

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD DE *ENTEROCOCCUS* PRESENTE  
EN QUESO COLONIA CON ÉNFASIS EN LA DISTRIBUCIÓN DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

**por**

**Estefania AMARO AGUIRRE**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2022**

Tesis aprobada por:

Director:

-----

PhD Marcela González

-----

PhD Stella Reginensi

-----

MSc Jorge Olivera Rodi

Fecha:

-----

18 de marzo 2022

Autor:

-----

Estefanía Amaro

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional que me han dado a lo largo de la carrera, donde he conocido grandes personas que se transformaron en grandes amistades.

A Marcela por guiarme con mucha dedicación en el transcurso del trabajo, por su apoyo y por su tiempo dedicado, a pesar de la pandemia nos fuimos reconvirtiendo para poder lograr el objetivo de recibirme.

A Stella, Jorge, Jimena y a Nancy por compartir sus conocimientos, experiencias y su tiempo conmigo.

## TABLA DE CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN .....  | II     |
| AGRADECIMIENTOS .....   | III    |
| LISTA DE CUADROS E LUSTRACIONES .....   | VI     |
| <br>  |        |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 1      |
| 1.1. OBJETIVOS .....  | 1      |
| 1.1.1. <u>Objetivo general</u> .....  | 1      |
| 1.1.2. <u>Objetivos específicos</u> .....   | 2      |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....  | 3      |
| 2.1. GENERALIDADES DE LA ELABORACIÓN DEL QUESO<br>COLONIA .....   | 3      |
| 2.1.1. <u>Proceso de elaboración y aditivos utilizados</u> .....  | 4      |
| 2.1.2. <u>Coagulación y corte de la cuajada</u> .....   | 6      |
| 2.1.3. <u>Cocción y secado del grano</u> .....  | 6      |
| 2.1.4. <u>Asentamiento o Pre prensado</u> .....   | 7      |
| 2.1.5. <u>Moldeado</u> .....  | 7      |
| 2.1.6. <u>Prensado Moldeado</u> .....   | 7      |
| 2.1.7. <u>Salado y Maduración</u> .....   | 7      |
| 2.2. EL GÉNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> .....  | 9      |
| 2.2.1. <u>Características generales del género <i>Enterococcus</i></u> .....  | 10     |
| 2.2.2. <u>Aspectos funcionales y de seguridad de <i>Enterococcus</i> en<br/>                productos lácteos</u> ..... | 10     |
| 2.2.2.1. <u>Propiedades bioquímicas de interés tecnológico</u> ..   | 11     |
| 2.2.3. <u>Patogenicidad y virulencia</u> .....  | 13     |
| 2.2.4. <u>Resistencia antimicrobiana</u> .....  | 13     |
| 2.2.4.1. <i>Enterococcus vancomicina</i> resistentes .....  | 18     |

|  |    |
|--|----|
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 18 |
| 3.1. DESCRIPCIÓN DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....   | 18 |
| 3.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE QUESO .....  | 20 |
| 3.2.1. <u>Recuento de microorganismos</u> .....  | 20 |
| 3.2.2. <u>Evaluación de resistencia de antibióticos de los aislamientos de <i>Enterococcus spp</i></u> ..... | 21 |
| 3.2.3. <u>Aplicaciones tecnológicas. Lipólisis, Proteólisis</u> .....  | 24 |
| 4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....   | 26 |
| 4.1. RECuentos en queso colonia.....   | 26 |
| 4.2. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> .....                             | 29 |
| 4.2.1. <u>Enterococos resistentes a vancomicina</u> .....  | 36 |
| 4.3. POSIBLES APLICACIONES TECNOLÓGICAS: LIPÓLISIS, PROTEÓLISIS, UTILIZACION DEL CITRATO.....                | 37 |
| 5. CONCLUSIONES.....   | 41 |
| 5.1. RECuento de ENTEROCOCOS .....   | 41 |
| 5.2. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LOS ENTEROCOCOS.....  | 41 |
| 5.3. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LOS ENTEROCOCOS...  | 42 |
| 6. <u>RESUMEN</u> .....  | 44 |
| 7. <u>SUMMARY</u> .....  | 46 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA .....  | 47 |
| 9. <u>ANEXOS</u> .....   | 53 |

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

## Cuadro No.

|   |    |
|---|----|
| 1. Composición química del queso Colonia .....  | 4  |
| 2. Aditivos y cantidades recomendadas para la elaboración de queso<br>Colonia, cantidades cada 100L de leche .....        | 5  |
| 3. Resistencia intrínseca y adquirida de <i>Enterococcus</i> a los antibióticos....                                       | 15 |
| 4. Esquema de recolección de muestras .....   | 18 |
| 5. Métodos utilizados para el recuento de microorganismos.....  | 20 |
| 6. Antibióticos y rangos de concentración utilizados .....  | 22 |
| 7. Especificaciones para el género <i>Enterococcus</i> (CLSI) .....   | 24 |
| 8. Amplitud en la diversidad de los recuentos en los quesos Colonia<br>analizados (n=36) .....                            | 26 |
| 9. Porcentaje del nivel de resistencia según el antibiótico analizado .....   | 32 |
| 10. Amplitud de MAR-Index de los aislamientos analizados .....  | 35 |
| 11. Índice de resistencia múltiple de los aislamientos seleccionados para<br>evaluar las propiedades biotecnológicas..... | 39 |
| 12. Resistencia a los antibióticos del aislamiento 12.1 .....   | 40 |

## Figura No.

|  |    |
|--|----|
| 1. Crecimiento de enterococos en medio m- <i>Enterococcus</i> .....  | 21 |
| 2. Recuento de los distintos grupos microbianos presentes en queso<br>Colonia ( $\bar{x} \pm d.s$ ) .....  | 27 |
| 3. Ocurrencia de muestras con <i>Enterococcus</i> sobre el total de quesos<br>analizados .....   | 28 |
| 4. Recuento de <i>Enterococcus</i> en las muestras analizadas .....  | 29 |
| 5. Antibiograma-patrón de distribución de discos en el medio de cultivo<br>Müller-Hinton. Discos de Cloranfenicol 30, Ampicilina 10, Vancomicina<br>30, Ciprofloxacina 5 (A), Eritromicina 15, Gentamicina 120,<br>Estreptomina 300, Tetraciclina 30 (B) y Fosfomicina 50, Rifampicina 5,<br>Nitrofurantoína 300 (C) ..... | 30 |
| 6. Porcentaje del nivel de resistencia de los enterococos aislados.....  | 31 |
| 7. Índice de resistencia múltiple a antibióticos de los aislamientos de<br><i>Enterococcus</i> spp. analizados.....  | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 8. Porcentaje de aislamientos con bajo (MAR-Index $\leq 0,2$ ) y alto (MAR-Index $> 0,2$ ) riesgo de resistencia .....           | 35 |
| 9. Porcentaje de aislamientos según nivel de resistencia a vancomicina ...   | 37 |
| 10. Halo de proteólisis en medio PCA+Caseína (A), crecimiento de la bacteria en PCA+Caseína sin actividad proteolítica (B) ..... | 38 |
| 11. Crecimiento de la bacteria en medio Spirit Blue sin actividad lipolítica ...   | 39 |

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Enterococcus* ha cobrado una gran importancia a nivel internacional debido a su elevada incidencia en las enfermedades nosocomiales y por la adquisición de resistencia a muchos antimicrobianos.

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos agentes antimicrobianos, y pueden transferir esta resistencia a otros miembros dentro de la misma especie o incluso a microorganismos patógenos. Los alimentos de origen animal o vegetal pueden actuar como vectores para la transmisión de estos microorganismos, y es por esto que la cadena alimentaria se considera la principal ruta de entrada al tracto gastrointestinal humano de bacterias resistentes a los antibióticos. La importancia del estudio de los perfiles de resistencia a antibióticos presentes en alimentos se sustenta por sus posibles implicancias en la salud humana.

Los quesos, así como otros fermentados lácteos, albergan numerosos microorganismos vivos pertenecientes a diferentes géneros, entre los cuales los enterococos se consideran una parte relevante de la microbiota dominante (Giraffa, 2003, Jamet et al., 2012). La resistencia térmica de los enterococos (la mayoría de ellos resisten a 63°C durante 30 min.) explica su presencia en quesos elaborados a partir de leche pasteurizada, así como con leche cruda.

Este trabajo busca generar información sobre la presencia y caracterización del perfil de resistencia a antibióticos, de cepas pertenecientes al género *Enterococcus* spp. aisladas de queso Colonia producido en Uruguay y ofrecido al consumidor en el mercado minorista de Montevideo, como son supermercados, almacenes y ferias vecinales. A nivel nacional no existe información en esta temática, y se justifica debido a la importancia del consumo de queso Colonia en nuestra población.

### 1.1. OBJETIVO

#### 1.1.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es estudiar la comunidad de *Enterococcus* spp. presente en quesos Colonia ofrecidos al consumidor en el mercado minorista de Montevideo, con énfasis en la distribución de la resistencia a antibióticos.

### 1.1.2. Objetivos específicos

1. Analizar la microflora presente en quesos Colonia disponibles en supermercados, almacenes y ferias vecinales de la ciudad de Montevideo.
2. Cuantificar e identificar la población de *Enterococcus* spp.
3. Caracterizar el potencial patogénico de la población de *Enterococcus* spp. relacionado al estudio de la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas.
4. Estudiar las posibles aplicaciones tecnológicas de las cepas aisladas con bajo potencial patogénico, evaluando la capacidad proteolítica, lipolítica y la utilización del citrato como única fuente de carbono.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. GENERALIDADES DE LA ELABORACIÓN DEL QUESO COLONIA

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization – FAO) se define como queso al “producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante la coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/ descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación” Y al queso madurado como “producto que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión” (FAO y WHO, 1999).

En Uruguay, la quesería artesanal elabora cerca del 5,3% de la producción total de leche y representa el 26% de los establecimientos lecheros del país (INALE, 2014). El queso artesanal es elaborado con leche cruda, pasteurizada o termizada, producida en el predio exclusivamente. El consumo de queso artesanal en Uruguay equivale al 50% del total consumido (Palau y Mesa Macedo, 2007).

El queso Colonia es un queso típico uruguayo, elaborado según criterio de calidad y tradición de los inmigrantes suizos radicados en la cuenca lechera de Colonia (Crosa et al., 2008). Es clasificado dentro de la categoría de pasta semidura o de mediana humedad debido a sus características y composición final. La principal característica de estos quesos es la presencia de ojos en la masa de tamaño irregular, que pueden variar de 1 a 2 cm, y un sabor ligeramente fuerte y dulzón (Laborde, 1979). El cuadro 1 muestra la composición química del queso Colonia.

Cuadro No. 1. Composición química del queso Colonia

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| <b>Humedad (%)</b>            | 38 a 40 |
| <b>Proteína (%)</b>           | 26 a 28 |
| <b>Materia Grasa (% MGES)</b> | 45      |
| <b>Sal</b>                    | 1 a 1,5 |

**Fuente:** Laborde, 1979.

#### 2.1.1. Proceso de elaboración y aditivos utilizados

Se parte de una leche limpia, fresca y con una acidez máxima de 17°D, tipificada en 2,8 o 2,9% MG. Se recomienda una pasteurización lenta por 30 minutos a 63°C. Una vez que se llega a las condiciones deseadas se agregan los aditivos como son: colorantes, sal nitrito, cloruro de calcio, y fermento bacteriano este último es de suma importancia ya que le aporta al queso Colonia sus características típicas (Cuadro N°2) (Laborde, 1979).

Cuadro No. 2. Aditivos y cantidades recomendadas para la elaboración de queso Colonia, cantidades cada 100L de leche

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| <b>Colorante (cc)</b>        | 1 a 2   |
| <b>Cl<sub>2</sub>Ca (gr)</b> | 10      |
| <b>Sal nitrito (gr)</b>      | 5 a 10  |
| <b>Fermento (%)</b>          | 0,7 a 1 |

**Fuente:** Laborde, 1979.

Se adicionan bacterias ácido lácticas (BAL) generalmente liofilizadas, su principal función es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de la lactosa, aportando un sabor y textura al queso característico, además de la liberación de enzimas que intervienen en la maduración. Otro aspecto importante del producto de la fermentación es que se evita el desarrollo de bacterias patógenas (Cozzano y Delgado, 2003).

Las BAL pueden ser mesófilas y termófilas, dependiendo de su temperatura óptima de crecimiento. Las primeras tienen una temperatura óptima de 30 a 37°C (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*), en cambio la temperatura óptima de crecimiento de las BAL termófilas es de 50 a 55°C (*Streptococcus thermophilus*) *Lactobacillus delberueckii bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *L.plantarum*. (Cozzano y Delgado, 2003). Las BAL también pueden ser clasificadas según las vías metabólicas utilizadas para fermentar la glucosa. Existen bacterias homofermentativas como son *Lactococcus* y *Streptococcus*, que como resultado de la fermentación generan 90% ácido láctico, responsable del descenso del pH. Por otro lado, las bacterias heterofermentativas, como es el género *Leuconostoc*. producen ácido láctico, pero también otros compuestos como CO<sub>2</sub>, etanol, ácido acético y diacetilo. Algunas BAL son capaces de metabolizar el citrato (*Lactococcus lactis* spp. *lactis biovar diacetylactis* y el género *Leuconostoc*) obteniendo como productos compuestos volátiles como diacetilo y acetato, que aportan compuestos que imparten en aspectos importantes de aroma y sabor en los quesos. La acumulación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) producido por el metabolismo heterofermentativo y del citrato es el responsable de la formación de los ojos característicos del queso Colonia (Cozzano y Delgado, 2003).

### 2.1.2. Coagulación y corte de la cuajada

La coagulación de la leche es el primer paso en la fabricación tradicional de cualquier tipo de queso. Esta coagulación es una acción conjunta del cuajo y de la acidificación (Cozzano y Delgado, 2003).

La acidificación de la leche es producida por bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de la leche o aquellas que la industria adiciona con dicha finalidad conocidas como “cultivos iniciadores” o “starters”. Las BAL fermentan la lactosa generando ácido láctico que provoca el descenso del pH de la leche. Cuando el pH alcanza el punto isoeléctrico de las micelas de caseínas a un pH 4,6 ocurre la precipitación de las mismas (Olivera, 2018).

Las enzimas coagulantes, pueden ser de origen animal, vegetal, microbiano o de microorganismos modificados genéticamente, y la cantidad utilizada depende de que cuajo se utilice y la presentación comercial del producto. El cuajo se disuelve en agua fría antes de ser agregado en la tina quesera. Una vez que la cuajada se despega bien de la tina y no se adhiere a la palma de la mano si se aplica presión, es el punto exacto de la cuajada para proceder al corte y así, evitar pérdidas de rendimiento quesero. El corte se hace con una lira hasta alcanzar el tamaño de un grano de maíz y procurando la mayor uniformidad de los mismos. Un buen corte producirá un suero con no más de 0,5% de materia grasa. Alcanzado el tamaño de grano buscado, se realiza una agitación lenta para que el grano tome cierta firmeza previo a la cocción. El tiempo de agitado es de aproximadamente 15 minutos (Laborde, 1979).

