

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE LA MULTIRRESISTENCIA MICROBIANA DEL
Staphylococcus aureus, AISLADO A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES
QUE INTERVIENEN EN LA ELABORACION DEL QUESO FRESCO
ARTESANAL PROVENIENTE DE DOS QUESERIAS.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
ROSARIO STEPHANIE CEDILLOS AVILA
JESSICA CECILIA GUERRA RODRIGUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

FEBRERO DE 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LÓPEZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL

Licda. María Luisa Ortíz de López

ASESORA DE AREA DE MICROBIOLOGIA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

DOCENTES DIRECTORAS

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODO PODEROSO, por habernos regalado sabiduría y guiarnos en el desarrollo de nuestros estudios.

A NUESTRAS DOCENTES DIRECTORAS:

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos y Msc. Amy Elieth Moran Rodríguez, por orientarnos con paciencia y comprensión durante la realización de nuestro trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE AREA:

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, Licda. María Luisa Ortiz de López y MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz. Por sus observaciones y recomendaciones las cuales ayudaron a la realización del trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por brindarnos su apoyo en la realización de nuestro trabajo.

A todas las personas que directa o indirectamente colaboraron en la realización de nuestro trabajo de graduación.

DEDICATORIA

A DIOS, gracias mi Señor Jesús, por ser mi sostén en los momentos mas difíciles, por todas las bendiciones que me has dado, por darme la fortaleza, sabiduría necesaria para seguir adelante.

A MI MADRE, Zoily de Castro, por ser el ángel que Dios puso en mi vida para cuidarme y apoyarme; por ser mi fuente de inspiración para seguir adelante a pesar de las dificultades.

A MI PADRE, Esteban Castro de León por estar conmigo y ser un buen padre.

A MI ESPOSO, Denis García por su apoyo y su amor incondicional, por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles.

A MIS HIJOS, Arí y Jonathan, por ser la luz en mi vida y mi fuerza para seguir adelante.

A MIS HERMANOS, Sebastián y Alejandro Cedillos por estar siempre a mi lado.

A MI NANA, Gladis Bonilla por estar incondicionalmente a mi lado, por ser mi segunda madre.

A mi compañera Jessica por toda su dedicación y esmero para poder llevar a cabo este nuevo triunfo.

Rosario Stephanie Cedillos de García

DEDICATORIA

A DIOS, gracias a la Santísima Trinidad, por dejarme llegar hasta aquí ahora y no dejarme caer en las pruebas difíciles por llenarme de fortaleza, esperanza y fé, gracias por todas las bendiciones recibidas en mi vida.

A MI MADRE, Cecilia de Guerra, por su apoyo incondicional, esfuerzo, dedicación y sabiduría, es una de las bendiciones mas grandes que me regalo papá Dios.

A MI PADRE, Miguel Ángel Guerra que donde quiera que esté comparte mi felicidad y se sintiera orgulloso de mi aunque no este ya entre nosotros.

A MI HIJA, Maria Cecilia, por llegar y darle sentido a mi vida dándome fuerzas de seguir adelante.

A MI ESPOSO, Gustavo Ardón por su apoyo, por estar conmigo en las buenas, malas y darme motivos para salir adelante.

A MI FAMILIA, a mi hermana, abuela, tíos que me han apoyado y ayudado a salir adelante en mi vida.

A mi compañera Stephanie por toda su paciencia, dedicación y esmero para poder culminar exitosamente nuestro trabajo.

Jessica Cecilia Guerra Rodríguez.

INDICE

	Página
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xix
Capítulo II	
2.0 Objetivos	22
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	24
3.1 La leche	24
3.2 Secreción de la leche	25
3.3 Mecanismo fisiológico la secreción y la eyección de la leche	26
3.4 Composición de la leche	27
3.4.1 Composición química de la leche	27
3.4.2 Características físicas de la leche	28
3.5 Microorganismos en la leche	29
3.5.1. Microorganismos derivados de la ubre	29
3.5.2. Microorganismos que provienen del medio ambiente	30
3.5.3. Equipos de recogida de la leche	30
3.5.4. Personal	31
3.6 Mastitis en el ganado bovino	32
3.6.1 Microorganismos causantes de mastitis	32

3.6.2 Mastitis estafilocócica	33
3.6.3 Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera	34
3.6.4 Antibióticos para el tratamiento de mastitis	35
3.7 Queso	36
3.7.1 Clasificación de los quesos	38
3.7.2 Propiedades nutricionales del queso	39
3.7.3 Los peligros del queso fresco	39
3.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	41
3.8.1 Resistencia	43
3.8.2 Intoxicación alimentaria por <i>Staphylococcus</i>	44
3.9 El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar).	46
3.9.1 Fundamentos teóricos de la prueba de difusión en disco	47
3.9.2 Puntos críticos	47
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	49
4.1 Tipo de estudio	49
4.2 Investigación bibliográfica	49
4.3 Investigación de campo, universo y muestra	50
4.3.1 Tipo de muestreo	51
4.3.2 Análisis estadístico	52
4.3.3 Formulación de la hipótesis	52
4.4 Parte Experimental	53
4.4.1. Selección de la Muestra	53
4.4.2. Procedimiento para la toma de muestras para el análisis	53

4.4.3. Procedimiento para la preparación de la muestras.	53
Preparación de las diluciones	
4.4.3.1. Muestras de queso fresco	53
4.4.3.2. Muestras de leche cruda	54
4.4.3.3. Muestras de lavado de manos de manipuladores	54
4.4.4. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> para cada una de las muestras	55
4.4.5. Pruebas de confirmación para <i>Staphylococcus aureus</i>	56
4.4.5.1. Prueba de la coagulasa	56
4.4.5.2. Prueba de la catalasa	57
4.4.6. Prueba de Sensibilidad por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer), para el <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de las Muestras	57
4.4.6.1. Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland)	57
4.4.6.2. Preparación del inóculo	57
4.4.6.3. Inoculación de las placas	58
4.4.6.4. Aplicación de los discos	59
4.4.6.6. Incubación	59
4.4.6.4. Lecturas de las placas e interpretación de los resultados	60

Capítulo V

5.0. Resultados y análisis de resultados	62
5.1. Guía de observación para el diagnóstico de las higiénicas	62

de las queserías en estudio	
5.2. Aislamiento	71
5.3. Susceptibilidad de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> a los antibióticos	74
5.4. Análisis estadístico (ANOVA)	80
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	85
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	88
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexos Nº

1. Escala de McFarland.
2. Antibióticos y Diámetros Críticos para *Staphylococcus spp*.
3. Límites aceptables (mm) de los diámetros de los halos de inhibición – límites de control en pruebas de disco de difusión.
4. Guía de observación para el diagnóstico de las condiciones higiénicas de las queserías en estudio.
5. Etiquetas para el muestreo.
6. Esquemas de parte experimental.
7. Normativas de comparación de Leche, Queso y Manipuladores.
8. Tablas de resultados de la parte experimental.
9. Procesamiento del queso fresco artesanal.
10. Aislamiento del *Staphylococcus aureus* en Agar Bair Parker.
11. Prueba de sensibilidad para las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* por el método de Kirby Bauer.

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Página
1. Composición química media de la leche de vaca.	27
2. Propiedades físicas de la leche.	28
3. Clasificación de los quesos de acuerdo a su composición y características físicas.	38
4. Producción diaria y el personal que labora en las queserías en estudio.	49
5. Cantidades de muestras a tomar de las queserías en estudio.	50
6. Resultados promedios obtenidos para la determinación e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	70
7. Promedios de diámetros de halos de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados y de la cepa control ATCC (29737) por cada antibiótico.	72
8. Análisis de varianza para multiresistencia	78

INDICE DE FIGURA

Figura N°		Página
1.	Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar Meller Hinton	57
2.	Modo empleado para la colocación de discos de antibióticos en el agar	58
3.	Discos de antibióticos con sus respectivos halos de resistencia.	59
4.	Espacio suficiente para el desarrollo de las actividades.	61
5.	Servicio de agua potable	62
6.	Frecuencia de limpieza en el lugar de trabajo	63
7.	Utilización de desinfectantes para limpiar el área de trabajo	63
8.	Frecuencia en que utilizan los desinfectantes	64
9.	Cuentan con el equipo de indumentaria adecuada en la quesería QS.	65
10.	Cuentan con el equipo de indumentaria adecuada en la quesería QJ.	65
11.	Utilización de maquillaje, aritos u otros accesorios por parte del personal de las queserías.	66
12.	Frecuencia con que el personal se lava las manos.	
13.	Limpieza de utensilios antes y después de la elaboración del queso fresco.	67
14.	Limpieza de depósitos de leche antes y después de usarlos.	68

15. Tapaderas en los recipientes de leche para su transporte.	68
16. Condiciones de almacenamiento de leche y queso.	69
17. Porcentaje de aislamiento por tipo de muestra	70
18. Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a la Amoxicilina / Ácido Clavulánico.	73
19. Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a la Ciprofloxacina	74
20. Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a la Eritromicina.	74
21. Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a la Penicilina G.	75
22. Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a la Tetraciclina.	75
23. Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a la Trimetroprim/ Sulfametoxazol.	76
24. Distribucion porcentual de la multiresistencia de las cepas	77
25. Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis	79

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxinucleico

ANOVA: Análisis estadístico de varianza

AOAC: Association of Oficial Analytical Chermistry

BHI: Caldo Infusión Cerebro Corazón

CLS: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI. Concentración Inhibitoria Mínima

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

Dnasa: Desoxiribonucleasa

FAO: Organización para la alimentación y la agricultura

IPOA: Internacional Peacw Opetions Association

MH: Mueller Hinton

MSPAS. Ministerio de Salud Pública y Asistentas Social

MRSA: *Staphylococcus aureus* metilino resistente

NSO: Norma Salvadoreña

p.r.m.: revoluciones por minuto

P/V: Peso sobre volumen

UDO: Universidad de Oriente

UI: Unidades Internacionales

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

V/V: Volumen sobre Volumen.

RESUMEN

El ***Staphylococcus aureus*** es el responsable de infecciones e intoxicaciones tanto en el hombre como en animales, dichas infecciones son de difícil manejo con los antibióticos disponibles, ya que algunas cepas de ***Staphylococcus aureus*** son resistentes a la mayoría de los antibióticos.

El objetivo de esta investigación fue determinar la multirresistencia del ***Staphylococcus aureus*** aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración del queso fresco artesanal, proveniente de dos queserías, ubicadas en San José Villanueva, departamento de La Libertad. Primero se realizó una guía de observación utilizando una lista de chequeo, para verificar las condiciones higiénicas de las queserías en estudio.

Posteriormente, se realizó una prueba piloto; donde se recolectaron 5 muestras de queso fresco, 5 muestras de leche por quesería y además se tomaron muestras de lavado de manos de los manipuladores; haciendo un total de 25 muestras a analizar. Seguidamente las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Las muestras recolectadas, se trabajaron por triplicado, en las cuales se aisló e identificó el ***Staphylococcus aureus***, utilizando la metodología indicada por la Association of Official Analytical Chemistry. A las cepas aisladas e identificadas se les comprobó la multirresistencia utilizando la prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco Kirby-Bauer frente a seis antibióticos: Ciprofloxacina, Penicilina G, Eritromicina, Tetraciclina, Sulfamida y Amoxicilina, donde se obtuvo que las

cepas aisladas de ***Staphylococcus aureus*** provenientes de leche y queso fresco, presentaron resistencia múltiple frente a 3 antimicrobianos (Amoxicilina / Ac. Clavulánico, Eritromicina y Penicilina G), mientras que las cepas aisladas provenientes del lavado de manos solamente presentaron resistencia a un antimicrobiano (Penicilina G). Los resultados obtenidos son un indicador del abuso de antibióticos presentes en los animales.

