



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CEPAS DE
***Staphylococcus aureus* RESISTENTES Y MULTIRESISTENTES**
AISLADOS EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES ELABORADOS
EN ZONAS RURALES DE RIOBAMBA”

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA:
SILVANA PAMELA YUGCHA PILAMUNGA

Riobamba - Ecuador
2016

©2016, Silvana Pamela Yugcha Pilamunga

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor

SILVANA PAMELA YUGCHA PILAMUNGA

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES Y MULTIRESISTENTES AISLADOS EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES ELABORADOS EN ZONAS RURALES DE RIOBAMBA”**, de responsabilidad de la señorita Silvana Pamela Yugcha Pilamunga, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Ana Karina Albuja

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. Félix Andueza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

NOTA DE TRABAJO DE

TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Silvana Pamela Yugcha Pilamunga, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación.

Riobamba, 11 de febrero de 2016

Silvana Pamela Yugcha Pilamunga

180464980-2

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida, la salud para poder culminar con esta meta, por ser mi fiel compañía y estar conmigo en los momentos más difíciles.

A mi hermana Patricia por su apoyo tanto económico como moral, por ser mi fuente de inspiración y por alentarme a seguir adelante en la culminación de mi carrera.

A mis padres Ernesto y Romelia por su apoyo incondicional en el transcurso de estos años.

Pamela

AGRADECIMIENTO

El más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por abrirme sus puertas y permitir que en sus aulas me forme profesionalmente.

Un eterno agradecimiento a la Dra. Anita Albuja mi tutora y al Dr. Félix Andueza mi colaborador por el apoyo brindado quienes contribuyeron desinteresadamente en la realización de este Trabajo de titulación.

A mis profesores, compañeros, amigos que me apoyaron de una u otra manera para culminar con esta meta académica.

A todos Gracias!!

Pamela

TABLA DE CONTENIDO	Página
DERECHO DE AUTOR	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE GRÁFICOS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I	Página
1 MARCO TEÓRICO	8
1.1 Generalidades	8
1.2 Definiciones generales	9
1.3 Clasificación del queso	9
1.3.1 <i>Según su dureza y contenido de humedad</i>	9
1.3.2 <i>Según su forma de elaboración</i>	10
1.3.3 <i>Según el periodo de maduración</i>	10
1.4 Queso fresco	11
1.4.1 <i>Conceptos generales</i>	11
1.4.2 <i>Clasificación del queso fresco</i>	12
1.4.3 <i>Materia prima</i>	13
1.4.4 <i>Proceso de elaboración</i>	14
1.4.4.1 <i>Tratamiento de la leche</i>	14
1.4.4.2 <i>Coagulación</i>	14
1.4.4.3 <i>Corte de la cuajada y desuerado</i>	14

1.4.4.4	<i>Moldeo</i>	14
1.4.4.5	<i>Prensado</i>	14
1.4.4.6	<i>Salado</i>	15
1.4.4.7	<i>Envasado</i>	15
1.5	Control de calidad	16
1.5.1	<i>Control de calidad físico-químico</i>	16
1.5.2	<i>Control microbiológico</i>	16
1.5.3	<i>Controles complementarios</i>	17
1.6	Enfermedades transmitidas por alimentos	17
1.7	Clasificación de ETA's	17
1.8	Microorganismos transmitidos por el queso	18
1.8.1	<i>Escherichia coli</i>	18
1.8.2	<i>Salmonella thypy</i>	19
1.8.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	19
1.8.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.8.4.1	<i>Características</i>	20
1.8.4.2	<i>Hábitat</i>	21
1.8.4.3	<i>Morfología</i>	21
1.8.4.4	<i>Manipuladores de alimentos y Staphylococcus aureus</i>	22
1.9	Medios de cultivo para detección de <i>Staphylococcus aureus</i> en los alimentos	23
1.9.1	<i>Petriefilm para la detección de Staphylococcus aureus</i>	23
1.9.2	<i>Identificación de S.aureus en medio manitol-salado o Chapman</i>	24
1.9.3	<i>Pruebas bioquímicas para la identificación de S. aureus</i>	25
1.10	Antibióticos	26
1.11	Clasificación	26
1.12	Resistencia	27
1.13	Tipos de resistencia	27
1.14	Resistencia a los antibióticos más importantes	28
1.14.1	<i>Resistencia a β-lactámicos</i>	30
1.14.2	<i>Resistencia a los aminoglucósidos</i>	30
1.14.3	<i>Resistencia a la meticilina</i>	31

1.14.4	<i>Resistencia a glicopéptidos</i>	31
1.14.5	<i>Resistencia fluoroquinolonas</i>	31
1.14.6	<i>Resistencia a macrólidos y lincosamidas</i>	31
1.14.7	<i>Resistencia a tetraciclinas</i>	32
1.15	Técnica de difusión en discos.	32
1.15.1	<i>Puntos críticos</i>	33
1.15.2	<i>Interpretación de las pruebas de susceptibilidad</i>	33

CAPÍTULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	34
2.1	Lugar de investigación	34
2.2	Materiales, equipos y reactivos	34
2.3	Muestreo	36
2.4	Preparación de diluciones	38
2.5	Cultivo y cuantificación	38
2.6	Morfología celular, colonial y bioquímica de cepas de <i>S.aureus</i>	39
2.6.1	<i>Crecimiento en agar manitol salado</i>	40
2.6.2	<i>Observación morfológica</i>	40
2.6.3	<i>Prueba de coagulasa</i>	40
2.6.4	<i>Producción de catalasa</i>	40

CAPÍTULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
3.1	Análisis, interpretación y discusión de resultados	42
	CONCLUSIONES	53
	RECOMENDACIONES	54

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1-1	Clasificación de los quesos de acuerdo a su contenido de humedad.....	8
Cuadro 2-1	Componentes de la leche en el queso.	13
Cuadro 3-1	Resistencia de <i>S. aureus</i> a los antibióticos más importantes.	29

ÍNDICE DE TABLAS**Página**

Tabla 1-1	Requisitos para quesos frescos establecidos en la NTE INEN 1528: 2012.	16
Tabla 2-1	Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.	17
Tabla 3-1	Criterios de interpretación para el método de difusión en disco para <i>Staphylococcus aureus</i> según el CLSI 2015.	41
Tabla 1-3	Cuantificación de <i>aureus</i> en placas petrifilm 3M primer muestreo.	42
Tabla 2-3	Cuantificación de <i>S. aureus</i> en placas petrifilm 3M segundo muestreo.	43
Tabla 3-3	Cuantificación de <i>S. aureus</i> en placas petrifilm 3M tercer muestreo.	44
Tabla 4-3	Ausencia de diferencia estadística significativa a $p < 0,05$, entre los lugares de procedencia de las muestras del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en queso fresco artesanal según Tukey.	45
Tabla 5-3	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> de las muestras de queso fresco artesanal.	47
Tabla 6-3	Resistencia / Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de queso fresco artesanal en el Muestreo 1.	48
Tabla 7-3	Resistencia / Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de queso fresco artesanal en el Muestreo 2.	48
Tabla 8-3	Resistencia / Susceptibilidad de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en queso fresco artesanal en el muestreo 3.	49
Tabla 9-3	Porcentaje de resistencia de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en queso fresco artesanal.	50
Tabla 10-3	Porcentaje de susceptibilidad de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en queso fresco artesanal.	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS	Página
Gráfico 1-1 Proceso de elaboración de queso fresco.....	15
Gráfico 2-1 Esquema del diseño experimental.....	36
Gráfico 3-1 Diseño o metodología experimental empleada.....	37
Gráfico 1-3 Cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en placas petrifilm primer muestreo.....	43
Gráfico 2-3 Cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en placas petrifilm segundo muestreo.....	44
Gráfico 3-3 Cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en placas petrifilm 3M de dilución tercer muestreo.....	45
Gráfico 4-3 Ausencia de diferencia estadística significativa a $p < 0,05$, entre los lugares de procedencia de las muestras del recuento de <i>S. aureus</i> aislados de quesos fresco artesanal.....	46
Gráfico 5-3 Porcentaje de resistencia de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en queso fresco artesanal.....	51
Gráfico 6-3 Porcentaje de susceptibilidad de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en queso fresco artesanal.....	52

ANEXOS

- Anexo A** Lista de microorganismos patógenos presentes en quesos frescos artesanales comercializados en Lima-Perú.
- Anexo B** Fotografías de preparación de diluciones de las diferentes muestras
- Anexo C** Fotografías del procedimiento de siembra en placas petrifilm Staph 3M
- Anexo D** Fotografías de aislamiento de *Staphylococcus aureus* en placas petrifilm 3M en el muestreo 1
- Anexo E** Fotografías de aislamiento de *Staphylococcus aureus* en placas petrifilm 3M en el Muestreo 2
- Anexo F** Fotografías de aislamiento de *Staphylococcus aureus* en placas petrifilm 3M en el muestreo 3
- Anexo G** Fotografías de la Tinción Gram en las muestras aisladas de queso fresco 3
- Anexo H** Fotografías de identificación de *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado de la solución madre
- Anexo I** Fotografías de identificación de *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado de las colonias aisladas en placas Petrifilm
- Anexo J** Fotografías de las prueba de catalasa
- Anexo K** Fotografías de las prueba de coagulasa
- Anexo L** Fotografías de la resistencia/susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* en el muestreo 2
- Anexo M** Fotografías de la resistencia/susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* en el Muestreo 3
- Anexo N** Norma Técnica INEN 1528: Requisitos para queso fresco.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y multiresistentes aislados en quesos frescos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba, este estudio se realizó en 6 queseras (San Juan, Quimiag y Pungalá), la muestra se recolectó periódicamente durante el mes de noviembre y diciembre 2015. Para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus*. se sembró las muestras en placas Petrifilm Staph 3M para su cuantificación y las colonias aisladas se identificaron posteriormente con métodos convencionales, se utilizó Agar Manitol obteniéndose un crecimiento y fermentación en 15 muestras de cepas de *Staphylococcus* aisladas, se confirmó mediante Tinción Gram, pruebas de catalasa, y coagulasa. La prevalencia de *Staphylococcus aureus* en los quesos analizados fue de 83.33%. La resistencia a los antibióticos (Penicilina, Cefoxitina, Tetraciclina, Amikacina, Vancomicina, Ciprofloxacina, Clindamicina y Eritromicina) se evaluó por el método de difusión en disco Kirby-Bauer, se obtuvo cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Penicilina en un 100,00%; Cefoxitina 33,33 % resistencia y 66,67 % sensibilidad; Tetraciclina 13,33 % resistencia y 86,67 % sensibilidad; Amikacina 6,67 % resistencia y 93,33 % sensibilidad; Vancomicina 100,00 % de sensibilidad; Ciprofloxacina 100,00% de sensibilidad; Clindamicina 20,00 % resistencia y 80.00% sensibilidad; Eritromicina 20,00% sensibilidad y 80,00 % resistencia intermedia. Se concluye que los resultados de cuantificación obtenidos de los quesos fueron altos no cumplen con la Norma General para Quesos Frescos no Madurados es decir el queso no es apto para el consumo humano porque puede causar problemas de intoxicaciones alimentarias y ocasionar problemas de resistencia a los antibióticos en el ser humano. Se recomienda capacitar a los productores y manipuladores involucrados en la producción de quesos en buenas prácticas de manufactura y sensibilizar a la comunidad sobre el uso correcto de antibióticos en animales a partir de los cuales se obtiene la materia prima para la elaboración del queso.

Palabras clave: <QUESO FRESCO ARTESANAL>, <PLACAS PETRIFILM STAPH>, <*Staphylococcus* [*Staphylococcus aureus*]>, <MÉTODOS CONVENCIONALES>, <ANTIBIÓTICOS>, < RESISTENCIA>, <QUESERAS>, <RIOBAMBA [CANTÓN]>, <MICROBIOLOGÍA>

SUMMARY

The present research determined the presence of *Staphylococcus aureus* strains resistant and multi-resistant isolated from artisanal cheese produced in rural areas of Riobamba, this study was carried out in 6 dairies (San Juan, Quimiag and Pungalá), the sample is collected periodically during the months of November and December 2015. The presence of *Staphylococcus aureus* was identified and the specimens were planted on Petrifilm Staph 3M plates for its quantification and isolated colonies were identified later with conventional methods, Agar Mannitol was used obtaining growth and fermentation in 15 samples of *Staphylococcus aureus* strains isolated, it was confirmed by Tincion Gram, tests of catalase and coagulase. The prevalence of *Staphylococcus aureus* in cheese analyzed was 83.33%. The resistance to antibiotics (Penicillin, Cefoxitin, Tetracycline, Amikacin, Vancomycin, Ciprofloxacin, Clindamycin and Erythromycin), were evaluated by the Kirby-Bauer disk diffusion method, and the results obtained were: *Staphylococcus aureus* strains resistant to Penicillin by 100%; Cefoxitin 33.33% resistance and 66,67% sensitivity; Tetracycline 13.33% resistance and 86.67% sensitivity; Amikacin 6.67% resistance and 93.33% sensitivity; Vancomycin 100% of sensitivity; Ciprofloxacin 100% sensitivity; Clindamycin 20% resistance and 80% sensitivity; Erythromycin 20% sensitivity and 80% intermediate resistance. This study concluded that the quantification results of cheeses were high, and these do not comply with General Standards of Fresh Cheese non Matured, this cheese is not suitable for human consumption because it can cause problems of food poisonings and resistance to antibiotics in humans. This study recommended to train producers and handlers involved in the production of cheeses in best practices of manufacturing and educate the community about the correct use of antibiotics in animals from which gets the raw material for the manufacture process cheese.

Key Words: <FRESH ARTISANAL CHEESE>, <PETRIFILM STAPH PLATES>, <*Staphylococcus aureus* [*Staphylococcus aureus*]>, <CONVENTIONAL METHODS> <ANTIBIOTICS>, <RESISTENCE>, <DAIRIES>, < RIOBAMBA [CANTON]>, <MICROBIOLOGY>

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática

Cepas de *Staphylococcus aureus* en los quesos elaborados artesanalmente puede representar un alto riesgo para la salud pública ya que podría servir como fuente de difusión y propagar el problema de la resistencia, cada año se pone en los mercados diferentes antimicrobianos para resolver el problema de la resistencia microbiana pero las bacterias desarrollan nuevas defensas contra estos eficaces antibióticos. La resistencia bacteriana es un tema muy importante en el estudio de los antibióticos porque su confirmación implica el fracaso del tratamiento. (Elika, 2013, http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/)

Existe un gran riesgo para la salud cuando los microorganismos y productos veterinarios son transferidos a los alimentos causando uno de los problemas que en los últimos años aqueja más a la población como es la resistencia antimicrobiana. (Rivera, J.et. 2011, p. 202) Un gran número de especies de *Staphylococcus* puede contaminar los alimentos, al hombre y los animales. Alrededor de 135 tipos de microorganismos son implicados como agentes causales de mastitis bovina, pero la mayoría de las infecciones intramamarias (IIM) son ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, un patógeno contagioso que se transmite en el rebaño durante el ordeño (Valero, 2012, p. 10)

Los alimentos que son contaminados con el microorganismo son generalmente alimentos de origen animal como quesos, leche, huevos, etc asimismo son contaminados otros alimentos como frutas y verduras. (Elika, 2013, http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/). Estas bacterias anaerobias Gram – positivas habitan en las mucosas de los animales y personas, produciendo enterotoxinas que contaminan al hombre a través de los alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas prácticas de elaboración y conservación generando en ellos intoxicaciones alimentarias. (De la Rosa, 2011, p. 32)

La terapia antibiótica ha llevado a una prolongación en la expectativa y calidad de vida, como parte de los avances en la medicina moderna que han reducido la morbimortalidad de numerosos padecimientos, en especial de las enfermedades infecciosas pero el aumento del uso de estos medicamentos a veces de forma indiscriminada desde la década de 1950 ha aumentado el problema de la resistencia antimicrobiana cuya principal causa es la selección de cepas bacterianas que fortalecen sus genes de resistencia a la mayoría de los antibióticos y la bacteria responsable de la infección logra evadir su acción. (Lemus et al, 2008, pp. 48-54)

Formulación del Problema

Problema General

¿Los quesos frescos elaborados artesanalmente en zonas rurales de Riobamba tienen cepas de *Staphylococcus aureus* que son resistentes y multiresistentes a antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de algunas enfermedades? (Lemus et al, 2008, p. 50) El uso de antibióticos está correlacionado con la aparición y el mantenimiento de cepas patógenas resistentes, el fenotipo de resistencia es codificado por genes que pueden estar ubicados en el cromosoma de la bacteria o en elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones). Estos elementos están relacionados con la transferencia de genes de resistencia entre bacterias de la misma o diferentes especies (Guerra, 2012, p. 16)

La determinación de los fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas patógenas es de mucha utilidad para la caracterización de la bacteria, la información que aporta puede contribuir en la investigación de una fuente de contaminación y permite evaluar los riesgos a la salud que tienen los consumidores cuando ingieren alimentos que están contaminados con patógenos resistentes a antibióticos (Cortecero, 2011, p. 18). Aunque en la actualidad se han definido veinte tipos diferentes de enterotoxinas las más implicadas en intoxicaciones alimentarias siguen siendo las enterotoxinas clásicas [enterotoxina A (SEA), enterotoxina B (SEB), enterotoxina C (SEC), enterotoxina D (SED) y enterotoxina E (SEE)]. (Guerra, 2012, p. 35)

En Venezuela (OPS, 2004), asociado principalmente con el consumo de quesos blancos frescos de elaboración artesanal y la región con el mayor número de casos reportados de ETA's es el estado Zulia (González, 2006, <http://www.cedib.org/2013/split/sql>). En este sentido, se ha señalado que los animales con mastitis subclínica son probablemente una de las principales fuentes de contaminación de la leche cruda con cepas de *S. aureus* de origen intramamario y a su vez enterotoxigenicas, convirtiéndose la leche cruda en una fuente potencial de contaminación para los productos elaborados a partir de ella, como los quesos frescos artesanales (Kousta, 2010, p. 18).

Los quesos artesanales producidos en las fincas de pequeños o medianos productores de la región se caracterizan por ser quesos frescos que en algunos casos son elaborados a partir de leche cruda en forma tradicional sin emplear métodos estandarizados y en la mayoría de los casos, en deficientes condiciones higiénicas sin ningún control sanitario. Con una distribución y comercialización no sujeta a vigilancia ni controles sanitarios, y al hecho que el almacenamiento se realiza sin refrigeración o refrigeración no controlada, al ser vendidos principalmente por

vendedores ambulantes, ocasiona que estos productos se conviertan en un riesgo potencial a la salud del consumidor. El conocimiento de la diseminación de *S. aureus* en las fincas donde se elabora queso artesanal puede contribuir a establecer las medidas necesarias para minimizar la contaminación de la leche y de los quesos frescos con *S. aureus*. (Lemus, et al, 2008, p. 47)

Antecedentes de la Investigación

Cedillos, R; Guerra, J en el año 2012 realizaron un trabajo sobre “Determinación de la multiresistencia microbiana de *Staphylococcus aureus*, aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración del queso fresco artesanal proveniente de dos queserías”. Tesis Bachelor, Universidad de El Salvador.

Para la realización de esta tesis se trabajó con queso fresco artesanal de dos queserías, de las cuales 5 muestras eran de queso fresco, 5 muestras de leche y muestras del lavado de manos de los manipuladores con un total de 25 muestras a analizar de las cuales se aisló e identificó *S. aureus* y se les comprobó la resistencia a diferentes antibióticos como: Ciprofloxacina, Penicilina G, Eritromicina, Tetraciclina, Sulfamida y Amoxicilina, de este análisis se obtuvo que las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* de las muestras de queso fresco y leche presentaron multiresistencia a 3 antimicrobianos: Amoxicilina / Ac. Clavulánico, Eritromicina y Penicilina G y las cepas de las muestras del lavado de manos presentan resistencia a Penicilina G. Los resultados obtenidos son un indicador del abuso de antibióticos presentes en los animales. (Guerra, 2012, p. 16)

Benítez, E; Centi, K en el año 2012 en el trabajo Determinación de la resistencia del *Staphylococcus aureus* aislado de quesos no madurados comercializados en el Mercado Central de San Salvador, a los antibióticos de prueba seleccionados. Tesis Bachelor, Universidad de El Salvador.