### 2.1.3. Cocción y secado del grano

El proceso de cocción se realiza calentando la cuajada en agitación hasta alcanzar los 42°C, inyectando vapor en forma suave al principio, y más rápido al final para llegar a una temperatura de 47°C. El tiempo total de cocción es aproximadamente 20 minutos dependiendo del equipo disponible en la quesería (Laborde, 1979).

#### 2.1.4. Moldeado

Antes del moldeado se realiza el pre-prensado, cuando se llega al punto deseado de la cuajada se la deja asentar durante de 5 a 10 minutos. El suero debe tener una acidez entre 11 a 12°D. El moldeado se debe realizar lo más rápido posible luego del pre prensado y así evitar el enfriamiento de la masa (Laborde, 1979). La cuajada es escurrida, colocada sobre la mesa de trabajo, cortada en trozos uniformes y colocada en moldes.

#### 2.1.5. Prensado

Cuando se utilizan prensas mecánicas se requiere alrededor de 20 horas de prensado. En este período el queso debe invertirse al menos seis veces, en un ambiente de trabajo con una temperatura alrededor de 20°C. En cambio, en prensas neumáticas generalmente es suficiente un prensado de 3 horas y media a 4 horas con una presión inicial de 2,5 Kg aumentando hasta 4kg en la etapa final (Laborde, 1979).

El prensado se da por finalizado cuando el queso alcanza un pH de 5.2 o una acidez titulable de 60 - 70°D. Luego del prensado, se recomienda que los quesos reposen en una cámara a 10°C hasta el día siguiente cuando son llevados a salmuera (Cozzano y Delgado, 2003).

#### 2.1.6. Salado y Maduración

El salado se realiza por inmersión en piletas, al igual que otros quesos suizos. La salmuera debe presentar una concentración de 20 a 21° Baumé, un pH = 5.2 y una temperatura de 10 a 12°C. El tiempo de permanencia en la pileta de salado se estima en 6 a 8 horas por Kg de queso (Laborde, 1979). El efecto de salado modifica la acidez del queso, el contenido de humedad y disminuye la actividad de las bacterias lácticas, contribuye a la formación de la cáscara del queso evitando el crecimiento de bacterias, además del aporte de sabor que le otorga al queso. Una vez que se sacan de la salmuera los quesos deben ser aireados por 24 horas en un lugar fresco (Cozzano y Delgado, 2003).

La maduración incluye una serie de cambios físicos y químicos que van dando al queso su textura y sabor definitivos. Los agentes responsables de dicha transformación son las enzimas provenientes de la leche, el cuajo y de las bacterias ácido lácticas. La maduración se da en cámaras a temperaturas que van desde 10 a 13°C los primeros quince días, luego en cámaras con una temperatura mayor (18 a 23°C) hasta completar la maduración, o sea 15 a 20 días más, permitiendo así la fermentación propiónica y la formación de ojos en la masa del queso. En este plazo los quesos deben darse vuelta diariamente colocándolos cada vez en tablas limpias y secas (Laborde, 1979). Por lo tanto, en la segunda etapa, el gas producido por las bacterias ácido lácticas se acumula en la masa del queso, lo que determina la formación de ojos, esto se evidencia por una curvatura en la cara superior del queso.

## 2.2. EL GÉNERO *ENTEROCOCCUS*

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas debido a su capacidad de producir ácido láctico a partir de glucosa. Al contrario de otras BAL, los enterococos no son considerados como “Generalmente reconocido como seguro” (GRAS), y algunas especies de *Enterococcus*, como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, han surgido como patógenos oportunistas, siendo una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Conde-Estévez et al., 2011, Guzmán Prieto et al., 2016).

Díaz et al. (2010) señalan que, “en la última década, estos organismos han adquirido cada vez más importancia como patógenos nosocomiales, a pesar de su baja virulencia. El Sistema Nacional de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos (NNIS) ha considerado al género *Enterococcus* como la tercera causa más frecuente de infecciones nosocomiales, siendo estas bacterias las responsables de más del 10 % de todas las infecciones adquiridas en los hospitales. La reciente alerta sobre *Enterococcus* no sólo se debe a su incremento en las infecciones nosocomiales, sino también por su resistencia a penicilinas y cefalosporinas de varias generaciones y a la adquisición de altos niveles de resistencia a los glucopéptidos, especialmente a la vancomicina, el antibiótico que ha sido usado para tratar las infecciones causadas por los cocos Gram positivos”.

Los *Enterococcus* son bacterias Gram positivas que habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos, pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva, además debido a su resistencia y adaptabilidad se encuentran también en suelo, agua y alimentos como son carnes, leche y queso. Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteriemias enterococcicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central, intrabdominal y pélvica (Díaz et al., 2010).

Son capaces de adaptarse a vivir en los ambientes más hostiles, incluso en presencia de niveles altos de sales biliares y detergentes. Esta habilidad para adaptarse y persistir en presencia de detergentes podría permitirles sobrevivir a regímenes de limpieza inadecuados, contribuyendo a su persistencia en los hospitales, pudiendo transmitirse de una persona a otra por instrumentos clínicos o a través de las manos de los trabajadores de la salud (Díaz et al., 2010).

El 90 % de aislamientos clínicos son de *E. faecalis* y *E. faecium*. Estos pueden diseminarse de persona a persona por transmisión fecal-oral a través de fluidos de personas infectadas o por contacto con superficies contaminadas. En

las mujeres se pueden encontrar un número alto de *Enterococcus* en la vagina de manera asintomática y el 60% de los hombres son portadores de estos microorganismos en la zona perineal y en el meato urinario (Díaz et al., 2010).

### 2.2.1. Características generales del género *Enterococcus*

Antiguamente los enterococos pertenecían al grupo de los *Streptococcus* grupo D de Lancefield. En el año 1970 fueron oficialmente declarados como un género independiente. La división de los géneros se basó en estudios taxonómicos y de ácidos nucleicos que demostraron diferencias con *Streptococcus* y permitieron considerarlos géneros diferentes (Díaz et al., 2010).

Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos, no formadores de esporas que presentan morfología esférica u ovoide, de tamaño 0,6-2,0 × 0,6-2,5 μm. Se disponen de a pares o formando cadenas cortas. Son no móviles, con excepción de las especies *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, utilizan la energía química extraída de materia orgánica, con metabolismo fermentativo. Fermentan un amplio rango de carbohidratos (usualmente la lactosa) con producción principalmente de ácido láctico, pero no de gas. La actividad acidificante de estas bacterias provoca que el pH final descienda a 4,2 - 4,6. Son microorganismos catalasa-negativos. Presentan un rango de temperatura de crecimiento de 10 °C a 45 °C, aunque el óptimo es a 37 °C, por lo que son identificados como microorganismos mesófilos. Pueden crecer a pH entre 4,0 a 9,6, con 6,5 % de NaCl y con 40 % de bilis. Sobreviven después del calentamiento a 60 °C durante 30 min (Díaz et al., 2010).

El género *Enterococcus* incluye patógenos, microorganismos de deterioro y otros con potencial biotecnológico. Los miembros de este grupo son microorganismos ubicuos que ocasionalmente se encuentran en grandes cantidades en los alimentos, especialmente los de origen animal.

### 2.2.2. Aspectos funcionales y de seguridad de *Enterococcus* en productos lácteos

Los quesos albergan una microflora variada con presencia de diferentes géneros bacterianos, entre los cuales los enterococos se consideran una parte relevante de la microbiota dominante (Giraffa, 2003). Se ha considerado durante mucho tiempo que la presencia de *Enterococcus* en productos lácteos es debido a condiciones antihigiénicas durante la producción y procesamiento de la leche,

pero su presencia no está relacionada únicamente a contaminación fecal directa, sino que existe una contaminación indirecta a través de aguas contaminadas, exterior de animales, equipo de ordeño y tanques de frío (Gelsomino et al., 2002). También se encuentran en el suelo, en las aguas superficiales y en las plantas (Giraffa, 2003).

Debido a su capacidad de crecer en un amplio rango de temperatura, resistencia al calor, adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento, este género de bacterias puede aumentar su número a temperaturas de heladera y sobrevivir temperaturas de pasteurización, explicando la presencia en quesos elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada. Se han identificado diferentes especies de *Enterococcus* en productos lácteos, pero *E. faecalis* y *E. faecium* siguen siendo las especies de mayor importancia (Giraffa, 2003, Jamet et al., 2012).

Las bacterias del género *Enterococcus* forman parte de una microflora nativa de los quesos, que provienen del ambiente del tambo, así como de las instalaciones donde ocurre el proceso de elaboración quesera donde juegan un rol importante debido a su contribución en el sabor y aroma (“flavor”) típico de ciertos quesos, dada su actividad proteolítica y lipolítica, o la producción de metabolitos como el diacetilo por la utilización del citrato (Moreno et al., 2006).

#### 2.2.2.1. Propiedades bioquímicas de interés tecnológico

Los enterococos juegan un papel importante en la elaboración de diversos tipos de alimentos ya que contribuyen al desarrollo de las propiedades organolépticas durante los procesos de maduración de estos. Los enterococos descomponen la lactosa y el citrato durante la maduración del queso, lo que lleva a la producción de varios compuestos volátiles, como acetaldéido, diacetilo y etanol, que son responsables de la formación de aroma y sabor característicos del producto final (Terzić-Vidojević et al., 2015). En algunos quesos típicos, producidos en países del sur y norte de Europa a partir de leche cruda o pasteurizada de oveja y de cabra (Feta, Cebreino, mozzarella de búfalo de agua, Hispano y Vecano), los enterococos son la microflora predominante ( $10^4$  - $10^7$  ufc/g) (Giraffa, 2003).

#### Proteólisis

La proteólisis es la degradación de las caseínas, tiene un efecto importante en el desarrollo de la textura del queso. Además, algunos péptidos pueden contribuir en el flavor (sabor y aroma) del queso (Olivera, 2018).

La proteólisis se debe a enzimas del coagulante residual que sigue actuando en la etapa de maduración (quimosina, pepsina), por enzimas nativas de la leche (plasmina), por proteinasas y peptidasas secretadas en la masa del queso por las LAB y NSLAB y por lisis bacteriana de las BAL.

### Lipólisis

La lipólisis consiste en la hidrólisis de los triglicéridos por lipasas de origen microbiano, la enzima nativa de la leche lipoproteína lipasa (LPL) y lipasa lipoproteica presentes en el cuajo. Esta reacción genera ácidos grasos libres contribuyendo en el sabor del queso, así mismo mediante el catabolismo de los ácidos grasos libres se producen compuestos aromáticos volátiles como metilcetonas y tioésteres que también contribuyen con el flavor del queso (El Soda y Awad, 2014).

### Actividad antimicrobiana

Existen cepas de enterococos que muestran actividad antimicrobiana específica contra bacterias patógenas o de deterioro. Las bacteriocinas producidas por los enterococos, enterocinas, son muy diversas y ampliamente distribuidos entre aislamientos (Terzić-Vidojević et al., 2015).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizadas ribosomalmente, extracelularmente, liberadas especialmente por cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*. Las enterocinas suelen pertenecer a las bacteriocinas de clase II, es decir, son pequeñas y estables con membrana activa. Son insensibles al cuajo, tienen una estabilidad amplia a valores de pH y una compatibilidad general con otras BAL. Las enterocinas han mostrado un espectro inhibitorio hacia patógenos transmitidos por alimentos como son *Listeria* spp., *Clostridium* spp, bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Vibrio cholera*. Esto indica su uso como agentes biopreservadores en productos lácteos (Bhardwaj et al., 2008).

### Propiedades probióticas

Existen cepas de enterococos con propiedades terapéuticas, se manifiestan a través de actividades probióticas incluyendo el mantenimiento de la microflora intestinal normal y por lo tanto por la reducción de trastornos gastrointestinales, alivio de la intolerancia a la lactosa, reducción de niveles séricos de colesterol, anticarcinogénicos, estimulación del sistema inmunitario,

además de las propiedades probióticas existen cepas de enterococos que ayudan a mejorar el valor nutricional de los alimentos (Bhardwaj et al., 2008).

Se debe asegurar que las cepas de enterococos a utilizar en la producción de quesos no son potencialmente patogénicas, es decir que deben ser reconocidas como GRAS.

### 2.2.3. Patogenicidad y virulencia

Estos microorganismos constituyen patógenos oportunistas, si bien tienen poco potencial patogénico, ocurren infecciones en pacientes inmunodeprimidos, hospitalizados y aquellos que requieren dispositivos invasivos. Algunos de los factores de virulencia reportados para este género son la sustancia de agregación (*asa1*), gelatinasa (*gelE*), citolisina (*cylA*), proteína de superficie de enterococos (*esp*), hialuronidasa (*hyl*), proteína de adhesión de colágeno (*ace*) y antígeno de endocarditis (*efaA*) (Duprè et al., 2003, Vankerckhoven et al., 2004), que facilitan la proliferación bacteriana en el cuerpo humano y, por lo tanto, provocan infecciones.

Dentro del género *Enterococcus*, las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* han surgido como patógenos oportunistas y son responsables de un porcentaje creciente de infecciones nosocomiales, incluidas bacteriemia e infecciones intra-abdominales y del tracto urinario (Conde-Estévez et al., 2011).

### 2.2.4. Resistencia antimicrobiana

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos agentes antimicrobianos. La mayoría de los genes que codifican resistencia intrínseca residen en el cromosoma bacteriano. Poseen gran capacidad para la adquisición de mecanismos de resistencia y de genes de virulencia (Rossi et al., 2014, Guzmán Prieto et al., 2016). La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el ADN (mutación) o por la adquisición de genes de resistencia a través de la conjugación con otra bacteria que contiene plásmidos o transposones conjugativos que pueden portar múltiples genes de resistencia a antibióticos (Arias y Murray, 2012).

Si bien la presencia de plásmidos no significa que una cepa sea patógena, los enterococos pueden intercambiar genes de resistencia entre miembros de su

mismo género y con cepas de otros géneros bacterianos de Gram-positivos y Gram-negativos. Desde el punto de vista sanitario, el mayor peligro es la transferencia de genes con bacterias patógenas como *Listeria* spp y *Staphylococcus aureus* (Sparo et al., 2011, Pesavento et al., 2010).

Los miembros del género *Enterococcus* son naturalmente resistentes a cefalosporinas, carbapenem, bajas concentraciones de aminoglucósidos, polimixinas, lincomicina y clindamicina, aunque el grado de resistencia a estos antibióticos depende de la especie considerada. Además pueden adquirir resistencia a glucopéptidos, mácrolidos, tetraciclinas, sulfametoxazol, cloranfenicol y ampicilina (Angulo et al., 2006, Barbosa et al., 2009). Debido al incremento de resistencia de los enterococos a los agentes antimicrobianos, las opciones terapéuticas son más limitadas. Las cepas multirresistentes de enterococos se están convirtiendo en una amenaza ya que algunas cepas son resistentes a todos los antimicrobianos disponibles (Díaz et al., 2010).

Los mecanismos de resistencia intrínseca son debidos a la resistencia natural que poseen estos microorganismos, la resistencia de bajo nivel a los betalactámicos se debe a la presencia de una proteína fijadora de penicilina (PBP5) de baja afinidad por estos antibióticos, y la resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos obedece a que el transporte activo de estos antibióticos en los enterococos es ineficiente por una pobre energización de su membrana citoplasmática (Cuadro N°3). Estos dos tipos de resistencia obliga al uso combinado de antibióticos, actuando en forma sinérgica para tratamientos infecciosos (Bazet et al., 2005).

