resistencia a antimicrobianos, tanto a nivel pecuario, con casos como el presentado en una granja de cerdos en China, la cual sufrió un brote de diarrea

aguda por una *E. coli* ampliamente resistente, y que debido a la mala respuesta a los diferentes tratamientos antibióticos, causó un gran número de muertes y pérdidas económicas (Yajing et al, 2020); como a nivel de salud humana, con reportes preocupantes como el caso de una diarrea aguda por una infección con *Salmonella enterica* multiresistente portadora del gen *mcr-1*, en un lactante humano en China (Yinxia et al., 2021), la cual posee limitadas opciones terapéuticas para su tratamiento.

En el estudio realizado por Arenas y colaboradores en el 2018, se identificó que el uso no terapéutico de antibióticos como los betalactámicos, macrólidos y tetraciclinas, constituyeron la mayor presión selectiva relacionada con el uso de antibióticos en las prácticas pecuarias a nivel nacional, dato que apoya los resultados del presente estudio donde el 100% (10/10) de los aislados positivos al gen *mcr-1* fueron resistentes a la tetraciclina, y el 80% (8/10) a la ampicilina como parte del grupo de los betalactámicos.

La detección de aislados de *Salmonella enterica* y de *E. coli* multiresistentes de origen porcino, principalmente la identificación de aislados resistentes a cefalosporinas de tercera generación, son una gran preocupación debido a que se ha comprobado que los humanos pueden adquirir *E. coli* productoras de BLEEs a través de la cadena cárnica aviar y porcina (Madec et al., 2015), generando un grave al efecto en la salud humana, pues éstas pueden hidrolizar este importante grupo de antibióticos dejándolo por fuera de las opciones terapéuticas (Paterson y Bonomo, 2020), como se observó en el aislado E1092, el cual fue positivo a BLEEs presentando resistencia a cefotaxima y cefuroxima. La identificación de asilamientos de *E. coli* portadores del gen *mcr-1* y con presencia de BLEEs, se ha reportado anteriormente en porcinos a nivel de granja en países como China, donde se encontró una frecuencia del 39,59% (78/197) (Shafiq et al., 2019), porcentaje mayor al encontrado en esta misma especie en nuestro estudio, con un 12,5% (1/8). La identificación de aislados de *E. coli* portadores del gen *mcr-1* y positivos a BLEEs, representa un peligro importante, ya que este tipo de microorganismos podrían

entrar en la cadena alimentaria, siendo una amenaza importante para la salud pública.

Todos los aislados fueron sensibles al grupo de los carbapenémicos, debido posiblemente a que su uso está prohibido en animales productores de alimentos, por la importancia que revisten en salud pública humana al ser un antibiótico de última línea, (Mollenkopf et al., 2017).

La identificación del gen *mcr-1* en diferentes municipios de Antioquia, podría sugerir que la farmacorresistencia microbiana a colistina por mecanismo móviles se trata de un problema generalizado, pues el gen se identificó las regiones Norte, Nordeste, Valle del Aburra, Oriente y Suroeste del departamento. Al ser Antioquia la región del país con mayor volumen de producción y consumo de carne de origen porcino (Porkolombia, 2018), la necesidad de producir cada vez más y mejor, ha llevado a la implementación de medidas preventivas basadas en el uso antibióticos para mejorar rendimientos productivos y, en general, para mantener niveles de salud adecuados en los grupos de animales; en este sentido, el inadecuado uso de antibióticos en granjas porcinas, la falta de sistemas más robustos para el control eficiente de farmacorresistencia microbiana en predios pecuarios y, aunado a que a nivel nacional la implementación del Decreto 1500 de 2007, dirigido a mantener los procesos óptimos de transformación de carne para asegurar la inocuidad de los alimentos, no está implementado en el 100% de las plantas de beneficio del departamento ni del país, puede existir riesgo de diseminación de enterobacterias multirresistentes, desde la producción primaria hasta el ser humano por inadecuadas prácticas de procesamiento, y el posterior manejo de la carne y productos cárnicos comestibles.