En este trabajo para la determinación de la resistencia del *S. aureus* en quesos no madurados se trabajó con 20 muestras de queso duro y 20 muestras de quesillo. Después del aislamiento e identificación de las cepas de *Staphylococcus aureus* se procedió a realizar la prueba de difusión en disco con los antibióticos seleccionados: Tetraciclina, Ciprofloxacina, Clindamicina, Vancomicina, Amikacina y Oxacilina. Posteriormente se demostró que las cepas aisladas del quesillo y queso duro son sensibles a la Ciprofloxacina, Clindamicina, Vancomicina, Amikacina y Oxacilina y del queso duro son resistentes a la Tetraciclina. Estos resultados obtenidos indican el uso inadecuado de antibióticos por parte de la población. (Benítez, 2012, pp. 25-34)

Reyes, G; Acosta, I; Atencio, L; González, L; Rivera, J; Guíñez, J. en el año 2010 en un trabajo sobre Susceptibilidad a antimicrobianos y perfil plasmídico de *Staphylococcus aureus* aislados de quesos artesanales e industriales del municipio Valledupar Cesar-Colombia

En esta investigación para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos y perfil plasmídico de *S. aureus* se trabajó con quesos duros, blandos y semiduros artesanales e industriales escogidos aleatoriamente a las cepas aisladas se realizó la prueba de difusión en disco y se demostró que el *S. aureus* en los quesos blandos presentan resistencia a PR, CR y EI; todas las cepas mostraron sensibilidad a OX, GM, CIP, FOX, CC, SXT, VA, RA, IPM. (Reyes et al, 2014, pp. 80-86)

Alvarado, V; Mora, M; Arias, M; Chaves, C; Rojas, N en el año 2011 en el trabajo sobre Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, Costa Rica

Para la realización de este trabajo se utilizaron 35 muestras de queso fresco a las que se le hicieron un recuento de Coliformes totales, Coliformes fecales y *Staphylococcus aureus*, a las cepas aisladas e identificadas de *S. aureus* se procedió a realizar la prueba de sensibilidad a los antibióticos con un sistema automatizado Vitek obteniendo como resultado resistencia de 23 cepas a los antibióticos β -lactámicos (ampicilina, oxacilina y penicilina). (Alvarado et al, 2011, pp. 102-106)

Justificación teórica

La mayor parte de problemas de contaminación están en los quesos elaborados artesanalmente debido a que estos quesos para su elaboración utilizan técnicas rudimentarias en donde se tiene poco control de calidad en las etapas de realización de los quesos, estos quesos al tener poca vida útil pueden ser atacados con microorganismos y causar daños a la salud a quienes lo consumen, por el contrario los quesos industriales al tener una técnica de producción mecanizada tiene un riguroso control de calidad en sus etapas. (Vásquez et al, 2012, p. 18)

El alimento debe tener ausencia de microorganismos la presencia de microorganismos en algún tipo de alimento está relacionado con una mala calidad microbiológica entre los microorganismos que se registran como indicadores de una mala calidad microbiológica están Coliformes totales, Coliformes fecales, *E coli*, *S. aureus* todos estos microorganismos pueden estar presentes en los quesos debido a unas malas prácticas de higiene y manipulación por parte de las personas que realizan la elaboración del queso asimismo se pueden contaminar por un mal almacenamiento, en

el transporte y la comercialización. (Carrasco, 2002, <http://www.saludcapital.gov.co/>). *S aureus* al ser un microorganismo de amplia distribución puede contaminar no solo el producto terminado sino puede estar presente en la leche cruda causando brotes de intoxicación. (Romero et al, 2009, p.111)

Debido que en algunos casos la leche utilizada para la elaboración del queso puede ser procedente de una vaca con mastitis por lo que es necesario un correcto proceso de pasteurización para eliminar estas bacterias, para que el queso no cause intoxicación estafilocócica a las personas que lo consumen y tener BPM para que el queso elaborado con leche pasteurizada no se contamine después con microorganismos patógenos. (Durán et al, 2010, pp. 56-68)

El uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento de la mastitis es un problema, ya se puede transmitir los residuos antibióticos a la leche y de esta manera transmitir a través de los alimentos a los consumidores afectando la salud humana con problemas de resistencia antimicrobiana. (Benítez, 2012, p. 30). *Staphylococcus aureus* un microorganismo ampliamente distribuido en el medio ambiente es responsable de muchas enfermedades nosocomiales y de intoxicaciones alimentarias que son enfermedades transmitidas por los alimentos producidas por microorganismos o sus toxinas estas intoxicaciones provocan dolores gastrointestinales, náuseas, vómitos, etc. (Alvarado et al, 2011, p. 103).

Los alimentos para su consumo deben ser higiénicamente preparados, para que haya una correcta higiene debe seguirse un conjunto de condiciones y medidas indispensables para garantizar la seguridad y salubridad de los productos alimentarios. En otros países también se registran similares casos de brotes de *Staphylococcus aureus* en quesos como por ejemplo en Venezuela en los quesos blancos elaborados artesanalmente nos indica que la mayoría de las muestras analizadas están por encima de los límites microbiológicos aceptables de *S. aureus* y de otros indicadores de calidad sanitaria. (Caldas et al, 2008, p. 19)

Desde la introducción de los antibióticos a la medicina *Staphylococcus aureus* ha sido objeto de estudio a causa de la facilidad que presenta para desarrollar mecanismos de resistencia hacia éstos. Se han encontrado cepas resistentes a prácticamente todos los antibióticos disponibles para su tratamiento, incluyendo recientemente a la vancomicina, antibiótico que permanecía como única opción ante una cepa multiresistente. (Alvarado et al, 2008, p.106).

Por esta razón se han realizado un sinnúmero de estudios a esta bacteria, no obstante, la mayoría se centran principalmente en el estudio de las cepas de origen nosocomial y existe muy poca información sobre la resistencia en cepas comunitarias. Por ello se consideró de importancia el

estudio de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de quesos elaborados artesanalmente. (Morales, 2006, p. 48)

Justificación práctica

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Para la identificación se usa medios que son diferenciales y selectivos al mismo tiempo, es el caso del agar manitol, selectivo para bacterias del género *Staphylococcus* y diferencial para *Staphylococcus aureus* (fermenta el manitol y sus colonias aparecen de color amarillo sobre el agar como resultado de la acidificación del medio). (Cortecero, 2011, p. 20)

Para el aislamiento e identificación de *S. aureus* se utiliza pruebas bioquímicas como la producción de coagulasa que permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de *Staphylococcus*. Además se utiliza la Tinción Gram y la prueba de catalasa y para la determinación de la resistencia y multiresistencia a los antibióticos por la técnica de difusión en disco. (Fernández et al, 2010, <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/>)

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y multiresistentes aislados en quesos frescos artesanales producidos en zonas rurales de Riobamba.

Objetivos Específicos.

1. Recolectar adecuadamente las muestras de queso fresco artesanal de las queserías San Juan, Quimiag y Pungalá siguiendo la Normativa de muestreo.
2. Aislar cepas de *Staphylococcus aureus* en muestras de quesos frescos artesanales mediante métodos microbiológicos.

3. Realizar pruebas de resistencia y multiresistencia frente a los antibióticos (Penicilina, Cefoxitina, Tetraciclina, Amikacina, Vancomicina, Ciprofloxacina, Clindamicina y Eritromicina.) a las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas.

4. Comparar si se encuentran dentro de los límites microbiológicos establecidos por la NTE INEN 1528: 2012 los resultados obtenidos del recuento en placa de *S. aureus*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades

El queso es un alimento concentrado que posee los nutrientes esenciales presentes de la leche cruda, puede ser fresco o pasar por un proceso de maduración. Se elabora al coagular la leche y retirar el suero, para la coagulación existe diversos métodos pero el más común es la adición de cuajada una enzima natural que se halla en el cuarto estómago de un rumiante también se utiliza extractos de plantas, el suero agrio o vinagre. (Anónimo 2010, <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/>)

El coagulante utilizado determina las características finales del queso. Existe mucha variedad de quesos en el mundo algunas de las clasificaciones se basan en sus diversas características y propiedades como por ejemplo su contenido de grasa, el tipo de leche utilizado o el método de coagulación, el contenido de humedad. Cuadro 1-1. (Buendía et al, 2012, <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/>)

Cuadro 1-1: Clasificación de los quesos de acuerdo a su contenido de humedad

Tipo	Humedad (%)	Grasa (%)	Textura	Conservación
Suave	45 a 75	Hasta 40	Suave, fácil de untar	Unos días
Semiduro	35 a 45	Hasta 35	Firme a desmenuzable, puede cortarse en rodajas	Unos meses
Duro	30 a 40	Hasta 30	Muy firme, denso a veces grumoso	Un año a más

Fuente: (Aguhob, 2002, pp. 32)

Las técnicas utilizadas para la elaboración de los quesos dependen de las condiciones locales, la calidad de la leche, las habilidades y la disponibilidad de los ingredientes el hecho de pasteurizar o no la leche y la temperatura de pasteurización va influir en las características, la microbiología y el sabor del producto final. Cuando se pasteuriza la leche se deja enfriar antes de seguir con la elaboración pero si se emplea leche cruda se deja reposar por uno o más días con el objetivo de

incrementar su acidez que es muy importante para tener un excelente cuajado de la leche. (Aguhob, 2015: p.24)

1.2 Definiciones generales

Según el CODEX STAN 283-1978 se entiende por queso al producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche” (Codex, 1978, <https://books.google.com.ec/books?id=I0HZIxxiE5>)

Según la NTE INEN 1528 se entiende por queso al producto blando, duro, madurado o no madurado con una proporción entre las proteínas de suero y la caseína no superior a la de la leche, que se obtiene por coagulación total o parcial de la proteína de la leche, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos dando un producto final con características físicas, químicas y organolépticas aceptables al consumidor. (INEN 1528, 2012, p. 1)

Según Pascual y col” queso es un producto fresco o maduro, sólido o semisólido que se obtiene de la separación del suero después de la coagulación de la leche natural y /o materias obtenidas de la leche por acción del cuajo u otros coagulantes permitidos obteniendo un producto final con características sensoriales agradables”. (Pascual, 2001, p. 80)

De acuerdo a la FAO/OMS “es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos. (Ares, s.f, <http://www.insacan.org/racvao/anales/2002/articulos/>)

Según Poncelet nos dice que queso es el producto fresco o madurado, solido o semisólido, obtenido de la leche, esta leche puede ser total o parcialmente desnatada, de la nata del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa con o sin hidrolisis previa de la lactosa, con una relación de caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche. (Ares, s.f, <http://www.insacan.org/racvao/anales/2002/articulos/>)

1.2 Clasificación de tipos de queso

1.3.1 Según su dureza y contenido de humedad

La NTE-INEN 62 estable una clasificación de acuerdo a su dureza y contenido graso así:

De acuerdo con su dureza los quesos pueden ser:

Duros: su humedad es igual o menor de 55%.

Semiduros: su humedad es mayor a 55% y menor de 65%

Blandos: su humedad es igual o mayor a 65%. (INEN 62, 2012, p. 1)

De acuerdo con su contenido de materia grasa, los quesos pueden ser:

Ricos en grasa: su contenido de grasa es igual o mayor a 60%

Extragrasos: su contenido de grasa mayor o igual que 45%.

Semigrasos: su contenido de grasa es mayor o igual que 25%

Pobres en grasa: su contenido de grasa es de 10%

Desnatados: su contenido de grasa es menor de 10% (INEN 62, 2012, p. 2)

1.3.2 Según su forma de elaboración

Industrial: El producto se elabora en industrias queseras, con instalaciones más o menos grandes y que suponen cierto capital. La leche se compra a los ganaderos que pueden estar cerca o lejos de la fábrica y el queso que se elabora puede fabricarse siguiendo los procesos tradicionales o no. (Meléndez, 2013, <http://es.slideshare.net/maherran/los-quesos-3>)

Artisanal: Al frente de su elaboración hay muy pocas personas y se caracteriza porque en su proceso de elaboración se mantienen los procedimientos tradicionales de la zona y se obtiene un producto peculiar. Cada artesano utiliza pequeñas cantidades de leche, la cual puede ser comprada o bien propia, en cuyo caso también se llama “queso de granja”. (Meléndez, 2013, <http://es.slideshare.net/maherran/los-quesos-3>)

1.3.3 Según el periodo de maduración

Atendiendo a su maduración o no, los quesos se denominarán de la siguiente forma:

Queso fresco: Su consumo se lo realiza después del proceso de elaboración.

Queso curado o madurado: Después del proceso de fabricación debe mantenerse durante algún tiempo controlando su temperatura para que se produzca cambios físicos y químicos propios del mismo. (INEN 62, 2012, p. 2)

- **Tierno:** Entre 7 -30 días.

- **Semi-Curado:** Entre 30 y 60 días.
- **Curado:** Más de 60 días.

Dentro de los quesos curados nos encontramos como caso particular a los madurados con mohos que pueden desarrollarse en el interior, como es el caso de los azules (Roquetfor, Cabrales), o en la superficie ((Meléndez, 2013, <http://es.slideshare.net/maherran/los-quesos-3>))

1.4 Queso fresco



Fotografía 1-1 Quesos frescos

Fuente: Silvana Yugcha, 2016

1.4.1 *Conceptos generales*

Según la NTE INEN 1528:2012 “Queso fresco es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácticos. (INEN 1528, 2012, p. 1)

Según Cortecero y col “Queso fresco es el producto obtenido de la coagulación o gelificación de la leche cuando se acidifica o se somete a la acción enzimática del cuajo, produciéndose la separación del cuero y la cuajada o “Sinéresis”. Esta cuajada después de separada del suero constituye un queso fresco. (Cortecero, 2011, p. 18)

Según González, M “ Queso es el producto que se obtiene por coagulación de la leche pasteurizada, integral o parcialmente descremada, constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel más o menos deshidratado que retiene un porcentaje de la materia grasa. (González, 2010, http://www.cedib.org/2013/split/sql_)

1.4.2 Clasificación del queso fresco

La Norma General para quesos frescos no madurados. NTE INEN 1528:2012 clasifica a los quesos de acuerdo a su composición y características físicas del producto en:

Según el contenido de humedad:

- Duro
- Semiduro
- Semiblando
- Blando

Según el contenido de grasa láctea:

- Rico en grasa
- Entero ó Graso
- Semidescremado ó bajo en grasa
- Descremado ó Magro INEN 1528, 2012, p. 3)

Cedeño, M clasifica los quesos frescos según su textura, su proceso de elaboración y según su contenido de grasa en:

Según su textura:

- Suaves madurados o no
- Semi suaves madurados
- Duros madurados con o sin ojos
- Muy duros granulados

Según el proceso de elaboración:

- Quesos madurados
- Quesos fundidos
- Quesos hilados

Según el contenido de grasa:

- Triple graso: contiene un mínimo de 75 % de grasa
- Doble graso: contiene un mínimo de 60 % de grasa
- Graso: contiene un mínimo de un 45 % y un máximo de un 60 % de grasa
- Semigraso: contiene un mínimo de un 25% y un máximo de 25 % de grasa
- Semidesnatado: contiene un mínimo de 10 % y un máximo de 25 % de grasa
- Graso: contiene un 20 % de grasa. (Cedeño, 2015, p.19)

1.4.3 *Materia prima*

La principal materia prima para la elaboración de los quesos es la leche que siempre debe ser de buena calidad para asegurar la obtención de quesos de buena calidad pueden proceder de vacas, ovejas, cabras, y búfalos, de su origen dependerá el producto final en los cuales variara el sabor y la textura asimismo se puede utilizar leche cruda o pasteurizada, cuando se utiliza la leche cruda se conserva más su sabor y toda la grasa y cuando se utiliza la leche pasteurizada la temperatura destruye las bacterias sin alterar su composición y cualidades. (Galván, 2005, p. 15)

El papel de los diferentes componentes de la leche en el queso se enuncia en la Cuadro 2-1 (Galván, 2005, p. 15)

Cuadro 2-1 Componentes de la leche en el queso.

Componentes	Función
Agua	Favorece el crecimiento microbiano y por tanto la maduración, afecta a la textura y rendimiento
Grasa	Afecta a la textura, sabor, rendimiento y color de los quesos
Lactosa	Afecta al desuerado, textura, sabor y maduración
Caseína	Afecta al rendimiento, sabor y olor
Proteínas del Suero	Contribuye con el valor nutritivo y la maduración
Minerales	Participa en la coagulación, influye en el desuerado y textura de la cuajada.
Enzimas Coagulantes	Utiliza la quimosina o renina, extraída del estómago de los corderos lactantes
Cuajos microbianos	Los cuajos microbianos son elaborados principalmente a partir de cultivos de mohos de la especie " <i>Rhizomucor</i> ".
Ácidos Orgánicos	Se puede omitir el uso de cultivos por medio de ácidos orgánicos: acético, cítrico, láctico.
Cloruro de Sodio	Da sabor al queso y alarga la vida útil al frenar el crecimiento microbiano y disminuir la actividad de agua.
Cloruro de Calcio	Se obtiene una cuajada más firme y acorta el tiempo de coagulación.
Nitratos	De sodio o potasio impide la hinchazón precoz por bacterias

Fuente: (Galván, 2005, pp. 10)

1.4.4 Proceso de elaboración

Para la elaboración de los quesos se debe pasar por etapas que generalmente son siete: Gráfico 1-1.

1.4.4.1 Tratamiento de la leche

Con esta etapa se consigue eliminar macro – sustancias extrañas procedentes de su manipulación en la cual se puede añadir o eliminar la nata según el tipo de queso que se quiera elaborar con posterior homogenización para obtener una textura más uniforme (Galván, 2005, p. 8)

1.4.4.2 Coagulación

Para la coagulación la leche debe estar a una temperatura de 35°C, cuando alcanza esa temperatura se añade a la leche el cuajo y la leche se transforma a un estado sólido o semisólido existiendo aglutinación de las micelas de la proteína caseína. (Navarro, 2013, <http://cosasdequesos.es/el-autor/>)

1.4.4.3 Corte de la cuajada y desuerado

Después de transcurrido el tiempo de coagulación y verificado la consistencia y textura adecuada se realiza su corte con la ayuda de unos instrumentos llamados liras para ocasionar un drenaje del suero para posteriormente trabajar en la cuba de elaboración mediante agitación y aumento de la temperatura para una expulsión del suero y su unión de esta manera el desuerado elimina el suero de la cuajada. (Navarro, 2013, <http://cosasdequesos.es/el-autor/>)

1.4.4.4 Moldeo

Consiste en el llenado de los granos de la cuajada en moldes que pueden ser de acero inoxidable o de plástico alimenticio, de esparto o madera. (García, 2006, <http://quesoselpericho.com/como-se-hace-el-queso.html>)

1.4.4.5 Prensado

En este paso se da la forma definitiva al queso y se evacua el suero y el aire atrapado entre los granos, la duración del prensado varía según que queso se pretenda elaborar. (Kurlat, 2011, <http://www.quesosargentinos.gov.ar/paginas/Cuadernillo->)

1.4.4.6 Salado

Con el salado se evita el crecimiento de microorganismos indeseables, y se proporciona el sabor para lo cual se recubre la superficie del queso con cloruro sódico (sal), o con inmersión en un baño de salmuera (agua y sal). (García, 2006, <http://quesoselpericho.com/como-se-hace-el-queso.html>)

1.4.4.7 Envasado

Los quesos antes de su distribución al público deben ser correctamente envasados para lo cual se deben limpiar para dar al consumidor una apariencia agradable y para evitar el ataque de microorganismos, para el envasado se lo debe realizar en fundas de plástico o en láminas de aluminio. (Culqui, 2010, p. 20)

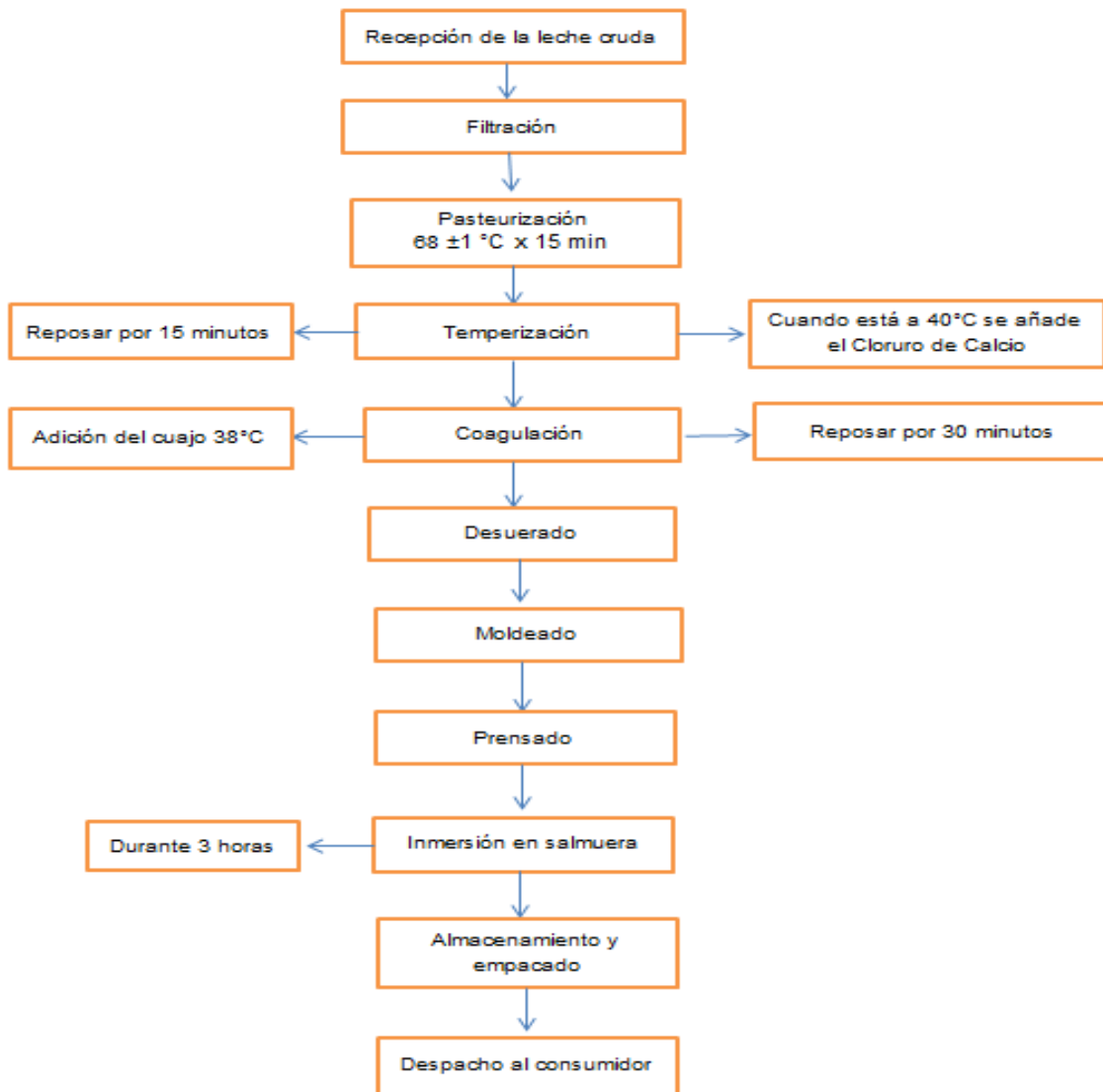


Gráfico 1-1. Proceso de elaboración de queso fresco

Fuente: (Kurlat, 2011, p. 13)

1.5 Control de calidad

1.5.1 Control de calidad físico-químico

Su composición química depende de la preparación de la leche utilizada para la elaboración, del método utilizado y del tiempo de maduración.