A los mecanismos de resistencia intrínseca se suman los mecanismos de resistencia adquirida (Cuadro N°3). Ambos tipos de resistencia pueden darse de forma independiente o asociarse en una misma cepa.

Cuadro No. 3. Resistencia intrínseca y adquirida de *Enterococcus* a los antibióticos

| Resistencia intrínseca  | Resistencia adquirida  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Betalactámicos de baja carga: penicilina, ampicilina y piperacilina</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Resistencia a betalactámicos de alta carga</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Cefalosporinas</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Resistencia alto nivel a aminoglucósidos</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Penicilinas resistentes a penicilinasas: oxacilina, dicloxacilina</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Glicopéptidos</li> </ul>                              |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Clindamicina</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Eritromicina</li> </ul>                               |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Trimetoprim/sulfametoxazol</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Tetraciclinas</li> </ul>                              |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Aminoglucósidos de baja carga</li> </ul>                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Fluoroquinolonas</li> </ul>                           |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Rifampicina</li> </ul>                                |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Cloranfenicol</li> </ul>                              |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Nitrofurantoína</li> </ul>                            |

**Fuente:** Adaptado de Bazet et al. (2005).

La resistencia a glicopéptidos, como la vancomicina ha cobrado mayor importancia debido a que existen pocas opciones terapéuticas para estas infecciones. Hasta el momento se han descrito seis genotipos de resistencia denominadas vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, de los cuales sólo dos tienen impacto clínico (vanA y vanB) por su capacidad de transferir genes entre especies y géneros diferentes. Las cepas con genotipo vanA presentan alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina y es inducible, esta resistencia está codificada a nivel de un transposón, frecuentemente localizado en un plásmido. Las cepas del genotipo vanB tienen resistencia variable a vancomicina y es inducible, pero permanecen sensibles a teicoplanina. Los determinantes de resistencia vanB residen generalmente en el cromosoma, aunque también pueden estar localizados en plásmidos y ser transferibles como parte de un gran elemento genético móvil, relacionado a un transposón conjugativo, lo que facilita su diseminación mediante transferencia horizontal (Bazet et al., 2005).

La transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre *Enterococcus* spp. y otros microorganismos ha sido documentada *in vitro* así como *in situ* en matrices alimentarias como el queso (Haubert et al., 2018). Los alimentos de origen animal o vegetal pueden actuar como vectores para la transmisión de estos microorganismos. En un estudio previo (Gelsomino et al., 2002), se comparó la microflora de enterococos presente en leche cruda y queso artesanal, con la existente en heces humanas y bovinas. Los autores observaron que el queso y las heces humanas contenían dos cepas dominantes de *E. casseliflavus* y una de *E. faecalis*, que no provenían del animal, sino que se encontraban en el equipo de ordeño. La presencia de cepas idénticas en las heces humanas y el queso, brindó evidencia de que el queso y la leche podrían ser los vectores de transmisión de las mismas.

La cadena alimentaria se considera la principal ruta de entrada al tracto gastrointestinal humano de bacterias resistentes a los antibióticos, ambiente en el que los genes de resistencia pueden ser transferidos a bacterias patógenas y/o oportunistas (Rossi et al., 2014).

Idealmente cada cepa que esté destinada a ser utilizada en la elaboración de cultivos iniciadores primarios o de cultivos adjuntos debe ser previamente caracterizada y evaluada en forma individual, se debe determinar la presencia o ausencia de factores de virulencia, además de evaluar la susceptibilidad a antibióticos clínicos (Terzić-Vidojević et al., 2015). La importancia del estudio de

los perfiles de resistencia a antibióticos presentes en la cadena alimentaria se sustenta por sus posibles implicancias en la salud humana.

#### 2.2.4.1. *Enterococcus vancomicina* resistente

En el año 1990 emergieron como patógenos nosocomiales los enterococos vancomicina resistentes (VRE), y su incidencia ha ido incrementándose con el correr de los años. En Inglaterra las infecciones por VRE se han incrementado en un 50% por año. En hospitales españoles la aparición de VRE se ha asociado con brotes epidémicos (Díaz et al., 2010). En América Latina cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina se detectaron por primera vez en 1998 en Brasil y Argentina, más tarde en Colombia. Inicialmente se trató de casos aislados, pero luego se produjeron brotes (Ponessa et al., 2006).

Los enterococos vancomicina resistentes han emergido como importantes patógenos en todo el mundo. La mayoría de los aislados presentaron el fenotipo vanA y correspondieron a *Enterococcus faecium* aunque se ha aislado también *Enterococcus faecalis*. Es posible la transmisión nosocomial de estos microorganismos por las manos o guantes a partir de pacientes infectados o colonizados. En Rosario, Argentina, se produjo un brote en el año 2000, luego de lo cual los VRE han sido detectados en distintos centros hospitalarios de la ciudad (Ponessa et al., 2006).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DESCRIPCIÓN DE RECOLECCIÓN DE DATOS Y MUESTREO

Se analizaron 36 quesos Colonia obtenidos aleatoriamente del mercado minorista de Montevideo (supermercados, almacenes, y ferias vecinales). Las muestras fueron colectadas mensualmente durante tres meses. Las mismas fueron transportadas en bolsas estériles y mantenidas bajo refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio de la Unidad de Tecnología en Alimentos, Facultad de Agronomía. En el cuadro No. 4 se detalla el esquema de muestreo realizado en la investigación.

Cuadro No. 4. Esquema de recolección de muestras

| <b>Queso</b> | <b>Lugar de recolección de las muestras</b> | <b>Fecha de recolección</b> |
|--------------|---|-----------------------------|
| <b>QEn1</b>  | Feria vecinal, artesanal                    | Agosto 2020                 |
| <b>QEn2</b>  | Feria vecinal, artesanal                    | Agosto 2020                 |
| <b>QEn3</b>  | Feria vecinal, artesanal                    | Agosto 2020                 |
| <b>QEn4</b>  | Feria vecinal, artesanal                    | Agosto 2020                 |
| <b>QEn5</b>  | Feria vecinal, artesanal                    | Agosto 2020                 |
| <b>QEn6</b>  | Supermercado, artesanal                     | Agosto, 2020                |
| <b>QEn7</b>  | Supermercado, artesanal                     | Agosto, 2020                |
| <b>QEn8</b>  | Supermercado, industrializado               | Agosto, 2020                |
| <b>QEn9</b>  | Supermercado, artesanal                     | Agosto, 2020                |
| <b>QEn10</b> | Supermercado, artesanal sin sal             | Agosto, 2020                |
| <b>QEn11</b> | Feria vecinal, artesanal                    | Agosto, 2020                |
| <b>QEn12</b> | Supermercado, industrializado               | Agosto, 2020                |
| <b>QEn13</b> | Supermercado, artesanal                     | Agosto, 2020                |
| <b>QEn14</b> | Feria vecinal, artesanal                    | Agosto, 2020                |

|              |   |                 |
|--------------|---|-----------------|
| <b>QEn15</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre, 2020 |
| <b>QEn16</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre, 2020 |
| <b>QEn17</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre, 2020 |
| <b>QEn18</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre, 2020 |
| <b>QEn19</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre, 2020 |
| <b>QEn20</b> | Feria vecinal, artesanal<br>bajo en sal | Setiembre, 2020 |
| <b>QEn21</b> | Supermercado,<br>artesanal              | Setiembre 2020  |
| <b>QEn22</b> | Puesto permanente,<br>artesanal         | Setiembre 2020  |
| <b>QEn23</b> | Supermercado,<br>industrializado        | Setiembre 2020  |
| <b>QEn24</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre 2020  |
| <b>QEn25</b> | Supermercado,<br>industrializado        | Setiembre 2020  |
| <b>QEn26</b> | Supermercado,<br>industrializado        | Setiembre 2020  |
| <b>QEn27</b> | Supermercado,<br>artesanal              | Setiembre 2020  |
| <b>QEn28</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre 2020  |
| <b>QEn29</b> | Feria vecinal, artesanal                | Setiembre 2020  |
| <b>QEn30</b> | Feria vecinal, artesanal                | Junio 2021      |
| <b>QEn31</b> | Feria vecinal, artesanal                | Junio 2021      |
| <b>QEn32</b> | Feria vecinal, artesanal                | Junio 2021      |
| <b>QEn33</b> | Puesto permanente,<br>artesanal         | Junio 2021      |
| <b>QEn34</b> | Puesto permanente,<br>artesanal         | Julio 2021      |
| <b>QEn35</b> | Supermercado,<br>industrializado        | Julio 2021      |
| <b>QEn36</b> | Supermercado,<br>artesanal al vacío     | Julio 2021      |

### 3.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE QUESO

#### 3.2.1. Recuento de microorganismos

Las muestras de queso colectadas fueron procesadas para determinar el recuento microbiano en placa de microorganismos mesófilos aerobios totales, bacterias ácido lácticas, enterobacterias y *Enterococcus* spp. Se pesaron 10 g de muestra que fueron diluidos en 90 mL de solución salina fisiológica (SSF, NaCl 0,85%) y homogenizados en Stomacher 400 (Seward, UK). A partir de la dilución preparada se realizaron diluciones decimales seriadas y fueron sembradas en placas por triplicado. Los medios de cultivo empleados y las condiciones en las que se incubaron las placas fueron las adecuadas para cada grupo microbiano (Cuadro No.5).

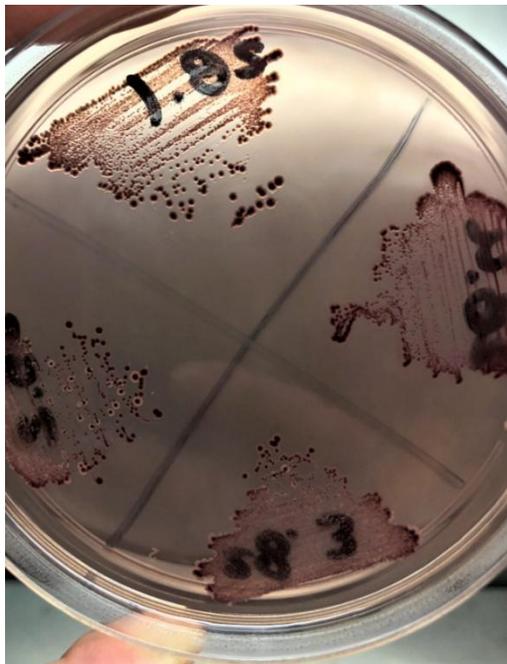
Cuadro No. 5. Métodos utilizados para el recuento de microorganismos

| <b>Grupo microbiano</b>           | <b>Medio de cultivo</b>                | <b>Condiciones de incubación</b>  |
|-----------------------------------|--|---|
| <b>Mesófilos aerobios totales</b> | Plate Count Agar (PCA, Oxoid)          | 37°C/24h  |
| <b>Bacterias ácido lácticas</b>   | Man Rogosa de Sharpe Agar (MRS, Oxoid) | 37°C/48h/condiciones microaerófilas, 6% O <sub>2</sub> utilizando el sistema Anoxomat MarkII (Mart Microbiology, Holanda) |
| <b>Enterobacterias</b>            | MacConkey (Oxoid)                      | 37°C/24h  |
| <b><i>Enterococcus</i></b>        | m- <i>Enterococcus</i> Agar (Acumedia) | 42°C/24h  |

### 3.2.2 Obtención de aislamientos de *Enterococcus*

Se realizaron aislamientos de presuntas colonias de *Enterococcus* a partir de las placas de m-*Enterococcus* crecidas. En cada placa fueron seleccionadas cinco colonias puntiformes rosadas, rojas o amarronadas, por ser características morfológicas típicas de las colonias de *Enterococcus* en el medio de cultivo empleado (Figura No. 1). A los presuntos aislamientos de *Enterococcus* se realizaron las pruebas bioquímicas confirmatorias como son: tinción de Gram, actividad catalasa, y crecimiento en presencia de 6,5% NaCl. Los aislamientos identificados como *Enterococcus* spp. fueron preservados en medio crioscópico (Trypticase Soya con 15% glicerol).

Figura No.1. Crecimiento de enterococos en medio m-*Enterococcus*



### 3.2.2. Evaluación de resistencia a antibióticos de aislamientos de *Enterococcus* spp.

La resistencia a antibióticos de los aislamientos identificados como *Enterococcus* spp. fue evaluada por el método de difusión de disco en placas de Agar Mueller Hinton (Oxoid). Este método se basa en el uso de una cantidad predeterminada de antibiótico, cuya sensibilidad está indicada por el tamaño de halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco. Se utilizaron discos de antibióticos (Oxoid) para determinar la susceptibilidad de los aislamientos a once antibióticos que se detallan en el cuadro No. 6.

Cuadro No. 6. Antibióticos y rangos de concentración utilizados

| <b>Antibióticos</b>   | <b>Abreviación</b> | <b>Concentración en el disco (µg)</b> |
|-----------------------|--------------------|---------------------------------------|
| <b>Ampicilina</b>     | AMP                | 10 µg                                 |
| <b>Eritromicina</b>   | E                  | 15 µg                                 |
| <b>Vancomicina</b>    | VA                 | 30 µg                                 |
| <b>Ciprofloxacina</b> | CIP                | 5 µg                                  |
| <b>Gentamicina</b>    | CN                 | 120 µg                                |
| <b>Estreptomina</b>   | S                  | 300 µg                                |
| <b>Cloranfenicol</b>  | C                  | 30 µg                                 |

|                        |     |        |
|------------------------|-----|--------|
| <b>Tetraciclina</b>    | TE  | 30 µg  |
| <b>Rifampicina</b>     | RD  | 5 µg   |
| <b>Fosfomicina</b>     | FOS | 200 µg |
| <b>Nitrofurantoina</b> | F   | 300 µg |

Los aislamientos se sembraron en Caldo Tripticasa de Soja (Tryptone Soya Broth-Oxoid), es un caldo de uso general que permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, tanto microorganismos exigentes como no exigentes, los mismos se incubaron a 37°C durante 24 horas. Los cultivos crecidos fueron sembrados con hisopo en la superficie de las placas de Petri con Agar Mueller Hinton (Oxoid). Se aplicaron los discos de antibióticos en las placas separados entre sí de tal forma que permita la difusión de los antibióticos y se pueda realizar correctamente la medición de los halos, evitando la interposición de halos de los distintos compuestos antibióticos considerados. Los análisis se realizaron por triplicado. Las placas se incuban de forma invertida en condiciones aeróbicas 37°C durante 24 horas.

Los halos de inhibición se midieron mediante el un programa informático ImageJ 1.53K (Wayne Resband and contributors National of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). La interpretación de los resultados se basó en las normas del Instituto de estándares de Laboratorio Clínico (Clinical Laboratory Standard Institute - CLSI). El cuadro No. 7 presenta las especificaciones para el género *Enterococcus*.

Los aislamientos que fueron sensibles a Vancomicina, Ampicilina, Gentamicina, Estreptomina y otros dos de los antibióticos evaluados fueron seleccionados para su posterior caracterización tecnológica.