Es probable que las muestras con farmacorresistencia fenotípica en las que no se detectó el gen *mcr-1*, presentaran mecanismos cromosómicos de farmacorresistencia microbiana (Quiroga et al, 2019), o algunas de las variantes del gen *mcr* que se han reportado a nivel mundial (Xavier et al., 2016), (Yin et al., 2017), (Carattoli et al., 2017), (Wang et al., 2020). Teniendo en cuenta que la colistina es un antibiótico de último recurso utilizado para el tratamiento de infecciones por

enterobacterias resistentes a carbapenémicos (Yu et al., 2016), la presencia de estos genes de farmacorresistencia microbiana podría llevar a la presentación de infecciones complicadas sin opciones terapéuticas disponibles tanto a nivel de producción primaria como en humanos. Aunque en Colombia ya se había reportado el gen *mcr-1* en muestras de alimentos de origen animal (INVIMA, 2017), para el conocimiento de los autores, este es el primer reporte de genes *mcr-1* en enterobacterias aisladas de materia fecal de porcinos, sirviendo como ejemplo del papel de la medicina veterinaria en la generación de mecanismos de farmacorresistencia microbiana a antibióticos a nivel de producción primaria.

Este estudio presenta varias limitaciones. Debido a la emergencia sanitaria por el COVID-19 decretada en marzo de 2020 a nivel nacional, se presentaron restricciones de ingreso a la planta de beneficio y al laboratorio, donde se realizaría el procesamiento microbiológico y molecular de las muestras. Debido a las restricciones por pandemia no fue posible alcanzar el tamaño muestral calculado de acuerdo a la prevalencia estimada del gen *mcr-1*, y el análisis de variantes de *mcr* adicionales.

La prueba de cribado tiene algunas limitantes en la identificación visual debido a posibles confusiones con otras bacterias con crecimiento similar, específicamente en el caso de *Salmonella* spp., se podría confundir con especies de *Proteus mirabilis* y *Acinetobacter junii*. Aunque el estudio de García-Fernández y colaboradores en el 2019 encontraron una especificidad del 100% y una sensibilidad del 95,5% para *E. coli* y del 81,8% para *Salmonella paratyphi*, es una prueba que depende del reconocimiento visual y experiencia para ser más exactos con la identificación inicial.

Los aislamientos que no crecieron en agar MK- colistina antes de la identificación del gen *mcr-1*, tal vez fue debido a que su MIC pudo haber sido menor a la concentración de 2mg/l utilizada en el medio, o por disminución de su capacidad de farmacorresistencia debido el tiempo que llevaban congeladas. Adicionalmente, no fue posible incluir la detección de variantes adicionales el gen *mcr*, que se han

detectado en porcinos cómo el *mrc-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*, por lo que podría haber una subestimación de las frecuencias encontradas.

Conclusiones

Este estudio evidencia una alta prevalencia de farmacorresistencia fenotípica adquirida a colistina y la circulación del gen tipo *mcr-1* en animales productores de alimentos específicamente en cerdos. A pesar de que el uso de colistina como promotor del crecimiento fue prohibido en el año 2018 en Colombia, en el presente estudio se detectaron aislados portadores de mecanismos móviles de farmacorresistencia microbiana frente a este antibiótico, lo que demuestra el efecto que puede tener el uso previo de la colistina, en la selección aislados resistentes en porcinos. La detección de mecanismos de farmacorresistencia microbiana de tipo transferible a este antibiótico, podría representar un riesgo potencial para la salud pública por su posible entrada a la cadena alimentaria.

El enfoque de Una Sola Salud se debe tener en cuenta para determinar el impacto que tiene el uso inadecuado de antibióticos cómo la colistina en animales productores de alimentos, el cual permite a través de la descripción de las interacciones humano, bacteria, animal y ambiente, identificar los puntos críticos que se deben intervenir para mantener o mejorar la salud humana y animal.

En consecuencia, la implementación de acciones que promuevan el uso racional de los antibióticos, como el funcionamiento eficaz de sistemas de vigilancia en farmacorresistencia microbiana en la industria pecuaria y, el mejoramiento de las medidas sanitarias en la industria porcina, deben suscitarse para evitar la aparición y diseminación de bacterias multirresistentes y su transferencia al humano a través de la cadena cárnica o el contacto directo. Asimismo, se debe promover la realización de futuras investigaciones que permitan esclarecer la epidemiología de la farmacorresistencia microbiana a colistina en animales productores de alimentos y su potencial diseminación al ser humano.

Referencias bibliográficas

Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G. (2016, Abril) Colistín en la era post-antibiótica. *Rev. Chil. Infecto*, 33(2): 166-176. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000200006#:~:text=El%20resurgimiento%20de%20colist%C3%ADn%20para,de%20la%20era%20post%2Dantimicrobiana.