Con la Norma Salvadoreña NSO 67.01.01.06. Leche cruda ⁽²⁸⁾, se concluyó que las muestras de leche cruda cumplen con dicha norma; las muestras de queso fresco según la Norma Salvadoreña NSO 67.01.04.05. Quesos no maduros ⁽²⁹⁾, no cumplen con dicha norma por lo que el queso fresco artesanal no es apto para el consumo humano; y para las muestras de lavado de manos de manipuladores según la guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto para alimentos y bebidas, de Perú ⁽⁷⁾, no cumplen según lo establecido en la Guía Técnica.

Por lo que se le recomienda a los fabricantes de productos lácteos artesanales hacer uso de las buenas prácticas de manufacturación para mejorar la higiene de sus productos.

Finalmente se obtuvo una investigación que constituye un aporte para todos aquellos involucrados en la fabricación de productos lácteos artesanales así como a las autoridades competentes y las personas que consumen este tipo de alimento.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La leche y el queso fresco constituyen uno de los principales alimentos dentro de la pirámide nutricional, ya que son una buena fuente de proteínas, vitaminas y minerales. Debido al tipo de proceso que conlleva su manufacturación, estos alimentos son un medio de cultivo de microorganismos y el queso por su alta salinidad, favorece a las especies de ***Staphylococcus***. Muchas de las intoxicaciones estafilocócicas han sido asociadas al consumo de leche y productos lácteos, en donde el ***Staphylococcus aureus*** enterotoxigénico podría encontrarse desde el momento de su obtención, o bien llegar potencialmente a dichos alimentos, a partir principalmente de manipuladores asintomático portadores de este microorganismo (8).

Por lo mencionado anteriormente se consideró de importancia hacer un estudio sobre 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.

Durante el desarrollo de esta investigación se determinó la multirresistencia microbiana del ***Staphylococcus aureus***, aislado a partir de muestras de leche cruda, de queso fresco artesanal y lavado de manos de manipuladores, proveniente de dos queserías ubicadas en San José Villanueva.

Primero se realizó una guía de observación utilizando una lista de chequeo para verificar las condiciones higiénicas de las queserías en estudio. Posteriormente las muestras seleccionadas se aislaron e identificaron cepas de

Staphylococcus aureus; empleando para ello los métodos de ensayo y análisis establecidos en Association of Official Analytical Chemistry; luego a los aislados se les realizó una prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco Kirby-Bauer frente a seis antibióticos.

El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el período de junio de 2010 a agosto de 2011.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Determinar 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.

2.2 Objetivos Específicos:

- 2.2.1 Realizar inspección de campo de las dos queserías en estudio utilizando una guía de observación.
- 2.2.2 Recolección de muestras de leche cruda y queso fresco artesanal para aislar el ***Staphylococcus aureus***.
- 2.2.3 Tomar muestra de lavado de manos de los manipuladores que elaboran el queso fresco artesanal para aislar el ***Staphylococcus aureus***.
- 2.2.4 Identificar el ***Staphylococcus aureus*** por medio de pruebas específicas y medios selectivos.
- 2.2.5 Comprobar la multirresistencia del ***Staphylococcus aureus*** identificado frente a diversos antimicrobianos por el método de Kirby – Bauer.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1. La Leche

Leche cruda de vaca: Es el producto íntegro, no alterado ni adulterado, de la secreción de las glándulas mamarias de las hembras del ganado bovino obtenida por el ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas y libre de calostro; que no ha sido sometida a ningún tratamiento a excepción del filtrado y/o enfriamiento, y está exento de color, olor, sabor y consistencia anormales. ⁽²⁸⁾

Se puede definir la leche desde los siguientes puntos de vista:

- **Biológico:** es una sustancia segregada por la hembra de los mamíferos con la finalidad de nutrir a las crías.
- **Legal:** producto del ordeño de un mamífero sano y que no representa un peligro para el consumo humano.
- **Técnico o físico-químico:** sistema en equilibrio, constituido por tres sistemas dispersos: solución, emulsión y suspensión. ⁽²⁴⁾

La vaca produce leche durante aproximadamente 300 días posteriores al nacimiento de las crías. La leche producida durante los primeros cuatro días es inadecuada para la elaboración de productos lácteos debido a su diferente composición y se le llama calostro, la cual es secretada antes y en los primeros días siguientes al parto. En sus caracteres externos esta leche difiere normalmente del aspecto de la leche normal, es de color entre amarillo claro y

normalmente del aspecto de la leche normal, es de color entre amarillo claro y castaño amarillento su consistencia es un tanto viscosa y el sabor es débilmente amargo-salado. (10, 19)

3.2. Secreción de la leche

El periodo de gestación es de unos doscientos setenta y ocho a trescientos días y cuando nace el ternero comienza inmediatamente la secreción de leche durante unos 300 días. La secreción de la leche esta regulada primordialmente por mecanismos hormonales; sin embargo la excreción de la leche se inicia a través de mecanismos nerviosos.

La leche se forma en las células del epitelio que recubre los alvéolos o acinos de la mama, que los contiene en gran numero. La secreción de la leche se produce en la ubre, que tiene cuatro cuartos y cada uno de ellos con su pezón y su glándula mamaria. En la mama de la vaca los acinos se reúnen en racimos formando lóbulos, estos se comunican por un conducto colector ramificado con la cisterna (seno galactóforo), situado en la base de la mama. Esta cisterna desemboca en el seno del pezón por un repliegue de la mucosa. El tejido glandular contiene alrededor de unos 2,000 millones de estos alvéolos; estos producen leche y va aumentando la presión interna hasta llegar a un limite, dejando entonces de producir leche que no pueden expulsar por si mismos. (19)

Unos músculos exteriores son los que presionan las células alveolares para que salga la leche hacia la cisterna de la ubre que tiene una capacidad de unos 300-

400 ml de leche. Los alvéolos así como la mama tienen un gran riego sanguíneo necesario para aportar los nutrientes que forman la leche. Los alvéolos están formados por una sola capa de células epiteliales, que son las responsables de secretar la leche, la función de estos es triple: 1) remover nutrientes de la sangre, 2) transformar estos nutrientes en leche y 3) descargar la leche en el lumen. ⁽¹⁹⁾

3.3 Mecanismo fisiológico de la secreción y la eyección de la leche.

El ordeño de la vaca se produce por un estímulo exterior que corresponde al que realiza el ternero en el pezón cuando quiere mamar; este es sustituido por otros estímulos que provocan la secreción de una hormona llamada oxitocina. Cuando la oxitocina es secretada en la sangre en unos sesenta segundos provoca una estimulación de la presión de los músculos sobre los alvéolos, con lo que la leche contenida en ellos pasa a la cisterna de la ubre y de allí al pezón, siendo extraída por los pezones a través del ordeño manual o por una máquina o por la succión del ternero. Al cabo de cuatro a siete minutos la oxitocina se diluye en la corriente sanguínea y la vaca deja de cooperar con el ordeño, por lo que esta operación se debe completar en el tiempo citado. La secreción láctea es un acto completamente involuntario, pero la salida de la leche está determinada por una reacción nerviosa al estímulo ejercido por las manipulaciones del ordeño. Los músculos involuntarios de la ubre se contraen provocando la salida de la leche. ⁽¹⁹⁾

3.4. Composición de la leche

Su composición química es muy compleja y completa, lo que refleja su gran importancia en la alimentación de las crías. La composición de la leche depende de las necesidades de la especie durante el periodo de crianza. La propiedad fundamental de la leche es la de ser una mezcla tanto física como química. Es una mezcla de sustancias definidas: lactosa, glicéridos de ácidos grasos, caseína, albúmina, sales, etc. Desde el punto de vista físico coexisten varios estados; emulsión, suspensión y solución. ⁽¹⁾

3.4.1 Composición química de la leche.

La composición química media de la leche de vaca son las siguientes:

Tabla Nº 1 Composición química media de la leche de vaca *

Constituyentes	Porcentajes
Agua	87.0%
Grasa	3.8%
Proteínas	3.5%
Lactosa	4.9%
Minerales	0.8%

* Referencia ⁽¹⁾

Aproximadamente el 85.0% de la leche es agua. La grasa es insoluble en agua y por ello se encuentra en la leche en forma de glóbulos grasos formando una emulsión. Después de cierto tiempo, la grasa se estratifica en forma de nata.

La grasa de la leche es una de las grasas alimenticias mas fácilmente digerible, es rica en energía y contiene vitaminas A, D y E. La cantidad de grasa en la leche es variable y esto depende de la raza y de la alimentación de la vaca. La

grasa contribuye mucho al sabor y a las propiedades físicas de la leche y de los productos lácteos. Las proteínas en la leche son la caseína, la albúmina y la globulina, estas son proteínas de alta calidad y son utilizadas en el desarrollo de los músculos y en el sustento del cuerpo. La lactosa da el sabor dulce a la leche, es un alimento de gran energía, el cual es absorbido lenta y uniformemente en el tubo digestivo. Las sales minerales o cenizas de la leche son cloruros, fosfatos, sulfatos, carbonatos y citratos. Los minerales principales son calcio, sodio, potasio, magnesio y hierro. Los minerales de la leche son los más necesarios para el crecimiento y mantenimiento de los huesos y se encuentran en la debida proporción, la cual varía en casos de enfermedades en la vaca. Aumenta el cloruro sódico y disminuye las demás sales. ⁽¹⁾

3.4.2 Características físicas de la leche

Algunas propiedades físicas dependen del total de los componentes: densidad, tensión superficial y calor específico; otras dependen de las sustancias disueltas: índice de refracción, punto de congelación y hay otras que solo depende de los iones: pH y conductividad. ⁽¹⁾

Tabla Nº 2 Propiedades físicas de la leche*

Propiedades físicas	Valores
Densidad de la leche completa (g/ml)	1.032
Densidad de la leche descremada (g/ml)	1.036
Densidad de la materia grasa (g/ml)	0.940
Poder calórico (por litro), calorías	700.0
pH	6.6 – 6.8
Conductividad eléctrica, mhos	45×10^{-4}

Tabla Nº 2 Continuación

Conductividad eléctrica, mhos	45×10^{-4}
Tensión superficial (dinas/cm/15°)	53.0
Viscosidad absoluta (15°)	0.0212 – 0.0354
Viscosidad específica	1.6 – 2.15
Índice de refracción	1.35
Punto de congelación	-0.55
Calor específico	0.93

* Referencia (1)

3.5 Microorganismos en la leche.

3.5.1 Microorganismos derivados de la ubre

Únicamente el canal galactóforo contiene por lo general gérmenes por lo cual constituye la primera fuente de infección para la leche. La leche extraída asépticamente de ubres sanas no es estéril, pero solamente contiene un pequeño número de bacterias, que se conocen como microorganismos de la ubre (por ejemplo la leche recién ordeñada puede tener 300 microorganismos/ml) ⁽²¹⁾. El contenido bacteriano de la leche recién ordeñada aumenta significativamente por la mastitis.

Los microorganismos causantes de la mastitis entran en la ubre por los pezones a través del canal del pezón, especialmente la zona adyacente al orificio, puede ser colonizados por microorganismos como es ***Staphylococcus aureus***, que permanece durante muchas semanas, contaminando la leche que sale de la ubre pero sin penetrar en la cisterna de la leche. Muchos microorganismos pueden originar mastitis en circunstancias especiales, pero los mas frecuentes

y los que causan mayores pérdidas económicas son, ***Escherichia coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Streptococcus agalactiae***, ***Streptococcus dysgalactiae*** y ***Streptococcus uberis***.⁽²⁴⁾

El ***Staphylococcus aureus*** es un patógeno para el hombre y se ha demostrado que algunas cepas productoras de mastitis de este microorganismo producen enterotoxinas.⁽²⁴⁾

3.5.2 Microorganismos que provienen del medio ambiente.⁽²⁴⁾

La importancia del ambiente como fuente de microorganismos en la leche cruda varía considerablemente. En los meses de verano, en los que la mayoría de las vacas pastan al aire libre, los niveles de contaminación son relativamente bajos. En las épocas de lluvia, en los que las vacas están al menos parcialmente estabuladas, la incidencia de contaminación ambiental es considerablemente más alta. En el ordeño manual o en el mecánico la leche está en contacto con el aire en el establo, los factores ambientales son una fuente de contaminación importante de la leche, especialmente por los microorganismos de la paja de la cama y de los alimentos del ganado.