Según la NTE INEN 1528:2012 establece los siguientes requisitos para la elaboración de quesos frescos no madurados, en esta Norma se incluye las determinaciones de humedad y grasa pero además de estos parámetros es necesario analizar la acidez, el pH y ciertos aditivos.

En la Tabla 1-1 se observan los requisitos que deben cumplir los quesos frescos de acuerdo a la NTE INEN 1528: 2012. (INEN 1528, 2012, p. 3)

Tabla 1-1. Requisitos para quesos no madurados establecidos en la NTE INEN 1528: 2012.

Tipo o clase	Humedad % Max NTE INEN 63	Contenido de grasa en extracto seco% m/m Mínimo NTE INEN 64
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero o graso	-	45
Semidescremado o bajo en grasa	-	20
Descremado o magro	-	0.1

Fuente: (INEN 1528, 2012)

1.5.2 Control microbiológico

La NTE INEN 1528:2012 nos indica que los quesos frescos no madurados deben estar ausentes de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y sus toxinas, de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la Tabla 2-1. (INEN 1528, 2012, p. 4)

Tabla 2-1. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.

Requisito	N	M	m	C	Método de ensayo
<i>Enterobacteriaceas,</i> <i>UFC/gr</i>	5	2x10 ²	10 ³	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i>	5	< 10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>UFC/gr</i>	5	10	10 ³	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogene</i> <i>UFC/25 gr</i>	5	ausencia	-		ISO 11290-1

Fuente: (INEN 1528, 2012)

1.5.3 Controles complementarios

Después del proceso de elaboración los quesos deben tener rigurosos controles como por ejemplo en el almacenamiento que se lo debe almacenar en cadena de frío a temperatura entre 4°C ± 2 °C para su posterior distribución, comercialización y transporte que se lo debe realizar de una manera adecuada para que no dañe el producto ni ocasione contaminación cruzada. (INEN 1528, 2012, p. 4)

1.6 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las ETA's son un conjunto de enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos o agua contaminada en cantidades suficientes puede afectar la salud del consumidor. Los agentes contaminantes pueden ser: agentes biológicos (bacterias y/o sus toxinas, hongos, virus, parásitos), agentes químicos (plaguicidas, fertilizantes, veneno, etc), agentes físicos (metales, vidrio, madera, etc. (Quilligana, 2007, p. 14)

Entre los síntomas más comunes que puede ocasionar las ETA's son dolores gastrointestinales además ojos hinchados, dificultades renales, visión doble, etc los síntomas varían en dependencia de la cantidad de bacterias o toxinas del alimento, cantidad de alimento consumido y estado físico de las personas en algunos casos puede durar un par de días, estas enfermedades afectan a niños, mujeres embarazadas y ancianos. (Benítez, 2012, p. 34)

1.7 Clasificación de ETA's

Las ETA's pueden clasificarse de la siguiente manera:

Infecciones transmitidas por alimentos

Estas enfermedades se presentan cuando se consumen alimentos contaminados con microorganismos patógenos los cuales colonizan e invaden el cuerpo sin la producción de toxinas por el microorganismo. (Castillo, 2009, http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036_)

Intoxicaciones alimentarias

Es una enfermedad que se produce por la ingestión de toxinas que se encuentran en los alimentos estas toxinas son elaboradas por bacterias, hongos como por ejemplo la toxina botulínica, la enterotoxina de *Staphylococcus*, etc. (Castillo, 2009, <http://www.alimentosecuador.com/descargas/>)

Toxiinfección alimentaria

Esta enfermedad se produce por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o por las toxinas que estos producen. (Cristóbal, 2003, p. 156)

Alergias causadas por alimentos

Se da por reacciones adversas por el consumo de alimentos o aditivos alimentarios en personas sensibles a estos. (. (Castillo, 2009, <http://www.alimentosecuador.com/descargas/>)

1.8 Microorganismos transmitidos por el queso

Los productos que son elaborados a partir de la leche cruda que no pasan por un proceso de pasteurización son focos de contaminación que pueden causar muchas enfermedades graves en el ser humano como la salmonelosis con variados síntomas como fiebre, vómito y diarrea. La leche a más de su carga microbiana normal contiene otros microorganismos procedentes de los manipuladores, que proliferan con facilidad en la leche constituyendo un excelente medio de cultivo, también proceden de la ubre enferma (mastitis), de heces u otras excreciones de vacas infectadas o sintomáticas y del equipo de ordeño. (Lanchipa, 2003, p. 4)

La carga microbiana en el queso está constituida por los siguientes microorganismos:

1.8.1 *Escherichia coli*

Se encuentra presente en la leche por el mal ordeño y a la utilización de agua contaminada empleada en el momento de la elaboración del queso. *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente severas, tales como infecciones del aparato excretor, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia, etc. La presencia de *E. coli* en algún alimento es indicativo que no es seguro para el consumo humano ya que se puede suponer que hay enteropatógenos donde hay contaminación fecal. (Barrios, 2006, p. 45)

1.8.2 *Salmonella thypy*

Es un género de bacilos Gram negativos son microorganismos “anaeróbicos facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo del tipo oxidativo y fermentativo. En los seres humanos la *Salmonella* produce diferentes cuadros clínicos como la fiebre tifoidea y paratifoidea, gastroenteritis, las bacteriemias e infecciones localizadas. (Zambrano, 2014, p. 12)

Salmonella se transmite sobre todo a través de alimentos contaminados. Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa por esto no fermentan la leche y sus derivados, por eso su presencia en dichos productos no se la puede verificar con un cambio de pH producido por la acidez desarrollada. (Zambrano, 2014, p. 12)

1.8.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, ocasiona la enfermedad listeriosis. Los animales son los portadores de esta bacteria en el intestino luego de su evacuación contaminan el agua, los suelos, vegetales, productos lácteos y carnes, la contaminación se presenta en el proceso de elaboración, empaque y almacenamiento de los alimentos en especial al almacenar los alimentos en refrigeración porque la bacteria se desarrolla en muchos casos en refrigeración por lo que es conveniente procurar tener una limpieza de estos artefactos. Los alimentos que se encuentran contaminados estos no cambian de color ni sabor. Los principales síntomas que ocasiona la enfermedad de listeriosis son: nauseas, diarreas, dolor abdominal, vómitos, dolor de cabeza, fiebre en algunos casos puede producir meningitis, sepsis y muerte. (Castillo, 2013, p. 50)

1.8.4 *Staphylococcus aureus*

Produce enterotoxinas que libera al alimento y cuando se ingiere el alimento que contiene la toxina produce graves reacciones dentro de 1 a 6 horas con síntomas graves como escalofríos, diarrea, vómitos, esta toxina puede permanecer activa aunque el alimento se almacene a bajas temperaturas, su metabolismo es de tipo fermentativo, del tipo aerobios y anaerobios facultativos, por lo que

puede desarrollarse en la leche y sus derivados fermentando la lactosa y provocando acidez desarrollada. (Castillo, 2013, p. 50)

Esta bacteria posee termo resistencia lo que provoca que resista en parte la pasteurización este coco produce la enzima penicilina, por ende presenta resistencia ante la penicilina, lo que sugiere que su tratamiento se realice con otro tipo de antibióticos. (Esteban et al, 2011, <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/>)



Fotografía 2-1. Forma morfológica de *Staphylococcus aureus*

Fuente: (Databio, 2010, <http://www.insht.es/>)

1.8.4.1 Características

Staphylococcus aureus pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, estas bacterias son inmóviles tiene forma de coco y se agrupa en parejas, cadenas cortas o formando racimos de uvas no forman esporas miden de 0.8 a 1.5 micras de diámetro, son Gram positivos, su metabolismo es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo, crece bien en agar sangre a 37°C. Es habitual encontrar una colonia mediana, a veces β-hemolítica, de bordes definidos blancos o en ocasiones dorada, conociéndose también como el *Staphylococcus* dorado. (Páez, 2011, <https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/>)

1.8.4.2 Hábitat

S. aureus habita en la mucosa de la nasofaringe donde existe como microbiota normal transitoria o permanente o en los alimentos donde produce enterotoxinas que contaminan al hombre a través de los alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas prácticas de elaboración y

conservación generando en ellos intoxicaciones alimentarias, también habita en las glándulas mamarias, piel y el cabello de una gran proporción de la población. Puede colonizar diversas superficies epiteliales y mucosas. (Zuta, 2009, p. 4)

Las personas involucradas en la elaboración de los alimentos ayudan su rápida propagación debido a malas prácticas de fabricación, almacenamiento y distribución debido a que *S. aureus* es un microorganismo que resiste las condiciones ambientales y extremadamente difíciles de erradicar. (Zuta, 2009, p. 4)

1.8.4.3 Morfología

Pared celular: Los componentes de la pared celular de los cocos Gram positivos están constituidos por el peptidoglicano y ácidos teicoicos. (Databio, 2010, <http://www.insht.es/>)

Peptidoglicano: Proporciona la forma y estabilidad a la bacteria. *S.aureus* se encuentra recubierto de proteína A, que es importante para la prueba específica de aglutinación de antígenos monoclonales además tiene la coagulasa que se encuentra ligada a la célula, que tiene como función la conversión del fibrinógeno en fibrina produciendo coagulación del plasma. (Databio, 2010, <http://www.insht.es/>)

Membrana: Se encuentra constituida por lípidos, proteínas y carbohidratos que sirven como barrera para el microorganismo. (Databio, 2010, <http://www.insht.es/>)

Cápsula: También denominada cápsula mucoide es una capa de polisacáridos que ayudan a la adherencia y al aumento del efecto antifagocítico. (Databio, 2010, <http://www.insht.es/>)

1.8.4.4 Poder patógeno de *Staphylococcus aureus* (Factores de virulencia)

S. aureus, presenta factores de virulencia que pueden ser productos extracelulares o propios de la célula bacteriana entre ellos están:

Coagulasa. Coagula el plasma humano, además existe coagulasa libre, que es secretada con múltiples formas antigénicas, la cual se puede evidenciar en un tubo de ensayo con plasma humano o de conejo, resultando un coágulo de fibrina. Asimismo, existe una coagulasa unida a la pared bacteriana que actúa como factor de la agregación plaquetaria.

Hemolisinas. Son de importancia para el hombre las proteínas alfa y delta debido que la proteína Alfa produce lisis de eritrocitos y toxicidad para otras líneas celulares; actúa bloqueando la repolarización de la membrana plasmática generando contracción de la musculatura lisa y vasoconstricción, por lo mismo, existe hipertensión esta proteína es termolábil.

Leucocidina. Ayuda al microorganismo a sobrevivir dentro de los fagosomas leucocitarios.

Hialuronidasa. Ayuda a degradar el tejido conectivo, ayudando el avance del microorganismo hacia zonas más profundas.

Estafiloquinasa. Tiene como función disolver los coágulos de fibrina.

Enterotoxinas. Estas proteínas son estables al calor y resistentes a enzimas proteolíticas. Suprimen la actividad de IgM aumentan la susceptibilidad del paciente a generar shock, induce náusea vómito y diarrea las Enterotoxinas A y D son las más comunes.

Proteína A. En la superficie de la pared bacteriana. Se une a la región Fc de la IgG, inactivándola.

Penicilinasa o b-lactamasa. Hidroliza el anillo b-lactámico presente en la estructura molecular de las penicilinas. Inactiva la penicilina.

Catalasa. Transforma el peróxido de hidrógeno en agua.

Toxina del Shock tóxico (TSST-1). Causante del síndrome del shock tóxico. Induce fiebre, vómito, rash en la piel, daño en órganos.

Lipasa: Degrada grasas lo cual le ayuda a colonizar la piel.

Leucocidina. Lisis neutrófilos y macrófagos

Toxina exfoliativa A y B. Causan descamación de la piel. (Velázquez, 2003, p. 384-390)

1.8.4.5 Manipuladores de alimentos y Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus al ser un microorganismo ampliamente distribuido, rápidamente se puede propagar a los alimentos y a la materia prima con los que se elabora los alimentos contaminándolos con sus toxinas que puede causar la enfermedad después de la eliminación de la bacteria. (Estrella, 2012, p. 84)

Asimismo los manipuladores de los alimentos en algunos casos ayudan a que esta propagación sea más rápida ya sea por contacto directo e indirecto con la materia prima o una incorrecta limpieza de las superficies utilizadas, o al ser un portador asintomático del microorganismo puede contaminar el alimento al toser, estornudar o hablar y cuando existe un decadente control de calidad en las etapas de producción, comercialización, distribución y transporte del producto. (Estrella, 2011, p. 87)

Staphylococcus aureus al ser un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales se lo puede erradicar con unas correctas prácticas de manufactura, almacenaje en los cuales se debe controlar la higiene, la temperatura ya que una adecuada temperatura de refrigeración ayudara a que el microorganismo no sea capaz de formar las toxinas por lo que es importante no romper la cadena de frio después de la elaboración del producto. (Estrella, 2012, pp. 84)

1.9 Medios de cultivo para detección de *Staphylococcus aureus* en los alimentos

Staphylococcus aureus al ser un microorganismo no exigente puede crecer en cualquier medio bacteriológico ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Uno de los medios que se utiliza para diferenciación de *Staphylococcus aureus* es el medio manitol-salino o Chapman, también se puede utilizar métodos rápidos para la enumeración de microorganismos indicadores. (Estrella, 2012, p. 94)

Estos métodos son un conjunto de técnicas microbiológicas, bioquímicas, fisiológicas, inmunológicas y serológicas para el aislamiento más efectivo, la detección, caracterización y enumeración más rápida de microorganismos y sus productos en alimentos. (Estrella, 2012, p. 94)

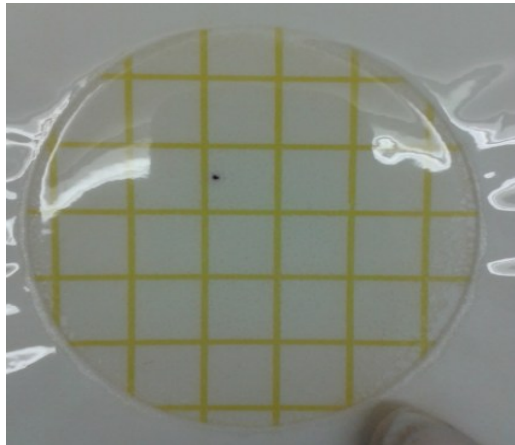
Actualmente en el mercado se encuentran disponibles diferentes productos para la detección rápida y efectiva de microorganismos indicadores en la industria de alimentos. (Estrella, 2012, p. 94)

1.9.1 Petrifilm para la detección de *Staphylococcus aureus*

Las placas Petrifilm Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus* son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene un agente gelificante soluble en agua fría. El medio modificado cromogénico Baird-Parker en la placa es selectivo y diferencial para el *Staphylococcus*

aureus. Las colonias rojo-violetas en la placa son *S. aureus*. Cuando solamente se aprecien colonias rojo-violeta, cuente las colonias y la prueba se habrá completado. (3M, <http://dpe-consultores.com/pdf/StaffExpress.pdf>)

Si encuentra flora de acompañamiento en el fondo de su prueba de *Staphylococcus aureus*, el Disco Staph Express Petrifilm™ de 3M™ se debe utilizar para diferenciar el *S. aureus* del resto de las colonias sospechosas. El Disco Staph Express Petrifilm se debe utilizar cuando la placa presente colonias que no sean color rojo-violeta; por ejemplo, colonias negras o azul-verdosas. El Disco Staph Express Petrifilm contiene un indicador y ácido desoxirribonucleico (DNA). El *S. aureus* produce desoxirribonucleasa (DNasa) y la DNasa reacciona con el indicador para formar zonas rosadas. Cuando el Disco se inserta en la placa, el *S. aureus* (y ocasionalmente el *Staphylococcus hyicus* y el *Staphylococcus intermedius*) produce una zona rosada. Otros tipos de bacteria no producen zonas rosadas. El *S. aureus*, el *S. hyicus* y el *S. intermedius* integran la mayoría del grupo de los organismos comúnmente conocidos como Staphylococcus coagulasa positiva. (3M, <http://dpe-consultores.com/pdf/StaffExpress.pdf>)



Fotografía 3-1. Placa Petrifilm Staph para recuento de *Staphylococcus aureus*

Fuente: Silvana Yugcha, 2016

1.9.2 Identificación de *Staphylococcus aureus* en medio manitol-salino o Chapman

Fermentación del manitol: positivo (color amarillo)

El método más recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios es la fermentación del manitol este medio por su elevado contenido de sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas. En la caja se puede observar un halo amarillo alrededor de las cepas

manitol positivo y un halo rosa en las que son manitol negativo, *S.aureus* sí fermenta al manitol, sus colonias tienen un halo amarillo. (Morales, 2006, p. 48)

Este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por la pigmentación amarilla característica de *S. aureus*. Debido a que esta bacteria fermenta el manitol se genera un cambio de color en el medio que vira de rojo pálido a amarillo. Los *Staphylococcus* coagulasa negativos no fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado. (Cervantes, 2014, p. 30)

1.9.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. aureus*

Coagulasa: positivo.

Principio del procedimiento

La detección de coagulasa permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo de las demás especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos. Se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma. *S. aureus* produce dos formas de coagulasa, una que se encuentra ligada a la membrana (coagulasa ligada, ya revisada) y otra coagulasa libre.

La coagulasa libre, a diferencia de la coagulasa ligada, no cataliza la reacción directa entre fibrinógeno y fibrina, su mecanismo de acción es modificar el factor de reacción con la coagulasa a estafilotrombina, un producto semejante a la trombina. Estafilotrombina es el factor que cataliza la conversión de fibrina a fibrinógeno, que formará un coágulo rodeando las células de *S.aureus* impidiendo que las células inmunológicas del hospedador entren en contacto con la bacteria e inicien la fagocitosis. (Cervantes, 2014, p. 37)

Catalasa: positivo

Principio del procedimiento

Staphylococcus producen catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Con la prueba de catalasa se puede diferenciar los *Staphylococcus* que son positivos de los *Streptococcus* que son negativos. (Seija, s.f, p.1)

El peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de carbohidratos, a esta vía metabólica recibe el nombre de metabolismo aerobio-oxidativo. La acumulación del peróxido

es muy tóxico por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando a *Streptococcus spp* producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno obteniendo agua y oxígeno gas. (Seija, s.f, p.1)



Catalasa positivo: *S. aureus*

1.10 Antibióticos

Los antibióticos son compuestos relativamente sencillos, producidos por bacterias, hongos o algas con capacidad de matar a diversos microorganismos.

Interfieren en algún paso en el metabolismo donde encuentran un blanco adecuado, desde el descubrimiento de la penicilina, se han descubierto una docena de nuevos tipos de antibióticos y optimizado o sintetizado cerca de una centena. Sin embargo su eficacia se ha visto alterada por su uso excesivo o incorrecto uso, que conduce a la aparición y diseminación de bacterias resistentes. (Mora, 2007, p. 59)

1.10 Clasificación

Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a muchos criterios, el más usado es su estructura molecular. Sin embargo hay una serie de otros criterios usados con frecuencia que es importante aclarar.

a. Tipo de acción antibacteriana

Según la acción pueden diferenciarse en antibióticos bactericidas y bacteriostáticos.

Antibiótico bactericida: es aquel capaz de producir la muerte bacteriana.

Antibiótico bacteriostático: en realidad puede alcanzar un efecto bactericida si se alcanza la concentración adecuada.

b. Espectro de acción

Según el número de especies bacterianas sobre las cuales un antibiótico tiene efecto se clasifican en antibióticos de amplio espectro o de espectro reducido.

- **Antibióticos de amplio espectro**

Estos antibióticos puede causar daño a bacterias tanto Gram (+) como Gram (-) y además las *Chlamydias, Rickettsias o Legionellas*, como las cefalosporinas, aminoglucósidos y quinolonas.

- **Antibióticos de espectro reducido**

Son útiles frente a un número muy pequeño de microorganismos. Generalmente son útiles frente a los Gram (+), también hay los que son útiles solo frente a los Gram (-), como la eritromicina y vancomicina que actúan solo sobre Gram-positivas. (Mora, 2007, p. 36)

1.12 Resistencia

Hay grupos bacterianos que no son afectados por un antibiótico, bien porque carecen del sitio de acción del antibiótico o porque es inaccesible. Esta situación se define diciendo que la bacteria es insensible o presenta resistencia natural. Todos los aislamientos de esta bacteria son resistentes a ese antibiótico de forma constante. Otras especies son susceptibles al antibiótico, pero esto no impide que por diferentes razones se aislen ocasionalmente variantes que no lo son y crecen normalmente en presencia del antibiótico. (Sussmann, et al, 2007, <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversita/>)

1.13 Tipos de Resistencia

Entre los tipos de resistencia a los antibióticos se clasifican en natural y adquirida.