Al-Tawfiq JA, Laxminarayan R, Mendelson M. (2017, Enero). How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *Int J Infect Dis*, 54:77–84. [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(16\)31634-4/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(16)31634-4/fulltext)

Arcos Ávila, Evelyn C., Mora Cardona, Leandro, Fandiño de Rubio, Luz C., Rondón Barragán, lang S. (2013, junio). Prevalencia de Salmonella spp. en carne porcina, plantas de beneficio y expendios del Tolima. *ORINOQUIA*, 17(1), 59-68. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092013000100007&lng=en&tlng=es.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092013000100007&lng=en&tlng=es)

Arenas N E, Moreno V. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infectio* 2018; 22(2): 110-119. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v22n2/0123-9392-inf-22-02-00110.pdf>

Barton Mary D. (2014, junio). Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current Opinion in Microbiology*. Volume 19. Pages 9-15. ISSN 1369-5274. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527414000642>)

Belaynehe KM, Shin SW, Park KY, Jang JY, Won HG, Yoon IJ. (2018, julio). Emergence of *mcr-1* and *mcr-3* variants coding for plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals in South Korea. *Int J Infect Dis*, 72:22–4. [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(18\)34419-9/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(18)34419-9/fulltext)

Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. (2017, Diciembre). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine

transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother*, 72(12):3317–24. <https://academic.oup.com/jac/article/72/12/3317/4161410>

Camou T, Zunino P, Hortal M. (2017, diciembre). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev. Médica de Uruguay*, 33(4): 104-127. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902017000400104&lng=es.

Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A. (2017, Agosto). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill* , 22(31). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28797329>

Central Ganadera S.A, 2020. Beneficio de porcinos. [Fecha de acceso: agosto 10 de 2020]. <https://centralganadera.com/servicios-de-la-central-ganadera/beneficio-porcinos/>

Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2007, 2011, and 2012. CLSI Document M100-S17, S21 and S22. Wayne, PA.

Dalmolin T V, Lima-morales D De, Barth AL. (2018, Agosto). Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know?. *Journal of Infectiology*, 1(2):16–22. <https://www.infectiologyjournal.com/articles/plasmidmediated-colistin-resistance-what-do-we-know.pdf>

Departamento Administrativo Nacional de Estadística, DANE. 2012. Boletín mensual insumos y factores de producción. [Fecha de acceso: agosto 15, 2020]. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_agosto_2012.pdf

Dohoo, Ian Robert; S Wayne Martin; Henrik Stryhn. Veterinary epidemiologic research. 2nd ed. Charlotte, P.E.I.: VER, Inc., 2009.

Düring K, Porsch P, Mahn A, Brinkmann O, Gieffers W. (1999, marzo) The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Journal*, 449:93–100. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2899%2900405-6?sid=nlm%3Apubmed>

Ellem, J. A., Ginn, A. N., Chen, S. C., Ferguson, J., Partridge, S. R., & Iredell, J. R. (2017, Julio). Locally Acquired *mcr-1* in *Escherichia coli*, Australia, 2011 and 2013. *Emerging infectious diseases*, 23(7), 1160–1163. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5512495/>

Emmanuel O. Ngbede A P, Anwar K, Yi Y, Folasade A, Alex A, Andrew M. Adamu LM. Mamfe ST, Daniel NM, Useh K.P, Kwaga MI. Adah PK, Patrick B, Chengming W. (2020, Septiembre). Identification of mobile colistin resistance genes (*mcr-1.1*, *mcr-5* and *mcr-8.1*) in Enterobacteriaceae and *Alcaligenes faecalis* of human and animal origin, Nigeria. *International Journal of Antimicrobial Agents* Volume 56, Issue 3, 106108, ISSN 0924-8579. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857920302910>.

El Garch F, de Jong A, Bertrand X, Hocquet D, Sauget M. (2018, Enero). *Mcr-1*-like detection in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals at slaughter in Europe. *Vet Microbiol*, 213:42-46. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113517309264?via%3Dihub>.

European Commission. (2011). Communication from the commission to the european parliament and the council. Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance [Fecha de acceso: abril 28, 2021]. <https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2011/EN/1-2011-748-EN-F1-1.Pdf>.