Cuadro No. 7. Especificaciones para el género *Enterococcus* (CLSI)

| Antibióticos      | Diámetro del halo de inhibición(mm) |            |            |
|-------------------|-------------------------------------|------------|------------|
|                   | Sensible                            | Intermedio | Resistente |
| <b>AMP 10 µg</b>  | ≥ 17                                | -          | ≤ 16       |
| <b>E 15 µg</b>    | ≥ 23                                | 14-22      | ≤ 13       |
| <b>VA 30 µg</b>   | ≥ 17                                | 15-16      | ≤ 14       |
| <b>CIP 5 µg</b>   | ≥ 21                                | 16-20      | ≤ 15       |
| <b>GN 120 µg</b>  | ≥ 10                                | 7-9        | ≤ 6        |
| <b>S 300 µg</b>   | ≥ 10                                | 7-9        | ≤ 6        |
| <b>C 30 µg</b>    | ≥ 18                                | 13-17      | ≤ 12       |
| <b>TE 30 µg</b>   | ≥ 19                                | 15-18      | ≤ 14       |
| <b>RD 5 µg</b>    | ≥ 20                                | 17-19      | ≤ 16       |
| <b>FOS 200 µg</b> | ≥ 16                                | 13-15      | ≤ 12       |
| <b>F 300 µg</b>   | ≥ 17                                | 15-16      | ≤ 14       |

**Fuente:** Tomado de CLSI (2015).

### 3.2.3. Aplicaciones tecnológicas

Las características a evaluar fueron la actividad lipolítica, proteolítica y la utilización del citrato como única fuente de Carbono de los aislamientos seleccionados.

La actividad lipolítica se evaluó en placas de medio Spirit Blue (Difco). Se sembraron en placas de Petri en superficie con ansa estéril en forma de botón, las mismas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. La presencia de un halo translúcido alrededor de las colonias crecidas se consideró que la cepa posee actividad lipolítica.

Para evaluar la actividad proteolítica los aislamientos se sembraron en Plate Count Agar (PCA, Oxoid) adicionado con caseína al 1%, se le agregó caseína al 1% para ver actividad proteolítica de la cepa. Las placas se sembraron en superficie con un ansa estéril en forma de botón, las mismas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. Las placas que presentaron un halo translúcido de proteólisis, o sea una zona clara alrededor de la colonia, se considera como positivo para la actividad ensayada.

La capacidad de las cepas de *Enterococcus* para utilizar el citrato como única fuente de carbono se determinó en tubos conteniendo agar Citrato de Simmons (Difco). Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. Los tubos que presentaron crecimiento y alcalinización del medio se consideraron positivo para esta actividad. No necesariamente que los enterococos utilicen el citrato como única fuente de carbono va a garantizar la producción de ciertos compuestos de interés biotecnológico, ya que esta técnica no evalúa la producción de los metabolitos obtenidos del citrato metabolizado.

Todos los ensayos considerados en la caracterización tecnológica se realizaron por duplicado.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RECUEENTOS EN QUESO COLONIA

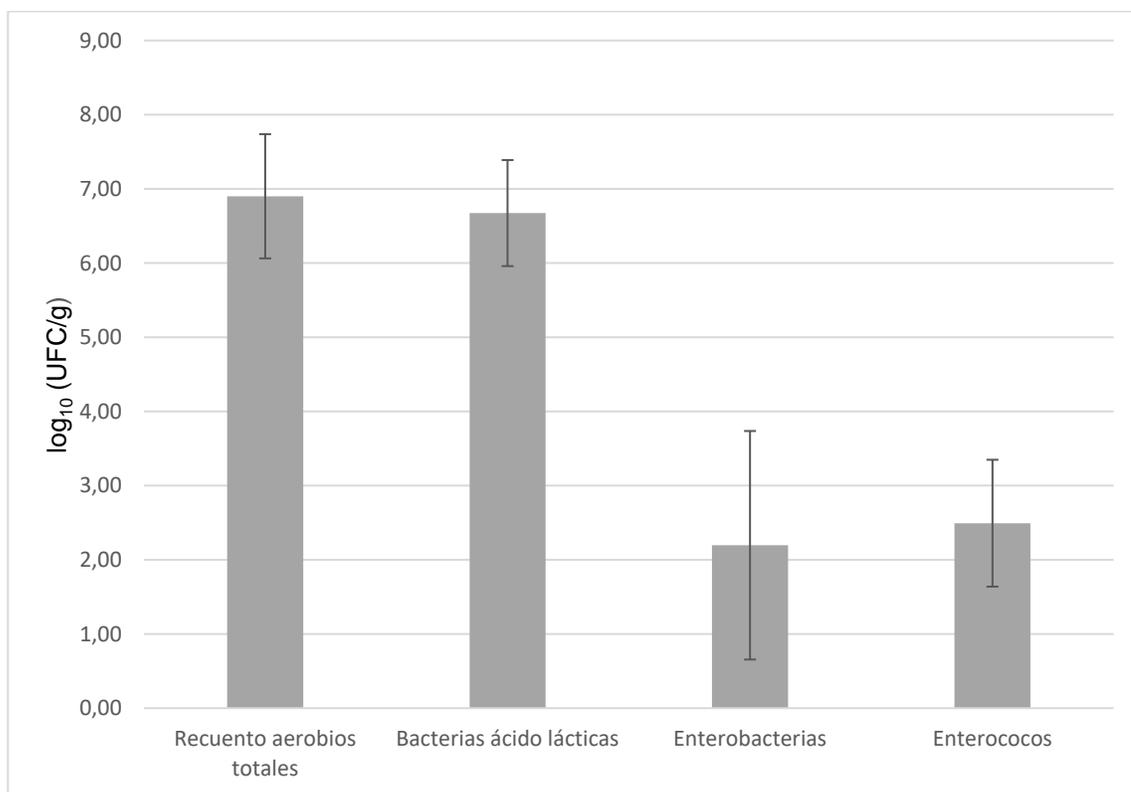
Para cada queso analizado se determinó los recuentos microbianos de microorganismos mesófilos aerobios (RT), recuento de enterobacterias, recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) y recuento de presuntos enterococos. Los resultados obtenidos de cada queso se muestran en el Anexo No. 2. Dentro de cada grupo microbiano los recuentos fueron muy variables según la muestra analizada. El cuadro No. 8 muestra los valores extremos y el valor promedio de los parámetros analizados en el grupo de muestras evaluadas.

Cuadro No. 8. Recuento de los distintos grupos microbianos en los quesos Colonia analizados (n=36)

| <b>Grupo microbiano</b> | <b><math>\bar{x}</math> (UFC/g)</b> | <b>Min. (UFC/g)</b> | <b>Máx. (UFC/g)</b> |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>RT</b>               | 3,14E+07                            | 1,00E+05            | 1,81E+08            |
| <b>BAL</b>              | 3,25E+07                            | 0,00E+00            | 2,12E+08            |
| <b>Enterobacterias</b>  | 1,33E+04                            | 0,00E+00            | 1,31E+05            |
| <b>Enterococos</b>      | 1,43E+04                            | 0,00E+00            | 1,25E+05            |

En la figura No.2 muestra que el desvío estándar asociado al recuento de Enterobacterias es mayor al presentado a los otros grupos microbianos considerados en este estudio, o sea existe una dispersión alta con respecto a la media en las distintas muestras, en cuanto al resto de los grupos microbianos los desvíos son menores, si bien hay muestras en los extremos, la mayoría son representadas por el valor promedio.

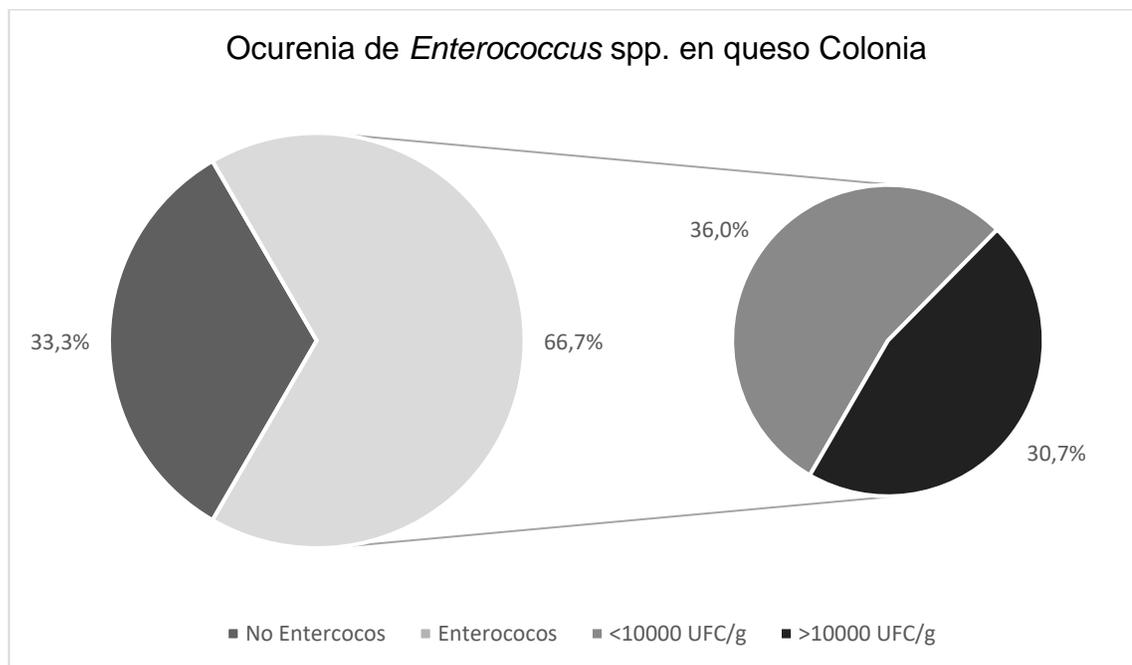
Figura No. 2. Recuento de los distintos grupos microbianos presentes en queso Colonia ( $\bar{X} \pm d.s$ )



El Reglamento Bromatológico establece que los quesos de mediana humedad como lo es el queso Colonia no pueden presentar recuentos de Enterobacterias mesófilas superiores a 5000 UFC/g. La mayor parte de los quesos analizados cumplieron con este requisito, sin embargo, el 30% de las muestras superaron este límite, incumpliendo con los requisitos bromatológicos establecidos. Cabe aclarar que de los parámetros definidos en el Reglamento Bromatológico el único parámetro evaluado en este estudio fue el recuento de Enterobacterias.

El porcentaje de quesos en los que se detectó la presencia de *Enterococcus* se presenta en el gráfico de la figura No. 3. De acuerdo a los resultados obtenidos el 66,7 % de los quesos analizados se encontró la presencia de *Enterococcus* spp. Aproximadamente dos tercios de los quesos Colonia analizados presentaron enterococos en su microflora. Estos niveles de ocurrencia son similares a los observados por Jamet et al. (2012) en un estudio que abarcó distintos tipos de quesos en Francia, pero inferiores a los observados en quesos típicos de Egipto o Turquía (Hammad et al., 2015, Sanlibaba y Senturk, 2018).

Figura No. 3. Ocurrencia de muestras con *Enterococcus* sobre el total de quesos analizados

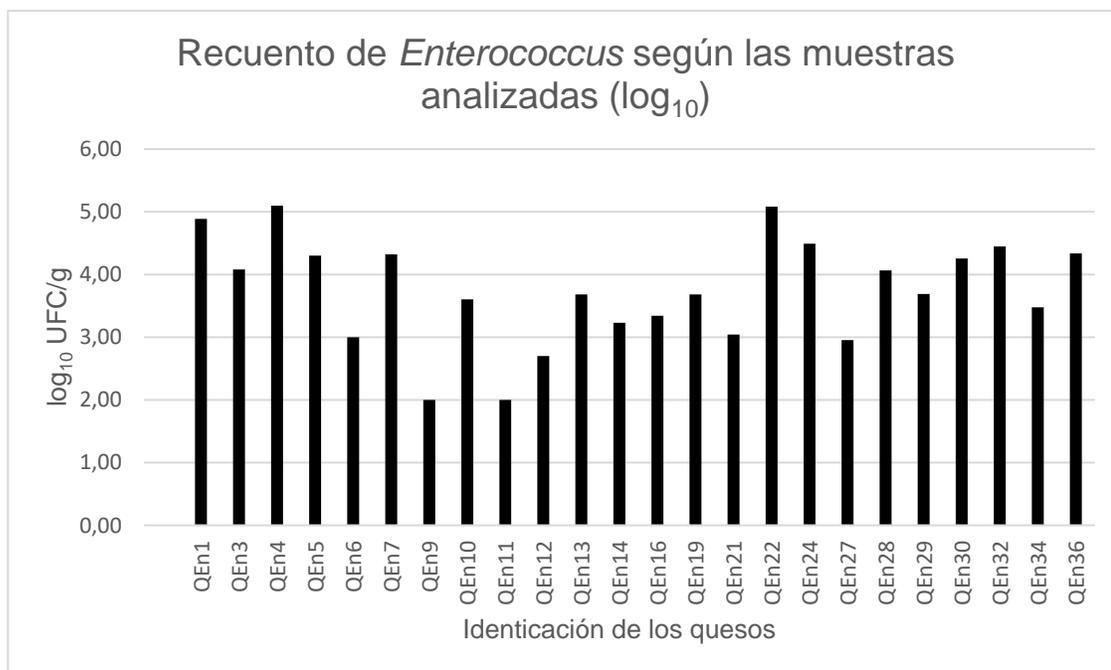


En las muestras que se observó crecimiento de enterococos (66,7%), la abundancia de la población varió entre  $10^2$  UFC/g hasta  $10^5$  UFC/g. Aproximadamente la mitad mostraron recuentos mayores a  $10^4$  UFC/g (Figura No. 3), mientras que la otra mitad presentó recuentos en el entorno de  $10^3$  UFC/g. Se consideró un valor de recuento bacteriano como umbral ( $10^4$  UFC/g) ya que es el orden de recuento promedio de enterococos ( $1,43E+04$ ).

Estos rangos de recuento bacteriano coinciden con los observados en quesos franceses por Jamet et al. (2012), aunque los valores máximos detectados en dicho estudio fueron de hasta  $10^8$  UFC/g.

La figura No 4. muestra el recuento de enterococos en las distintas muestras analizadas. Si se comparan los recuentos bacterianos se puede observar una gran variación de los mismos. El recuento de enterococos tuvo un máximo de 5,1  $\text{Log}_{10}$  UFC/g, un mínimo de 2  $\text{Log}_{10}$  UFC/g y un valor medio de recuento de 3,7  $\text{Log}_{10}$  UFC/g, estos recuentos son menores a los observados por González-Montiel y Fernández (2015) en un estudio realizado en queso blando en México, que presentaron un máximo de 7,71  $\text{Log}_{10}$  UFC/g, un mínimo de 5,30  $\text{Log}_{10}$  UFC/g de *Enterococcus* spp., con un promedio de 6,59  $\text{Log}_{10}$  UFC/g.