La resistencia natural

Esta resistencia puede estar presente en cada especie, o grupo bacteriano en la cual la resistencia es propia de cada microorganismo como por ejemplo las bacterias Gram - negativas tienen una resistencia natural a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* presenta una resistencia natural a la penicilina porque posee una enzima penicilinasas que inactiva la penicilina. (Apaza, 2008, http://www.almageriatria.info/pdf_files/col_09/alumnos_3/)

La resistencia adquirida

Como su nombre lo indica puede ser adquirida por una cepa de una especie bacteriana como por ejemplo existen cepas de *Neumococo* que pueden adquirir resistencia a la penicilina, asimismo la *E.*

coli puede adquirir resistencia a la ampicilina, este tipo de resistencia debe tomarse muy en cuenta al momento de prescribir los antibióticos porque puede llevar a un fracaso en el tratamiento ya que los antibióticos no están activos frente a los microorganismos y no cumplirán con la función para los cuales fueron determinados. (Vignoli, 2010, <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/>)

1.14 Resistencia a los agentes antimicrobianos más importantes

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de Salud Pública en muchos países debido a la persistente circulación de cepas resistentes en el medio ambiente y la posible contaminación de agua y alimentos. Ante este panorama los investigadores han postulado que eventualmente los microorganismos ingeridos diariamente con los alimentos podrían estar sirviendo de reservorios para el mantenimiento de la resistencia a los antibióticos.

Hay una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos.

1. La bacteria produce enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que este alcance su blanco;
2. La pared celular se vuelve impermeable al agente antimicrobiano;
3. El sitio de ataque es alterado por mutación de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano;
4. Las rutas metabólicas específicas dentro de la bacteria son alteradas genéticamente para que el agente antimicrobiano no pueda provocar un efecto. (Stephen, 2005, p. 18)

Los mecanismos de acción de los antimicrobianos se resumen como sigue:

- β - Lactámicos y glicopéptidos: Inhiben la síntesis de la pared celular.
- Aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas: Inhiben la síntesis proteica al alterar la función de los ribosomas.
- Fluoroquinolonas: Inhiben la síntesis del ADN
- Trimetoprim/sulfametoxazol (TMPSMZ): Actúan en el citoplasma e interfieren, entre otras con la síntesis del ácido tetrahidrofólico.
- Polimixinas: Interfieren con la membrana citoplasmática. (Sanabria, 2002, p. 28)

S. aureus puede poseer resistencia para diferentes antimicrobianos, a continuación se presenta el Cuadro 3-1 donde se describe los principales antibióticos a los que cepas de *S. aureus* presenta resistencia:

Cuadro 3-1. Resistencia de *S. aureus* a los antibióticos más importantes.

ANTIBIÓTICO	GENES DE RESISTENCIA	PRODUCTO DEL GEN	MECANISMO DE RESISTENCIA
Penicilina	<i>blaZ</i>	<i>B – lactamasa</i>	Hidrolisis enzimática del núcleo B – lactámico
B – lactámicos	<i>mecA</i>	PBP2A	Afinidad reducida al antibiótico
Aminoglucósidos	<i>aaA – aphD</i>	Acetiltransferas, Fosfotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación
Macrólidos, lincosamidas	<i>ermA, ermB, ermC</i>	Metilasa	Metilación del rRNA 23 S
Macrólidos, estreptograminas	<i>msrA, vha, vat, vatB</i>	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bombas de expulsión Modificación por acetilación
Tetraciclinas	<i>tetK, tetL, tetM</i>	Sistemas clase K, L y M	Bombas de expulsión Protección ribosomal
Rifampicina	<i>Rif</i>	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad β de la RNA polimerasa
Quinolonas	<i>Par gyrA o gyrB</i>	Componente parC de la topoisomerasa IV Componentes <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i> de la girasa	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV
Trimetoprim-sulfametoxazol	<i>dfrA sulA</i>	Dehidrofolato reductasa (dhfr) Dehidropteroato sintasa	Afinidad reducida de la DHFR Sobreproducción de ácido p- aminobenzoico
Glicopéptidos	<i>Van</i>	Peptidoglicano alterado D – Ala – D - Lac	Se atrapa la vancomicina en la pared celular. Síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad a la vancomicina
Oxazolidinonas	<i>Rrn</i>	rRNA 23 S	Mutación en el dominio V del Rrna 23S. interfiere con la unión ribosomal
Cloramfenicol	<i>Cat</i>	rRNA 50S	Modificación por acetiltransferas
Fosfomicina	<i>fosB</i>	Glutación – S - Transferasa	Modificación en la síntesis de N – acetil murámico

Fuente: (Sanabria, 2002)

1.14.1 Resistencia a β -lactámicos

Casi todas las bacterias presentan proteínas ligadoras de penicilinas, pero no todos los antibióticos β -lactámicos las destruyen o inhiben, puesto que existen mecanismos de resistencia de los gérmenes patógenos a tales fármacos. Existen tres tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a penicilinas y cefalosporinas que son utilizados por las bacterias a fin de eludir al antibiótico: (Vives et al, 2010, <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/>)

- Producción de β -lactamasas.
- Menor afinidad del antibiótico por las PBP.
- Incapacidad del antibiótico para penetrar al sitio de acción.

Las beta-lactamasas producidas por *S. aureus* confieren resistencia a: penicilina G, aminopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera generación; se caracterizan además por ser inactivadas por los inhibidores de la beta lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam). (Villacís, 2015, p. 47)

1.14.2 Resistencia a aminoglucósidos

La resistencia de *S. aureus* a aminoglucósidos puede ser consecuencia de uno de tres posibles eventos:

1. Una mutación cromosómica que codifica una alteración del sitio de acción en el ribosoma.
2. Transporte inefectivo, lo que produce una resistencia de bajo nivel.
3. La producción de enzimas modificadoras, el cual es el mecanismo más comúnmente encontrado. (Prat, 2009, http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)

Hay tres clases de enzimas modificadoras de aminoglucósidos

- Aminoglucósido nucleotidiltransferasa (ANTs) que cataliza la transferencia de un nucleótido a un grupo hidroxilo o amino
- Aminoglucósido acetiltransferasa (AACs), cataliza la transferencia de un grupo acetilo a un grupo amino
- Aminoglucósido fosfotransferasa (APHs), cataliza transferencia de un grupo fosforil a un grupo hidroxilo o amino (Prat, 2009, http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)

1.14.3 Resistencia a la meticilina

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina o SARM es una penicilina semisintética, esta bacteria resiste la acción de la β -lactamasas que degrada la penicilina esta resistencia también implica una resistencia intrínseca a todos los β -lactámicos, cefalosporinas y carbapenemes, por lo cual causa serios problemas a la Salud Pública. (Borraz, 2005, p. 27)

El *S. aureus* es un microorganismo habitual en el ámbito hospitalario y ocasiona serios problemas de multirresistencia que son muy graves para los pacientes, debido a que las cepas de SARM ocasionan multirresistencia a varios grupos antibióticos. (Camarena, 2011, p. 1)

1.14.4 Resistencia a glicopéptidos

La resistencia a glicopéptidos en *Staphylococcus* se ha descrito en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* coagulasa negativos como *S. haemolyticus* y en los últimos años se comenzaron a describir aislamientos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida y también resistente a los glicopéptidos. (Borraz, 2005, p. 22)

1.14.5 Resistencia fluoroquinolonas

La resistencia a fluoroquinolonas es el resultado de mutaciones espontáneas a nivel cromosomal en el sitio de acción de la droga (ADN girasa y/o topoisomerasa IV). Se han detectado una variedad de mutaciones en los genes que codifican ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) en bacterias Gram positivas y Gram negativas de origen humano, en contraste, es poco lo que se conoce sobre la base genética de la resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *Staphylococcus* de origen animal. (Morales, 2006, p. 48)

1.14.6 Resistencia a macrólidos y lincosamidas

Los antibióticos del grupo macrólidos, lincosaminas y estreptograminas (MLS) presentan diferencias estructurales, pero poseen mecanismos de acción y de resistencia muy relacionados. La resistencia de *Staphylococcus* a macrólidos y lincosamidas se basa en la modificación del sitio de acción, eflujo e inactivación enzimática. El sistema de eflujo codificado por *msr(A)* media resistencia a macrólidos de 14 y 15 miembros y a estreptogramina B, este gen ha sido raramente detectado en estafilococos de origen animal. (Reyes et al, 2010, pp. 80)

1.14.7 Resistencia a tetraciclinas

Cuatro genes diferentes (*tetM*, *tetO*, *tetK*, *tetL*) que confieren resistencia a tetraciclina han sido detectados en *Staphylococcus* de origen animal. Los genes *tet(M)* y *tet(O)* codifican proteínas de protección ribosomal y los genes *tet(K)* y *tet(L)* codifican proteínas de eflujo. Las proteínas Tet (M) y Tet(O) son proteínas citoplasmáticas que protegen el ribosoma de la acción de las tetraciclinas. Los genes que las codifican (*tetM* y *tetO*) se expresan por inducción y se encuentran comúnmente en transposones conjugativos. (Prat, 2009, http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)

El mecanismo de eflujo es mediado por proteínas trans-membrana insertadas en la membrana citoplasmática. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a las tetraciclinas fuera de la célula tan rápido como el antibiótico entra, la resistencia es determinada por la reducción en la concentración del antibiótico en el citoplasma, de esta manera se previene o se limita el acceso de la droga a su sitio de acción. (Prat, 2009, http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)

Los genes *tet(K)* y *tet(L)* generalmente se encuentran en pequeños plásmidos transmisibles. La bomba de eflujo de tetraciclina TetK y TetL son inducibles por tetraciclina, las proteínas de eflujo cambian un protón al complejo tetraciclina-catión (es la manera como el antibiótico penetra la membrana citoplasmática en las bacterias Gram positivas) (Valero, 2012, p. 10)

1.15 Técnica de difusión en discos.

La técnica de difusión en disco o la prueba Bauer–Kirby es la técnica más utilizada para la determinación de la sensibilidad y resistencia de las cepas de bacterias a los diferentes grupos de antibióticos con esta técnica podemos especificar que antibiótico es el más adecuado para el tratamiento de cualquier infección bacteriana y consiste en la medición del diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del antibiótico. (Villa, 2001.p. 19)

Con esta técnica se busca conseguir que los discos de antibióticos al tener contacto con el agar, el antibiótico se propague al medio teniendo una mayor concentración en las cercanías del disco y una menor concentración mientras se aleja con esto se alcanza una masa de bacterias crítica, y por lo tanto existe un crecimiento de bacterias. (Taroco, 2008, p. 664)

1.15.1 Puntos críticos

Para la realización de la prueba de difusión en disco se debe controlar los siguientes puntos críticos:

- a) Concentración del inóculo.- La concentración del inóculo debe ser la adecuada para evitar una mala interpretación de los resultados, esta concentración debe ser a una dilución de 0,5 en escala McFarland. (Taroco, 2008, p. 667)

- b) Medio.- Para la realización de la técnica de difusión en disco el medio más adecuado es el Mueller – Hinton. (Taroco, 2008, pp. 667)

- c) Concentración de los discos de antibiótico.- Se debe tener en cuenta este punto ya que cada antimicrobiano tiene fijado ya una concentración estándar y si se cambia la concentración se tendría varios criterios de interpretación. (Taroco, 2008, pp. 667)

1.15.2 Interpretación de las pruebas de susceptibilidad

Están basados en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un agente antimicrobiano con niveles alcanzados en sangre o tejidos del antimicrobiano dosificado.

Susceptible: Cuando el microorganismo es inhibido por las concentraciones alcanzadas por el agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada es usada para el sitio de la infección.

Intermedia: Cuando el microorganismo presenta una concentración inhibitoria mínima del agente antimicrobiano cercano a los niveles de antibiótico usualmente alcanzados en sangre o tejidos y para los cuales la respuesta puede ser más baja que para los aislamientos susceptibles.

Resistente: Cuando el aislamiento no es inhibido por las concentraciones séricas del antimicrobiano normalmente alcanzadas a dosis normales.

No susceptibles: Cuando el microorganismo solamente tiene la categoría de interpretación de susceptible, debido a la ausencia o rara ocurrencia de resistencia. (Carrasco, 2010, p. 27)

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.9 Lugar de investigación

De campo: Queserías de mayor producción artesanal en las zonas rurales del cantón Riobamba: San Juan, Quimiag y Pungalá alcanzando el 27% del universo, donde se recolectó las muestras de queso fresco artesanal de acuerdo a lo planteado en el diseño experimental.

De laboratorio: Laboratorio de Microbiológica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo lugar donde se realizó los análisis microbiológicos respectivos para establecer la presencia o no de *S. aureus* y su resistencia a los antibióticos. Para lo cual se utilizó adecuados procesos de recolección, clasificación, registro y codificación de los datos, mismos que se basaron bajo normas apropiadas. De la misma forma para el aislamiento, identificación y resistencia.

2.10 Materiales, equipos y reactivos

Materia prima

Queso fresco artesanal proporcionado por los productores de 6 queseras de las zonas rurales del cantón Riobamba.

Queso A

Queso B

Queso C

Queso D

Queso E

Queso F

Equipos

Autoclave OMNI CLAVE Modelo OCM

Cámara de seguridad biológica

Microscopio
Incubadora
Balanza analítica
Cronómetro
Computador
Refrigerador ECASA Modelo VV-5126
Estufa

Materiales

Cajas Petri plásticas
Pipetas fijas de 100 uL
Pipetas fijas de 1000 uL
Puntas amarillas
Puntas azules
Vasos de precipitación 100 y 250 mL
Erlenmeyer de 150 mL, 250 mL y 500 mL
Probeta de 100 mL
Láminas portaobjetos
Coolers
Frio geles
Gradillas
Hisopos de madera
Papel craft
Mechero de alcohol
Papel aluminio
Reverbero
Algodón estéril
Gasas quirúrgicas
Tubos de vidrio de 10 mL
Dispersor
Asas de siembra

Reactivos

Agua destilada
Alcohol industrial
Alcohol antiséptico

Medios de cultivo

Placas petrifilm Staph Express para recuento de *Staphylococcus aureus* 3M
Agar base manitol salado
Caldo cerebro corazón
Agua peptonada

2.11 Muestreo

Para la evaluación de la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y multiresistentes en quesos frescos artesanales del cantón Riobamba se escogieron las queseras de mayor producción artesanal de quesos al día. Se tomaron 18 quesos frescos de 250 g que se eligieron aleatoriamente de cada quesera artesanal la muestra se recolectó periódicamente durante el mes de diciembre y noviembre 2015. Los mismos que fueron transportados en un termo con hielo en recipientes estériles al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias.

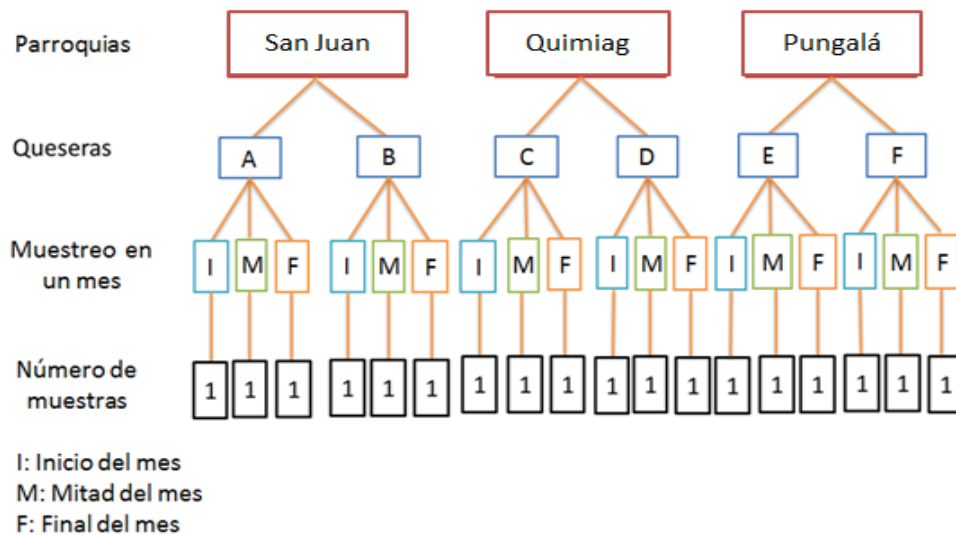


Gráfico 2-1. Esquema del diseño experimental

Fuente: Silvana Yugcha, 2016

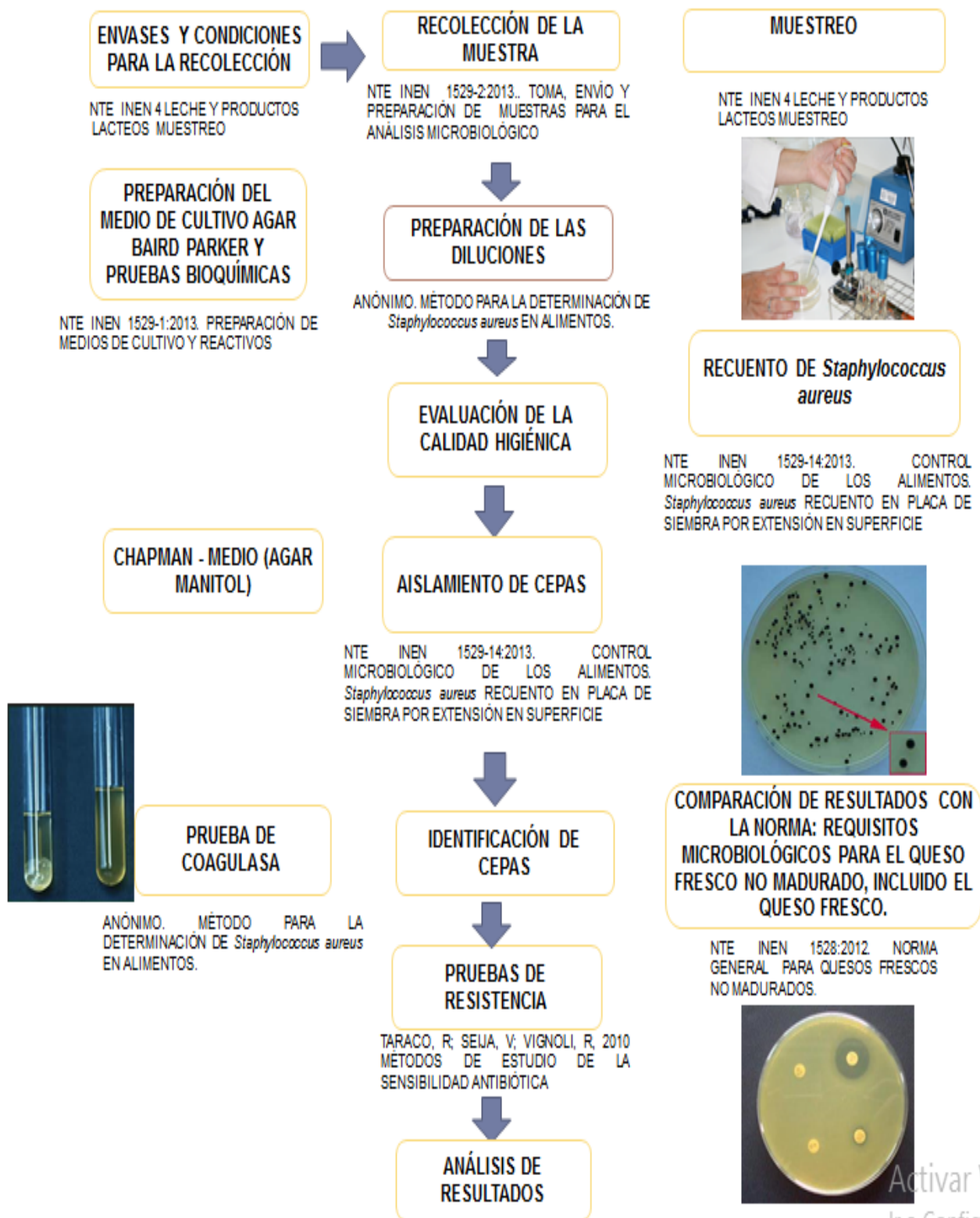


Gráfico 3-1 Diseño o metodología experimental empleada

Fuente: Silvana Yugcha, 2016

2.12 Preparación de diluciones

Para la preparación de las diluciones se midieron 10 g de queso fresco para hacer diluciones seriadas hasta 10^{-6} con agua peptonada al 0,1% y se colocó en una bolsa estéril para desmenuzar el contenido posteriormente se colocó en un matraz estéril que contenía 90 ml de agua peptonada al 0,1%, y se homogenizó.

Posteriormente, a partir del homogenizado que constituyó la primera dilución se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Para preparar la dilución 10^{-2} se arrastró 1 mL de la dilución 10^{-1} , con pipeta de 1 mL a un tubo de dilución que contenía 9 mL de agua peptonada y se agito cuidadosamente y así sucesivamente. Un volumen de 1000 uL de la dilución 10^{-3} de cada muestra se sembró en las Placas Petrifilm 3M siguiendo la guía de interpretación de las Placas Petrifilm™ Staph Express. Además se sembró la solución 10^{-1} en agar manitol salado de cada muestra. Luego de la siembra las placas y los medios de cultivo se incubaron en una estufa a 35°C y se examinó la siembra a las 24 horas de incubación.

2.13 Cultivo y cuantificación

Determinación de *Staphylococcus aureus*. Recuento en Placas Petrifilm Staph Express 3M.

Principio

Las Placas Petrifilm Staph Express 3M para recuento de *Staphylococcus aureus* contienen un medio de cultivo listo para ser empleado, con el agente gelificante soluble en agua fría cromogénico Baird-Parker, el cuál es selectivo y diferencial para el *Staphylococcus aureus*, presentando colonias rojo-violeta en la placa. . (3M, <http://dpe-consultores.com/pdf/StaffExpress.pdf>)

Procedimiento

Se preparó las diluciones de cada muestra respectivamente como se mencionó anteriormente, posteriormente se colocó la placa Petrifilm en una superficie plana, se levantó el film superior y se colocó con una pipeta automática en forma perpendicular a la placa Petrifilm, 1000 µL de la muestra en el centro del film inferior. Se bajó el film superior evitando introducir burbujas de aire.