European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (EMA/ESVAC). Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. Fourth ESVAC report. European Medicines Agency. p. 1–115. [Fecha de acceso: agosto 18, 2021] <

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/10/WC500175671.pdf

European Union (EU). 2015. Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C 299/04). Official Journal of the European Union 11.9.2015. C 299/7-26. [Fecha de acceso: agosto 20, 2021]. https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/antimicrobial_resistance/docs/2015_prudent_use_guidelines_en.pdf

Fleming A. Nobel Lecture, (1945, Diciembre). [Fecha de acceso: Agosto 25, 2020]. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf>

Food and Drug Administration (FDA). 2013. New animal drugs and new animal drug combination products administered in or on medicated feed or drinking water of food-producing animals: recommendations for drug sponsors for voluntarily aligning product use conditions with GFI #209. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC. [Fecha de acceso: agosto 20, 2021]. <https://www.fda.gov/media/83488/download>

Fukuda A, Sato T, Shinagawa M, Takahashi S, Asai T, Yokota S ichi. (2018, Enero). High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan. *Int J Antimicrob Agents* ,51(1):163–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857917304272?via%3Dihub>

García-Fernández S, García-Castillo M, Ruiz-Garbajosa P, Morosini MI, Bala Y, Zambardi G, Cantón R. (2019 Enero). Performance of CHROMID® Colistin R agar, a new chromogenic medium for screening of colistin-resistant Enterobacterales. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 93(1):1-4.

García-Graells Cristina, Keersmaecker Sigrid C.J. De, Vanneste Kevin, Brigitte Pochet, Vermeersch Katie, Roosens Nancy, Dierick Katelijne, and Nadine Botteldoorn. (2018, febrero). Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance, *mcr-1* and *mcr-2* Genes, in *Salmonella* spp. Isolated from Food at Retail in Belgium

from 2012 to 2015. Volume: 15 Issue 2.
<https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/fpd.2017.2329>.

García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE. (2018, Julio). Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Int J Antimicrob Agents*, 52(1):104–8.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857918301006?via%3Dihub>

Giske, C.G. (2015, octubre). Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 21, Issue 10, 2015, Pages 899-905.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X15005546>.

Hanning IB, Nutt JD, Ricke SC. (2009, julio). Salmonellosis outbreaks in the States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne pathog Dis* 6:636-648. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2008.0232>.

Hille K, Roschanski N, Ruddat I, Woydt J, Hartmann M, Rösler U. (2018, Febrero). Investigation of potential risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* isolates from German fattening pig farms harbouring the *mcr-1* colistin–resistance gene. *Int J Antimicrob Agents*, 51(2):177–80.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857917302996?via%3Dihub>

Huijbers PMC, Blaak H, de Jong MCM, Graat EAM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, de Roda Husman AM. (2015, septiembre). Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review. *Environ Sci Technol* 49:11993–12004 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b02566>.

Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. (2016). Resolución No. 00006896 (10/06/2016). Por medio de la cual se establecen los requisitos para la expedición de la Guía Sanitaria de Movilización Interna – GSMI y se dictan otras disposiciones. [Fecha de acceso: septiembre 10, 2020].

<https://www.ica.gov.co/getattachment/50386e41-620d-48a9-aca1-c7b11cf4dd6f/2016R6896.aspx>

Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, (2018). Resolución No. 00022747 (09/04/2018). Por medio de la cual se prohíbe la importación, fabricación, registro, comercialización y uso de aditivos que contengan polimixina E (colistina) y polimixina B como promotores de crecimiento en especies animales productoras de alimentos para el consumo humano. [Fecha de acceso: agosto 17, 2021]. <https://www.ica.gov.co/getattachment/4972ba67-e1ba-4b2a-89ed-09f54f5c62b4/2018R22747.aspx>

Instituto Nacional de Salud, INS. (2016). Alerta por la primera detección de mcr-1 gen de resistencia a colistina en aislamientos de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* de origen humano en Colombia. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Alerta%20Colombia%20mcr1%20Salmonella%20y%20E%20%20coli.pdf>

Instituto Nacional de Salud, INS. (2020). Boletín Epidemiológico Semanal, Semana Epidemiológica 42 del 11 al 17 de octubre de 2020 [Fecha de acceso: septiembre 9, 2021]. https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_42.pdf

Instituto Nacional de Salud, Grupo de evaluación de Riesgos (EIRA) y Plaguicidas, INS. (2016). Uso de colistina en sistemas de producción pecuarios y su posible impacto en la salud pública 2016. [Fecha de acceso: agosto 11, 2021]. <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/CONCEPTO%20COLISTINA.pdf>