Figura No. 4. Recuento de *Enterococcus* spp. en las muestras analizadas

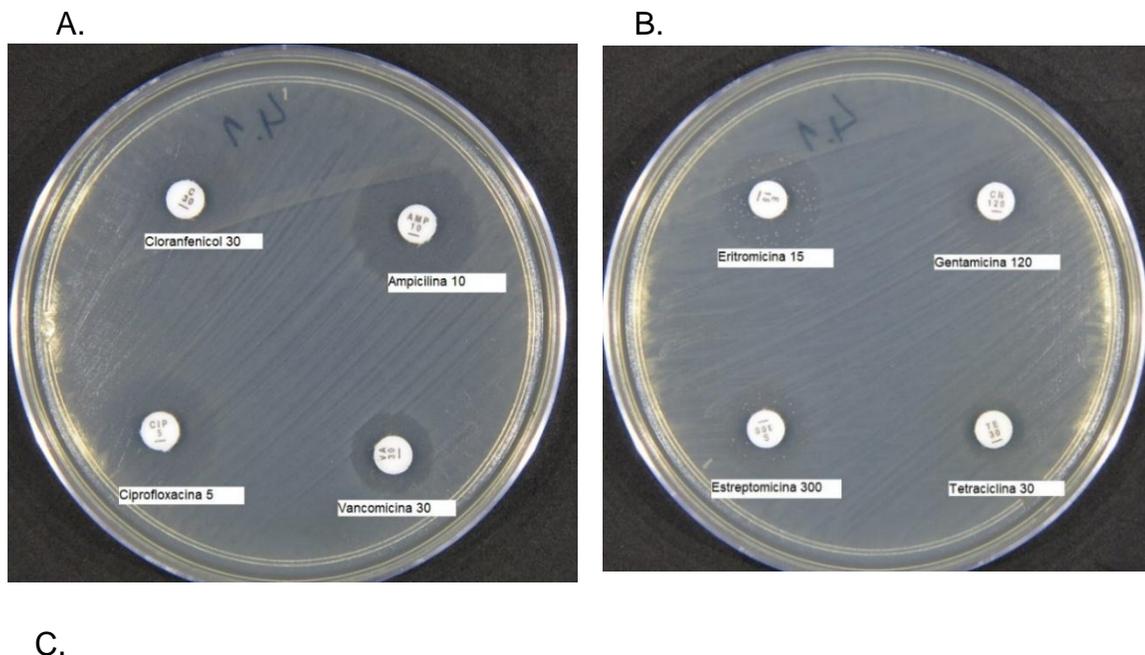


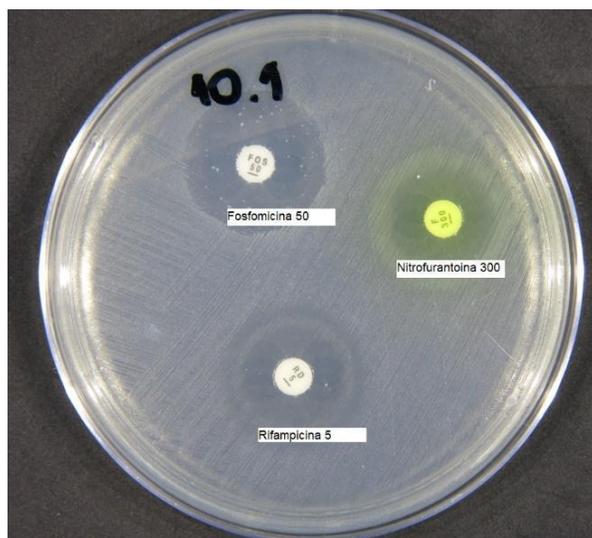
Se seleccionaron 84 aislamientos obtenidos a partir de las placas m-*Enterococcus* que resultaron presuntos *Enterococcus* de acuerdo a las pruebas bioquímicas empleadas.

#### 4.2. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *ENTEROCOCCUS*

Los aislamientos de enterococos confirmados se sometieron a pruebas de susceptibilidad a once antibióticos mediante el método de difusión de disco en placas de Müller-Hinton para ver los diámetros de los halos de resistencia para cada antimicrobiano. En el cuadro No. 5 se muestra el patrón de distribución de los discos de antibióticos.

Figura No. 5. Antibiograma-patrón de distribución de discos en el medio de cultivo Müller-Hinton. Discos de Cloranfenicol 30, Ampicilina 10, Vancomicina 30, Ciprofloxacina 5 (A aislamiento N°4.1), Eritromicina 15, Gentamicina 120, Estreptomicina 300, Tetraciclina 30 (B aislamiento N°4.1) y Fosfomicina 50, Rifampicina 5, Nitrofurantoina 300 (C aislamiento N°10.1)

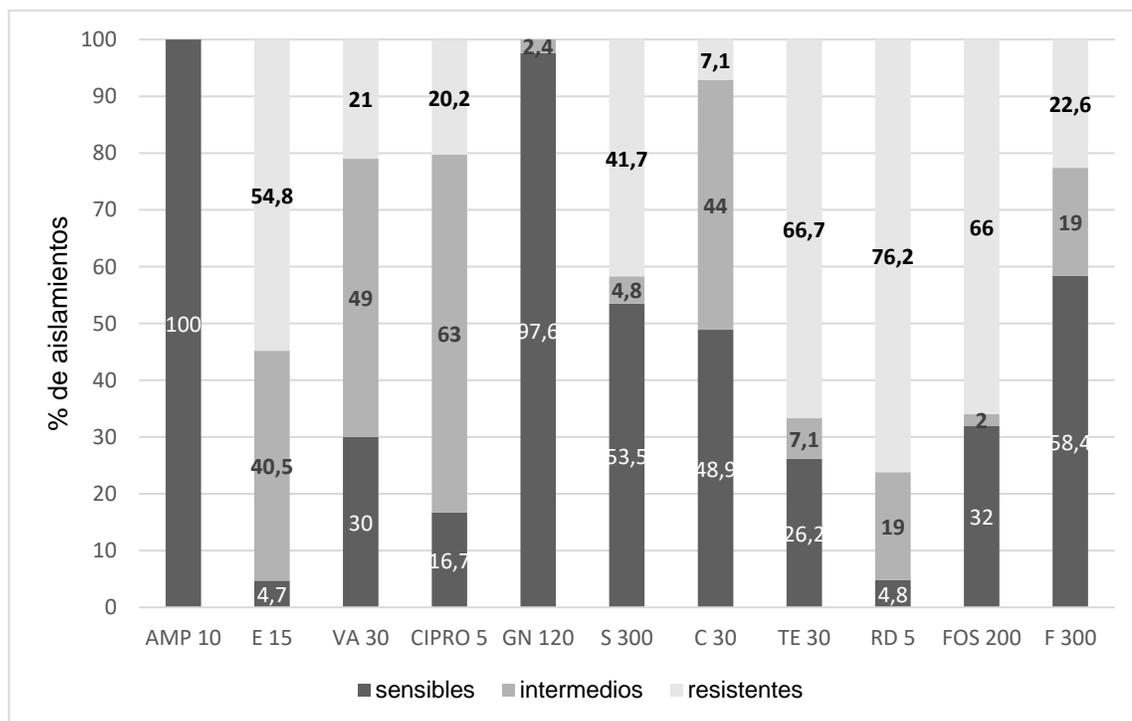




En el Anexo no.3 se muestra el nivel de resistencia de todos los aislamientos de enterococos para los antibióticos analizados. Todos los aislamientos mostraron resistencia a por lo menos uno de los antibióticos evaluados en este estudio.

La figura No 6. muestra en porcentaje el nivel de resistencia a los once antibióticos analizados. La interpretación de los resultados se basó en las normas del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (Clinical Laboratory Standard Institute – CLSI; CLSI 2015) y los aislamientos se clasificaron como sensibles (S) intermedio (I) o resistentes (R) para cada antibiótico. Todos los aislamientos estudiados mostraron sensibilidad a Ampicilina y el 97,6% de los aislamientos mostraron sensibilidad a Gentamicina a concentraciones terapéuticas, cabe aclarar que el 2,4% restante no fueron resistente a este antibiótico, sino que presentaron resistencia intermedia. Esto es importante, ya que según Foulquié-Moreno et al. (2006), estos dos antibióticos, junto con la vancomicina, son los más relevantes en el tratamiento contra infecciones causadas por *Enterococcus*.

Figura No 6. Porcentaje del nivel de resistencia de *Enterococcus* spp. aislados de queso Colonia (n= 84)



EL 53,5 de los aislamientos presentaron sensibilidad a Estreptomicina, a Nitrofurantoína el 58,4 % y a Cloranfenicol el 48,9 %. Por otra parte, los aislamientos que mostraron mayor porcentaje de resistencia fueron a Eritromicina (54,8%), a Tetraciclina (66,7 %), a Rifampicina (76,2%) y a Fosfomicina (66,0 %). La alta ocurrencia de aislamientos resistentes a estos antibióticos ha sido observada también en quesos italianos (Russo et al., 2018) y artesanales de Portugal (Câmara et al., 2020). Sin embargo, la relevancia clínica de la resistencia a estos antibióticos no es crítica, ya que rara vez se utilizan para tratar infecciones por enterococos. La alta ocurrencia de aislamientos resistentes a Tetraciclina también fue observada por otros autores en quesos de Italia (Russo et al., 2018), Egipto (Hammad et al., 2015) y Francia (Jamet et al., 2012). La resistencia a la Tetraciclina se atribuye al alto uso de estos antibióticos en las prácticas veterinarias, y concuerda con el aumento observado de la presencia de genes de resistencia a la tetraciclina en el medio ambiente, las instalaciones animales y,

en consecuencia, en los alimentos de origen animal (Fuka et al., 2017, Kürekci et al., 2016, Ogier y Serror, 2008).

En cuanto a los aislamientos con nivel de resistencia intermedio, el 49% presentan un nivel de resistencia intermedia a Vancomicina y el 63% a Ciprofloxacina (Cuadro No.9).

Cuadro No. 9. Porcentaje del nivel de resistencia según el antibiótico analizado

| <b>Antibióticos</b> | <b>% de aislamientos sensibles</b> | <b>% de aislamientos intermedios</b> | <b>% de aislamientos resistentes</b> |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>AMP 10 µg</b>    | 100                                | 0                                    | 0                                    |
| <b>E 15 µg</b>      | 4,7                                | 40,5                                 | 54,8                                 |
| <b>VA 30 µg</b>     | 30,0                               | 49,0                                 | 21,0                                 |
| <b>CIP 5 µg</b>     | 16,7                               | 63,0                                 | 20,2                                 |
| <b>GN 120 µg</b>    | 97,6                               | 2,4                                  | 0                                    |
| <b>S 300 µg</b>     | 53,5                               | 4,8                                  | 41,7                                 |
| <b>C 30 µg</b>      | 48,9                               | 44,0                                 | 7,1                                  |
| <b>TE 30 µg</b>     | 26,2                               | 7,1                                  | 66,7                                 |
| <b>RD 5 µg</b>      | 4,8                                | 19,0                                 | 76,2                                 |
| <b>FOS 200 µg</b>   | 32,0                               | 2,0                                  | 66,0                                 |
| <b>F 300 µg</b>     | 58,4                               | 19,0                                 | 22,6                                 |

Los antibióticos han sido utilizados indiscriminadamente en la ganadería, aunque han demostrado ser beneficiosos, por razones económicas, puede contribuir a la transmisión de la resistencia a los antibióticos en la cadena alimentaria.

En Estados Unidos, el 70% del uso de los antibióticos es animal y el 30% es de uso humano (Casana Rico, 2017).

La utilización de los antibióticos en producción ganadera tiene ciertos fines, el primero es el uso para el tratamiento de infecciones, el segundo es como profiláctico previniendo infecciones mediante el tratamiento grupal de animales, los antibióticos se agregan en raciones en forma de premezcla en

concentraciones elevadas, y como último y no menos utilizado es el uso como promotor de crecimiento, también incluidos en la alimentación del ganado a través de raciones, pero a concentraciones subterapéuticas. En estas condiciones, las bacterias logran sobrevivir a la presión selectiva generada mediante mutaciones cromosómicas que les confieren resistencia a los antibióticos, que pueden diseminar mediante transferencia horizontal de genes. Esto genera un reservorio de bacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos, incluidas bacterias multirresistentes (Casana Rico, 2017).

Los aislamientos evaluados que presentaron resistencia a uno o más antibióticos de tres o más clases diferentes se clasificaron como MDR (bacterias multirresistentes). Cabe aclarar que, de los once antibióticos evaluados en este estudio, solamente dos comparten la misma clase de antibióticos que son la Gentamicina y Estreptomina que pertenecen a los aminoglucósidos, por lo tanto, para evaluar el riesgo de los aislamientos se calcula el índice de resistencia múltiples a antibióticos, ya que prácticamente todos pertenecen a diferentes clases.

El índice de resistencia a múltiples antibióticos (MAR-Index) de cada aislamiento se calculó como:

$$MAR - Index: a/b$$

*Donde:*

*a: respresenta el número de antibióticos a los que el aislamiento es resistente*

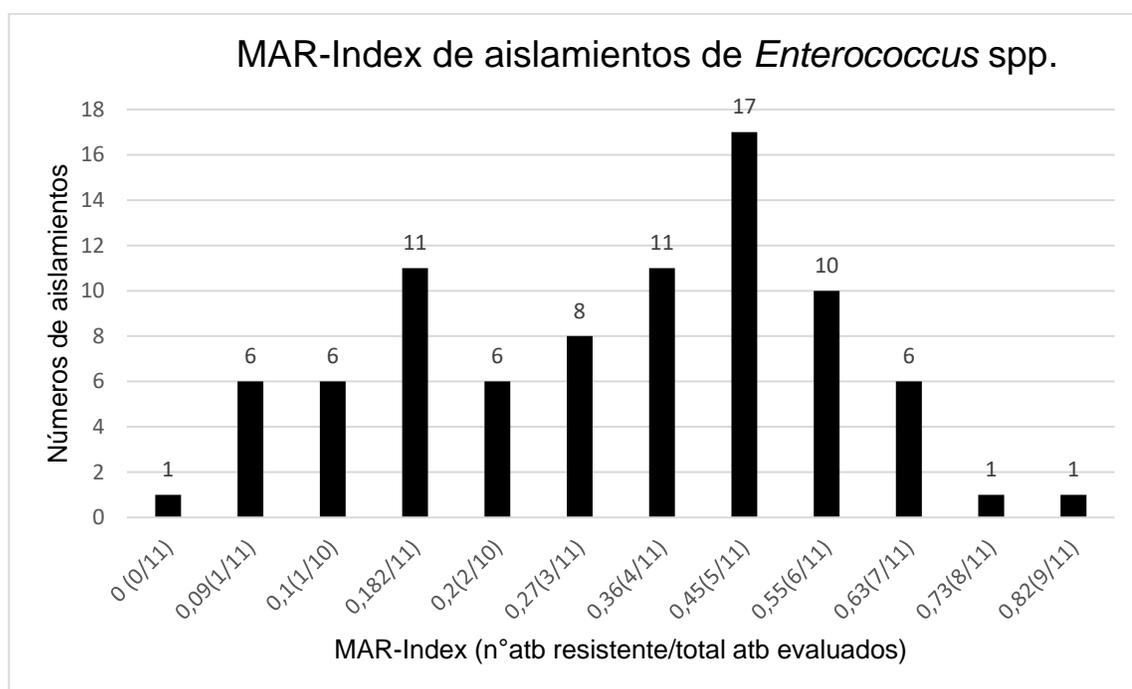
*b: representa el número de antibióticos contra los que se probó el aislamiento*

(Krumperman,1983).