3.5.3 Equipos de recogida de la leche.⁽²⁴⁾

Los equipos de recogida de la leche son una importante fuente de microorganismos en la leche y la principal de bacterias psicrótrofas Gram negativas causantes de alteraciones. Entre los factores que contribuyen a la

contaminación se incluyen los sistemas de tuberías mal diseñadas y construidas, la limpieza y desinfección inadecuada entre ordeños. El principal problema de los equipos se encuentra en los codos, juntas y accesorios del equipo, como las llaves de salida de los tanques, poco accesibles y que no se pueden limpiar *in situ*.

3.5.4. Personal. ⁽²⁴⁾

La contaminación directa de la leche por las manos de los empleados puede producirse durante el ordeño manual. También es posible que la leche se contamine a través de las manos que tocan la superficie de las ordeñadoras que contactaran con la leche.

En la práctica, no parece posible que por esta vía pase a la leche un número importante de microorganismos. Hay una posibilidad potencial de que puedan llegar así microorganismos patógenos. Pueden ser introducidos por una persona que tenga síntomas clínicos de infección o por otra fuente de contaminación como las heces. En cualquier caso es deseable que las personas implicadas en el manejo de la leche sean conscientes de sus responsabilidades como manipuladores de alimentos y reciban un completo entrenamiento con respecto a la higiene personal, exclusión durante las enfermedades.

3.6 Mastitis en el ganado bovino ⁽¹³⁾

La mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria de la vaca, la cual se deriva de la palabra griega “mastos” que significan “pechos” e “itis” que quiere decir inflamación. Se caracteriza por alteraciones física química y casi siempre bacteriológica de la leche, teniendo alteraciones patológicas en la ubre que generalmente son de origen infeccioso.

Entre las anomalías más importantes de la leche cabe mencionar el cambio de color, presencia de coágulos y de gran número de leucocitos. Aunque en muchos casos hay tumefacción, aumento de temperatura, dolor y endurecimiento de la glándula mamaria.

El propósito de la inflamación es doble:

- 1) Eliminar o neutralizar los microorganismos invasores, y
- 2) Ayudar a reparar los tejidos lesionados, para regresar la glándula a su normal funcionamiento.

3.6.1 Microorganismos causantes de mastitis ⁽¹³⁾

La mastitis de origen infeccioso es causada por bacterias y se ha encontrado que por lo menos 26 microorganismos pueden causar la enfermedad. Entre los grupos mas frecuentes están los siguientes:

- 1) ***Streptococcus***: ***Streptococcus agalactiae***, ***Streptococcus dysgalactiae***, ***Streptococcus uberis*** y ***Streptococcus ziiepidemicus***
- 2) ***Stafilococcus***: ***Stafilococcus aureus*** y ***Stafilococcus epidermidis***

- 3) Bacterias coliformes: ***Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes***.
- 4) Microorganismos que causan enfermedades específicas: ***Listeria*, *Bruscella*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Salmonellas***.
- 5) Otros agentes infecciosos: ***Micoplasma californicum*, *Nocardia sp.*, *Clostridium perfringens* y *Spherophorus necróphorus***.

3.6.2 Mastitis estafilocócica ⁽¹³⁾.

La mastitis estafilocócica está producida por el ***Staphylococcus aureus***. Los estafilococos están muy difundidos entre el hombre y los animales en buen estado fisiológico. En la vaca se encuentran en la superficie cutánea en particular sobre la piel de la ubre y los pezones. En estos puntos pueden incluso multiplicarse sin originar enfermedad.

La aparición de una enfermedad depende siempre de una predisposición, la mayor frecuencia de este tipo de mastitis hay que relacionarla con el tratamiento a base de antibióticos en la mastitis estreptocócica, ya que existen cepas de estafilococos resistentes a la penicilina, con lo cual la anulación de los estreptococos deja el organismo a merced de los estafilococos. A veces los estafilococos también pasan a la mama accidentalmente como consecuencia de aplicaciones descuidadas de antibióticos en las que se emplean instrumentales sucios. Entre todos los gérmenes causantes de mastitis también los estafilococos son particularmente frecuentes en infecciones mixtas, en unión de otros microorganismos como estreptococos, ***Escherichia coli*, *Streptococcus***

pyogenes y *Clostridium perfringens*. Como también el hombre alberga el *Staphylococcus aureus* sobre las mucosas, en la piel y en las heridas, existe la posibilidad de que se produzca un paso a la leche en el acto del ordeño.

3.6.3. Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera

Los antibióticos son drogas que se usan para combatir enfermedades causadas por diversos microorganismos tales como la mastitis, la neumonía o infecciones de las patas. Son administrados a los animales en diferentes formas, siendo las más comunes la intramamaria o la inyección intramuscular. La presencia de residuos de antibióticos en la leche es un problema que aqueja a toda la industria lechera, debido a que cantidades mínimas de antibióticos en la leche representan un problema de salud pública que no debe ser aceptado, además de ser ilegal. Se ha determinado que pequeñas cantidades de antibióticos en la leche, cantidades mínimas como 0.003 UI (unidades internacionales) de penicilina/ ml, pueden afectar a una persona que sea alérgica a dicho antibiótico causando problemas como ardor en la piel, comezón, asma y shock anafiláctico. Además, existe el problema de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos que puede reducir o eliminar por completo su acción y uso en el tratamiento de enfermedades. Otro problema relacionado con los antibióticos es la clara interferencia en el procesado de queso, mantequilla y yogurt. Su presencia disminuye el ácido y afecta el sabor

característico de la mantequilla. En el caso de los quesos, la presencia de antibióticos disminuye el cuajado de la leche y causa una mala maduración del queso. Basados en estos problemas los residuos de antibióticos en leche han atraído la atención a nivel mundial de los consumidores y de los legisladores generando reglas estrictas que controlan el uso de antibióticos en los ranchos lecheros. (34)

3.6.4 Antibióticos para el tratamiento de mastitis

La mastitis debe ser tratada con antibiótico del tipo de la penicilina G, ampicilinas, tetraciclinas, sulfamidas, oxitetraciclina, amoxicilina, eritromicina, ceftiofur, estreptomina o espiromicina y sulfamidas como la sulfametazina, aplicado por vía intramuscular y repetir la aplicación a las 24 horas, si es necesario. Según su gravedad por tres a cuatro días seguidos, debe hacerse énfasis en el aseo y vaciado previo de cada cuarto, antes del tratamiento. Se debe respetar los tiempos de desecho de la leche de vacas tratadas con antibióticos. Dichos tiempos de retiro son diferentes y dependen de la sustancia usada. No se debe vender la leche de vacas que han sido tratadas con antibióticos antes de que haya pasado el tiempo de retiro. Si por error se ordeñara una vaca tratada con antibióticos adentro del tanque de leche, se debe tirar toda la leche del tanque y volver a lavarlo antes de seguir ordeñando. Generalmente los tiempos de retiro de la leche vienen marcados en la etiqueta del producto, pero se debe siempre preguntar al veterinario. Por ejemplo un

tratamiento con: Eritromicina base 1,0 g y Amoxicilina trihidrato 2,0 g. Se debe discontinuar el tratamiento 14 días antes de la faena del animal para consumo humano. No destinar la leche (con o sin manufactura previa) para consumo humano hasta pasadas 96 hs. del último tratamiento (6 ordeños). (22, 24, 26).

Otra forma habitual de tratar la mastitis es la inyección intramuscular de ceftiofur, ya que después del tratamiento la leche se puede vender. Esto se debe a que cuando el fármaco se usa correctamente los niveles de residuos en la leche son muy bajos (menos de 2ppb). Los niveles detectables generalmente son consecuencia de una utilización incorrecta, pero es posible que inyecciones diarias sucesivas puedan ocasionar que los residuos se acumulen hasta niveles detectables incluso cuando se administran la dosis correcta. (24)

3.7 Queso

Queso: el producto blando, pastoso, granulado, semi duro, duro, extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

- a) Coagulación total o parcial de la proteína de leche , leche desnatada (descremada), leche parcialmente desnatada (descremada), nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla (manteca), o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como

consecuencia de dicha coagulación; y/o

- b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o productos obtenidos de la leche y que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas, y organolépticas que el producto definido en el apartado (a). (29)

Queso fresco: es el queso no maduro ni escaldado, moldeado de textura relativamente firme, levemente granular; preparado con leche entera, semidescremada, o descremada, cuajado con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácteos. También se designa como queso blanco. (29)

El término actual de “queso” se deriva del latín “caseus”. Según la FAO “queso” es el producto fresco o madurado obtenido por drenaje tras la coagulación de la leche, nata, leche desnatada total o parcialmente, grasa láctica o una combinación de estos componentes. (21)

Los quesos frescos son aquellos en los que la elaboración consiste únicamente en cuajar y deshidratar la leche. A estos quesos no se les aplican técnicas de conservación adicionales, por lo que aguantan mucho menos tiempo sin caducar. Su mantenimiento se podría comparar al de los yogures, pues es necesario conservarlos en lugares refrigerados. El hecho de procesar la leche en menor medida hace que tengan sabores suaves y texturas poco consistentes. (21)

3.7.1 Clasificación de los quesos.

Según el código alimentario se clasifican según el proceso de elaboración y el contenido en grasa láctea (%) sobre el extracto seco.

Según sea el proceso de elaboración:

1. Fresco y blanco pasteurizado: el queso fresco es aquel que está listo para consumir tras el proceso de elaboración y el blanco pasterizado es el queso fresco cuyo coágulo se somete a pasterización y luego se lo comercializa.
2. Afinado, madurado o fermentado: es aquel que luego de ser elaborado requiere mantenerse durante determinado tiempo (dependiendo del tipo de queso) a una temperatura y demás condiciones para que puedan generarse ciertos cambios físicos y/o químicos característicos y necesarios.

Según sea el contenido de grasa (%), sobre el extracto seco (sin agua)

- Desnatado: contiene como mínimo 10% de grasa
- Semidesnatado: con un contenido mínimo del 10% y un máximo del 25%.
- Semigraso: con un contenido mínimo del 25% y un máximo de 45% graso:
contenido mínimo de grasa del 45% hasta un máximo del 60%
- Extragrasso: con un contenido mínimo del 60%. (35)

Los quesos según la Norma Salvadoreña para quesos no maduros, especificaciones (NSO 67.01.04:05), se clasifican de acuerdo a su composición y características físicas en los siguientes tipos: (29)

Tabla Nº 3 Clasificación de los quesos de acuerdo a su composición y características físicas.

a) Queso cottage	b) Queso cottage bajo en grasa
c) Queso ricotta alto en grasa	d) Queso ricotta
e) Queso quark	f) Queso crema
g) Queso crema bajo en grasa	h) Queso fresco bajo en grasa
i) Queso fresco	j) Quesillo
k) Queso de suero o requesón	l) Queso de capas
m) Queso duro	n) Queso mozzarella

3.7.2 Propiedades nutricionales del queso

Los datos nutricionales del queso pueden variar en función de su contenido en grasa, pero en general se puede decir que es una rica fuente de calcio, proteínas, y fósforo. Al tratarse básicamente de leche concentrada, hacen falta 600 gramos de leche para igualar esta cantidad de proteínas, y 550 gramos para la de calcio. ⁽³⁵⁾

3.7.3 Los peligros del queso fresco

Debe mantenerse la cadena del frío, puesto que rupturas de la misma inducirán a la multiplicación de bacterias de riesgo. El queso fresco se caracteriza por ser un producto poco fermentado, aunque ligeramente ácido (pH entorno a 5,3), muy líquido (actividad del agua de 0,9), con un bajo porcentaje de sal (menor al 15%) y con un potencial de óxido-reducción electronegativo (ausencia de oxígeno). Estas condiciones permiten el desarrollo de muchos microorganismos

propios de la leche y de contaminación ambiental. Por este motivo, es esencial que en este producto se realice siempre una pasteurización previa de la leche.