Inmediatamente se colocó el aplicador para alta sensibilidad en el film superior sobre el inóculo. Se distribuyó la muestra ejerciendo una ligera presión sobre el mango del aplicador, sin girar el

aplicador, posteriormente se levantó el aplicador y se esperó unos 5 minutos para que el gel se solidifique. Se incubaron las placas caras arriba en pilas, por un tiempo de 24 horas de incubación a una temperatura de 35 °C. Después de transcurrido el tiempo de incubación se contó las colonias rojo-violeta. . (3M, <http://dpe-consultores.com/pdf/StaffExpress.pdf>)

Utilización del Disco

En algunas placas se encontraron otras colonias de colores diferentes además del rojo-violeta, para lo cual se utilizó un Disco Staph Express Petrifilm que se utilizó de la siguiente manera:

Se removió el Disco de su empaque individual tomándolo de la pestaña, después se levantó la película superior de la Placa Petrifilm y se colocó el disco en la cavidad de la placa y se bajó la película superior. Inmediatamente se aplicó presión gentilmente al área del Disco, incluyendo sus bordes, deslizando un dedo firmemente a lo largo de la película superior, con esto se garantizó un contacto uniforme del Disco con el gel para eliminar cualquier burbuja de aire.

Asimismo se incubó las placas con los discos insertados cara arriba, por un tiempo de 3 horas a 35 °C, después se contó todas las zonas rosadas aunque no se encuentre presente una colonia; a las colonias aisladas se identificaron posteriormente con métodos convencionales. Se levantó la película superior y se tomó la colonia del gel. (3M, <http://dpe-consultores.com/pdf/StaffExpress.pdf>)

2.14 Morfología celular, colonial y bioquímica de las cepas de *S. aureus*

Se tomaron de 3-5 UFC caracterizadas por ser colonias rojo-violetas típicas de *S. aureus* crecidas en las Placas Petrifilm™ Staph Express por ser un sistema de medio de cultivo listo para la muestra que contiene un agente gelificante soluble en agua fría. El medio modificado cromogénico Baird Parker en la placa es selectivo y diferencia para *S. aureus*. Las mismas se sometieron a pruebas bioquímicas confirmatorias para identificar el género y especie en estudio. Estas incluyeron: Morfología bacteriana, tinción Gram, producción de ácido a partir de manitol, prueba de catalasa y prueba coagulasa.

Las cepas identificadas como *S. aureus* se almacenaron en agar nutritivo a -20°C para conservarlas hasta la realización del resto de las determinaciones. Las bacterias conservadas fueron reactivadas en caldo cerebro corazón y se incubaron a 35°C por 24 horas.

2.14.2 Crecimiento en agar manitol salado

Staphylococcus se aislaron en agar manitol salado, que es un medio de alta salinidad (7.5% de NaCl) y que contiene manitol como fuente de energía, *S aureus* fermenta manitol y hace que el medio se torne amarillo, aunque los *Staphylococcus* crecen en este medio, su capacidad para fermentar el manitol es muy variable. *Staphylococcus* varían respecto a los azúcares que fermentan pero cuando se cultivan en tubos de fermentación cada especie produce ácido a partir de los azúcares aunque sin desprendimiento de gases. (De la Rosa, 2011, p.34)

2.14.3 Observación morfológica

Al observar las cepas de *Staphylococcus aureus* microscópicamente presentó las siguientes características: Cocos Gram positivo en forma de racimo de uvas de aproximadamente 1µm de diámetro, Inmóviles, no forman esporas. Estas cepas fueron cultivadas en Agar Manitol salado a 35°C cambiando el medio de color rojo a un color amarillo y en las Placas Petrifilm 3M presentaron un color rojo violeta, además en las pruebas bioquímicas dieron catalasa y coagulasa positivo. (3M, <http://dpe-consultores.com/pdf/StaffExpress.pdf>)

2.14.4 Producción de catalasa

Se realizó la prueba de catalasa a las cepas que resultaron manitol positivo, para lo cual se colocó en un portaobjeto una colonia del *Staphylococcus* en estudio y se le agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% donde se pudo observar un burbujeo intenso inmediatamente después de la adición del peróxido de hidrógeno confirmando que se trataba de *Staphylococcus* ya que estos microorganismos producen catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta prueba de la catalasa nos sirve para diferenciar los *Staphylococcus* que son positivos de los *Streptococcus* que son negativos. Posteriormente se realizó la prueba de coagulasa para determinar si se trata o no de *S. aureus*. (Páez, 2015, <https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus/>)

2.14.5 Prueba de coagulasa

Para determinar la presencia de *S. aureus* se realizó la prueba de coagulasa a los cultivos que resultaron manitol positivo. La coagulasa es una enzima que estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, por lo que comprueba la facultad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de esta enzima. De ellos se obtuvieron 15 cultivos coagulasa positivo debido a la formación de un coágulo en el plasma. Esta prueba se realizó en tubo debido a su mayor exactitud y a su capacidad para detectar tanto la coagulasa unida como la libre. (Páez, 2015, <https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus/>)

Para esta prueba se colocó 0,5 cm³ de plasma en tubos de ensayo a continuación se colocó 0,1 cm³ de cada uno de los cultivos de presuntos *Staphylococcus aureus* y como tubo control se pipeteo 0,1 cm³ de caldo cerebro corazón y 0,5 cm³ de plasma. Los tubos se incubaron a baño de agua a 37 ° C por 4 a 6 horas

Resistencia a antimicrobianos

Método de difusión del disco en agar

Se utilizó la técnica de difusión del disco en agar. En *S. aureus* se ensayó la resistencia/sensibilidad con discos de; penicilina PE 10 unid, Cefoxitina FOX 30 ug, Tetraciclina TE 30 ug, Amikacina AK 30 ug, Vancomicina VA, Ciprofloxacina CIP 5 ug, Clindamicina DA 2 ug y, Eritromicina E 15 ug. Se midieron los halos de inhibición siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI (2015) (CLSI, por sus siglas en inglés: The Clinical and Laboratory Standards Institute). El criterio de sensibilidad o resistencia a cada agente se determinó según las especificaciones del CLSI (2015)

Tabla 3-1. Criterios de interpretación para el método de difusión del disco para *S. aureus* según el CLSI 2015

Antibiótico	Interpretación diámetro zona inhibición (mm)			
	Contenido	Resistente	Intermedio	Susceptible
Penicilina	10 unid	≤ 28	–	≥ 29
Tetraciclina	30 ug	≤ 14	15 – 18	≥ 19
Clindamicina	2 ug	≤ 14	15 – 20	≥ 21
Eritromicina	15 ug	≤ 13	14 – 22	≥ 23
Ciprofloxacina	5 ug	≤ 15	16 – 20	≥ 21
Vancomicina	–	–	–	≥ 21
Amikacina	30 ug	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Cefoxitina	30 ug	≤ 21	–	≥ 22

Fuente: CLSI 2015

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados

En la Tabla 1-3, (Gráfico 1-3) podemos observar el crecimiento bacteriano obtenido en el muestreo 1 de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas. En la muestra A se observa un conteo de 630 UFC/gr; en la muestra B de 460 UFC/gr; la muestra C de 150 UFC/gr; la muestra D 800 UFC/gr; la muestra E 200 UFC/gr y la muestra F 410 UFC/gr.

Todas las muestras sobrepasan el índice máximo permitido según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528: 2012 Norma General para Quesos Frescos No Madurados. El índice máximo permitido es 10^2 UFC/g, ninguna muestra cumple con este requisito esto puede deberse a un tratamiento inadecuado o contaminación posterior al tratamiento de la materia prima y/o desaseo de los equipos y utensilios utilizados en la elaboración del queso. (Caldas y Ogeerally, 2008, p. 18).

En un estudio similar realizado por (Castillo G. 2013. p 124) sobre la “Prevalencia de bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, en quesos frescos artesanales” nos muestra una prevalencia de *Staphylococcus aureus* en los 24 quesos analizados de un 100 % es decir los quesos presentan recuentos fuera de los parámetros de la Normativa ecuatoriana por una deficiente manipulación durante la producción y comercialización del queso.

Tabla 1-3: Cuantificación de *Staphylococcus aureus*

<i>S.aureus</i>		Muestreo 1
Procedencia	Quesera	E. Evaluación UFC/gr
San Juan A	1	630
San Juan B	2	460
Quimiag C	1	150
Quimiag D	2	800
Pungalá E	1	200
Pungalá F	2	410

Realizado por: Silvana Yugcha

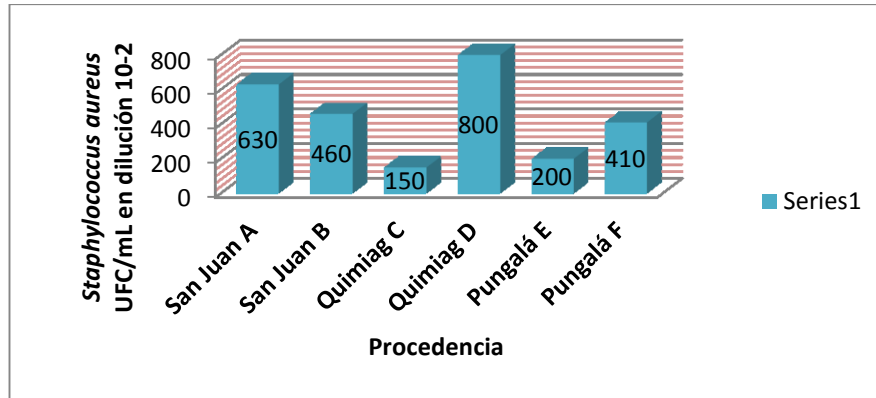


Grafico 1-3: Cuantificación de *Staphylococcus aureus* en Placas Petrifilm

Realizado por: Silvana Yugcha

En la Tabla 2-3, (Gráfico 2-3). Podemos observar que el crecimiento bacteriano obtenido en el muestreo 2 de *Staphylococcus aureus* con dilución 10^{-3} sigue sobrepasando los límites permitidos aunque se hizo una mayor dilución esto únicamente nos ayudó a un mejor contaje de *Staphylococcus aureus* en Placas Petrifilm 3M. Estos contajes altos de *S.aureus* en la mayoría de las queseras como por ejemplo en la quesera B 8000 UFC/ gr, la quesera C 6000 UFC/gr y en la quesera F 4000 UFC/gr.

Los datos de mi investigación coinciden con Cortecero y Benítez, 2011, p. 69 en el cual destaca que las condiciones sanitarias son inadecuadas así como los materiales y utensilios utilizados para la fabricación del queso por ejemplo utilizaban envases de plástico en lugar de tinajas de acero inoxidable para la coagulación de la leche, la cuajada era cortada con un cuchillo o en forma manual y en la mayoría de las queseras no trabajaban con una protección personal adecuada.

Tabla 2-3: Cuantificación de *Staphylococcus aureus*

3.

<i>S.aureus</i>		Muestreo 2
Procedencia	Quesera	E. Evaluación UFC/gr
San Juan A	1	1500
San Juan B	2	8000
Quimiag C	1	6000
Quimiag D	2	1000
Pungalá E	1	0
Pungalá F	2	4000

Realizado por: Silvana Yugcha

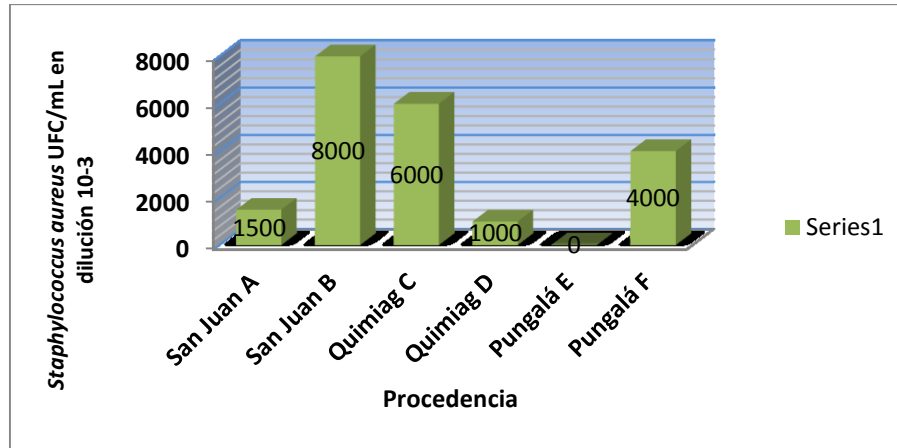


Grafico 2-3: Cuantificación de *Staphylococcus aureus* en Placas Petrifilm

Realizado por: Silvana Yugcha

En la Tabla 3-3, Gráfico 3-3) podemos observar que el crecimiento bacteriano obtenido en el muestreo 3 de *Staphylococcus aureus* con dilución 10^{-3} se mantiene con un recuento alto de *Staphylococcus aureus* establecidos por la NTE los quesos no son aptos para el consumo humano, este hecho parte desde que las queseras no cumplen con un tratamiento previo de la leche antes del inicio del proceso ya que en algunas plantas solo termizaban la leche y no había la correcta pasteurización de la misma. Además el producto final no goza de un buen almacenamiento ya que en muchos de los casos el producto terminado se lo guardaba en refrigeradores que se encontraban sucios o eran distribuidos inmediatamente después de terminarlo en bolsas de plástico para el transporte, el mismo que no cuenta con un sistema de refrigeración.

Tabla 3-3: Cuantificación de *Staphylococcus aureus*

<i>S.aureus</i>		Muestreo 3
Procedencia	Quesera	E. Evaluación UFC/gr
San Juan	1	1200
San Juan	2	5000
Quimiag	1	3000
Quimiag	2	0
Pungalá	1	0
Pungalá	2	9000

Realizado por: Silvana Yugcha

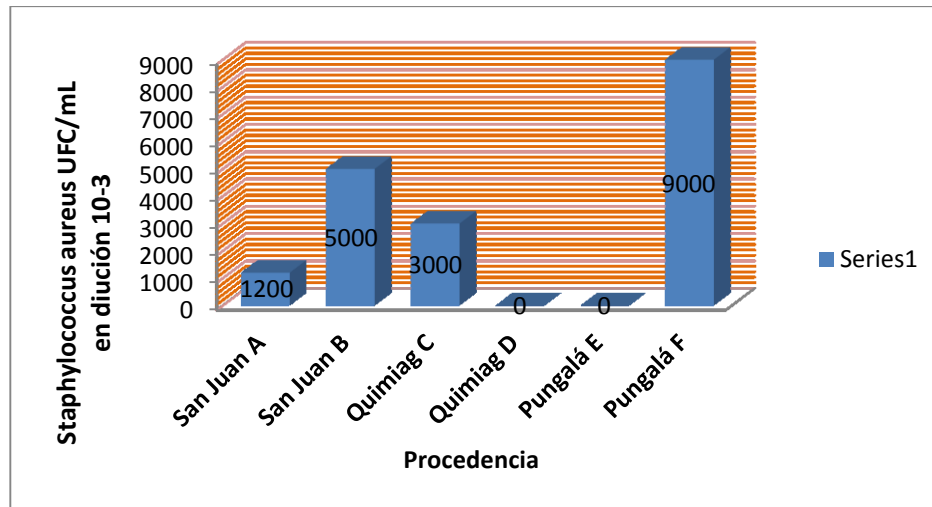


Gráfico 3-3: Cuantificación de *Staphylococcus aureus* en Placas Petrifilm 3M

Realizado por: Silvana Yugcha

En la Tabla 4-3, Gráfico 4-3 se muestra que no existe diferencia estadística significativa a $p < 0,05$, entre los lugares de procedencia de las muestras y el recuento de *Staphylococcus aureus* en los quesos de producción artesanal, esto nos indica que en su mayor parte las queseras analizadas elaboran los quesos con una misma carga bacteriana esto puede deberse a que no aplican correctamente las Buenas Prácticas de Manufactura. Todas las muestras no cumplen los requisitos microbiológicos establecidos por la Norma INEN por lo que no son aptos para el consumo humano ya que podrían causar infecciones perjudicando la salud del consumidor.

Tabla 4-3: Ausencia de diferencia estadística significativa a $p < 0,05$, entre los lugares de procedencia de las muestras del recuento de *S. aureus* aislados en queso fresco artesanal según Tukey.

Separación de medias según Tukey (P < 0,05)		
Procedencia	Media	Grupo
San Juan	2798,33	a
Quimiag	1825,00	a
Pungalá	2268,33	a

Realizado por: Silvana Yugcha

En el Gráfico 4-3, se puede notar que no hay diferencia significativa entre la procedencia de los quesos, tanto San Juan, Quimiag y Pungalá tiene recuento alto de *Staphylococcus aureus*, los resultados son parecidos al realizado por Benítez y Centi 2012, p. 50 en San Salvador, donde se reporta un numero incontable de colonias que sobrepasa al límite permitido por la Norma Salvadoreña 67.01.04.06 de quesos no madurados, estos resultados se deben a las inadecuadas condiciones de almacenamiento de los quesos y a una mala manipulación de los mismos.

Estudios realizados sobre Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, en Costa Rica por Alvarado et al, 2010, p 12 nos indica que la contaminación de los alimentos por *S. aureus* puede ocurrir directamente desde los animales de consumo, los cuales pueden estar infectados, o puede resultar de la manipulación o manejo inadecuado de alimentos durante su procesado, almacenamiento o comercialización, ya que los seres humanos pueden ser portadores de este microorganismo

La intoxicación por este agente se produce al consumir dosis que van desde los 20 ng hasta $< 1 \mu\text{g}$ de toxina. Los síntomas, que incluyen náuseas, calambres abdominales, diarrea y vómito, pueden presentarse de una hasta seis horas luego de haber ingerido el alimento, lo cual varía dependiendo de la susceptibilidad individual y la dosis tóxica ingerida. La mayoría de las personas que se ven afectadas por este tipo de intoxicación resuelven el cuadro satisfactoriamente y las muertes por el mismo son sumamente raras, sin embargo la intoxicación estafilocócica, sí produce una considerable carga económica y social

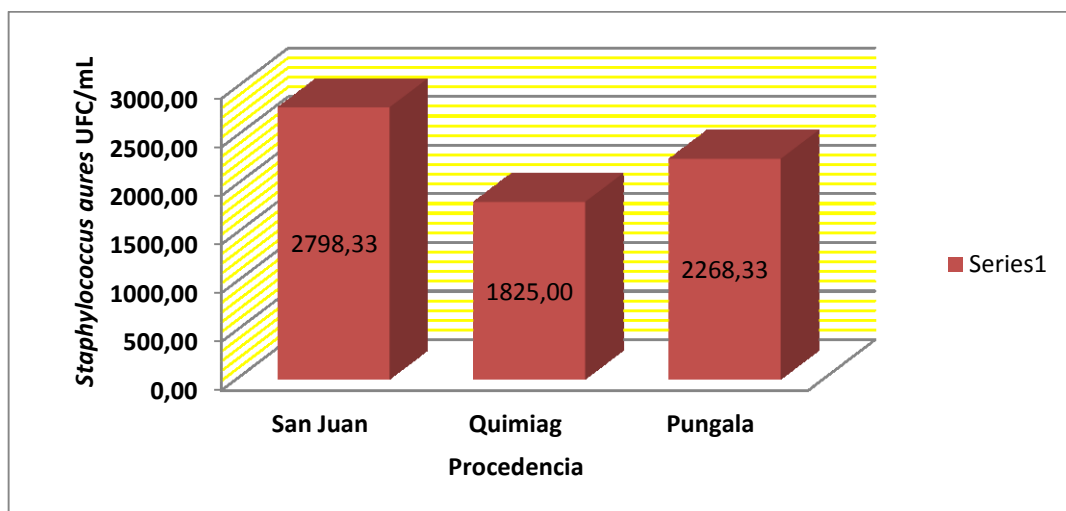


Gráfico 4-3: Ausencia de diferencia estadística significativa a $p < 0,05$, entre los lugares de procedencia de las muestras del recuento de *Staphylococcus aureus* aislados de quesos fresco artesanal

Realizado por: Silvana Yugcha

En las pruebas de identificación de *Staphylococcus* de las muestras de queso fresco artesanal Tabla 5-3, se obtuvo crecimiento en las placas Petrifilm 3M colonias rojo-violetas las mismas se sometieron a pruebas bioquímicas confirmatorias para identificar el género y especie en estudio. Hubo crecimiento y fermentación en agar manitol salado y dieron positivo para las pruebas de catalasa y coagulasa confirmando la presencia de *Staphylococcus aureus*. Excepto en la muestra D y E que fueron catalasa y coagulasa negativo las mismas que se descartaron en la realización del antibiograma. *Staphylococcus aureus* fermenta manitol este método es el más recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios, este medio por su elevado contenido de sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas. En la caja se pudo observar un halo amarillo alrededor de las cepas manitol positivo y un halo rosa en las que son manitol negativo, *S.aureus* sí fermenta manitol. (Morales, 2006, p. 48), en la prueba de catalasa la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno de esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H₂O₂ que es un producto aerobio de los azúcares haciendo que se aprecie un desprendimiento de burbujas. En la prueba de coagulasa en tubo actuó una exocoagulasa o coagulasa libre la misma que actúa mediante la inactivación de un factor (CRF), formándose un complejo coagulasa-CRF, el cual reacciona con el fibrinógeno produciendo un coágulo de fibrina. (Seija, 2010, p.2)

Tabla 5-3: Identificación de *Staphylococcus aureus* en muestras de queso fresco artesanal

Muestra	Crecimiento en agar manitol	Tinción Gram	Catalasa	Coagulasa
1 A	(+)	(+)	(+)	(+)
2 A	(+)	(+)	(+)	(+)
3 A	(+)	(+)	(+)	(+)
1 B	(+)	(+)	(+)	(+)
2 B	(+)	(+)	(+)	(+)
3 B	(+)	(+)	(+)	(+)
1 C	(+)	(+)	(+)	(+)
2 C	(+)	(+)	(+)	(+)
3 C	(+)	(+)	(+)	(+)
1 D	(+)	(+)	(+)	(+)
2 D	(+)	(+)	(+)	(+)
3 D	(+)	(+)	(-)	(-)
1 E	(+)	(+)	(+)	(+)
2 E	(+)	(+)	(-)	(-)
3 E	(-)	(+)	(-)	(-)
1 F	(+)	(+)	(+)	(+)
2 F	(+)	(+)	(+)	(+)
3 F	(+)	(+)	(+)	(+)

Realizado por: Silvana Yugecha

En la tabla 6-3 se presentan los resultados del antibiograma en el primer muestreo de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de queso fresco. Los resultados indican que las cepas aisladas presentan resistencia a penicilina debido a que *Staphylococcus aureus* presenta una resistencia natural a este antibiótico por producción de la enzima penicilinasas, que son enzimas que inactivan a la penicilina así evitando que esta misma llegue a las proteínas fijadoras de penicilina.