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA. (2017). Alerta por la primera detección del gen mcr-1 de resistencia al antibiótico colistina en aislamientos de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Give en alimentos en Colombia. [Fecha de acceso: septiembre 10, 2020] http://app.invima.gov.co/alertas/ckfinder/userfiles/files/ALERTAS%20SANITARIAS/Alimentos_Bebidas/2017/Agosto/02-0817%20Alerta%20colistina%20alimentos.pdf

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA. (2019). Datos del consumo de carne bovinos y porcinos 2019 por departamento. [Fecha de acceso: septiembre 10, 2020] <https://www.invima.gov.co/documents/20143/426809/DATOS-DE-CONSUMO-POR-MUNICIPIO-Y-DEPARTAMENTO-2019.pdf>

INTERNATIONAL STANDRAD ISO 20776-1: 2006. (2006) Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. 2006.

Jelovcan S, Leekitcharoenphon P, Weissensteiner G, Hendriksen RS, Lassnig H, Allerberger F. (2016, Diciembre). Detection of plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1*) in *E. coli* isolated from pig caecum in Austria. *Int J Infect Dis*, 53:44. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971216313340>.

Jiratchaya Puangseree, Saharuetai Jeamsripong, Rangsiya Prathan, Chanika Pungpian, Rungtip Chuanchuen. (2021, Junio). Resistance to widely-used disinfectants and heavy metals and cross resistance to antibiotics in *Escherichia coli* isolated from pigs, pork and pig carcass. *Food Control*, Volume 124, 2021, 107892, ISSN 0956-7135. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671352100030X>)

Li XS, Liu BG, Dong P, Li FL, Yuan L, Hu GZ. (2018, Mayo). The prevalence of *mcr-1* and resistance characteristics of *Escherichia coli* isolates from diseased and healthy pigs. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 91(1):63–5. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889317304108>

Liakopoulos A, Mevius DJ, Olsen B, Bonnedahl J. (2016, Agosto). The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild: Table 1. *J Antimicrob Chemother*, 71(8):2335–6. <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkw262>

Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos A-P, Mevius D. (2013, Abril). Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing

Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. *Clin Infect Dis*, 56(7):1030–7. <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis1043>

Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. (2019, enero). Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. 2019; 7(2):55. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020055>.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J. (2016, Febrero). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 16(2):161–8. [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(15\)00424-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(15)00424-7/fulltext)

Madec J.Y. , M. Haenni, V. Métayer, E. Saras, M.H. Nicolas-Chanoine. (2015, Agosto). High prevalence of the animal-associated *bla*_{CTX-M-1} *Incl1*/ST3 plasmid in human *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59 pp. 5860-5861

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. (2012, marzo). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* ;18(3):268-81.

Manrique CT. (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Academia de Farmacia “Reino de Aragón” Zaragoza: Cometa, S.A.

McEwen Scott A, Collignon Peter J. Antimicrobial resistance: a ulti perspective (2018, Abril). *Mricrobiology Spectrum*. Vol. 6, No 2. <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0009-2017>

Mendelson M, Brink A, Gouws J, Mbelle N, Naidoo V, Pople T. (2018, Septiembre). The One Health stewardship of colistin as an antibiotic of last resort for human health

in South Africa. *Lancet Infect Dis*, 18(9):e288–94. [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(18\)30119-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(18)30119-1/fulltext)

Mollenkopf, D. F., Stull, J. W., Mathys, D. A., Bowman, A. S., Feicht, S. M., Grooters, S. V., Daniels, J. B., & Wittum, T. E. (2017, febrero). Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Recovered from the Environment of a Swine Farrow-to-Finish Operation in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(2), e01298-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01298-16>

Moreno M, Claudia, González E, Rubén, & Beltrán, Constanza. (2009, Agosto). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 185-192. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014

Nordmann P, Poirel L. (2016, Marzo). Plasmid-mediated colistin resistance: An additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect*, 22(5):398–400. [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(16\)300246/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(16)300246/fulltext)

O'Neill J. (2016, Mayo). Tackling drugs-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*. <https://amr-review.org/>

Olaitan AO Iumuyiw, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, Serge Morand, Jean-Marc Rolain. (2015, Agosto) Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *J Antimicrob Chemother*, 70(12):3402–4. <https://academic.oup.com/jac/article/70/12/3402/2363712>.

Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. (2016, Enero). Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: A new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents*, 47(1):1–3. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857915004008?via%3Dihub>

Organización Mundial de la Salud, OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [Fecha de

acceso: noviembre17, 2020]. [https:// https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)

Organización Mundial de la Salud, OMS. (2017). Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana (Lista OMS de AIC). [Fecha de acceso: noviembre 17, 2020]. <https://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017es.pdf>

Organización Mundial de la Salud, OMS. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. [Fecha de acceso: noviembre17, 2020]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255204>

Organización Mundial de la Salud, OMS. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. [Fecha de acceso: noviembre17, 2020]. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, OPS/OMS. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. [Fecha de acceso: noviembre 17, 2020]. Disponible en : https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11129:amr-antimicrobial-resistance-intro&Itemid=41534&lang=es

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud pública en las Américas. 2016. [Fecha de acceso: diciembre 13, 2020]. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-jun-10-alerta-epi-enterob-resist.pdf>

Paterson Davis L, Bonomo Robert A. (2020, Diciembre). Extended-spectrum B-lactamases: a clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 18, No. 4. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.

Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. (2016, Marzo). Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis*, 16(3):281. [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(16\)00006-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(16)00006-2/fulltext)

Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. (2019, Marzo). Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S032575411830052X?via%3Dihub>

Qixia Luo, Yuan Wang, Yonghong Xiao. (2020, junio). Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health*. Volume 2, Issue 2. Pages 71-78, ISSN 2590-0536. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.05.001>.

Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. (2017, Diciembre). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand*, 59(1):31. <http://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-017-0299-7>.

Roschanski Nicole, Linda Falgenhauer, Mirjam Grobbel, Sebastian Guenther, Lothar Kreienbrock, Can Imirzalioglu, Uwe Roesler. (2017, agosto). Retrospective survey of *mcr-1* and *mcr-2* in German pig-fattening farms, 2011–2012, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 50, Issue 2, 2017, Pages 266-271, ISSN 0924-8579. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.007>.

Saavedra S, Arévalo A, Ovalle M, Montaña L, Hidalgo A. (2017, Noviembre). Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring *mcr-1* in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother*, 61 (12): e00841-17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5700323/>

Sánchez-Benito R, Iglesias MR, Quijada NM, Campos MJ, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Garduño E, Domínguez L, Quesada A. (2017, Agosto). *Escherichia coli* ST167 carrying plasmid mobilisable *mcr-1* and blaCTX-M-15 resistance determinants isolated from a human respiratory infection. *Int J Antimicrob Agents*, 50(2):285–6. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857917301814?via%3Dihub>

Shafiq, M., Huang, J., Ur Rahman, S., Shah, J. M., Chen, L., Gao, Y., Wang, M., & Wang, L. (2019, Julio). High incidence of multidrug-resistant *Escherichia*

coli coharboring *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-15} recovered from pigs. *Infection and drug resistance*, 12, 2135–2149. <https://doi.org/10.2147/IDR.S209473>

Shah MM, Odoyo E, Larson PS, Apondi E, Kathiiko C, Miringu G, Nakashima M, Ichinose Y. (2015, junio). First Report of a Foodborne *Providencia alcalifaciens* Outbreak in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*;93(3):497-500. <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/93/3/article-p497.xml>

Sistema Nacional de Recaudo. Porkcolombia. (2020). [Fecha de acceso: Enero 14, 2020]. <https://www.porkcolombia.co/estadisticas-sectoriales/>

Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. (2018, Septiembre). Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol*, 26(9):794–808. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X18300428%3Fshowall%3Dtrue>

Timmerman, T. Dewulf, B. Catry, B. Feyen, G. Opsomer, A. de Kruif. (2006). Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Prev Vet Med*, 74), pp. 251-263. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167587705002771>

Timmermans Michaël, Wattiau Pierre, Denis, Olivier, Boland Cécile. (2021, Abril). Colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-5*, including a case of triple occurrence (*mcr-1*, -3 and -5), in *Escherichia coli* isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 57, Issue 6, 2021, 106350, ISSN 0924-8579. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106350>.

Tham J, Walder M, Melander E, Odenholt I. (2012, Octubre). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in food. *Infect Drug Resist*, 5:143-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3476749/>

Thrusfield, Michael V. *Veterinary Epidemiology*. 2007. 3^a Ed. reimpr. Blackwell Science, Oxford.