Por otra parte si existen microorganismos patógenos en la masa elaborada, claramente se permitirá su multiplicación, aumentando enormemente el riesgo sanitario.

En estas condiciones, la refrigeración del queso es muy importante. Debe mantenerse de forma constante la cadena del frío, puesto que rupturas de la misma inducirán a la multiplicación de bacterias de riesgo. Entre ellas hay que destacar:

- ***Brucella y Mycobacterium***. Propios de la materia prima, es decir, de la leche cruda si los animales están enfermos o son portadores. Son los responsables de las fiebres de malta y de la tuberculosis, respectivamente.
- ***Clostridium botulinum***. Propia de las superficies, así como de los suelos, polvo e incluso algunas materias fecales contaminadas.
- ***Salmonella***. Microorganismo de origen fecal procedente de animales o de personas portadoras.
- ***Staphylococcus aureus***. De origen propio de la piel de animales y personas, pero también abundante en agua y algunas superficies contaminadas con materiales o restos animales contaminados.
- ***Listeria monocytogenes***. Microorganismo que podemos encontrar en cualquier parte, aunque sus condiciones más favorables de crecimiento son productos anaerobios y refrigerados. En ellos su velocidad de crecimiento

puede ser especialmente alta.

- ***Escherichia coli***. Al igual que ***Salmonella***, es un contaminante fecal.

Además de éstos, hay una gran cantidad de microorganismos que podrán crecer en el queso fresco si los animales de los que proceden o el procesado al que se ha sometido el queso, no ha sido suficiente. De entre todos ellos son especialmente peligrosas las enterobacterias, puesto que pueden crecer en diversas condiciones con velocidades muy altas.

Hasta tal punto es así que los sistemas de moldeado y los de refrigeración suelen estar contaminados en la casi totalidad de las instalaciones, sobre todo si son de tipo artesanal. Incluso, si se emplean procesos de picado o troceado, entre otros, que requieren una manipulación o corte del producto final, se contaminan con facilidad, quedando los microorganismos adheridos a las superficies. En estos casos es realmente complicada la eliminación de los patógenos, lo que hace que la instalación y el producto en general se encuentre contaminado de forma recurrente. (35, 36)

3.8. *Staphylococcus aureus*

El ***Staphylococcus aureus*** es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas, que se dividen en más de un plano, por lo que se agrupan regularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de esporas. Son gram positivas y pertenece a la familia *micrococcaceae*. Su metabolismo es de tipo fermentativo, son aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positiva y oxidasa

negativo. Son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gases y producen acetil metil carbinol. Fermentan el manitol con formación de ácidos y puede hacerlo en anaerobiosis. No hidrolizan el almidón y son capaces de crecer en presencia de un 40% de bilis. Soportan tasas elevadas de cloruro sódico, hasta un 15%. La temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 °C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pHs mucho más extremos. Poseen una enzima, la coagulasa, que los diferencia del resto de las especies del género; esta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina. Poseen igualmente una desoxirribonucleasa (Dnasa) que es una nucleasa exocelular que depolimeriza el ADN. A esta enzima se la denomina termonucleasa por ser termo resistente en las cepas de ***Staphylococcus aureus***. (25)

Sobre medios sólidos crece dando colonias que suelen ser de color dorado o amarillo, aunque es posible que algunas carezcan de pigmento. La mayoría de los cultivos que producen enterotoxina son coagulasa positivos (coagulan el plasma sanguíneo), son facultativos en cuanto a su exigencia de oxígeno en un medio glucosado complejo, aunque en aerobiosis crecen mejor que en anaerobiosis. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y mucosas de los humanos; se encuentran en el ambiente externo y en las fosas nasales del 20 al 40% de los adultos, otros sitios de colonización son los pliegues cutáneos, el periné, axilas y la vagina. Causan supuración, formación de absceso, varias infecciones pirógenas e incluso septicemia mortal. (4, 11)

Los factores que pueden predisponer a un individuo a infecciones graves por ***Staphylococcus aureus***, incluyen las siguientes:

- Defectos quimiotáticos de los leucocitos (p. ej., diabetes mellitus y artritis)
- Lesiones cutáneas (p. ej., quemaduras, incisiones quirúrgicas, eccema)
- Presencia de cuerpos extraños (p. ej., suturas, catéteres intravenosos, prótesis)
- Administración profiláctica o terapéutica de agentes antimicrobianos. (11)

3.8.1 Resistencia

Staphylococcus aureus posee resistencia mediante una beta lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta lactamasa está codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas.

La resistencia al óxido nítrico es una cualidad peculiar del ***Staphylococcus aureus***, capacidad que lo distingue de otros patógenos, incluyendo los comensales ***Staphylococcus epidermidis*** y ***Staphylococcus saprophyticus***. Esa resistencia se debe a que el microorganismo produce una enzima llamada lactato deshidrogenasa, que la faculta para tolerar el estrés causado por el radical del óxido nítrico. Esta observación se ha hecho en especies resistentes a la metilina como las que son susceptibles al antibiótico, así como en cepas hospitalarias como adquiridas en la comunidad. Los estafilococos muestran susceptibilidad variable ante muchos antimicrobianos. La resistencia puede clasificarse en diferentes tipos:

1. La producción de β -lactamasa bajo el control de un plásmido es común y confiere al microorganismo resistencia a muchas penicilinas (penicilina G, ampicilina, ticarcilina y fármacos similares).
2. La resistencia a la nafcilina (a meticilina y oxacilina), es independiente de la producción de β -lactamasa. El gen *mecA* de la resistencia a la nafcilina reside en el cromosoma. El mecanismo de resistencia a la nafcilina se vincula con ausencia o inaccesibilidad de ciertas proteínas de enlace a la penicilina (PBP) en los microorganismos.
3. La tolerancia implica que un fármaco inhibe los estafilococos pero no los mata. Es decir, hay una diferencia muy grande entre la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de un antimicrobiano. La tolerancia puede atribuirse a la falta de activación de las enzimas autolíticas de la pared celular.
4. Los plásmidos también pueden ser portadores de genes de resistencia a las tetraciclinas, eritromicinas, aminoglucósidos y otros fármacos. Todos, salvo algunas cepas de estafilococos, aún son susceptibles a la vancomicina. (4)

3.8.2 Intoxicación alimentaria por *Staphylococcus*.

Una de las intoxicaciones alimentarias que se presentan con mayor frecuencia es la originada por la ingestión de la enterotoxina que se forma en los alimentos cuando en los mismos se multiplican ciertas cepas de ***Staphylococcus aureus***.

La toxina recibe la denominación de enterotoxina porque produce

gastroenteritis o inflamación de la mucosa que reviste el tracto gastrointestinal. No todos los estafilococos coagulas positivos son necesariamente enterotoxigénicos. Algunos cocos productores de toxina son muy halotolerantes (toleran concentraciones de NaCl del 10 al 20 por ciento), y también toleran bastante bien los nitritos y de aquí que, si las demás condiciones del medio son favorables, sean capaces de crecer en las soluciones de adobado y en la superficie de las carnes en adobo o adobadas. En general, cuanto mejor es el alimento como medio para que se multipliquen los cocos, tanto más amplios son los intervalos correspondientes a la temperatura, al pH y a_w (índice de agua) dentro de los cuales puede tener lugar su multiplicación. El intervalo de temperaturas dentro del cual tienen lugar la multiplicación y la producción de toxina está comprendido entre los 4 y los 46°C aproximadamente, según el alimento de que se trate. Normalmente, los estafilococos penetran en los alimentos en escasa cantidad y son superados en número por las bacterias que compiten con ellos en los alimentos frescos. No obstante, es posible que en los alimentos que han sido sometidos a tratamiento térmico esta competición no exista, razón por la cual es posible que tenga lugar la multiplicación sin restricción de los estafilococos. (10, 11, 26).

Los estafilococos cada vez adquieren mayor importancia como agentes de mastitis en las vacas, y algunos de estos cocos son capaces de producir enterotoxina en la leche o en los productos lácteos. En este tipo de intoxicación, el período de incubación (tiempo transcurrido entre la ingestión del

alimento y la aparición de los primeros síntomas) suele ser corto, pues suele tener una duración de 2 a 4 horas (oscilando desde 1 a 7 horas), diferenciándose a este respecto de las demás intoxicaciones e infecciones alimentarias corrientes, las cuales suelen tener un período de incubación de mayor duración. Los síntomas más corrientes en el hombre son: salivación, a continuación náuseas, vómitos, arcadas, retortijones abdominales de intensidad variable, y diarrea. En los casos de intoxicación grave, en las heces y en los vómitos se pueden encontrar sangre y mucosidad. Es posible que se presenten cefalalgia, calambres musculares, sudoración, escalofríos, abatimiento, pulso débil, shock, y respiración superficial. Por lo general, en lugar de fiebre, se registra una temperatura corporal inferior a la normal. Su curso es corto, generalmente de un día o dos, y normalmente la curación es total y sin complicaciones. La mortalidad es extraordinariamente baja, por lo general, no se administra tratamiento alguno, a no ser que se trate de casos graves, en cuyo caso se puede administrar solución salina por vía parenteral con el fin de restablecer el balance salino y combatir la deshidratación. (11)

3.8 El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar).

Es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

3.9.1 Fundamentos teóricos de la prueba de difusión en disco de Kirby-

Bauer ⁽³⁰⁾

La prueba de difusión en disco se basa en la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando un gradiente continuo de concentración. Si el disco que contiene el antibiótico se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco de inhibición del crecimiento. Esta área, al ser proporcional a la CMI (concentración inhibitoria mínima) permitirá la distinción de cepas sensibles, resistentes o intermedias. Esta prueba está estandarizada y se acepta universalmente, si se realiza adecuadamente con los controles necesarios.

3.9.2 Puntos críticos ⁽³⁰⁾

- a) Concentración del inóculo. La concentración ideal del inóculo corresponde a una dilución de turbidez 0,5 en la escala de McFarland. Concentraciones diferentes pueden dar lugar a interpretaciones erróneas de los resultados.
- b) Medio. El medio adecuado para realizar la prueba es el Mueller-Hinton (MH). Para determinadas bacterias con requerimientos nutricionales específicos se pueden utilizar el MH-sangre o el MH-chocolate.
- c) Concentración de los discos de antibiótico. Para cada antimicrobiano hay fijadas unas concentraciones estándar. La variación de estas concentraciones implica variar los criterios de interpretación.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio fue experimental, transversal y prospectivo.

- **Experimental:** ya que se realizó el aislamiento, identificación y determinación de la multirresistencia del *Staphylococcus aureus*, en muestras de leche, queso fresco y manipuladores; que se recolectaron en dos queserías ubicadas en el Municipio de San José Villanueva, Departamento de La Libertad.
- **Transversal:** porque se llevó a cabo durante un período aproximado de 14 meses, en donde se estudió el problema de interés.
- **Prospectivo:** porque los resultados que se obtuvieron en el estudio servirán para futuras investigaciones ya que es el primer estudio que se hace sobre resistencia bacteriana en cepas aisladas en quesos frescos artesanales.