Tabla 6-3: Resistencia / Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* aislados de queso fresco artesanal en el Muestreo 1.

	Diámetros de halos de inhibición (mm)								Interpretación							
	P	Fox	Te	Ak	Va	Cip	Da	E	P	Fox	Te	Ak	Va	Cip	Da	E
A	25	23	26	22	17	25	25	19	R	S	S	S	S	S	S	I
B	27	25	30	23	21	26	21	20	R	S	S	S	S	S	S	I
C	22	26	27	22	18	26	22	21	R	S	S	S	S	S	S	I
D	27	30	26	24	20	28	23	19	R	S	S	S	S	S	S	I
E	28	29	28	21	17	30	25	15	R	S	S	S	S	S	S	I
F	25	27	35	27	20	30	21	17	R	S	S	S	S	S	S	I

Realizado por: Silvana Yugcha

En la Tabla 7-3 se muestra los resultados del antibiograma del muestreo 2 de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de queso fresco en el cual hubo una resistencia a la penicilina, a la Cefoxitina, Tetraciclina, y Clindamicina, esto puede verificarse al comprobar los diámetros obtenidos de estas cepas con los diámetros que da la norma del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, CLSI 2015 que indican que para que una cepa sea reportada como resistente a la acción de la tetraciclina debe presentar un diámetro menor o igual a 14 mm, en este caso el halo de inhibición de la tetraciclina fue de 10 mm.

Tabla 7-3: Resistencia / Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* aislados de queso fresco artesanal en el Muestreo 2

	Diámetros de halos de inhibición (mm)								Interpretación							
	P	Fox	Te	Ak	Va	Cip	Da	E	P	Fox	Te	Ak	Va	Cip	Da	E
A	27	27	28	25	19	23	21	20	R	S	S	S	S	S	S	I
B	26	28	29	23	21	28	22	20	R	S	S	S	S	S	S	I
C	28	21	28	22	19	25	21	20	R	R	S	S	S	S	S	I
D	28	26	29	24	18	26	23	18	R	S	S	S	S	S	S	I
F	26	10	14	27	22	27	10	15	R	R	R	S	S	S	R	I

En la Tabla 8- 3 se muestra los resultados del antibiograma del tercer muestreo de cepas de *S. aureus* aisladas de queso fresco, la muestra A presenta una resistencia a penicilina, la muestra A, C, F a Cefoxitina, la muestra F a tetraciclina, Amikacina y Clindamicina que fueron comparados con los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, CLSI 2015 en el mismo nos indica el diámetro de inhibición para la penicilina que debe ser igual o menor a 28mm, para la cefoxitina igual o menor a 21 mm, a tetraciclina, amikacina y clindamicina igual o menor a 14 mm.

Tabla 8-3: Resistencia/Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* aislados de queso fresco artesanal en el Muestreo 3

	Diámetros de halos de inhibición (mm)								Interpretación							
	P	Fox	Te	Ak	Va	Cip	Da	E	P	Fox	Te	Ak	Va	Cip	Da	E
A	28	18	30	28	20	30	22	28	R	R	S	S	S	S	S	S
B	27	25	31	25	21	25	21	29	R	S	S	S	S	S	S	S
C	22	8	30	25	19	29	0	25	R	R	S	S	S	S	S	S
F	23	21	10	10	22	25	21	21	R	R	R	R	S	S	R	I

Realizado por: Silvana Yugcha

En la Tabla 9-3 se muestran los porcentajes de Resistencia de cepas de *S.aureus* aislados en queso fresco artesanal. Con este estudio reportamos que Penicilina presento 100,00 % de resistencia, Cefoxitina 33,33 % resistencia; Tetraciclina 13,33 % resistencia; Amikacina 6,67 % resistencia y Clindamicina 20,00 % resistencia.

Los principales mecanismos de resistencia encontrados en bacterias Gram positivas son los mecanismos de inactivación enzimática, se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico a través de la producción de β -lactamasas este es el caso de los aminoglucósidos y penicilina. La resistencia a la penicilina esta mediada por el gen blaZ, cuyo producto es la β -lactamasa, que hidroliza el anillo β - lactámico de la penicilina y lo inactiva. Asimismo los genes Bla producen resistencia a cefalosporinas. (Becerra et al, 2009, pp.70-74).

Otros mecanismos de resistencia son por alteraciones del sitio blanco de acción antibiótica. En este mecanismo de resistencia se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, subunidad 50 s, 30 s ribosomales. Responsable de la resistencia a macrólidos, Clindamicina, tetraciclina. (Crespo, 2002, p. 182)

Por metilación ARN ribosomal de la subunidad 50S es el mecanismo de resistencia de *S. aureus* a tetraciclinas y macrólidos. El mecanismo de resistencia ribosomal a Amikacina es poco frecuente y consiste en la mutación del péptido 12S de la subunidad 30 S (Otto et al, 2010. p. 5). El *mecA* hace parte de una isla genómica conocida como casete cromosómico estafilocócico (SCCmec, por sus siglas en inglés, *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) el cual se integra al cromosoma de *S. aureus*. El SCCmec puede transportar en forma variable genes de resistencia a otros antibióticos como clindamicina, eritromicina, y Rifampicina. (Tibavizco, 2007, p. 15)

La importancia y el incremento en las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* a llevado a microbiólogos clínicos involucrados en manejo de pacientes a el estudio constante de este microorganismo frente a los antibióticos más utilizados.

Tabla 9-3: Porcentaje de Resistencia de cepas de *S.aureus* aislados en queso fresco artesanal.

Antibióticos	Resistencia
Penicilina	100,00%
Cefoxitina	33,33%
Tetraciclina	13,33%
Amikacina	6,67%
Vancomicina	0,00%
Ciprofloxacina	0,00%
Clindamicina	20,00%
Eritromicina	0,00%

Realizado por: Silvana Yugcha

Existe una muestra de cepa de *Staphylococcus aureus* aislado del queso fresco que resulto multiresistente, este término se refiere cuando una cepa es resistente al menos a dos antimicrobianos tomando en cuenta el Grafico 5-3 la cepa de *Staphylococcus aureus* que corresponde a la muestra F presenta resistencia múltiple a penicilina, cefoxitina, tetraciclina, amikacina y clindamicina en un 75% de multiresistencia, esto se lo puede atribuir al uso indiscriminado de antibióticos en los animales ya que estos se utilizan con diversos objetivos como en el tratamiento y prevención de mastitis en vacas lecheras y para el tratamiento de diversas enfermedades. (Cedillos y Guerra, 2012, p. 80).

En estudios realizados en Lima-Perú sobre la Evaluación de *S. aureus* en quesos frescos artesanales se reportó que el 80% de muestras estaban por encima del límite máximo permitido, además señalan que este alto grado de contaminación alcanzado por este alimento fue por contacto de personas enfermas con el alimento y por mala higiene en las superficies de contacto sobre las cuales se deposita el mismo. (Luján et al, 2006, p. 67)

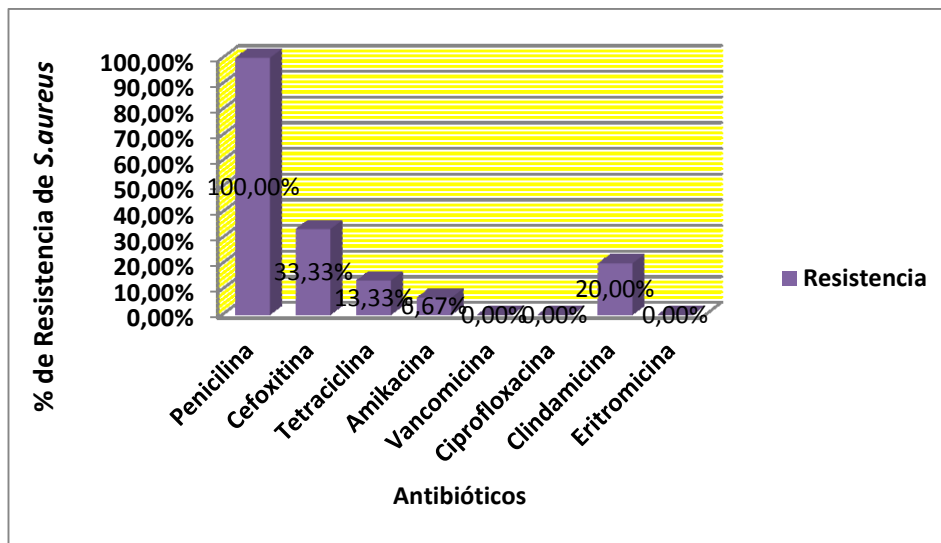


Gráfico 5-3: Porcentaje de Resistencia de cepas de *S.aureus* aislados en queso fresco artesanal.

Realizado por: Silvana Yugcha

En la Tabla 10-3. Gráfico 6-3. Se indican los resultados de los análisis microbiológicos de cepas de *S.aureus* aisladas de queso fresco artesanal frente a ocho antibióticos resultando Ciprofloxacina y Vancomicina los antibióticos más efectivos para tratar infecciones por *S. aureus* ya que presento en la mayoría de los casos un mayor halo de inhibición.

La vancomicina es un glicopéptido que altera la permeabilidad de la membrana e inhibe la síntesis del ARN, la importancia de este antibiótico ha aumentado en los últimos años porque ha habido un incremento en la aparición de *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina. Por lo tanto sigue siendo un antibiótico de elección en pacientes alérgicos a penicilinas y que tienen infección por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

La eritromicina tubo resistencia intermedia en un 80% estos antibióticos son activos, sobre todo, frente a microorganismos de los llamados ‘Gram-positivos’ y tienen utilidad en muchas infecciones (amigdalitis, infecciones bucales, neumonías ,etc), sobre todo en alérgicos a penicilina.

Tabla 10-3: Porcentaje de Susceptibilidad de cepas de *S.aureus* aislados en queso fresco artesanal.

Antibióticos	Susceptibilidad
Penicilina	0,00%
Cefoxitina	66,67%
Tetraciclina	86,67%
Amikacina	93,33%
Vancomicina	100,00%
Ciprofloxacina	100,00%
Clindamicina	80,00%
Eritromicina	20,00%

Realizado por: Silvana Yugcha

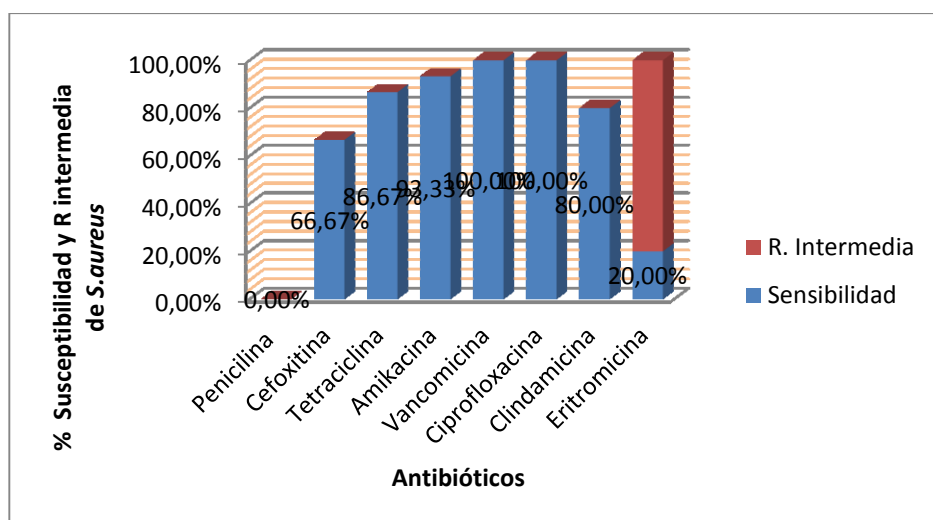


Gráfico 6-3: Porcentaje de Susceptibilidad y R intermedia de cepas de *S.aureus* aislados en queso fresco artesanal.

Realizado por: Silvana Yugcha

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* en quesos provenientes de las queseras A, quesera B, quesera C, quesera D y quesera F.

Se aisló cepas de *Staphylococcus aureus* mediante el método de siembra en placas petrifilm 3M y la confirmación con el uso de pruebas bioquímicas convencionales en las cuales se pudo identificar la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* en 15 muestras de las 18 muestras de queso fresco,

La prevalencia de *Staphylococcus aureus* en los quesos analizados fue de 83.33%. donde se encontró resistencia a Penicilina en un 100,00%; Cefoxitina 33,33 % de resistencia y 66,67 % de sensibilidad; Tetraciclina 13,33 % de resistencia y 86,67 % de sensibilidad; Amikacina 6,67 % de resistencia y 93,33 % de sensibilidad; Vancomicina 100,00 % de sensibilidad; Ciprofloxacina 100,00% de sensibilidad; Clindamicina 20,00 % de resistencia y 80.00% de sensibilidad y Eritromicina 20,00% de sensibilidad y 80,00 % de resistencia intermedia.

La mayoría de los quesos presentaron recuentos fuera de los parámetros establecidos por la NTE INEN 1528, esto se debe a una deficiente manipulación de la materia prima durante su producción y comercialización, convirtiendo al queso en un vehículo importante en la diseminación de cepas de *S.aureus* resistentes a antibióticos creando alto riesgo para la salud de los consumidores.

RECOMENDACIONES

Capacitar a los productores y manipuladores involucrados en la producción de los quesos en buenas prácticas de manufactura durante el proceso de elaboración del mismo, para que se lleve a cabo bajo condiciones sanitarias adecuadas para garantizar una calidad microbiológica óptima y de esta forma mejor la calidad e inocuidad del producto.

Evitar al máximo el uso innecesario de antibióticos en los animales a partir de los cuales se obtiene la materia prima para la elaboración de los quesos o respetar el tiempo del tratamiento antes de extraer la leche.

Se recomienda al organismo encargado realizar una vigilancia continua a todos los sitios donde se elaboran y comercializan los quesos, con el fin de prevenir enfermedades transmitidas por estos y asegurar el bienestar de los consumidores.

Sensibilizar a la comunidad médica sobre el uso correcto de los antibióticos con el fin de evitar la resistencia a los mismos.

GLOSARIO

BP	Baird Parker
°C	Grados Celsius
mm	Milímetros
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
g	Gramos
MNPC	Muy numerosas para contar
%	Porcentaje
uL	Microlitro
Min	Minuto
°T	Temperatura
TSST-1	Toxina 1 del síndrome del shock tóxico
pH	Potencial hidrógeno
t	Tiempo
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo
IAE	Infecciones alimentarias estafilocócicas
CLSI	Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico de los Estados Unidos
ANOVA	Análisis de Varianza
h	Hora
ETA's	Enfermedades transmitidas por alimentos

BIBLIOGRAFÍA

1. **AGUHOB, S & BARRIE, A.** *Procesamiento de Lácteos*. 2ª ed. Lima-Perú. 2002. pp.7-18.
2. **ALVARADO, V. et al.** "Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*". *Revista Costarricense de Salud Pública* [en línea]. 2011. Costa Rica. 20(2). pp. 102 - 106. [Consulta: 23 septiembre 2015]. ISSN 1409-1429. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292011000200006&script=sci_arttext
3. **ANÓNIMO.** *Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos*. 2010. [Consulta 30 octubre 2015]. Disponible en : http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcusaureus_17365.pdf
4. **ANÓNIMO.** *Género *Staphylococcus**. 2010. [Consulta: 16 septiembre 2015]. Disponible en: <http://kimi-foro.latin-foro.es/t4-genero-staphylococcus>
5. **APAZA, R; & García, M.** *Resistencia a los antibióticos*. 2008. [Consulta: 09 septiembre 2015]. Disponible en: [http://www.almageriatria.info/pdf_files/col_09/alumnos_3/Marco%20A.%20Garcia-%20Colombia-%20RESISTENCIA_MICROBIANA-2%20\(2\).pdf](http://www.almageriatria.info/pdf_files/col_09/alumnos_3/Marco%20A.%20Garcia-%20Colombia-%20RESISTENCIA_MICROBIANA-2%20(2).pdf)
6. **ARES, L.** Calidad de los quesos fundamentos y aspectos generales. s.f. [consulta: 06 agosto 2015]. Disponible en : <http://www.insacan.org/racvao/anales/2002/articulos/15-2002-11.pdf>
7. **BARRIOS, H.** *Evaluación y mejoramiento de la calidad microbiológica de queso fresco a base de leche no pasteurizada, elaborado artesanalmente y comercializado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala*. [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 2006. pp 45. [Consulta 24 Septiembre 2015]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2422.pdf
8. **BENITÉZ, E.,& CENTI, K.** *Determinación de la Resistencia de *Staphylococcus aureus* aislado de quesos no madurados comercializados en el Mercado Central de San Salvador, a los antibióticos de prueba seleccionados*. [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad de el Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Salvador. 2012. pp.25-82. [Consulta 24 Septiembre 2015]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2757/1/terceraevaluacion.pdf>

9. **BORRAZ, C.** *Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de Staphylococcus aureus aislados en hospitales Españoles.* [en línea] (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona. 2006. pp. 18-35. [Consulta 13 octubre 2015]. Disponible en: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42524/1/CBO_TESIS_DOCTORAL.pdf
10. **BUENDÍA, M. et al. González.** "*Queso fresco*". 2012. [Consulta: 11 agosto 2015]. Disponible en : http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TEMA3.QUESO_2832.pdf
11. **CALDAS, I., & OGEERALLY, O.** *Microorganismos indicadores de interés sanitario en queso artesanal tipo "telita". Upata, Municipio Piar, Estado Bolívar.* [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad del Oriente. Escuela de Ciencias de la Salud. Venezuela. 2008. pp 19-23 [Consulta: 11 agosto 2015]. Disponible en : <http://ri.bib.udo.edu.ve/bitstream/123456789/36/1/TESIS-Bioanálisis-CIyOO.pdf>
12. **CAMARENA, J., & SÁNCHEZ, R.** *Infección por Staphylococcus aureus resistente a meticilina.* 2010. [Consulta: 15 agosto 2015]. Disponible en : <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
13. **CARRASCO, A.** *Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y CLSI M100 – S20.* Bogotá. 2010. [Consulta: 18 agosto 2015]. Disponible en : http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf
14. **CARRASCO, G.** *Evaluación Microbiológica del queso cabañas elaborado en la planta de lácteos Zamorano.* [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad Zamorano. Escuela de Agroindustria. Honduras. 2002 pp 21-27. [Consulta: 11 agosto 2015]. Disponible en : <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1532/1/T1498.pdf>
15. **CASTILLO, G.** "*Prevalencia de bacterias patógenas Listeria monocytogenes y Staphylococcus aureus, en quesos elaborados artesanalmente en las parroquias rurales del cantón Riobamba.*". (Tesis Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Facultad Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2013. pp 45-67
16. **CASTILLO, M., & HUALPA, D.** *Inocuidad en los Alimentos.* Loja. 2009. [Consulta: 18 agosto 2015]. Disponible en : http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036_Inocuidad%20de%20los%20alimentos.pdf

17. **CEDEÑO, M.** "*Calidad del Queso Fresco en diferentes lugares de procedencias y lugares de comercialización en Quevedo*". [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Carrera Ingeniería en Alimentos. Ríos- Ecuador. 2015. pp. 18-19. [Consulta: 11 agosto 2015]. Disponible en : <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/342/1/T-UTEQ-0012.pdf>.
18. **CERVANTES, E.et al. García.** "Características generales del *Staphylococcus aureus*". "*Revista Latinoamericana de Patología Clínica*". [en línea]. 2014. México. 61(1), pp. 28 - 40. [Consulta: 25 agosto 2015]. Disponible en : <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
19. **CODEX ALIMENTARIUS.** Norma General del Codex para el Queso. CODEX STAN A-6. 1999.pp. 23. [Consulta: 20 agosto 2015]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=I0HZIxxiE5IC&pg=PA23&dq=Norma+del+codex+para+queso+fresco&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi6ioj4_8XKAhXFtoMKHXx1DskQ6AEIGjAA#v=onepage&q=Norma%20del%20codex%20para%20queso%20fresco&f=false
20. **CORTECERO, L., & Benítez.** *Evaluación de Resistencia Bacteriana a Antibióticos Oxitetraciclina y Eritromicina en quesos frescos costeños costeños del Departamento de Bolívar provenientes de los Municipios de Arjona Y Villanueva*. [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad de Cartagena. Facultad de Ingeniería. Cartagena-Colombia. 2011. pp. 18-22. [Consulta: 21 agosto 2015]. Disponible en: <http://190.25.234.130:8080/jspui/bitstream/11227/525/1/TESIS%20DE%20GRADO.pdf>
21. **CRISTÓBAL, R., & Maurtua.** "Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp*". "*Revista Panamericana de Salud Pública*". [en línea], 2003, (United State of America) 14(3), pp. 158 - 164. [Consulta: 20 agosto 2015]. ISSN 1020-4989. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S1020-49892003000800002&script=sci_arttext
22. **CULQUI, C.** *Elaboración de Queso Fresco*. [en línea] (Tesis Pregrado).. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de ciencias Agropecuarias. Guaranda-Ecuador.2010. p. 20. [Consulta: 21 agosto 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/luismario56/elaboracion-de-queso-fresco>
23. **DATABIO.** *Staphylococcus aureus*. 2010. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf>