El MAR-Index (Multiple Antibiotic Resistance) se utiliza para diferenciar entre bacterias con bajo o alto riesgo para la salud. Krumperman (1983) sugirió un índice MAR de 0,2 para diferenciar entre la presencia de aislamientos de bajo riesgo y alto riesgo, aunque reconoció que este valor era arbitrario. En el Anexo No. 3 se pueden ver los índices de resistencia múltiples de los presuntos aislamientos de *Enterococcus*. Los mismos oscilaron entre 0 (no hubo resistencia a ningún antibiótico) y 0,8 (resistencia a 8 antibióticos diferentes) (Figura No.7). En total, el 64% (54/84) de los aislamientos tenían un MAR-Index>0,2 (Figura

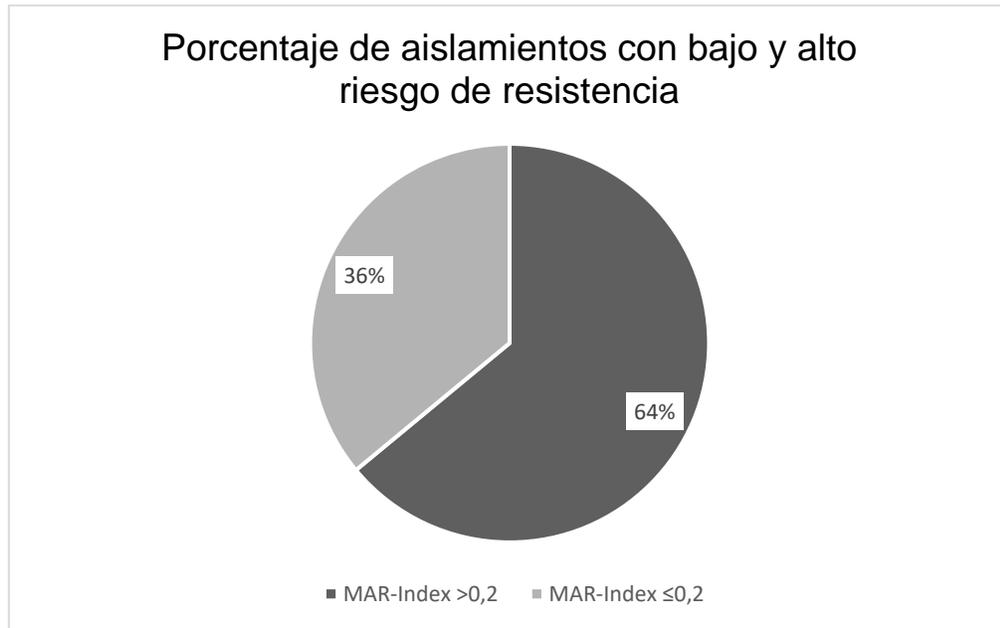
N°8). Estos valores son menores a los obtenidos para enterococos aislados de muestras de leche cruda de Marruecos, para los cuales el MAR-Index fue mayor a 0,2 para el 100% de los aislamientos (Bouymajane et al., 2018).

Figura No. 7. Índices de resistencia a múltiples antibióticos de los aislamientos de *Enterococcus* spp. analizados



En referencia al gráfico de la figura No. 7, el 20% de los presuntos aislamientos de *Enterococcus* (17/84) presentó resistencia a cinco de los once antibióticos con un MAR-index de 0.45.

Figura No. 8. Porcentaje de aislamientos con bajo (MAR-Index  $\leq 0,2$ ) y alto (MAR-Index  $> 0,2$ ) riesgo de resistencia



El valor medio de los índices MAR del conjunto de aislamientos *Enterococcus* spp. obtenidos de los quesos tipo Colonia ofrecidos al consumidor es de 0,33, y podría considerarse una población bacteriana de riesgo, dada la alta resistencia a antibióticos observada (Cuadro No. 10). Estos resultados podrían ser considerados como una llamada de atención al posible peligro de contaminación de quesos con aislamientos de *Enterococcus* spp. multirresistentes.

Cuadro No. 10. Amplitud de MAR-Index de los aislamientos analizados

|            | <b>MAR-Index</b> |
|------------|------------------|
| <b>Mín</b> | 0                |
| <b>Máx</b> | 0,80             |
| $\bar{x}$  | 0,33             |

#### 4.2.1. Enterococos resistentes a Vancomicina

La resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus* ocasiona la pérdida de una importante alternativa terapéutica en un género que presenta resistencia intrínseca a muchos antibióticos y una gran capacidad para adquirir nuevas resistencias. En ocasiones la utilización de Vancomicina es la última opción para tratar grandes infecciones.

Como se observa en el siguiente gráfico (Figura No. 9) el nivel de resistencia intermedio a Vancomicina es predominante, 49% de los aislamientos, mientras que las cepas Vancomicina-resistentes abarca el 21% del total de aislamientos. Los resultados observados en este trabajo se aproximan a los obtenidos para *Enterococcus* aislados de queso Coelho en Brasil (Porto et al., 2016) así como en los quesos italianos Ragusano y Pecorino en Italia (Russo et al., 2018). Sin embargo, también se han encontrado trabajos con ningún aislamiento resistente a la Vancomicina (Gaglio et al., 2016, Sanlibaba y Senturk, 2018), así como una alta ocurrencia de aislamientos resistentes (Çitak et al., 2004). La aparición de enterococos resistentes a glicopéptidos, incluida la Vancomicina, se ha extendido rápidamente, y ha sido asociada al uso de esta clase de antibióticos en la medicina clínica y a la utilización de Avoparcina, otro antibiótico perteneciente al grupo de los glicopéptidos, como aditivo alimentario

al ganado para promover el crecimiento de pollos, cerdos y ganado vacuno (Bager et al., 1997, Koluman et al., 2009).

Sería de gran importancia en trabajos posteriores ahondar y estudiar estos aislamientos con resistencia intermedia. Se podría realizar un análisis complementario de estos aislamientos considerados “intermedios” para vancomicina mediante el método de concentración mínima inhibitoria (MIC) , que es la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de la bacteria en cuestión, se basa en realizar microdiluciones seriadas del antibiótico, en este caso de vancomicina diluyendo al medio, ya sea en un medio de cultivo sólido o líquido comparándola con un patrón, siguiendo las indicaciones de centros de referencia como el CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards).

Figura No. 9. Porcentaje de aislamientos según nivel de resistencia a vancomicina



#### 4.3. POSIBLES APLICACIONES TECNOLÓGICAS: LIPÓLISIS, PROTEÓLISIS, UTILIZACION DEL CITRATO

Algunas cepas de enterococos juegan un papel importante en la elaboración de diferentes quesos dada sus propiedades biotecnológicas que consisten en la fermentación ácido láctica, a la actividad lipolítica, proteolítica, a la producción de componentes como acetaldehído, acetoína y diacetilo mediante catabolismo del citrato. Esto contribuye al desarrollo de las propiedades organolépticas durante los procesos de maduración de los quesos. Este papel benéfico de los enterococos en el desarrollo del aroma, sabor y textura de ciertos quesos ha llevado a la inclusión de cepas enterococales como cultivos iniciadores primarios (LAB) o como cultivos adjuntos (NSLAB). Según Rodríguez, M. A. et al. (2007), en un estudio realizado en queso venezolano se utilizó cepas de *Enterococcus* como fermento, dando como resultado un producto con una textura, aroma y sabor deseable.

Por la razón anterior, los aislamientos de *Enterococcus* que se seleccionaron para ser caracterizados tecnológicamente fueron los que presentaron sensibilidad a Vancomicina, Ampicilina, Gentamicina, Estreptomina y a otros dos de los antibióticos considerados en el estudio de resistencia.

De los 84 aislamientos presuntos de enterococos, se seleccionaron 16 según los criterios antes mencionados para evaluar su actividad lipolítica, proteolítica y el uso del citrato como única fuente de carbono. Solamente se detectó actividad proteolítica en un único aislamiento (12.1), ninguno de los aislamientos presentó actividad lipolítica ni utilización de citrato como única fuente de carbono. En la figura No. 10 (A) se observa el crecimiento del aislamiento 12.1 y su actividad proteolítica en el medio PCA adicionado con Caseína, mientras que la figura No. 10 (B) muestra el crecimiento de un aislamiento que no presenta esta actividad. La figura No. 11 muestra un aislamiento negativo para la actividad lipolítica a modo de ejemplo.

Figura No. 10. Crecimiento de aislamientos en placas de PCA + Caseína. Halo de proteólisis producido por el aislamiento 12.1 (A), crecimiento del aislamiento 30.2 (sin actividad proteolítica) (B).

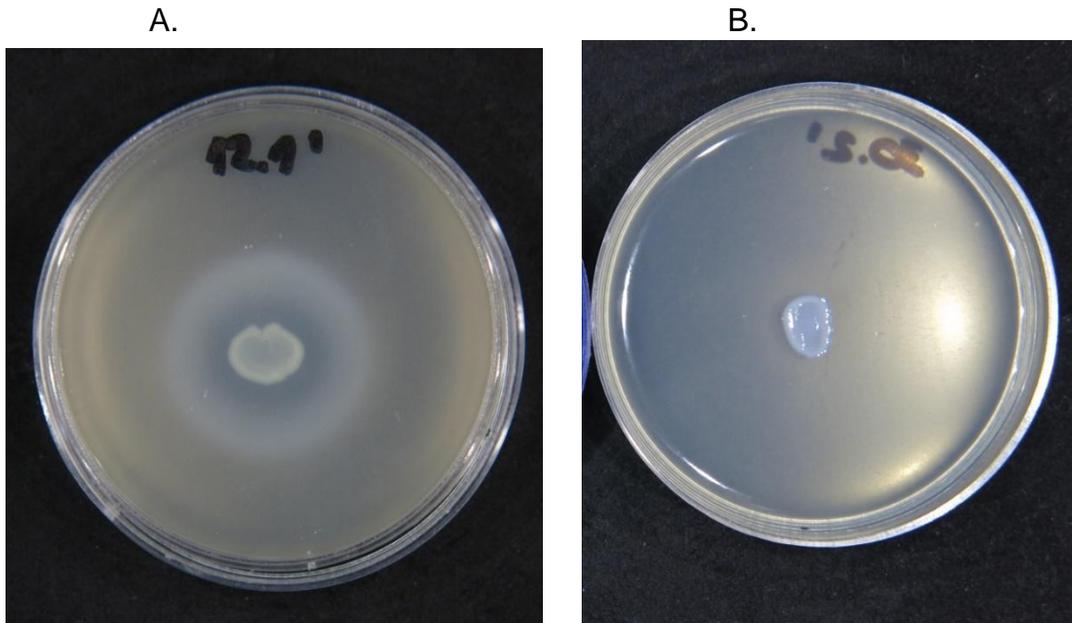
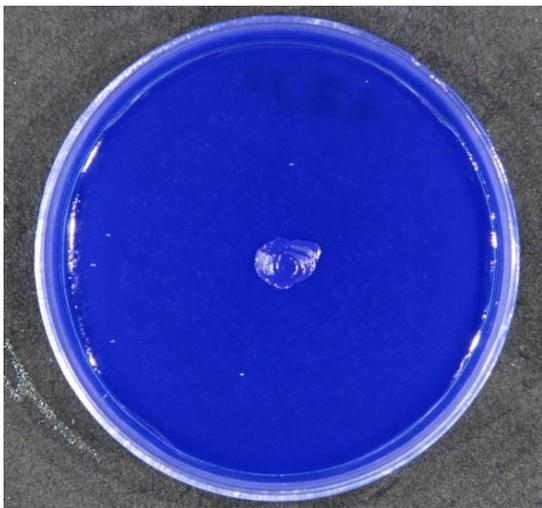


Figura No. 11. Crecimiento de aislamiento sin actividad lipolítica en el medio Spirit Blue



Los estudios realizados evalúan si los aislamientos presentaron características de importancia tecnológica. Esto no es suficiente para saber si, en caso de emplearlos como parte de fermentos de quesería, las propiedades organolépticas de los quesos elaborados son las deseadas. Se podría considerar para estudios posteriores el uso de esta cepa (12.1) como fermento para ver su desempeño como cultivo adjunto. Se debería evaluar además la seguridad de las cepas previamente a ser utilizadas en la producción de alimentos.

En cuanto a los MAR-Index de los 16 aislamientos en general muestran bajo riesgo de portar genes de resistencia a múltiples antibióticos, 10 de los 16 aislamientos presentaron índices MAR menores a 0,2 como se observa en el cuadro No. 11, y así evitar la transferencia a bacterias del mismo y diferente género, lo que implicaría un riesgo en la utilización de estas cepas en la producción de quesos. Sería necesario además de evaluar la sensibilidad a distintos antibióticos, determinar la presencia o ausencia de factores de virulencia de las cepas previo a su uso en producción.

Cuadro No. 11. Índice de resistencia a múltiples antibióticos de los aislamientos seleccionados para evaluar sus propiedades biotecnológicas.

| <b>Aislamiento</b> | <b>MAR-<br/>Index<br/>a/b</b> |
|--------------------|-------------------------------|
| <b>10.1</b>        | <b>0,18</b>                   |
| <b>10.3</b>        | <b>0,09</b>                   |
| <b>10.5</b>        | <b>0,36</b>                   |
| <b>12.1</b>        | <b>0,09</b>                   |
| <b>14.4</b>        | <b>0,18</b>                   |
| <b>14.5</b>        | <b>0,09</b>                   |
| <b>16.2</b>        | <b>0,09</b>                   |
| <b>16.5</b>        | <b>0,09</b>                   |
| <b>24.1</b>        | <b>0,18</b>                   |
| <b>24.2</b>        | <b>0,18</b>                   |
| <b>29.1</b>        | <b>0,36</b>                   |
| <b>29.3</b>        | <b>0,36</b>                   |
| <b>29.5</b>        | <b>0,45</b>                   |
| <b>30.1</b>        | <b>0,27</b>                   |
| <b>30.2</b>        | <b>0,27</b>                   |
| <b>30.3</b>        | <b>0,18</b>                   |

El aislamiento 12.1 fue identificado como *Enterococcus faecalis*, mediante secuenciación del gen del ARNr 16S. Sería interesante realizar futuras investigaciones para profundizar en la caracterización de este aislamiento, por ejemplo, evaluar la actividad acidificante de la cepa para la utilización en la producción de quesos. En el cuadro No. 12, se observa el nivel de resistencia que presentó la cepa 12.1 de *E. faecalis* a los antibióticos evaluados, la misma fue baja, sólo tuvo resistencia a un antibiótico (Fosfomicina 200 µg).