4.2 Investigación Bibliográfica.

Se realizó en las Bibliotecas de:

- Facultad de Química y Farmacia “Dr. Benjamín Orozco” de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de las Ingenierías de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.

- Biblioteca Central de la Universidad Nueva San Salvador
- Biblioteca Central de la Universidad Evangélica de El Salvador.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS).
- Internet.

4.3 Investigación de Campo, Universo y Muestra.

Se seleccionaron muestras de lavado de manos de manipuladores, leche cruda y queso fresco artesanal, que se recolectaron en dos queserías ubicadas en el Municipio de San José Villanueva, Departamento de La Libertad. Las cuales se analizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Universo: Las queserías ubicadas en el Municipio de San José Villanueva, Departamento de La Libertad.

Muestra: Dirigida puntual de los productos lácteos y de todo el personal que laboran en ambas queserías ubicadas en el centro del Municipio de San José Villanueva, Departamento de La Libertad.

Tabla Nº 4 Producción diaria y el personal que labora en las queserías en estudio

Queserías	Leche Total por Quesería (Botellas)	Queso (Unidades)	Personal (P)
QS	370	61	2
QJ	440	70	3
Total	810	131	5

4.3.1 Tipo de muestreo. ⁽¹⁶⁾

En esta investigación se realizó una prueba piloto; donde se recolectaron 5 muestras de queso fresco y 5 muestras de leche por quesería, además se tomaron muestras de lavado de manos del total del personal que laboran en ambas queserías; haciendo un total de cinco manipuladores. Las muestras se tomaron de la siguiente manera:

Tabla N° 5 Cantidades de muestras a tomar de las queserías en estudio.

Queserías	Muestras de Leche		Muestras de Queso		Manipuladores	
	Cantidad de muestras	Vol. aprox. en (mL)	Cantidad de muestras	Peso aprox. en (g)	Cantidad	Unidad a analizar
QS	5	100 mL	5	80 0g	2	2 manos
QJ	5	100 mL	5	80.0 g	3	2 manos
Total	10	1000 ml	10	800.0 g	5	10 manos

Cada muestra se trabajo por triplicado y los resultados obtenidos, a partir de esta prueba piloto, sirvieron para trabajar la fórmula para el muestreo aleatorio simple, que se presenta a continuación:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{d^2} \quad , \text{ donde:}$$

Error de muestreo $d = 5\%$,

Nivel de confianza del 95% $z = 1.96 \%$

Proporción de producto satisfactorio $p = 1.0 \%$

$$q = 1 - p$$

n = numero de muestras representativas

Sustituyendo la formula:
$$n = \frac{(1.96)^2 (0.01)(0.99)}{(0.05)^2} = 15.0$$

Lo que significa que para futuras investigaciones solamente se tomarían un promedio de 15 muestras representativas para el análisis.

4.3.2 Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa El StatAdvisor, este programa ejecutó un análisis de varianza (ANOVA), de varios factores con respecto a la multirresistencia para determinar que factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre ésta. También evaluó la significancia de las interacciones entre los factores.

ANOVA Multifactorial - Multirresistencia

Variable dependiente: multirresistencia

Factores: antibiótico

muestra

Número de casos completos: 150

4.3.3 Formulación de la hipótesis

Hipótesis Nula

H₀ = La multirresistencia no depende del origen de la muestra ni del tipo de antibiótico.

Hipótesis Alternativa

H_i = La multirresistencia depende del origen de la muestra y del tipo de antibiótico.

4.4 Parte Experimental

4.4.1. Selección de la Muestra.

Se visitaron dos queserías ubicadas en el Municipio de San José Villanueva, Departamento de La Libertad, de las cuales se seleccionaron cinco muestras de leche cruda y cinco muestras de queso fresco en cada una de las queserías, así como también se tomó muestra de lavado de manos del total de manipuladores (cinco) que laboran en ambas queserías.

4.4.2. Procedimiento para la toma de muestras para el análisis.

Para el análisis microbiológico se obtuvieron muestras de:

- c) Lavado de manos de los manipuladores.
- d) Leche cruda.
- e) Queso fresco artesanal.

Estas se trasladaron de las queserías al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de CENSALUD, en condiciones adecuadas de refrigeración y debidamente etiquetadas.

4.4.3. Procedimiento para la preparación de las muestras. Preparación de diluciones. ⁽³⁾

4.4.3.1 Muestra de Queso Fresco

Con un algodón impregnado de alcohol se frotó la superficie externa del contenedor de la muestra con el fin de quitar cualquier suciedad externa que

podiera existir y alterar los resultados.

1. Se pesó asépticamente 10.0 g de queso fresco.
2. Se transfirió a una bolsa de stomacher y se adicionaron 90.0mL de buffer fosfato pH 7.2
3. Se homogenizó en un stomacher por dos minutos a 360 r.p.m.
4. Se transfirió la solución a un frasco de dilución. Esta se tomó como la dilución 10^{-1} .
5. Se mezcló cuidadosamente la dilución agitando 25 veces en forma de arco de 30 cm.

4.4.3.2 Muestra de Leche Cruda.

Con un algodón impregnado de alcohol se frotó la boca del recipiente que contiene la muestra con el fin de quitar cualquier suciedad externa que pudiera existir y alterar los resultados. La muestra se agitó 25 veces en forma de arco de 30 cm. para homogenizar su contenido.

1. En un frasco de dilución, con 90.0 ml de búfer fosfato pH 7.2, se agregó en forma aséptica con pipeta estéril 10.0 ml de muestra.
2. Se mezcló cuidadosamente la dilución agitando 25 veces en forma de arco de 30 cm. Esta se tomó como la dilución 10^{-1} .

4.4.3.3 Toma de muestra de lavado de manos de manipuladores.

1. Se vertió el agua peptonada buferada del frasco (100 mL) en una bolsa plástica estéril.

2. Se introdujeron las manos a muestrear (una a una) hasta la altura de la muñeca.
3. Se solicitó al manipulador que realizara un frotado de los dedos y manos particularmente de las uñas y la palma de las mano durante un minuto.
4. Luego de retirar las manos se anudó la bolsa. Esta se tomó como la dilución de 10^{-1} .

4.4.4. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* para cada una de las muestras. ⁽³⁾

De la dilución 10^{-1} se transfirieron asépticamente 1 mL y se distribuyó equitativamente (0.3, 0.3 y 0.4 mL) a 3 placas con agar Baird Parker.

1. Se distribuyó el inóculo sobre la superficie del agar usando un rastrillo de vidrio en L. Las placas se dejaron en posición horizontal hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.
2. Se incubaron por un tiempo de 45-48 horas a una temperatura de 35°C.
3. Se seleccionaron las placas que contenían de 10 a 100 colonias con apariencia típica de *Staphylococcus aureus*. Las colonias de *Staphylococcus aureus* son circulares, lisas, convexas, húmedas, de 2 a 3 mm de diámetro en las placas no amontonadas, de color gris a negro azabache, frecuentemente con el margen de luz blanquecino, rodeado por una zona opaca y frecuentemente con una zona clara exterior, las colonias tienen consistencia gomosa cuando son tocadas por la punta de un asa.

4. Se observaron varias colonias típicas de ***Staphylococcus aureus*** en las placas seleccionadas, las cuales se contaron separadamente, tomando solamente aquellas que tenían apariencia típica de ***Staphylococcus***.
5. Se Seleccionaron de cada placa cinco colonias sospechosas de ser ***Staphylococcus aureus***, se realizó la prueba para la producción de coagulasa, y se obtuvieron resultados positivos, se multiplico el número de colonias de cada placa por el factor de dilución de la muestra. Se reportó este número como el número de ***Staphylococcus aureus*** por gramo de muestra probado (UFC/g).

4.4.5. Pruebas de confirmación para *Staphylococcus aureus*.

4.4.5.1. Prueba de la Coagulasa

1. Se transfirieron colonias sospechosas de ***Staphylococcus aureus*** en tubos pequeños que contenían de 0.2 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) que se emulsionó completamente.
2. Se incubó el cultivo que contenía BHI a una temperatura de 35°C por un tiempo de 18 a 24 horas. Se agregó 0.5 mL de coagulasa de plasma humano al cultivo de BHI y se mezcló completamente.
3. Se incubaron a una temperatura de 35°C y se incubó por un período de 24 horas hasta la formación de coagulo. Se formó un firme y completo coágulo que se quedó en el lugar cuando el tubo se inclinó o se invirtió por lo que la prueba fue considerada positiva para ***Staphylococcus***

4.4.5.2. Prueba de la Catalasa

1. Se agregó con gotero una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %, colocándola sobre el portaobjetos de vidrio, limpio y seco.
2. Se tomó el centro de una colonia sospechosa de *Staphylococcus aureus* de 18-24 horas agregándola sobre la gota de peróxido de hidrógeno. Se observó la formación inmediata de burbujas siendo resultado positivo.

4.4.6. Prueba de Sensibilidad por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer), para el *Staphylococcus aureus* aislado. ⁽¹⁷⁾

4.4.6.1. Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland).

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó como estándar o patrón de comparación una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland), preparada de la siguiente manera: Se agregó 0,5 ml de una solución de BaCl₂ 1% (P/V) a 9,5 mL de una solución de H₂SO₄ 1% (V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión. Esta corresponde a una concentración bacteriana de 1x10⁸. (Ver anexo Nº 1)

4.4.6.2. Preparación del inóculo

- a. De una placa de cultivo con el microorganismo aislado de las muestras incubadas por 18 - 24 h, se seleccionaron colonias aisladas y se preparó una suspensión directa en solución salina al 0.9 %.

- b. La suspensión se ajustó inmediatamente a la escala 0,5 de Mc. Farland. Se realizó a la vez, una suspensión con la bacteria de referencia (*Staphylococcus aureus* ATCC 29737).

4.4.6.3. Inoculación de las Placas

1. Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de líquido.
2. Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de haber colocado los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial se absorbiera. Esto se realizó por triplicado.

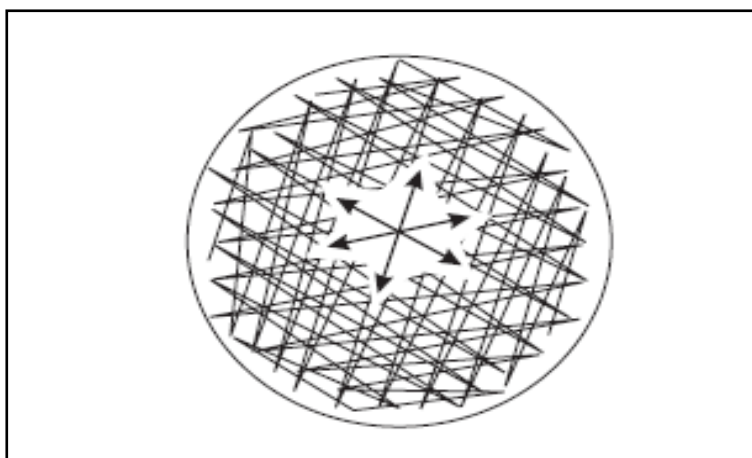


Fig. Nº 1 Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar Mueller Hinton

4.4.6.4. Aplicación de los discos

Los discos de sensibilidad utilizados fueron: ciprofloxacina, penicilina G, eritromicina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazole y amoxicilina/ácido clavulánico.

- 1) Se colocaron los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco asegurándose un contacto completo con la superficie del agar.
- 2) Los discos no se removieron una vez que tomaron contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.