24. **DE LA ROSA, M; & Prieto.** *Microbiología en Ciencias de la Salud* . 2ª ed. Madrid- España. Elsevier. 2011. p. 32
25. **DURÁN, L.et al. Sánchez, J.** "Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora".*Zootecnia Tropical*". [en línea], 2010. 28(4). pp. 467 - 475. ISSN 0798-7269. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s079872692010000400003&script=sci_arttext
26. **Elika.** *Staphylococcus aureus*. 2013. [Consulta: 10 septiembre 2015]. Disponible en: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/documento95/7.staphylococcus.pdf
27. **ESTEBAN, M.et al. Quintos.** *Importancia de la determinación de Staphylococcus aureus en los alimentos*. Durango. 2011. [Consulta: 10 septiembre 2015]. Disponible en: [http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8821/ART%C3%8DCULO SAUREUScorregido261112%5B1%5D.pdf?sequence=1](http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8821/ART%C3%8DCULO%20SAUREUScorregido261112%5B1%5D.pdf?sequence=1)
28. **ESTRELLA, G.** "*Monitoreo de la Calidad e Inocuidad durante el almacenamiento de queso fresco elaborado artesanalmente en las parroquias rurales del Cantón Riobamba*". (Tesis Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2013. pp. 25-47
29. **FERNÁNDEZ, A et al. García.** *Métodos de identificación bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*. Eimc. 2010. [Consulta: 27 agosto 2015]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
30. **FRAIZER, W., & WESTHOFF, D.** *Microbiología de los Alimentos*. 2ª. ed.. España: Acribia S.A. 1985. p. 52
31. **GARCÍA, F.** *Cómo se hace el Queso?*: 2015. [Consulta: 18 agosto 2015]. Disponible en: <http://quesoselpericho.com/como-se-hace-el-queso.html>
32. **GALVÁN, M.** Proceso Básico de la Leche y el Queso. "*Revista Digital Universitaria*". 2005. 6 (9), pp. 2-17. ISSN: 1067-6079. [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art87/sep_art87.pdf
33. **GARCÍA, B.** *Caracterización de Físicos-Química de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo HGO con el fin de proponer Normas de Calidad*. [en línea]. (Tesis

- Pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo. 2006. [Consulta: 4 noviembre 2015]. Disponible en: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/506/Caracterizacion%20fisico%20quimica%20tipos%20de%20quesos.pdf;jsessionid=836070260EC2A1155E976DFFFA24EFC2?sequence=1>
34. **GONZÁLEZ, M.** Tecnología para la elaboración de queso Blanco, Amarillo y Yogurt. Panamá. 2010. [Consulta: 4 noviembre 2015]. Disponible en: http://www.cedib.org/2013/split/sql_aaaaaaaon
35. **GUERRA, J., & CEDILLOS, R.** *Determinación de la Multirresistencia Microbiana del Staphylococcus aureus, aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración del queso fresco artesanal proveniente de dos queserías.* [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad de el Salvador. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador-El Salvador. 2012. pp 16. [Consulta: 4 noviembre 2015]. Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/2114/1/TRABAJO_DE_GRADUACION.pdf
36. **GUTIÉRREZ, A. et al.** "Enterocolitis por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina." *Elsevier*. [en línea]. España. 2014. 21(10). pp. 599-604. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-enterocolitis-por-staphylococcus-aureus-i-resistente-13054556>
37. **KURLAT, J.** Lácteos Queso Artesanal y Ricotta. 2011. 2ª ed. San Martín. [Consulta: 18 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.quesosargentinos.gov.ar/paginas/Cuadernillo-QuesoArtesanalRicotta-2.pdf>
38. **LANCHIPA, L., & SOSA, Y.** *Evaluación de la carga microbiana patógena en la elaboración del queso fresco en el Distrito de Tacna.* [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Tacna-Perú. 2003. p. 4 [Consulta: 4 noviembre 2015]. Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/2114/1/TRABAJO_DE_GRADUACION.pdf
39. **LEMUS, D. et al.** Maniscalchi. "Staphylococcus oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui." *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. [en línea]. Venezuela. 2008. 28. pp. 48-54. [Consulta: 14 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v28n1/art10.pdf>

40. **MELÉNDEZ, J.** Los quesos. 2013. [Consulta: 19 septiembre 2015]. Disponible en: http://es.slideshare.net/maherran/los-quesos-33095289?next_slideshow=1
41. **MORA, N., & GARCÍA, A.** Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas frente a diversos antibióticos. [En línea] (Tesis Pregrado).. Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto-Hidalgo. 2007. pp 59. [Consulta: 4 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Susceptibilidad%20de%20bacterias%20acido%20lacticas.pdf>
42. **MORALES, M., & RUIZ, C.** "Diferencias en la Resistencia a los antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de diversas fuentes de aislamiento". "Revista del Centro de Investigación" [en línea]. México. 2006. 7(25) pp. 45 - 64. [Consulta: 16 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/342/34202504.pdf>
43. **NAVARRO, A.** *Coagulación de la leche*. España. 2013. [Consulta: 23 noviembre 2015]. Disponible en: <http://cosasdequesos.es/el-autor/>
44. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 1528.** *Norma General para Quesos Frescos No Madurados.Requisitos* [en línea]. 2012. p. 1. [Consulta: 7 noviembre 2015]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf>
45. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 1529-1.** *Control Microbiológico de los Alimentos Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos. Requisitos.* [en línea]. 2013. p. 1. [Consulta: 09 septiembre 2015]. Disponible en: http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/2015/ACO/JUNIO/nte_inen_1529_1_1_1r.pdf
46. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 1529-14.** *Control Microbiológico delLos Alimentos Staphylococcus Aureus. Recuento en placa de Siembra por Extensión en Superficie.* [en línea]. 2013. p. 3. [Consulta: 10 septiembre 2015]. Disponible en: <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte1/1529-14-1R.pdf>
47. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 1529-2,** *Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, Envío y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico.* [en línea]. 2013. p. 1. [Consulta: 09 septiembre 2015]. Disponible en: <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte1/1529-2-1R.pdf>

- 48. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 4.** *Leche y productos lácteos. Muestreo.* [en línea]. 2012 p. 1. [Consulta: 09 septiembre 2015]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0004.1984.pdf>
- 49. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 62.** *Quesos. clasificación y designaciones.* [en línea]. 2012. pp. 1-3. [Consulta: 16 septiembre 2015]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0062.1974.pdf>
- 50. PÁEZ.** *MicrobitosBlog.* 2015. [consulta: 06 agosto 2015]. Disponible en : <https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus/>
- 51. PASCUAL, M., & CALDERÓN, V.** Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas 2ª ed. Argentina. Díaz de Santos. 2001. pp. 80.
- 52. PRAT, S.** *Prueba de Suceptibilidad Antimicrobiana por difusión en agar.* Chile. 2009. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en: http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf
- 53. QUILLIGANA, F.** Relación de la Manipulación y Almacenamiento en las enfermedades transmitidas por los Alimentos ETAS de los consumidores de carne del Mercado Modelo de la ciudad de Ambato. [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos. Ambato-Ecuador. 2007. pp. 14. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3391/1/P143%20Ref.3114.pdf>
- 54. REYES, G.et al. Acosta.** "Susceptibilidad a antimicrobianos y perfil plasmídico de *Staphylococcus aureus* aislados de quesos artesanales e industriales del municipio Valledupar". *"Revista Redieluz"*. [en línea]. 2014. Cesar-Colombia. 4(1). pp. 80-86. [Consulta: 27 septiembre 2015]. ISSN 2244-7334. Disponible en: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/redieluz/article/view/19737/19685>
- 55. RIVERA, J.et al Mujica.** "*Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: suceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos". *"Revista Científica, FCV-LUZ"*. 2011. Maracaibo-Venezuela. 11(3). pp. 202 - 210. [Consulta: 24 septiembre 2015]. ISSN 0798-2259. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/959/95918239003.pdf>

- 56. ROMERO, P. et al. Leyva.** "Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical Mexicano de la región de Tonalá". "Revista mexicana de ingeniería química". 2009. México. 8(1). pp. 111-119. [Consulta: 24 septiembre 2015]. ISSN 1665-2738. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382009000100011&script=sci_arttext
- 57. SANABRIA, G.** "Evolución de la resistencia en el Staphylococcus aureus". "Revista Instituto de Medicina Tropical". 2002. Paraguay. 3(2), pp. 27-39. [Consulta: 24 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.imt.edu.py/admin/uploads/Documento/v3n2a05.pdf>
- 58. STEPHEN, J., & CAVALIERI, I.** *Manual de pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. 2005. [Consulta: 4 septiembre 2015]. Disponible en: http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjlrqPYu8bKAhVsv4MKHQvICK8QFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.paho.org%2Fhq%2Findex.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D22539%26Itemid%3D&usq=AFQjCNH-Bfsyz_XZIBRaAkXkE_NItXAVfg
- 59. SUSSMANN, O. et al. Mattos.** *Resistencia bacteriana*. 2007. [Consulta: 4 septiembre 2015]. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
- 60. TAROCO, R. et al. Seija.** *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. 2008. [Consulta: 18 septiembre 2015]. Disponible <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- 61. VALERO, K.** Caracterización, capacidad enterotoxigénica y resistencia a antibióticos de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de leche y queso en tres municipios del estado Zulia. [en línea]. (Tesis Doctoral). Universidad de Venezuela. Facultad de Ciencias. Venezuela. 2008. pp. 10. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en : <http://saber.ucv.ve/jspui/handle/123456789/1876?mode=full>
- 62. VÁSQUEZ, A.** Eficacia de medicamentos en las Enfermedades Infecciosas de difícil control en Salud Pública, de pacientes adultos que asisten a una clínica asistencial en Soyapango. administrados a pacientes adultos. [en línea]. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Facultad de Medicina. Nicaragua. 1999. pp. 18. [Consulta: 07 noviembre 2015]. Disponible en : http://ri.ues.edu.sv/733/1/Eficacia_de_los_medicamentos_como_control.pdf
- 63. VÁSQUEZ, N. et al. Durán.** "Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara". "Revista Scielo".

30(3). 2012. pp. 217 - 223. [Consulta: 07 noviembre 2015]. ISSN 0798-7269. Disponible en : http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692012000300001&script=sci_abstract&tlng=es

64. **VELÁZQUEZ, M.** "Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente". *Revista Scielo*. 47(5), 2005. pp. 381 - 387. [Consulta: 17 noviembre 2015]. ISSN 0036-3634. Disponible en : http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000500009
65. **VIGNOLI, R., & SEIJA, V.** *Principales mecanismos de Resistencia Antibiótica*. 2010. [Consulta: 03 septiembre 2015,]. Disponible en : <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
66. **VILLA, C.** *Manual de Procedimientos para la detección de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos*. 2001. [Consulta: 10 septiembre 2015]. Disponible en : <http://microagroalimuvime.wikispaces.com/file/view/antimicrobianos+2015.pdf>
67. **VILLACIS, V.** Identificación de *Staphylococcus* penicilino resistente y sus relación con la faringoamigdalitis en el personal que trabaja en la elaboración de queso artesanal, en el cantón La Joya de los Sachas. [en línea]. (Tesis Pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de Laboratorio Clínico. Ambato-Ecuador. 2015. pp. 47. [Consulta: 07 noviembre 2015]. Disponible en : <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10345/1/Villacis%20Lozada,%20Victoria%20Maricela.pdf>
68. **VIVES, E. et al.** Medvedovsky. *Inhibidores de la pared bacteriana*. 2004. [Consulta: 07 diciembre 2015]. Disponible en : <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/inhibidores-de-la-pared-bacteriana.pdf>
69. **ZAMBRANO, M.** Determinación de la presencia de *Salmonella* en queso fresco comercializado en el cantón Chone provincia de Manabí entre Mayo y Julio del 2014. [en línea] (Tesis Pregrado). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo. Guayaquil- Ecuador. 2014. pp. 7. [Consulta: 05 noviembre 2015]. Disponible en : <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/123456789/2592/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-47.pdf>

70. ZUTA, N. Aplicación de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de enterotoxinas en *Staphylococcus aureus* aislados de alimentos en la ciudad de Lima. [en línea]. (Tesis Posgrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima-Perú. 2009. . [Consulta: 10 diciembre 2015]. Disponible en : http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/237/1/Zuta_an.pdf

ANEXOS

Anexo A. Lista de microorganismos patógenos presentes en quesos frescos artesanales comercializados en Lima-Perú.

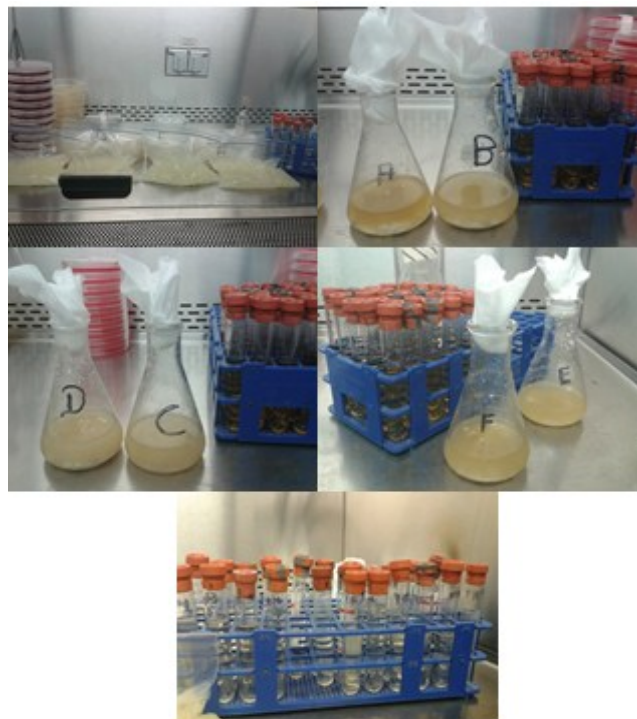
CUADRO 1. Carga microbiana encontrada en las muestras de queso fresco artesanal analizadas

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas (UFC/g)	Coliformos totales (NMP/g)	Coliformos fecales (NMP/g)	Escherichia coli (NMP/g)	Staphylococcus aureus (UFC/g)	Enterococcus faecalis (NMP/g)	Lactobacillus spp. (UFC/g)
1	2,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10	6,8 ≥ 10 ⁴	4,6 ≥ 10 ²	2,2 ≥ 10 ⁴
2	1,1 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	6	9,7 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	4,8 ≥ 10 ⁴
3	2,2 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	3	8,2 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	2,5 ≥ 10 ⁴
4	2,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,5 ≥ 10	7,3 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	2,2 ≥ 10 ⁴
5	2,1 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	2,4 ≥ 10 ²	1,6 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	1,3 ≥ 10 ⁴
6	2,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,2 ≥ 10	8,2 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	4,4 ≥ 10 ⁴
7	7,2 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,6 ≥ 10	6,8 ≥ 10 ⁴	3,8 ≥ 10	1,9 ≥ 10 ⁴
8	10,6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	Ausente	8,0 ≥ 10 ⁴	1,4 ≥ 10 ²	2,1 ≥ 10 ⁵
9	2,3 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,5 ≥ 10	7	7,3 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	7,4 ≥ 10 ⁴
10	5,5 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	2,7 ≥ 10	Ausente	6,5 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	1,3 ≥ 10 ⁴
11	2,7 ≥ 10 ⁵	3,3 ≥ 10	9,3 ≥ 10	2,3 ≥ 10	2,4 ≥ 10 ⁵	1,1 ≥ 10 ⁴	1,5 ≥ 10 ⁵
12	1,6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	9	2,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	5,9 ≥ 10 ⁴
13	28,5 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	3,8 ≥ 10	1,3 ≥ 10 ⁴	1,9 ≥ 10	1,2 ≥ 10 ⁵
14	29,4 ≥ 10 ⁵	> 3,7 ≥ 10	4,4 ≥ 10	4,4 ≥ 10	5,6 ≥ 10 ⁴	1,1 ≥ 10 ⁴	2,2 ≥ 10 ⁵
15	3,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,2 ≥ 10	2,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	5,6 ≥ 10 ⁴
16	3,1 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10	3,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	5,3 ≥ 10 ⁴
17	28,1 ≥ 10 ⁵	1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	2,4 ≥ 10 ²	7,2 ≥ 10 ⁴	3,1 ≥ 10	7,0 ≥ 10 ⁴
18	25,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	2,1 ≥ 10 ³	Ausente	6,6 ≥ 10 ⁴	3,8 ≥ 10	2,6 ≥ 10 ⁵
19	46,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	6	5,5 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ⁵
20	47,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,6 ≥ 10	Ausente	4,4 ≥ 10	5,5 ≥ 10 ⁴
21	49,4 ≥ 10 ⁵	1,4 ≥ 10 ²	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	8,1 ≥ 10 ⁵	1,9 ≥ 10	4,7 ≥ 10 ⁵
22	37,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	2,3 ≥ 10	3,9 ≥ 10 ⁵	2,7 ≥ 10	2,9 ≥ 10 ⁵
23	31,8 ≥ 10 ⁵	> 2,1 ≥ 10	2,4 ≥ 10 ²	2,7 ≥ 10	1,4 ≥ 10 ⁵	2,7 ≥ 10	2,9 ≥ 10 ⁵
24	24,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,6 ≥ 10 ⁵	1,6 ≥ 10	5,6 ≥ 10 ⁵
25	53,0 ≥ 10 ⁵	4,6 ≥ 10 ²	4	4	Ausente	1,4 ≥ 10 ²	3,0 ≥ 10 ²
26	51,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	5,1 ≥ 10 ⁴	7	1,1 ≥ 10 ⁵
27	49,2 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	2,1 ≥ 10	2,7 ≥ 10 ⁴	9	2,3 ≥ 10 ⁵
28	79,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	6,7 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	7,3 ≥ 10 ⁵
29	76,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,9 ≥ 10 ⁵	1,4 ≥ 10 ²	6,7 ≥ 10 ⁴
30	21,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	3,3 ≥ 10	7,0 ≥ 10 ⁵	3,1 ≥ 10	2,4 ≥ 10 ⁴
31	0,12 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,0 ≥ 10 ⁵	8,6 ≥ 10	3,6 ≥ 10 ⁴
32	48,6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	Ausente	3	1,8 ≥ 10 ⁵
33	1,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	3,3 ≥ 10	Ausente	Ausente	2,8 ≥ 10 ⁵
34	43,6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	2,7 ≥ 10	9,4 ≥ 10 ⁵	1,9 ≥ 10	1,6 ≥ 10 ⁴
35	3,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,0 ≥ 10 ⁴	3,1 ≥ 10	7,6 ≥ 10 ³
36	14,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	8,6 ≥ 10	Ausente	3,7 ≥ 10	1,5 ≥ 10 ³
37	27,4 ≥ 10 ⁵	4,3 ≥ 10	4,3 ≥ 10	1,5 ≥ 10	9,4 ≥ 10 ⁵	2,7 ≥ 10	1,0 ≥ 10 ³
38	73,2 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	5,3 ≥ 10 ⁵	3,1 ≥ 10	4,7 ≥ 10 ³
39	46,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,4 ≥ 10 ²	8,3 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	3,6 ≥ 10 ³

Fuente: Cristóbal y Maurtua, 2003, p. 161

<http://www.scielo.org/pdf/rpsp/v14n3/a02v14n3>

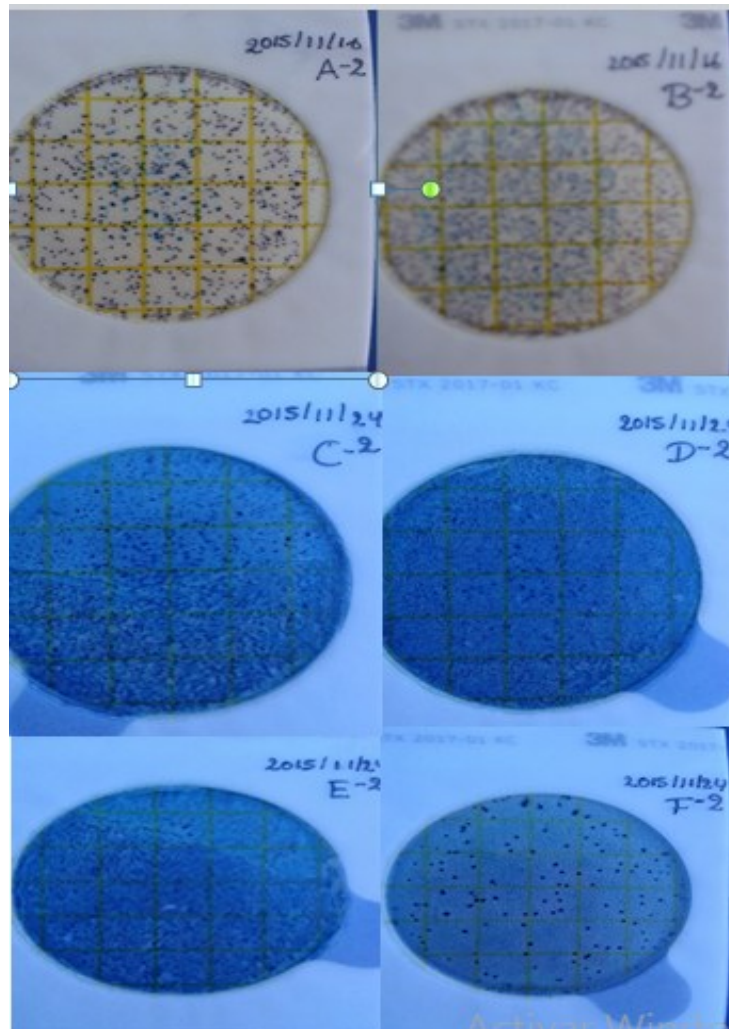
Anexo B. Fotografías de preparación de diluciones de las diferentes muestras.