Cuadro No.12. Resistencia de la cepa *E. faecalis* 12.1 a los antibióticos.

| <b>Antibióticos</b> | <b>Diámetro de halo de inhibición (mm)</b> | <b>Nivel de resistencia</b> |
|---------------------|--|-----------------------------|
| <b>AMP 10 µg</b>    | 29   | Sensible                    |
| <b>E 15 µg</b>      | 19   | Intermedio                  |
| <b>VA 30 µg</b>     | 19   | Sensible                    |
| <b>CIP 5 µg</b>     | 23   | Sensible                    |
| <b>GN 120 µg</b>    | 19   | Sensible                    |
| <b>S 300 µg</b>     | 16   | Sensible                    |
| <b>C 30 µg</b>      | 23   | Sensible                    |
| <b>TE 30 µg</b>     | 26   | Sensible                    |
| <b>RD 5 µg</b>      | 21   | Sensible                    |
| <b>FOS 200 µg</b>   | Con colonias                               | Resistente                  |
| <b>F 300 µg</b>     | 21   | Sensible                    |

## 5. CONCLUSIONES

Este estudio es uno de los primeros realizados en el país que informa sobre la presencia de *Enterococcus* spp. y su perfil de resistencia a compuestos antimicrobianos, en queso Colonia. Los resultados del presente trabajo confirman la presencia de *Enterococcus* spp. en cerca del 70% de los quesos analizados. Del mismo modo, se observó que estos enterococos constituyen una fuente potencial de diseminación de resistencia a antibióticos. La alta ocurrencia de aislamientos multirresistentes (MAR-Index promedio 0,33) debería ser considerada como una llamada de atención al posible peligro de contaminación de quesos con aislamientos de *Enterococcus* spp. multirresistentes y la capacidad de transmitir estas resistencias a otras bacterias en el tracto gastrointestinal de los consumidores además del riesgo de transmisión de resistencia a otras bacterias que estén presentes en la propia matriz del queso, entre ellas bacterias patógenas.

La presencia de aislamientos de *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (49% de aislamientos con resistencia intermedia y 21% de aislamientos resistentes) es una preocupación, considerando que la administración de este antibiótico es el tratamiento alternativo para pacientes con intolerancia a la penicilina o frente a infecciones con enterococos con alta resistencia a la penicilina. Por lo tanto, debería ampliarse el estudio de esta población, en especial en el alto porcentaje de aislamientos clasificados como intermedios.

Un tema importante en la selección de cepas para un uso seguro como cultivos adjuntos en la producción de quesos es la caracterización de la susceptibilidad a antibióticos para evitar la propagación de genes de resistencia a otros microorganismos a través de la transferencia horizontal de genes. Por lo tanto, de los 84 aislamientos de presuntos *Enterococcus* estudiados se seleccionaron los más sensibles para evaluar algunas propiedades biotecnológicas de interés. Sólo un aislamiento, identificado como *E. faecalis*, presentó actividad proteolítica.

La utilización de cepas de *Enterococcus* spp. como cultivos adjuntos necesita estudios más importantes y detallados. Para la selección de cepas inocuas en la producción de quesos seguros, las mismas deben tener bajo índice MAR, con ausencia de factores de virulencia y además evaluar las propiedades biotecnológicas. Se debería contemplar la multirresistencia observada en este estudio, ya que el promedio de los índices MAR es de 0,33 con un máximo de

0,8, esto muestra que los aislamientos de los presuntos enterococos presentan mayor nivel de resistencia que lo considerado aceptable ( $MAR-Index \leq 2$ ).

## 6. RESUMEN

La quesería en Uruguay elabora cerca del 5,3% de la producción total de leche y representa el 26% de los establecimientos lecheros del país que producen el 50% del total del queso consumido en Uruguay. El queso Colonia es un queso típico uruguayo, elaborado según criterio de calidad y tradición de los inmigrantes suizos radicados en la cuenca lechera de Colonia, es un queso de mediana humedad y su característica principal es la presencia de ojos de tamaño irregular. En este trabajo se analizaron quesos tipo Colonia provenientes de ferias vecinales y supermercados de Montevideo. La microflora de estos quesos fue cuantificada, con énfasis en la población de *Enterococcus* spp. La presencia de enterococos en los quesos puede tener efectos contradictorios, suponen un riesgo por su potencial patogénico, pero contribuyen en el desarrollo de las características típicas de los quesos. De las 36 muestras analizadas, se detectaron enterococos en 24 de ellas, con un recuento máximo de 1,25E+05 UFC/g y un promedio de 1,43E+04 UFC/g. En esta investigación también se evaluó la resistencia a diferentes antibióticos de 84 aislamientos de enterococos provenientes de las muestras procesadas. Todos los aislamientos presentaron resistencia por lo menos a un antimicrobiano. Se evaluó el riesgo de contaminación de las muestras con enterococos multirresistentes mediante el MAR-Index, para el cual se establece un valor  $>0,2$  considerándose a la población microbiana como de riesgo dado el alto nivel de resistencia observado. En este estudio el MAR-Index promedio fue de 0,33, por lo que la población de *Enterococcus* spp. aisladas de queso Colonia representan un riesgo potencial para la salud humana que debería ser monitoreado.

También se evaluaron características de interés tecnológico en los aislamientos de *Enterococcus* obtenidos. Se evaluó la actividad lipolítica, proteolítica y la utilización del citrato como única fuente de carbono, si bien no se determinó la producción de metabolitos, la descomposición del citrato puede generar

compuestos como el diacetilo, siendo estas todas características biotecnológicas de interés para industria quesera. De los 16 aislamientos seleccionados por su bajo potencial patogénico, solamente uno mostró actividad proteolítica. Ninguno de los aislamientos presentó actividad lipolítica ni fue capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Palabras clave: *Enterococcus* spp.; queso Colonia; resistencia antimicrobiana.

## 7. SUMMARY

The cheese industry in Uruguay produces about 5.3% of the total milk production and represents 26% of the country's dairy farms, which produce 50% of the total cheese consumed in Uruguay. Colonia cheese is a typical Uruguayan cheese, produced according to the quality criteria and tradition of Swiss immigrants who settled in the Colonia dairy basin. It is a cheese of medium humidity and its main characteristic is the presence of irregular-sized eyes. In this work, Colonia cheeses from neighborhood fairs and supermarkets in Montevideo were analyzed. The microflora of these cheeses was quantified, with emphasis on the population of *Enterococcus* spp. The presence of enterococci in cheeses can have contradictory effects, either as a risk due to their pathogenic potential, or as a benefit to produce unique traditional products. Enterococci counts were observed in 24 of the 36 samples analyzed, with a maximum count of  $1.25E+05$  and an average of  $1.43E+04$ . Resistance to different antimicrobials was also evaluated in 84 enterococci isolates. All isolates showed resistance to at least one antimicrobial. The risk of contamination of the samples with multidrug-resistant enterococci was evaluated using the MAR-Index, for which it is established that a value greater than or equal to 0.2 considers the microbial population to be at risk given the high level of observed resistance. In this study, the average MAR-Index was 0.33, so the population of *Enterococcus* spp. isolated from Colonia cheese represents a potential risk to human health that should be monitored.

Possible technological applications of the isolates obtained were also evaluated. Lipolytic and proteolytic activity and the production of metabolites such as diacetyl by the decomposition of citrate, all biotechnological characteristics of interest to the cheese industry, were evaluated. Of the 16 isolates selected for their low pathogenic potential, only one showed proteolytic activity and none showed lipolytic activity or utilization of citrate as the sole carbon source.

Keywords: *Enterococcus* spp., Colonia cheese, antimicrobial resistance.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Angulo, F. J.; Heuer, O. E.; Hammerum, A. M.; Collignon, P.; Wegener, H. C. 2006. Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clinical Infectious Diseases*. 43: 911 - 916.
2. Arias, C. A.; Murray, B. E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 266 - 278.
3. Bager, F.; Madsen, M.; Christensen, J.; Aarestrup, F. M. 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 31(1-2): 95 - 112.
4. Barbosa, J.; Ferreira, V.; Teixeira, P. 2009. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology*. 26(5): 527 - 532.
5. Bazet, C.; Blanco J.; Seija, V.; Palacio, R. 2005. Enterococos resistentes a vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*. 21: 151 - 158.
6. Bhardwaj, A.; Malik, R.; Chauhan, P. 2008. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 317 - 325.
7. Bouymajane, A.; Filali, F. R.; Oulghazi, S.; Ed-Dra, A.; Benhallam, F.; El Allaoui, A.; Anissi, J.; Sendide, K.; Ouhmidou, B.; Moumni, M. 2018. Occurrence, molecular and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from raw cow's milk trade by street trading in Meknes city, Morocco. *Germs*. 8(2): 77 - 84.
8. Câmara, S. P. A.; Dapkevicius, A.; Silva, C. C. G.; Malcata, F. X.; Enes Dapkevicius, M. L. N. 2020. Artisanal Pico cheese as reservoir of *Enterococcus* species possessing virulence and antibiotic resistance properties: Implications for food safety. *Food Biotechnology*. 34(1): 25 - 41.

9. Casana Rico, C. 2017. El uso de antibióticos en la industria alimentaria y su contribución al desarrollo de resistencias: determinantes de la diseminación de la resistencia a la colistina. Trabajo fin de grado. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 22 p.
10. Çitak, S.; Yucel, N.; Orhan, S. 2004. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 57: 27 - 31.
11. CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute, US). 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute. 240 p. (CLSI document M100-S25).
12. Conde-Estévez, D.; Grau, S.; Albanell, J.; Terradas, R.; Salvadó, M.; Knobel, H. 2011. Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteraemia in cancer patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 30(1): 103 - 108.
13. Cozzano, S.; Delgado, M. 2003. Estudio del proceso de elaboración del queso Colonia y evaluación de la retención de sólidos en tres queserías artesanales. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 77 p.
14. Crosa, M. J.; Harispe, R.; Márquez, R.; Pelaggio, R.; Repiso, L.; Silvera, C. 2008. Cambios reológicos del queso Colonia durante el proceso de maduración. *INNOTECH*. no. 3: 54 - 56.
15. Díaz, M.; Rodríguez, C.; Zhurbenko, R. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 48(2): 147 - 161.

16. Duprè, I.; Zanetti, S.; Schito, A. M.; Fadda, G.; Sechi, L. A. 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology*. 52: 491 - 498.
17. El Soda, M.; Awad, S. 2014. Role of specific groups of bacteria. In: Batt, C.; Tortorello, M. L. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 1. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier. pp. 416 - 420.
18. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT); WHO (Organización Mundial de la Salud, CH). 1999. *Codex Alimentarius: general standard for cheese*. Roma, FAO. 6 p.
19. Foulquié-Moreno, M. R.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E.; De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106(1): 1 - 24.
20. Fuka, M.; Maksimovic, A.; Tanuwidjaja, I.; Hulak, N.; Schloter, M. 2017. Characterization of enterococcal community isolated from an artisan Istrian raw milk cheese: biotechnological and safety aspects. *Food Technology and Biotechnology*. 55: 368 - 380.
21. Gaglio, R.; Couto, N.; Marques, C.; Lopes, M. D. F. S.; Moschetti, G.; Pomba, C.; Settanni, L. 2016. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 236: 107 - 114.
22. Gelsomino, R.; Vancanneyt, M.; Cogan, T.M.; Condon, S.; Swings, J. 2002. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3560 - 3565.
23. Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 88(2-3): 215 - 222.
24. González-Montiel, L.; Fernández, F. 2015. Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal Food Technology*. 18(3): 250 - 257.

25. Guzmán Prieto, A. M.; van Schaik, W.; Rogers, M. R.; Coque, T. M.; Baquero, F.; Corander, J.; Willems, R. J. L. 2016. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? (en línea). *Frontiers in Microbiology*. 7: 788. Consultado 30 dic. 2021. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880559/pdf/fmicb-07-00788.pdf>.
26. Hammad, A. M.; Hassan, H. A.; Shimamoto, T. 2015. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*. 50: 815 - 820.
27. Haubert, L.; da Cunha, C. E. P.; Lopes, G. V.; da Silva, W. P. 2018. Food isolate *Listeria monocytogenes* harboring tetM gene plasmid-mediated exchangeable to *Enterococcus faecalis* on the surface of processed cheese. *Food research international*. 107: 503 - 508.
28. INALE (Instituto Nacional de la Leche, UY). 2014. Encuesta lechera INALE 2014: resultados preliminares. (en línea). Montevideo, INALE. Consultado 30 dic. 2021. Disponible en [https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.inale.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2019%2F12%2FEncuestaLechera\\_2014\\_-\\_Producci%25C3%25B3n-de-leche.xlsx&wdOrigin=BROWSELINK](https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.inale.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2019%2F12%2FEncuestaLechera_2014_-_Producci%25C3%25B3n-de-leche.xlsx&wdOrigin=BROWSELINK).
29. Jamet, E.; Akary, E.; Poisson, M. A.; Chamba, J. F.; Bertrand, X.; Serror, P. 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiology*. 31(2): 191 - 198.
30. Koluman, A.; Akan, L. S.; Çakiroglu, F. P. 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*. 20: 281 - 283.
31. Krumperman, P. H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 165 - 170.

32. Kürekci, C.; Önen, S. P.; Yipel, M.; Aslantaş, Ö.; Gündoğdu, A. 2016. Characterization of phenotypic and genotypic antibiotic resistance profile of enterococci from cheeses in Turkey. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources*. 36: 352 - 358.
33. Laborde, W. 1979. Elaboración del queso Colonia. In: Curso de capacitación para supervisores de industrias lácteas: especialización en quesos (2do., 1979, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.
34. Moreno, M. F.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E.; De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 1 - 24.
35. Ogier, J. C.; Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126: 291 - 301.
36. Olivera, J. 2018. Selección de bacterias ácido lácticas (LAB) y adjuntas (NSLAB) autóctonas de la leche y queso, para el control de *Clostridium* spp. responsables del defecto de "hinchazón tardía". Tesis Maestría en Biotecnología. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 197 p.
37. Palau, H.; Mesa Macedo, A. 2007. Cluster de quesería artesanal de San José y Colonia. Montevideo, PACPY- MES. 45 p.
38. Pesavento, G.; Ducci, B.; Nieri, D.; Comodo, N.; Lo Nostro, A. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*. 21(5): 708 - 713.
39. Ponessa, A.; Gambandé, T.; All, L.; Fernandez de Arroyabe, G.; Ferrari, M.; Dlugovitzky, D.; Notario, R. 2006. Enterococos vancomicina resistentes: colonización en pacientes hospitalizados, en Rosario, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 40(4): 499 - 502.

40. Porto, B. C.; Fujimoto, G.; Borges, M. D. F.; Bruno, L. M.; Carvalho, J. D. G. 2016. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. *Revista Ciência Agronômica*. 47: 69 - 76.
41. Rodríguez, M. E.; Chacón, R.; Guerrero, B.; Otoniel, J.; López, G. 2007. Selección y elaboración de un cultivo iniciador a partir de cepas de *Enterococcus* aisladas en un queso venezolano ahumado andino. *Revista Científica*. 17(6): 641 - 646.
42. Rossi, F.; Rizzotti, L.; Felis, G.E.; Torriani, S. 2014. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: current knowledge and future perspectives. *Food Microbiology*. 42: 232 - 243.
43. Russo, N.; Caggia, C.; Pino, A. Coque, T.; Arioli, S.; Randazzo, C. 2018. *Enterococcus* spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano cheese types: a snapshot of their antibiotic resistance distribution. *Food and Chemical Toxicology*. 120: 277-286.
44. Sanlibaba, P.; Senturk, E. 2018. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of enterococci from traditional cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*. 21(1): 1955 - 1963.
45. Sparo, M.; Urbizu, L.; Solana, M. V.; Pourcel, G.; Delpech, G.; Confalonieri, A.; Ceci, M.; Sanchez Bruni, S. F. 2011. High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Letters in Applied Microbiology*. 54: 119 - 125.
46. Terzić-Vidojević, A.; Veljović, K.; Begović, J.; Filipić, B.; Popović, D.; Tolinački, M.; Miljković, M.; Kojić, M.; Golić, N. 2015. Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? (en línea). *Frontiers in Microbiology*. 6: 954. Consultado 30 dic. 2021. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4563272/pdf/fmicb-06-00954.pdf>.