Fig. Nº 2 Modo empleado para la colocación de discos de antibióticos en el agar

4.4.6.5. Incubación

Se incubaron las placas a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, por un periodo de 16 – 24 horas. Después del tiempo de incubación se examinó cada placa y se midieron los diámetros de los halos

de inhibición alrededor de cada disco. (Ver tablas de resistencia y sensibilidad en anexo N° 2 y 3)

4.4.6.6. Lectura de las placas e interpretación de los resultados.

1. Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando un calibrador. Se mantuvo iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas del calibrador por efecto de paralelismo.
2. El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

Los diámetros de inhibición fueron interpretados basándose en las tablas N°10 y 11, (ver anexo N° 2 y 3). La sensibilidad de la cepa bacteriana fue reportada como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R)



Fig. N° 3 Discos de antibióticos con sus respectivos halos de resistencia.

CAPITULO V
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

5.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

El muestreo realizado en las dos queserías (QS y QJ) ubicadas en San José Villanueva departamento de la Libertad para la obtención de 25 muestras divididas de la siguiente manera: 10 muestras de leche, 10 muestras de queso, 5 muestras de lavado de manos de los manipuladores, y su posterior análisis microbiológico, dio como resultados los datos que a continuación se presentan. (Ver anexo N° 8)

5.1 Guía de observación para el diagnóstico de las condiciones higiénicas de las queserías en estudio.

Se realizó una lista de chequeo para la observación de las condiciones higiénicas de las queserías en estudio dando los resultados siguientes:

1. Cuenta con el espacio suficiente para el desarrollo de las actividades.

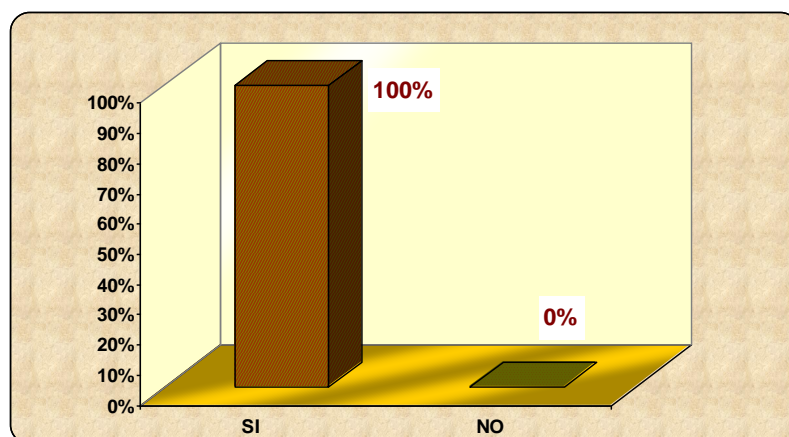


Figura N° 4 Espacio suficiente para el desarrollo de las actividades. (n = 2 queserías)

Como se puede observar en la figura N° 4, el 100% de las queserías cuentan con el espacio suficiente para la elaboración de sus productos lácteos.

La quesería QS cuenta con un local solamente para la elaboración de sus productos lácteos mientras que en la quesería QJ los productos que laboran los hacen en la casa donde habitan al aire libre. A pesar que ambas queserías cuentan con el espacio suficiente este no es el adecuado para la fabricación de los productos lácteos.

2. Cuenta con servicio de agua potable.

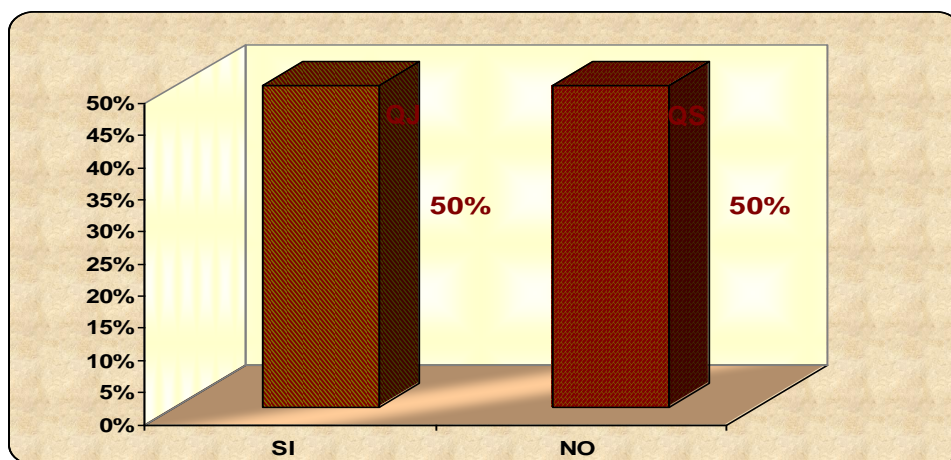


Figura N° 5 Servicio de agua potable. (n = 2 queserías)

En la figura N° 5, se muestra que el 50% de las queserías en estudio cuentan con servicio de agua potable, lo que significa que solamente una de las queserías en estudio posee agua potable (quesería QS) mientras que la quesería QJ no cuenta con servicio de agua potable, siendo éste un factor indispensable para las buenas prácticas de fabricación.

3. Cuántas veces se hace limpieza en el lugar de trabajo.

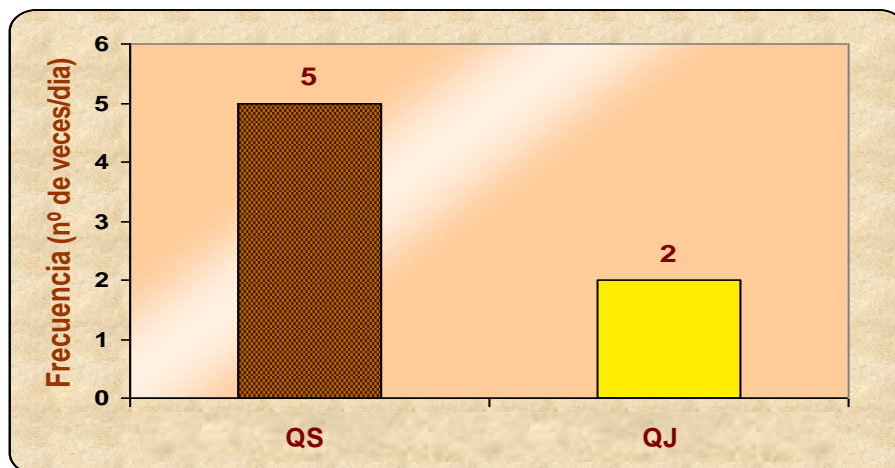


Figura Nº 6 Frecuencia de limpieza en el lugar de trabajo. (n = 2 queserías)

En la Figura Nº 6, se muestra la cantidad de veces que ambas queserías realizan el aseo en su lugar de trabajo. Como podemos observar en la quesería QS se realiza la limpieza cinco veces al día, mientras que en la quesería QJ hacen la limpieza dos veces al día.

4. Utilizan desinfectantes para limpiar el área de trabajo.

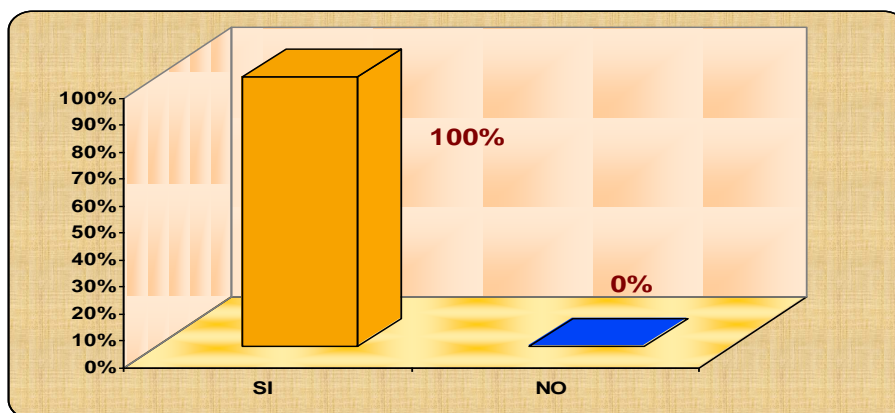


Figura Nº 7 Utilización de desinfectantes para limpiar el área de trabajo. (n = 2 queserías)

Como se muestra en la figura N° 7, el 100% de las queserías en estudio utilizan desinfectante para limpiar el área de trabajo. Como desinfectante utilizan lejía en solución o pura dependiendo del caso. En ambas queserías para desinfectar el área de trabajo utilizan lejía pura, para lavar pisos utilizan lejía diluida.

5. Cada cuanto tiempo utilizan estos desinfectantes:

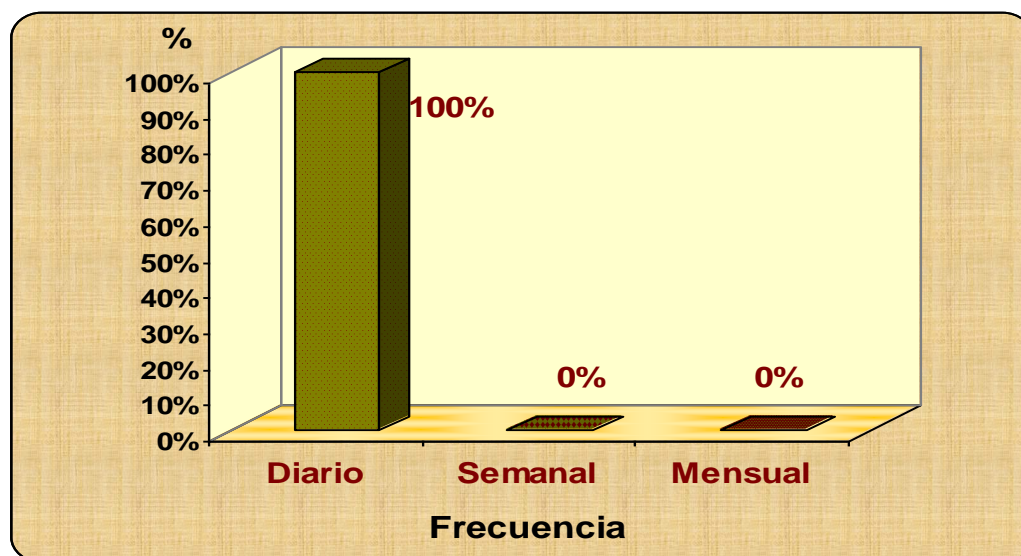


Figura N° 8 Frecuencia en que utilizan los desinfectantes. (n = 2 queserías)

En la figura N° 8, se muestra que el 100% de las queserías utilizan desinfectante diariamente para el aseo tanto de su lugar de trabajo como para lavar los utensilios y demás cosas que utilizan para la elaboración de sus productos lácteos.

6. Cuentan con el equipo e indumentaria adecuada como:



Figura N° 9 Cuentan con el equipo de indumentaria adecuada en la quesería QS. (n = 2 manipuladores)

La figura N° 9 se muestra que el personal que labora en la quesería QS el 100% utiliza botas de hule y delantales; mientras que la otra indumentaria como malla para el cabello, guantes y ropa especial el 100% del personal no lo utilizan.