Tong H, Liu J, Yao X, Jia H, Wei J, Shao D, Ke Liu, Yafeng Qiu, Zhiyong Ma, Beibei Li. (2018, noviembre). High carriage rate of *mcr-1* and antimicrobial resistance profiles of *mcr-1* positive *Escherichia coli* isolates in swine faecal samples collected from eighteen provinces in China. *Vet Microbiol*, 53–
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113518308204?via%3Dihub>

Thrusfield, Michael V. (2007). *Veterinary Epidemiology*. 3ª Ed. reimpr. Blackwell Science, Oxford. 2007.

Unión Europea. (2005). Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicamentosos, por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y se deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo. [Fecha de acceso: abril 28, 2021].
<https://data.consilium.europa.eu/doc/document/PE-43-2018-INIT/es/pdf>.

Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. (2012, Noviembre). A comprehensive summary of LL-37, the lactoferrin-derived human cathelicidin peptide. *Cellular Immunology*, 280:22–35:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874912002031?via%3Dihub>.

Wang C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M. y Zong, Z. (2020, Marzo). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect*, 104-127.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7067168/>.

Wang X, Wang Y, Wang Y, Zhang S, Shen Z, Wang S. (2018, Junio). Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in several uncommon species of Enterobacteriaceae from commercial poultry farm surrounding environments. *Vet Microbiol*, 219:161-164. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811351830261X?via%3Dihub>.

Wang Zheng, Fu Yulin, Schwarz Stefan, Yin Wenjuan, Walsh Timothy R., Zhou Yuqing, He Junjia, Jiang Haiyang, Wang Yang, Wang Shaolin.(2019, marzo). Genetic environment of colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* in *Escherichia coli*

from one pig farm in China. *Veterinary Microbiology*. Volume 230, 2019, Pages 56-61, ISSN 0378-1135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.011>.

Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM. (2018, Abril). Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS One*, 13(4):e0195281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5880376/>

Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* [Internet]. 2016 Jul ;21(27):30280. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27416987>

Yajing Wang, Jianzhao Liao, Khalid Mehmood, Yung-Fu Chang, Zhaoxin Tang, Hui Zhang. (2020, agosto). *Escherichia coli* isolated in pigs, Guangdong, China: Emergence of extreme drug resistance (XDR) bacteria. *Journal of Infection*, Volume 81, Issue 2, 2020. Pages 318-356. ISSN 0163-4453. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445320302759>

Yang QE, Tansawai U, Andrey DO, Wang S, Wang Y, Sands K, Anong K, Kanit A, Nophawan B, Brekhna H, Timothy R, Pannika R. (2018, Noviembre). Environmental dissemination of *mcr-1* positive Enterobacteriaceae by *Chrysomya* spp. (common blowfly): An increasing public health risk. *Environ Int*, 281-90. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.021>

Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh T, Shen J, Wang Y. (2017, Agosto). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*, 8(3):e00543-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28655818>

Yinxia Li, Yaowen Zhang, Maoyi Chen, Jie Hu, Haoran Zhang, Ying Xiang, Haiyan Yang, Shaofu Qiu, Hongbin Song. (2021, febrero). Plasmid-borne colistin resistance gene *mcr-1* in a multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate from an infant with acute diarrhea in China. *International Journal of Infectious*

Diseases. Volume 103, 2021. Pages 13-18. ISSN 1201-9712.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220324619>

Yu CY, Ang GY, Chin PS, Ngeow YF, Yin WF, Chan KG. (2016, Junio). Emergence of *mcr-1* mediated colistin resistance in *Escherichia coli* in Malaysia. *Int J Antimicrob Agents*, 47(6):504–5. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092485791630067X?via%3Dihub>.

Zineb Cherak, Lotfi Loucif, Abdelhamid Moussi, Jean-Marc Rolain (2021). Epidemiology of mobile colistin resistance (*mcr*) genes in aquatic environments. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Volume 27, Pages 51-62, ISSN 2213-7165. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521001946>

Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nuesch-Inderbinden M, Hächer H, Stephan R. (2016, Febrero). Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2594-2595. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808203/>

Anexo 2. Protocolo PCR para la detección de MCR-1

LÍNEA DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Grupo de Microbiología Molecular
Grupo de Microbiología Básica Aplicada
Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquía

TITULO:

PCR para detección de MCR-1

OBJETIVO:

Estandarizar la detección del gen *mcr-1* relacionado con la resistencia a colistina mediada por plásmidos.