47. Vankerckhoven, V.; Van Autgaerden, T.; Vael, C.; Lammens, C.; Chapelle, S.; Rossi, R.; Jabes, D.; Goossens, H. 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(10): 4473 - 4479.

## 9. ANEXO

Anexo No.1. Aislamientos seleccionados para ver propiedades tecnológicas de las cepas

| Aislamiento | AMP 10 µg | E 15 µg | VA 30 µg | CIP 5 µg | GN 120 µg | S 300 µg | C 30 µg | TE 30 µg | RD 5 µg | FOS 200 µg | F 300 µg | MAR-index a/b |
|-------------|-----------|---------|----------|----------|-----------|----------|---------|----------|---------|------------|----------|---------------|
| 10.1        | S         | R       | S        | S        | S         | S        | S       | S        | I       | R          | S        | 0,18          |
| 10.3        | S         | I       | S        | I        | S         | S        | S       | R        | S       | S          | S        | 0,09          |
| 10.5        | S         | R       | S        | S        | S         | S        | S       | R        | R       | R          | S        | 0,36          |
| 12.1        | S         | I       | S        | S        | S         | S        | S       | S        | S       | R          | S        | 0,09          |
| 14.4        | S         | I       | S        | I        | S         | S        | S       | S        | R       | I          | R        | 0,18          |
| 14.5        | S         | I       | S        | I        | S         | S        | S       | I        | R       | N/D        | S        | 0,09          |
| 16.2        | S         | R       | S        | S        | S         | S        | S       | I        | I       | N/D        | S        | 0,09          |
| 16.5        | S         | I       | S        | S        | S         | S        | S       | R        | I       | R          | S        | 0,09          |
| 24.1        | S         | I       | S        | R        | S         | S        | S       | S        | S       | R          | S        | 0,18          |
| 24.2        | S         | I       | S        | R        | S         | S        | S       | R        | I       | S          | S        | 0,18          |
| 29.1        | S         | R       | S        | R        | S         | S        | S       | R        | R       | S          | S        | 0,36          |
| 29.3        | S         | R       | S        | I        | S         | S        | S       | R        | R       | S          | R        | 0,36          |
| 29.5        | S         | R       | S        | R        | S         | S        | S       | R        | R       | S          | R        | 0,45          |
| 30.1        | S         | S       | S        | I        | S         | S        | S       | S        | R       | R          | R        | 0,27          |
| 30.2        | S         | S       | S        | S        | S         | S        | S       | S        | R       | R          | R        | 0,27          |
| 30.3        | S         | S       | S        | S        | S         | S        | S       | S        | R       | S          | R        | 0,18          |

Anexo No. 2. Recuento de los distintos grupos microbianos en las muestras de quesos analizadas

| Queso | Recuento aerobios totales (log10) | Recuento Enterobacterias (log10) | Recuento Bacteria ácido lácticas (log10) | Recuento Enterococcus (log10) |
|-------|-----------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------------|
| QEn1  | 6,76                              | 0,00                             | 7,49                                     | 4,89                          |
| QEn2  | 8,26                              | 4,08                             | 8,29                                     | 0,00                          |
| QEn3  | 6,26                              | 0,00                             | 6,87                                     | 4,08                          |
| QEn4  | 7,14                              | 0,00                             | 7,18                                     | 5,10                          |

|              |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|
| <b>QEn5</b>  | 7,57 | 4,78 | 7,76 | 4,30 |
| <b>QEn6</b>  | 8,07 | 4,00 | 8,33 | 3,00 |
| <b>QEn7</b>  | 7,46 | 4,64 | 7,31 | 4,32 |
| <b>QEn8</b>  | 7,29 | 0,00 | 6,64 | 0,00 |
| <b>QEn9</b>  | 7,27 | 2,48 | 7,15 | 2,00 |
| <b>QEn10</b> | 6,59 | 4,45 | 6,65 | 3,60 |
| <b>QEn11</b> | 6,45 | 0,00 | 7,00 | 2,00 |
| <b>QEn12</b> | 5,00 | 2,00 | 5,48 | 2,70 |
| <b>QEn13</b> | 8,06 | 3,30 | 6,85 | 3,68 |
| <b>QEn14</b> | 6,76 | 4,86 | 6,70 | 3,23 |
| <b>QEn15</b> | 5,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>QEn16</b> | 6,46 | 5,12 | 8,12 | 3,34 |
| <b>QEn17</b> | 5,70 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>QEn18</b> | 7,18 | 2,00 | 6,30 | 0,00 |
| <b>QEn19</b> | Nd   | 4,45 | 7,48 | 3,68 |
| <b>QEn20</b> | 6,90 | 2,48 | 6,34 | 0,00 |
| <b>QEn21</b> | 6,69 | 3,72 | 6,83 | 3,04 |
| <b>QEn22</b> | 6,27 | 3,92 | 6,06 | 5,08 |
| <b>QEn23</b> | 7,15 | 0,00 | 7,29 | 0,00 |
| <b>QEn24</b> | 6,67 | 0,00 | 7,33 | 4,49 |
| <b>QEn25</b> | 7,26 | 0,00 | 7,23 | 0,00 |
| <b>QEn26</b> | 7,53 | 4,34 | 6,36 | 0,00 |
| <b>QEn27</b> | 8,26 | 0,21 | 5,89 | 2,95 |
| <b>QEn28</b> | 7,69 | 2,48 | 7,85 | 4,06 |
| <b>QEn29</b> | 6,85 | 0,00 | 7,03 | 3,69 |
| <b>QEn30</b> | 5,83 | 4,23 | 7,80 | 4,26 |
| <b>QEn31</b> | 5,93 | 0,00 | 5,85 | 0,00 |
| <b>QEn32</b> | 6,02 | 4,58 | 7,53 | 4,45 |
| <b>QEn33</b> | 6,81 | 0,00 | 6,70 | 0,00 |
| <b>QEn34</b> | 8,21 | 2,48 | 8,01 | 3,48 |
| <b>QEn35</b> | 7,46 | 2,00 | 7,78 | 0,00 |
| <b>QEn36</b> | 6,70 | 2,48 | 6,78 | 4,34 |

Anexo No. 3. Nivel de resistencia y MAR-Index para los aislamientos seleccionados (n:84)

| Aislamiento | AMP<br>10 | ERITRO<br>15 | VANCO<br>30 | CIPRO<br>5 | GENTA<br>120 | ESTREPTO<br>300 | CLORANF<br>30 | TETRA<br>30 | RIFAM<br>5 | FOSFO<br>200 | NITRO<br>300 | MAR-<br>index |
|-------------|-----------|--------------|-------------|------------|--------------|-----------------|---------------|-------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| 3.1         | S         | R            | R           | I          | I            | I               | R             | R           | R          | n/d          | I            | 0,5           |
| 3.2         | S         | R            | R           | R          | I            | R               | R             | R           | R          | n/d          | R            | 0,8           |
| 3.3         | S         | R            | R           | I          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | I            | 0,5           |
| 3.4         | S         | R            | R           | I          | S            | S               | I             | R           | R          | n/d          | I            | 0,4           |
| 3.5         | S         | R            | R           | I          | S            | R               | I             | R           | R          | R            | I            | 0,55          |
| 3.6         | S         | R            | R           | R          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | I            | 0,6           |
| 3.8         | S         | R            | I           | I          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | I            | 0,4           |
| 4.1         | S         | R            | R           | I          | S            | R               | S             | R           | R          | n/d          | I            | 0,5           |
| 4.1         | S         | R            | R           | R          | S            | R               | R             | R           | R          | n/d          | I            | 0,7           |
| 4.3         | S         | R            | R           | R          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | I            | 0,6           |
| 4.4         | S         | R            | R           | R          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | I            | 0,6           |
| 4.6         | S         | R            | I           | I          | S            | R               | I             | R           | R          | R            | S            | 0,45          |
| 4.7         | S         | R            | I           | I          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | I            | 0,4           |
| 4.8         | S         | R            | I           | R          | S            | R               | S             | R           | R          | n/d          | I            | 0,5           |
| 5.1         | S         | I            | I           | I          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | S            | 0,3           |
| 5.2         | S         | I            | I           | I          | S            | S               | S             | R           | I          | n/d          | S            | 0,1           |
| 5.3         | S         | R            | I           | I          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | S            | 0,4           |
| 5.4         | S         | I            | I           | I          | S            | S               | S             | S           | I          | n/d          | S            | 0             |
| 5.5         | S         | R            | I           | R          | S            | R               | I             | R           | R          | n/d          | S            | 0,5           |
| 5.6         | S         | R            | R           | I          | S            | R               | I             | R           | I          | n/d          | S            | 0,4           |
| 5.7         | S         | R            | S           | I          | S            | R               | S             | R           | R          | n/d          | S            | 0,4           |
| 5.8         | S         | R            | I           | I          | S            | R               | S             | R           | R          | n/d          | S            | 0,4           |
| 6.1         | S         | R            | S           | I          | S            | R               | I             | R           | I          | R            | S            | 0,36          |
| 6.2         | S         | R            | S           | I          | S            | R               | I             | R           | I          | S            | S            | 0,27          |
| 6.3         | S         | R            | I           | I          | S            | R               | S             | R           | I          | S            | S            | 0,27          |
| 6.4         | S         | R            | I           | S          | S            | R               | I             | R           | R          | S            | S            | 0,36          |
| 6.5         | S         | S            | I           | S          | S            | S               | S             | S           | R          | S            | S            | 0,09          |
| 7.1         | S         | R            | I           | I          | S            | S               | I             | I           | I          | n/d          | S            | 0,1           |
| 7.2         | S         | R            | S           | I          | S            | S               | I             | I           | R          | n/d          | S            | 0,2           |
| 7.3         | S         | R            | I           | I          | S            | S               | S             | S           | I          | n/d          | S            | 0,1           |
| 7.4         | S         | I            | I           | I          | S            | S               | S             | S           | R          | n/d          | S            | 0,1           |
| 5.5         | S         | R            | I           | I          | S            | S               | S             | I           | R          | n/d          | I            | 0,2           |

|      |   |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |      |
|------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|------|
| 10.1 | S | R | S | S | S   | S | S | S | I | R   | S | 0,18 |
| 10.2 | S | R | I | I | S   | R | S | R | R | R   | I | 0,45 |
| 10.3 | S | I | S | I | S   | S | S | R | S | S   | S | 0,09 |
| 10.4 | S | I | I | I | S   | S | I | I | R | R   | I | 0,18 |
| 10.5 | S | R | S | S | S   | S | S | R | R | R   | S | 0,36 |
| 292  | S | R | I | R | S   | R | I | R | R | R   | R | 0,63 |
| 11.1 | S | I | I | I | S   | S | S | R | R | R   | S | 0,27 |
| 12.1 | S | I | S | S | S   | S | S | S | S | R   | S | 0,09 |
| 12.2 | S | I | I | I | S   | S | S | S | I | R   | S | 0,09 |
| 12.3 | S | I | I | I | S   | S | I | S | I | R   | S | 0,09 |
| 12.4 | S | I | I | I | S   | S | I | S | I | R   | S | 0,09 |
| 12.5 | S | I | R | S | S   | S | S | S | S | R   | S | 0,18 |
| 14.1 | S | I | R | I | S   | S | S | S | R | S   | S | 0,18 |
| 14.2 | S | R | I | I | S   | S | S | S | R | R   | S | 0,27 |
| 14.3 | S | I | I | I | S   | S | S | S | R | R   | I | 0,18 |
| 14.4 | S | I | S | I | S   | S | S | S | R | I   | R | 0,18 |
| 14.5 | S | I | S | I | S   | S | S | I | R | n/d | S | 0,1  |
| 16.2 | S | R | S | S | S   | S | S | I | I | n/d | S | 0,1  |
| 16.3 | S | I | I | R | S   | S | I | S | R | R   | S | 0,27 |
| 16.4 | S | R | S | I | S   | S | R | S | R | S   | R | 0,36 |
| 16.5 | S | I | S | S | S   | S | S | R | I | R   | S | 0,18 |
| 22.1 | S | I | I | I | S   | S | I | R | R | S   | S | 0,18 |
| 22.2 | S | I | I | I | S   | S | S | R | R | R   | S | 0,27 |
| 22.4 | S | I | R | S | S   | S | I | R | R | R   | S | 0,36 |
| 22.5 | S | I | S | R | S   | S | R | R | R | R   | S | 0,45 |
| 24.1 | S | I | S | R | S   | S | S | S | S | R   | S | 0,18 |
| 24.2 | S | I | S | R | S   | S | S | R | I | S   | S | 0,18 |
| 24.5 | S | I | R | R | S   | S | S | S | R | R   | R | 0,45 |
| 29.1 | S | R | S | R | S   | S | S | R | R | S   | S | 0,36 |
| 29.2 | S | R | R | S | S   | S | S | R | R | R   | R | 0,55 |
| 29.3 | S | R | S | I | S   | S | S | R | R | S   | R | 0,36 |
| 29.5 | S | R | S | R | S   | S | S | R | R | S   | R | 0,45 |
| 28.1 | S | R | I | I | n/d | R | I | R | R | n/d | S | 0,44 |
| 28.2 | S | R | I | I | n/d | R | I | R | R | n/d | R | 0,55 |
| 28.3 | S | R | I | I | n/d | R | I | R | R | n/d | I | 0,44 |
| 28.4 | S | R | I | I | n/d | R | I | R | R | n/d | I | 0,44 |
| 28.5 | S | I | I | I | n/d | R | I | R | R | R   | I | 0,44 |
| 30.1 | S | S | S | I | S   | S | S | S | R | R   | R | 0,27 |
| 30.2 | S | S | S | S | S   | S | S | S | R | R   | R | 0,27 |

|      |   |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |      |
|------|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|------|
| 30.3 | S | S | S | S | S   | S | S | S | R | S   | R | 0,18 |
| 30.4 | S | R | S | I | S   | R | I | R | R | S   | R | 0,36 |
| 30.5 | S | R | R | I | S   | S | S | S | R | R   | S | 0,36 |
| 32.1 | S | I | I | S | n/d | R | S | R | I | n/d | S | 0,22 |
| 32.2 | S | I | I | I | n/d | S | I | R | R | n/d | S | 0,22 |
| 32.3 | S | I | S | S | n/d | S | I | R | R | n/d | S | 0,22 |
| 32.4 | S | R | I | I | S   | R | S | R | R | R   | R | 0,67 |
| 32.5 | S | I | I | R | n/d | R | R | R | R | S   | S | 0,5  |
| 34.3 | S | I | R | I | n/d | R | I | R | R | R   | R | 0,6  |
| 34.4 | S | R | I | I | S   | R | S | R | R | R   | R | 0,55 |
| 36.1 | S | I | I | I | n/d | I | I | R | R | S   | S | 0,2  |
| 36.2 | S | I | S | R | n/d | I | I | R | R | R   | S | 0,4  |
| 36.6 | S | I | I | I | n/d | I | I | R | R | R   | S | 0,3  |