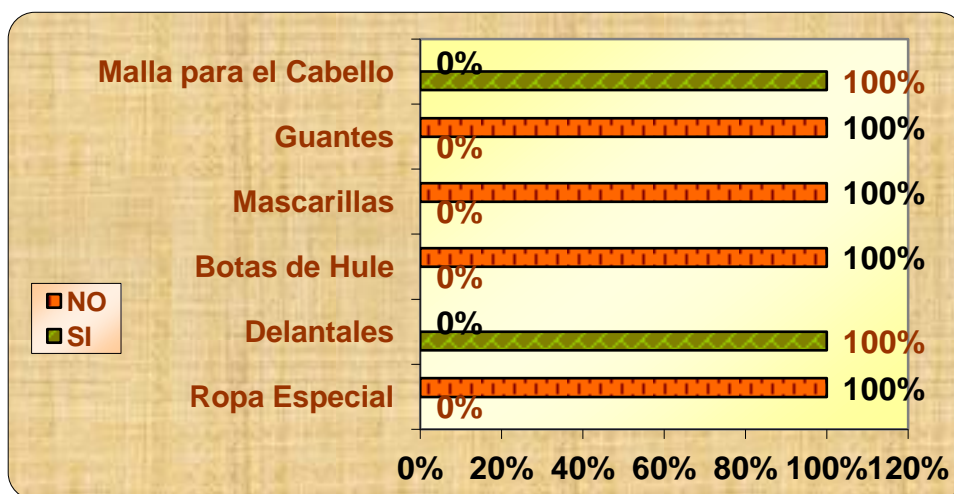


Figura N° 10 Cuentan con el equipo de indumentaria adecuada en la quesería QJ. (n = 3 manipuladores)

La figura N° 10 se muestra que el personal que labora en la quesería QJ el 100% utiliza malla para el cabello y delantales; mientras que la otra indumentaria como botas de hule, guantes y ropa especial el 100% del personal no lo utilizan. Como se puede observar en las figuras N° 9 y 10 los manipuladores que trabajan en ambas queserías no cuentan con la indumentaria apropiada para poder elaborar sus productos lácteos, lo que trae como consecuencia que dichos productos no tengan la calidad apropiada para el consumo humano.

7. El personal que labora usa maquillaje, aritos u otros accesorios

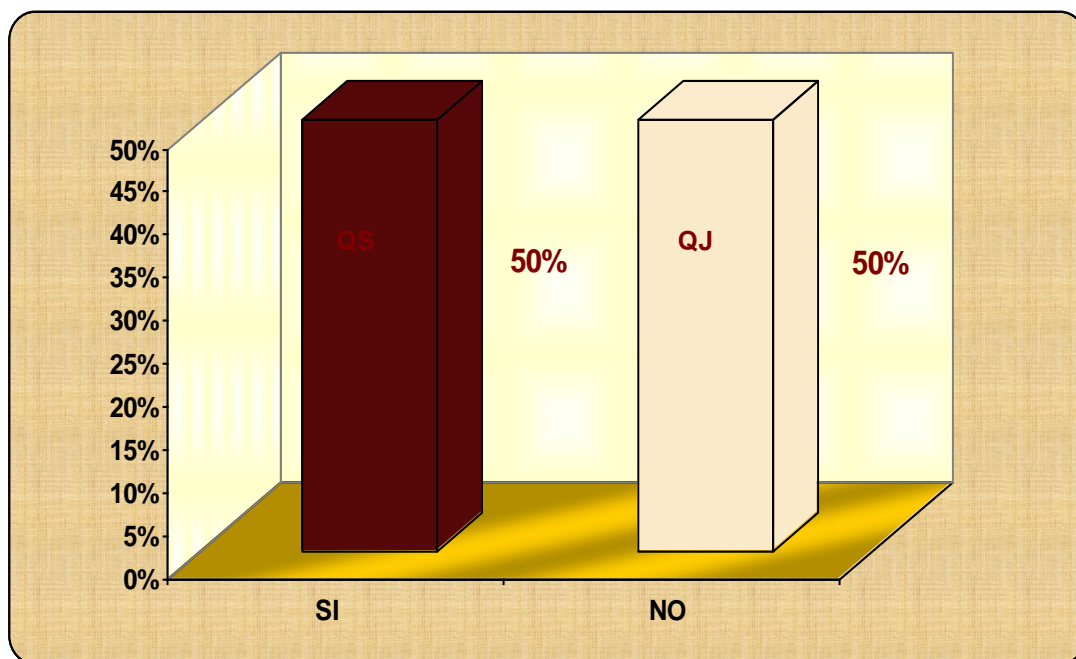


Figura N° 11 Utilización de maquillaje, aritos u otros accesorios por parte del personal de las queserías. (n = 5 total de manipuladores)

La figura N° 11, muestra que el 50% de los manipuladores de las queserías en estudio utilizan maquillaje, aritos u otro tipo de accesorios. Los manipuladores que laboran en la quesería QS utilizan aritos.

7. Cuantas veces se lavan las manos el personal que laboran en las queserías.

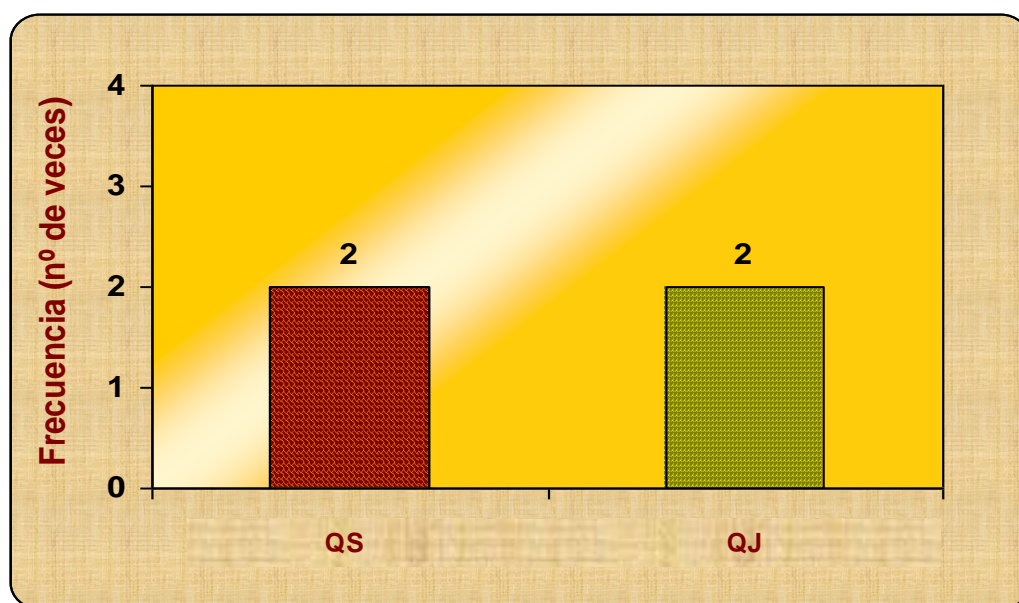


Figura N° 12 Frecuencia con que el personal se lava las manos. (n = 5 total de manipuladores)

En la figura N° 12, se muestra que el personal que labora en ambas queserías se lava las manos dos veces (antes y después), en el proceso de fabricación de sus productos lácteos.

9. Lavan los utensilios necesarios antes y después de la elaboración del queso.

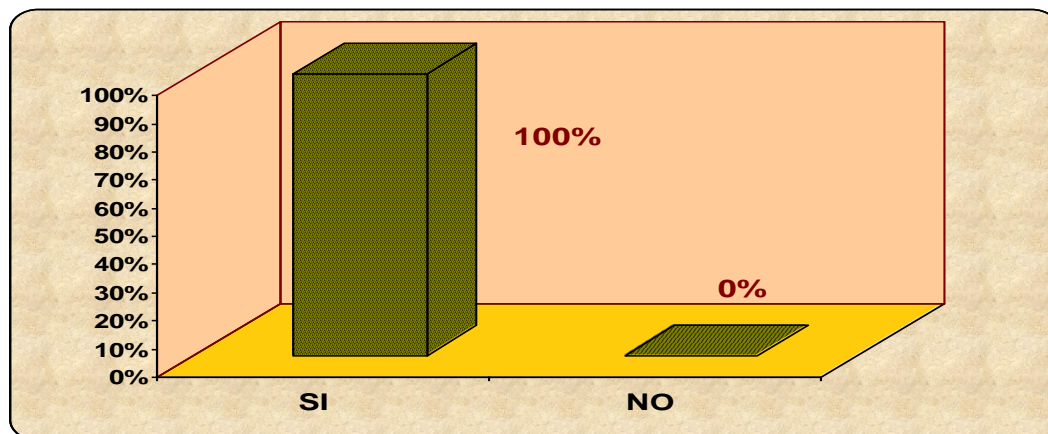


Figura Nº 13 Limpieza de utensilios antes y después de la elaboración del queso. (n = 2 queserías)

Como muestra la figura Nº 13, el 100% de las queserías en estudio lavan los utensilios necesarios antes y después de elaborar los productos lácteos. Para el proceso de lavado utilizan lejía y detergente para lavar los utensilios.

10. Lavan los depósitos de la leche antes y después de utilizarlos

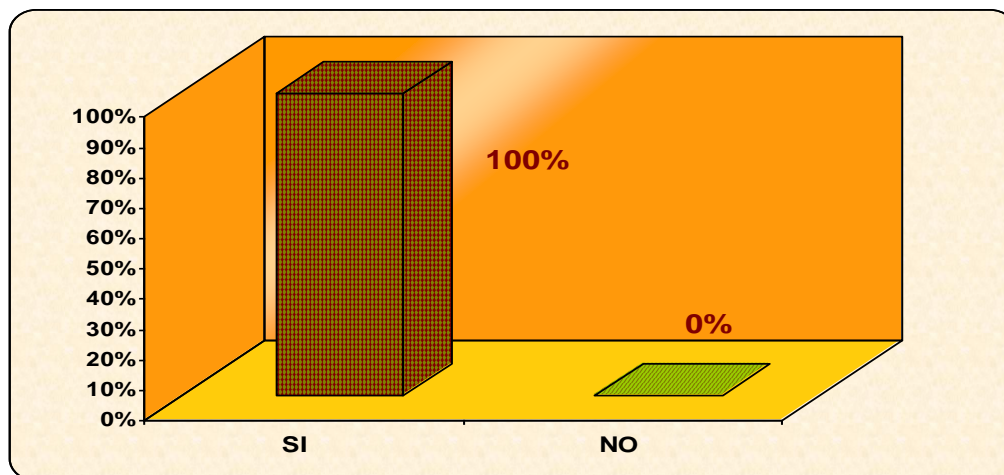


Figura Nº 14 Limpieza de depósitos de leche antes y después de usarlos. (n = 2 queserías)

La figura N° 14, presenta que el 100% de las queserías lavan los depósitos de leche antes y después de utilizarlos. Ambas queserías lavan los utensilios como batallas, recipientes, huacales, etc; con agua, jabón y lejía antes y después de utilizarlos.

11. Los recipientes que utilizan para el transporte de la leche tienen tapadera.

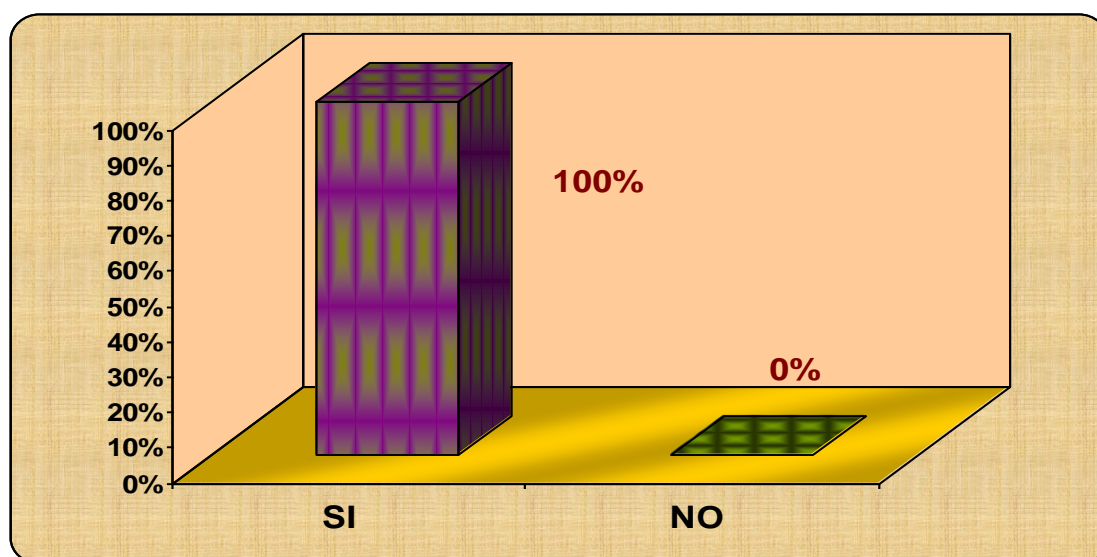


Figura N° 15 Tapaderas en los recipientes de leche para su transporte. (n = 2 queserías)

La figura N° 15, presenta que el 100% de las queserías, los recipientes utilizados para el transporte de la leche poseen tapadera al momento de ser llevados a los dos lugares. Para el transporte de la leche, se pudo observar que los depósitos contaban con tapadera y en el caso de un proveedor de mayoreo de leche este utiliza hielo para asemejar la refrigeración para el transporte de leche.