DEFINICIONES

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

ALCANCE:

Este procedimiento será aplicable a los aislados de bacilos Gram-negativos que presenten resistencia fenotípica a colistina.

MATERIALES NECESARIOS

- Documentos relacionados
- Pipetas de 1000, 200, 100, 20 y 10 μ l
- Viales de 0.2 ml
- Viales de 1 ml
- Gradilla
- Marcador negro
- Agua (MLQ estéril)
- Buffer
- MgCl₂
- dNTPs
- Primers para cada gen a amplificar en sentido "forward" y "reverse"
- Taq polimerasa
- Gradilla de refrigeración

PROCEDIMIENTO

1. Realizar el cálculo de los volúmenes de reactivos a adicionar de acuerdo a la tabla que se presenta a continuación, multiplicando por el número de muestras a procesar. Tener en cuenta cuatro reacciones adicionales correspondientes a

un control positivo (BK47554 MCR+), un control negativo y 2 excesos para asegurar que el volumen sea suficiente al hacer alícuotas de la mezcla.

Reactivos del MM	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (1 reacción)
Agua (MLQ estéril)	-----	-----	8.8 µl
Buffer	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	2 µl
Primer CLR5-F	2.5 µM	0.2 µM	1.25 µl
Primer CLR5-R	2.5 µM	0.2 µM	1.25 µl
Taq	5 U	1 U	0.20 µl
Volumen total			23 µl

NOTA: El volumen final real es 25µl: 23 µl de master mix (MM) + 2 µl de DNA.

- Limpiar cuidadosamente la superficie de trabajo y las pipetas con suficiente alcohol y secar con servilletas. Encender la luz ultravioleta durante 15 minutos antes de iniciar la PCR.
- Tomar un tubo eppendorf de 1.5 ml y marcar como MM (Master Mix).
- Seleccionar tubos de PCR (0.2 ml) estériles de acuerdo al número de muestras. Marcar con el código de la muestra en la tapa de cada tubo.
- Retirar del congelador los reactivos a utilizar excepto la DNA polimerasa y colocarlos en una gradilla. Realizar la MM siguiendo los cálculos realizados previamente. Mezclar en vortex antes de agregar cada reactivo.
- Adicionar la DNA polimerasa a la MM y guardar la enzima en la nevera. No mezclar la enzima en vortex antes de agregarla.
- Realice vortex al MM y adicione 23 µl a cada tubo de PCR.
- Adicionar 2 µl de DNA de cada muestra a evaluar a cada tubo de PCR. Esto debe ser realizado en una zona separada de la utilizada para la preparación de la MM, para evitar contaminaciones.
- Ubicar las muestras en el termociclador, seleccionado el programa "MCR1", el cual tiene las siguientes condiciones:

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	15 min	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	30 seg	30 ciclos
Alineamiento	55 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo

- Visualizar el producto de amplificación en gel de agarosa a 1% de concentración, durante 45 minutos a 100 voltios. Usar marcador de 100 pb. El tamaño esperado para MCR1 es 309 pb.

La secuencia de los primers, gen blanco, tamaño esperado y cepas controles se presentan en la siguiente tabla:

Primer s	Secuencia (5' a 3')	Blanc o	Tamañ o (bp)	Cepa control	Referencia
CLR5-F	CGGTCAGTCCGTTTGT TC	<i>mcr-1</i>	309	BK47554	Donación Public Health Research Institute
CLR5-R	CTTGGTCGGTCTGTAG GG				

RESPONSABLES: Serán responsables de este proceso las personas encargadas de realizar el procedimiento y la coordinadora de la línea Epidemiología Molecular Bacteriana Judy Natalia Jiménez Quiceno

DOCUMENTOS RELACIONADOS (Referenciar en otra parte si es necesario):

Nombre del documento	Ubicación
Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb;16(2):161-8.	http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7

MANEJO DE CONTINGENCIAS:

Cada que se presente una situación específica dentro del procesamiento de muestras inusual, el caso debe ser informado a los responsables, con el fin de tomar decisiones sobre el particular

HISTORIAL

Desarrollado por	Fecha	Revisado por	Fecha
Astrid V. Cienfuegos	29-marzo-2016	Erika R.	