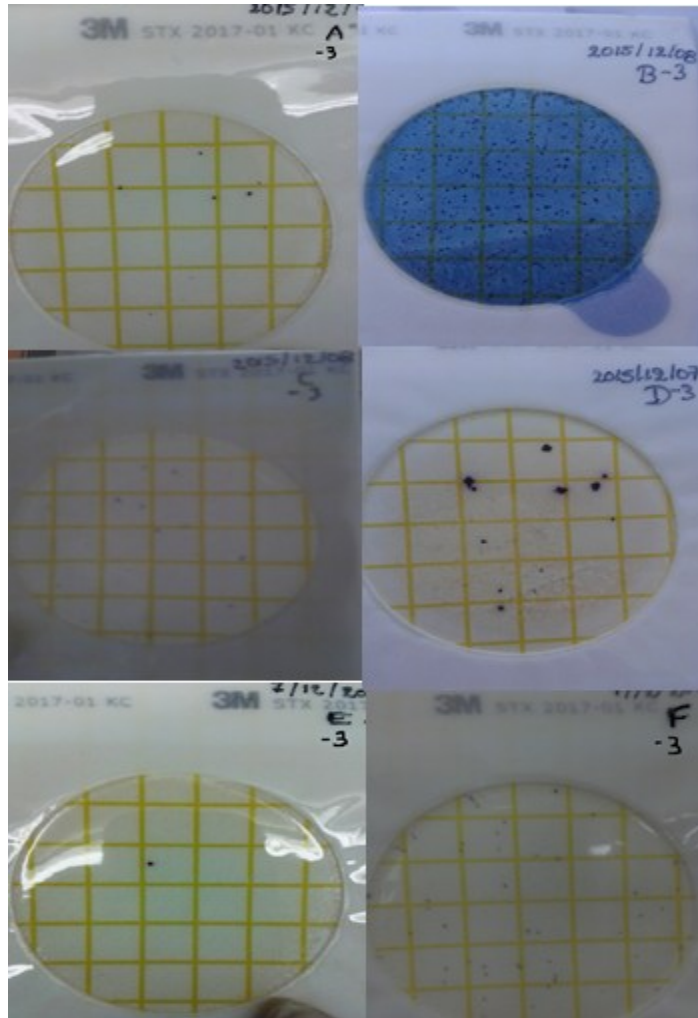
Anexo C. Fotografías del procedimiento de siembra en Placas Petrifilm Staph 3M



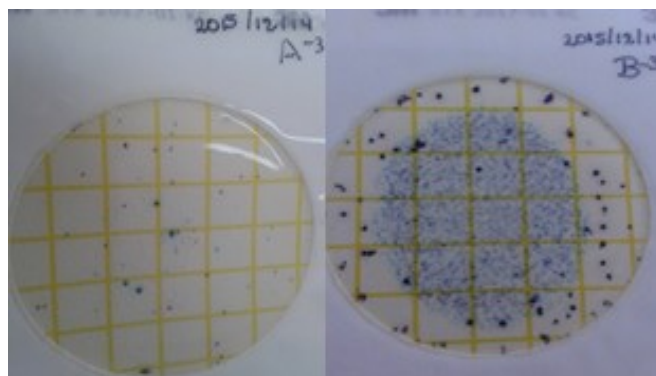
Anexo D. Fotografías de aislamiento de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm 3M en el muestreo 1

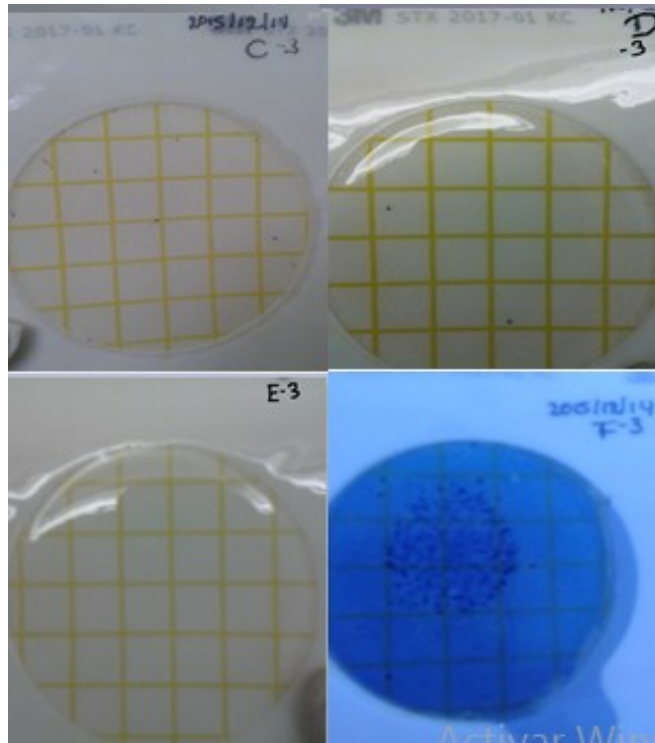


Anexo E. Fotografías de aislamiento de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm 3M en el muestreo 2

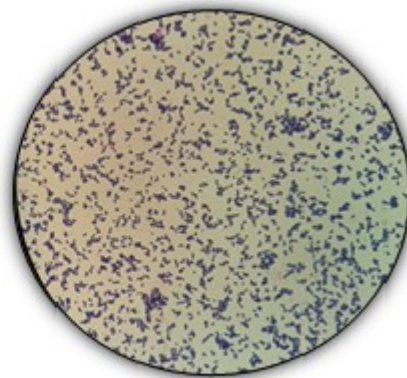
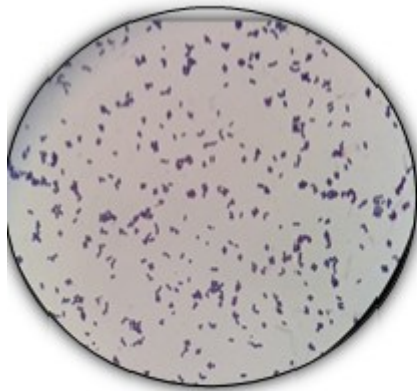
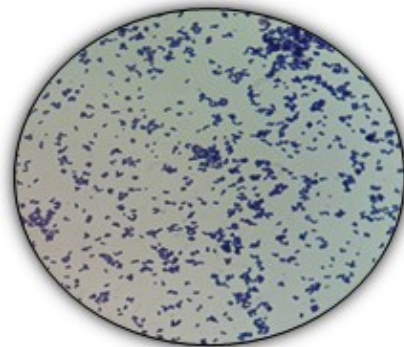
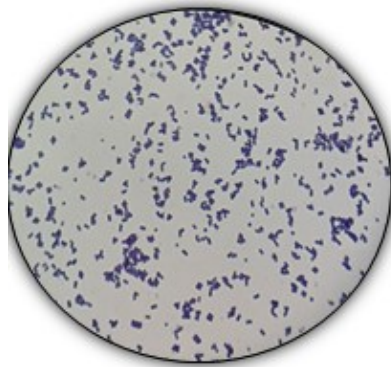


Anexo F Fotografías de aislamiento de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm 3M en el muestreo 3



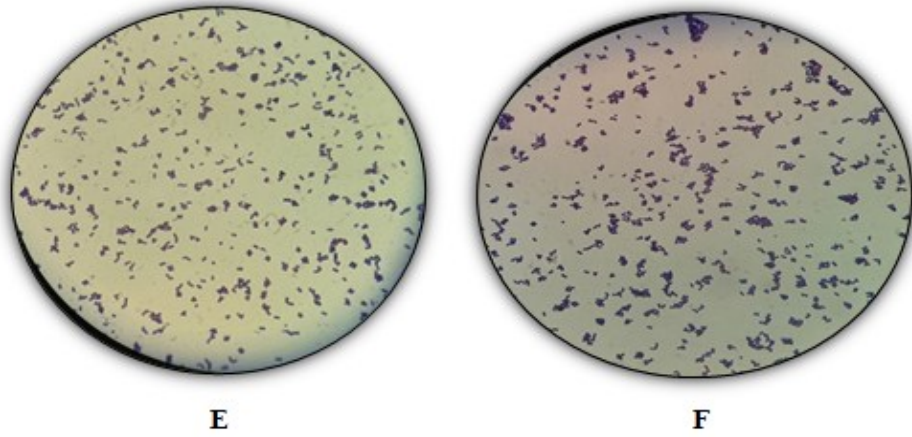


Anexo G. Fotografías de la coloración Gram en las muestras aisladas de queso fresco



C

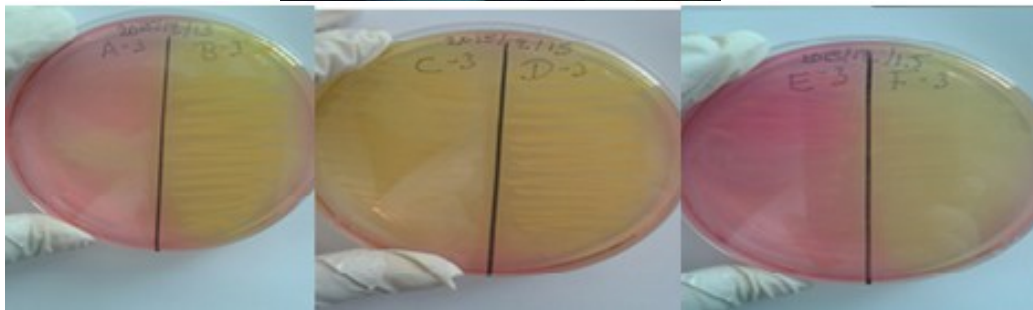
D



Anexo H. Fotografías de identificación de *Staphylococcus aureus* en Agar manitol salado de la solución madre



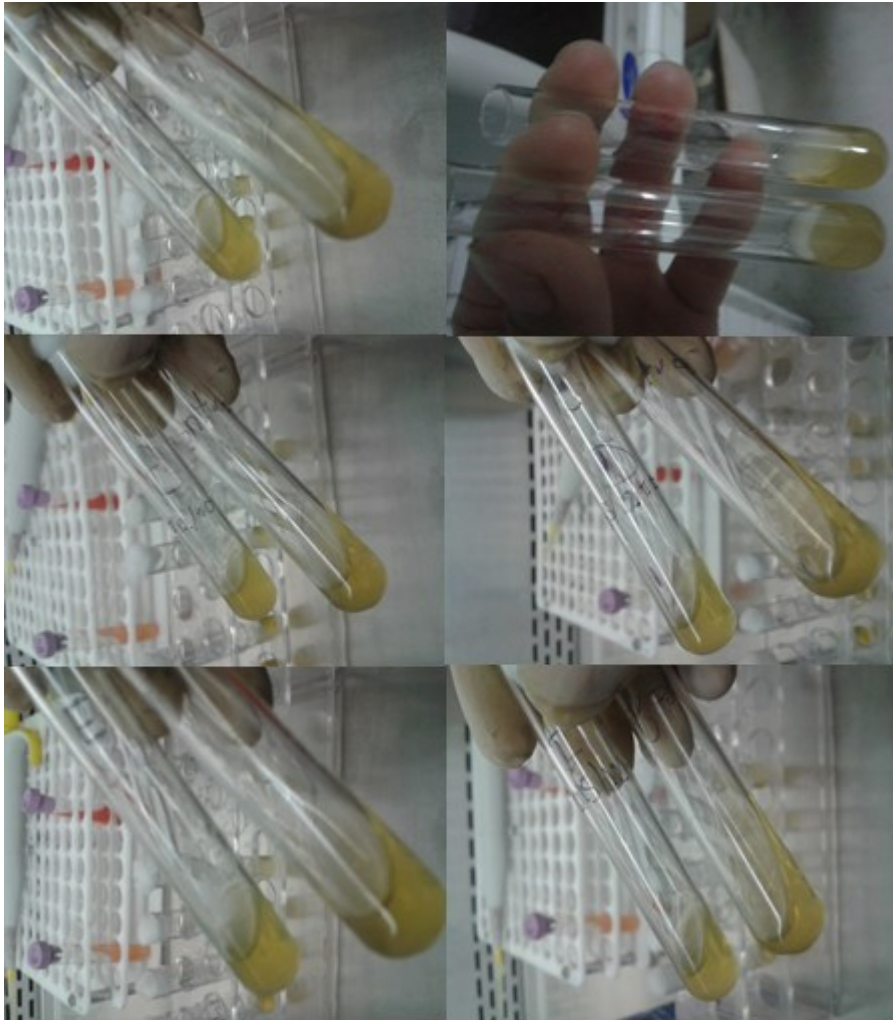
Anexo I. Fotografías de identificación de *Staphylococcus aureus* en Agar manitol salado de las colonias aisladas en placas Petrifilm



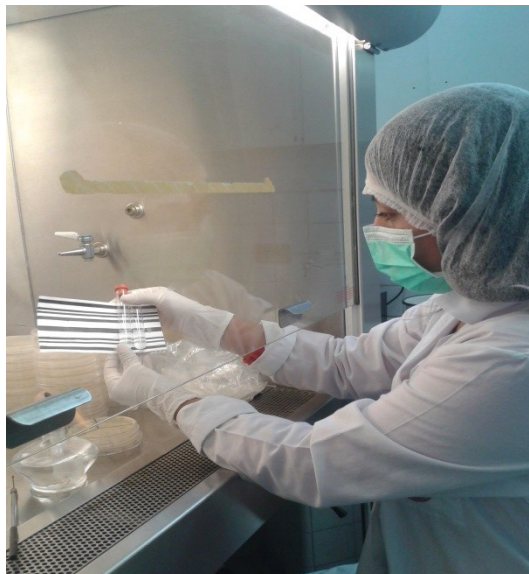
Anexo J. Fotografías de las prueba de catalasa

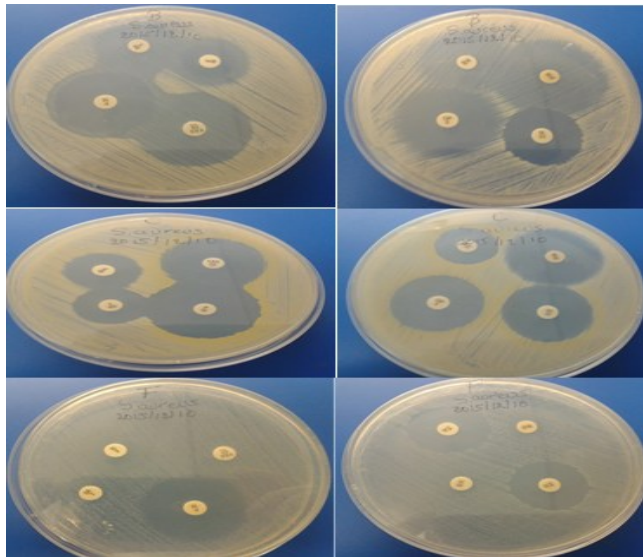


Anexo K. Fotografías de las prueba de coagulasa

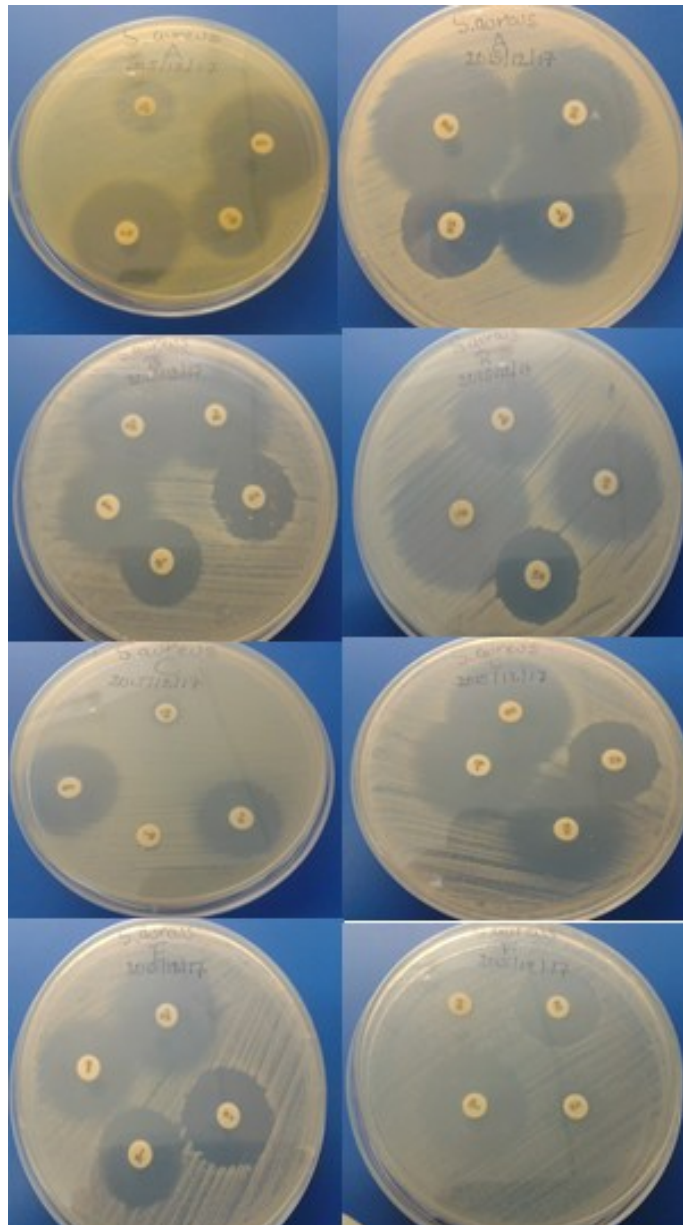


Anexo L. Fotografías de la resistencia/susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* en el muestreo 2






Anexo M. Fotografías de la resistencia/susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* en el Muestreo 3



ANEXO N. Norma Técnica INEN 1528: Requisitos para queso fresco.

CDU: 637.352 ICS: 67.100.30		CIIU: 3112 AL 03.01-420
Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	NORMA GENERAL PARA QUESOS FRESCOS NO MADURADOS. REQUISITOS	NTE INEN 1528:2012 Primera revisión 2012-03
<p>1. OBJETO</p> <p>1.1 La presente Norma establece los requisitos para el queso fresco no madurado, incluido el queso fresco, destinado al consumo directo o a posterior elaboración.</p> <p>1.2 En caso que exista norma específica para una variedad de queso fresco, en particular se considerará esta.</p> <p>2. DEFINICIONES</p> <p>2.1 Para efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>2.1.1 Queso. Se entiende por queso el 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:</p> <p>a) Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o leche, de mantequilla o de cualquier combinación de estos ingredientes, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los ingredientes lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o</p> <p>b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado a).</p> <p>2.1.1.1 Queso madurado. Se entiende por queso sometido a maduración el queso 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.</p> <p>2.1.1.2 Queso madurado por mohos. Se entiende por queso madurado por mohos un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso.</p> <p>2.1.1.3 Queso no madurado. Se entiende por queso no madurado el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación.</p> <p>2.1.2 Queso fresco. Es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácteos. También se designa como queso blanco.</p> <p>2.1.3 Queso condimentado. Es el queso al cual se han agregado condimentos y/o saborizantes naturales o artificiales autorizados.</p> <p>2.1.4 Queso cottage. Es el queso no madurado, escaldado o no, de alta humedad, de textura blanda o suave granular o cremosa preparado con leche descremada granulada con enzimas y/o cultivos</p>		

3. CLASIFICACIÓN

3.1 De acuerdo a su composición y características físicas el producto, se clasifica en:

3.1.1 *Según el contenido de humedad,*

- a) Duro
- b) Semiduro
- c) Semiblando
- d) Blando

3.1.2 *Según el contenido de grasa láctea,*

- a) Rico en grasa
- b) Entero ó Graso
- c) Semidescremado ó bajo en grasa
- d) Descremado ó Magro

4. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

4.1 La leche utilizada para la fabricación del queso fresco, debe cumplir con los requisitos de la Norma NTE INEN 10, y su procesamiento se realizará de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

4.2 Los límites máximos de plaguicidas no deben superar los establecidos en el Codex Alimentarius CAC/ MLR 1 en su última edición.

4.3 Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los establecidos en el Codex Alimentario CAC/MLR 2 en su última edición.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Para la elaboración de los quesos frescos no madurados, se pueden emplear las siguientes materias primas e ingredientes autorizados, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius:

5.1.1.1 Leche y/o productos obtenidos de la leche.

5.1.1.2 Ingredientes tales como:

- a) Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o aromas y cultivos de otros microorganismos inocuos;
- b) Cuajo u otras enzimas coagulantes inocuas e idóneas;
- c) Cloruro de sodio;
- d) Vinagre;

5.1.2 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con lo establecido en la tabla 1.

Tipo o clase	Humedad % max NTE INEN 63	Contenido de grasa en extracto seco, % m/m Mínimo NTE INEN 64
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero ó graso	-	45
Semidescremado o bajo en grasa	-	20
Descremado ó magro	-	0,1

5.1.3 **Requisitos microbiológicos.** Al análisis microbiológico correspondiente, los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

5.1.3.1 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 2.

TABLA 2. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
Listeria monocytogenes /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Donde:

- n = Número de muestras a examinar.
- m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.
- M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.
- c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

5.1.4 **Aditivos.** Se pueden utilizar los aditivos permitidos y en las cantidades especificadas en la NTE INEN 2074 y además:

- a) Gelatina y almidones modificados (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los estabilizadores, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)
- b) Harinas y almidones de arroz, maíz y papa (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los antiaglutinantes para el tratamiento de la superficie de productos cortados, rebanados y desmenuzados únicamente, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)

5.1.5 **Contaminantes.** El límite máximo permitido debe ser el que establece el Codex alimentarius de contaminantes CODEX STAN 193-1995, en su última edición