12. Condiciones de almacenamiento de la leche y el queso:

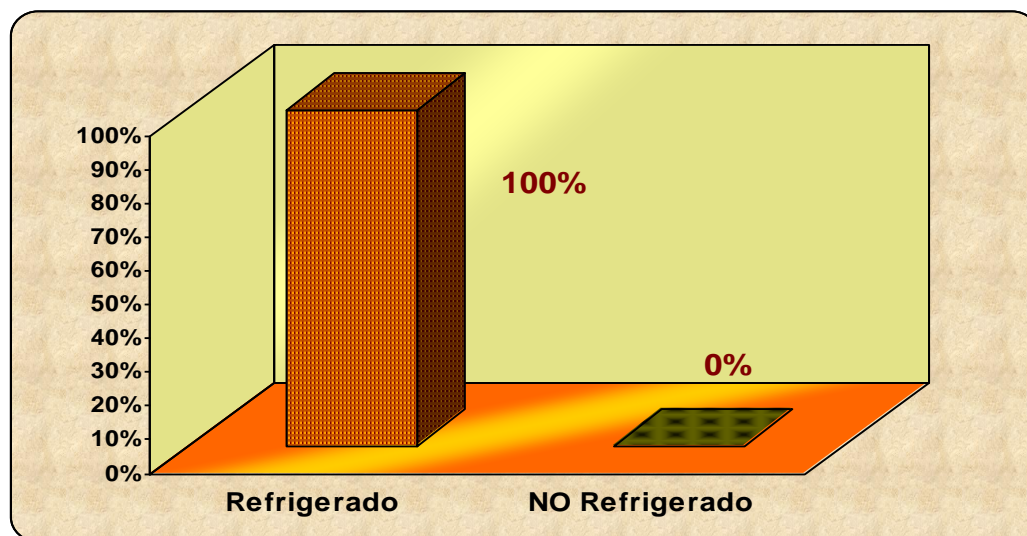


Figura Nº 16 Condiciones de almacenamiento de leche y queso. (n = 2 queserías)

Como se observa en la figura Nº 16, el 100% de las queserías mantienen almacenado en refrigeración la leche y sus productos lácteos. Ambas queserías contaban con cámaras de refrigeración para mantener sus productos lácteos.

5.2 Aislamiento.

De las 25 muestras recolectadas, trabajadas por triplicado, se obtuvieron 75 cepas aisladas del género *Staphylococcus aureus*, siendo el 100% identificados como *Staphylococcus aureus*. Coagulasa (+).

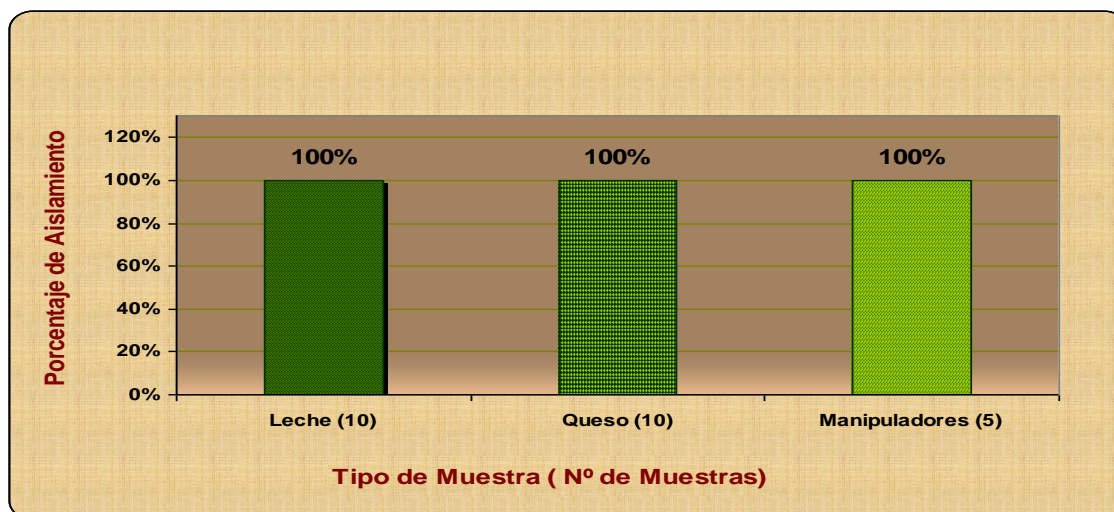


Figura Nº 17 Porcentaje de aislamiento por tipo de muestra.

En la figura Nº 17 se observa el porcentaje de aislamiento del *Staphylococcus aureus* por cada una de las muestras.

A continuación se presentan los resultados de los conteos de *Staphylococcus aureus* realizados en cada tipo de muestra.

Tabla Nº 6. Resultados promedios obtenidos para la determinación e identificación de *Staphylococcus aureus*

Determinación	Tipo de Muestra		
	Leche	Queso	Manipuladores
Recuento en placa UFC/g	37,333	>65,000	>65,000
Prueba de Catalasa	+	+	+
Prueba de Coagulasa	+	+	+

En la Tabla Nº 6 se muestra los conteos promedios obtenidos en la determinación del *Staphylococcus aureus* en agar Baird Parker, así como los resultados obtenidos de la prueba auxiliar (catalasa) y la prueba confirmativa (coagulasa).

Las muestras que presentaron colonias presuntivas se les realizó la prueba auxiliar y confirmativa, evidenciándose resultados positivos para ***Staphylococcus aureus*** en el 100% de los aislados.

En las muestras de leche cruda se obtuvieron conteos promedio de ***Staphylococcus aureus*** de 37,333 UFC/mL, por lo que las muestra de leche cruda cumplen con la Norma Salvadoreña NSO 67.01.01.06. Leche cruda ⁽²⁸⁾, ya que según dicha norma el recuento máximo de microorganismos por cm³, antes de la pasteurización debe ser de 1×10^6 máximo.

Para las muestras de queso fresco hubo conteos promedios de ***Staphylococcus aureus*** >65,000 UFC/g. Según la Norma Salvadoreña NSO 67.01.04.05. Quesos no maduros ⁽²⁹⁾ el recuento máximo permitido para ***Staphylococcus aureus*** es de 1×10^3 UFC/g (como recuento máximo permitido), por lo que las muestras de queso fresco artesanal no cumplen con dicha Norma.

Esto es debido que según la norma para la fabricación del queso fresco debe hacerse con leche previamente pasteurizada, factor que no se cumple en la elaboración de quesos frescos artesanales, además de ello existen deficiencias en las Buenas Prácticas de Manufactura como son: falta de higiene en la elaboración, manipulación en el proceso de fabricación, el ordeño, la falta de

refrigeración de la leche durante el transporte, el ordeño de vacas con mastitis, entre otros factores aportando mayor cantidad de microorganismos al producto

En cuanto a las muestras de lavado de manos de manipuladores se presentó un conteo promedio de ***Staphylococcus aureus*** >65,000 UFC/mano. Según la guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto para alimentos y bebidas, de Perú (7), el límite permisible de ***Staphylococcus aureus*** es de <100 UFC/mano, por lo que las muestras no cumplen según lo establecido en la Guía Técnica.

Se ha tomado como referencia la guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto para alimentos y bebidas, de Perú (7), debido a que en el país no existe una normativa para regular este tipo de muestras.

5.3. Susceptibilidad de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos.

En las tablas 15 a la 22 (ver anexo N° 8), se presentan los resultados obtenidos en la prueba de Kirby Bahuer que se realizó para las cepas aisladas de ***Staphylococcus aureus*** frente a los diferentes antibióticos; así como los diámetros de inhibición para cada uno de ellos.

Tabla N° 7. Promedios de diámetros de halos de *Staphylococcus aureus* aislados y de la cepa control ATCC (29737) por cada antibiótico.

Promedio Muestra	Antibiótico					
	Amoxicilina/ ác. clav (mm)	Ciprofloxacina (mm)	Eritromicina (mm)	Penicilina G (mm)	Tetraciclina (mm)	Trimetro /sulfa (mm)
Leche	9.13	30.73	10.69	7.90	24.10	27.13
Queso	11.57	29.07	10.00	10.77	24.34	26.1
Manipuladores	25.53	28.80	28.00	17.60	24.06	25.33
Cepa Control ATCC (29737)	32	30	30	32	28	32

En la Tabla N° 7 se muestran los promedios del diámetro de los halos obtenidos para cada uno de los antibióticos probados con cada uno de los aislados de las muestras y la cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus*.

En las figuras de la 18 a la 24 se explican los resultados de las tablas de la 20 a la 22 (ver anexo N° 8), donde se presentan los resultados de los antibiogramas para las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*, frente a los 6 antimicrobianos: Amoxicilina/ácido clavulánico, Eritromicina, Ciprofloxacina, Penicilina G, Tetraciclina y Trimetoprim/sulfametoxazol; además muestran los porcentajes de cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles para cada uno de los antibióticos probados. El método de Kirby-Bauer determina si una muestra es resistente, sensible o de sensibilidad intermedia; sin embargo las gráficas de resultados se resumieron en dos criterios resistentes y sensibles.

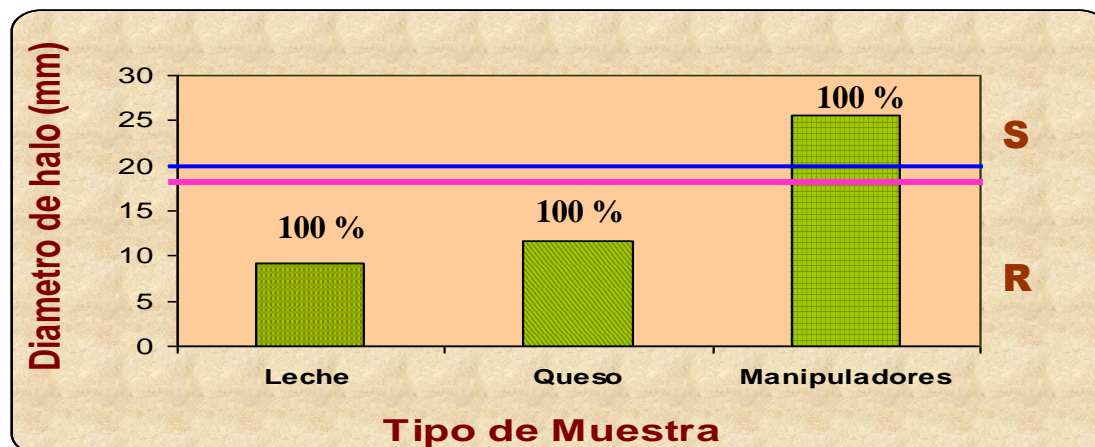


Figura N° 18 Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a la Amoxicilina / ácido clavulánico. (R= Resistente, S= Sensible)

En la figura N° 18, se muestra que el 100% de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* tanto de la leche, como las del queso presentan resistencia ante la Amoxicilina / ácido clavulánico; sin embargo para las cepas aisladas de las muestras de lavado de manos de manipuladores el 100% de las muestras fueron sensibles ante dicho antibiótico.

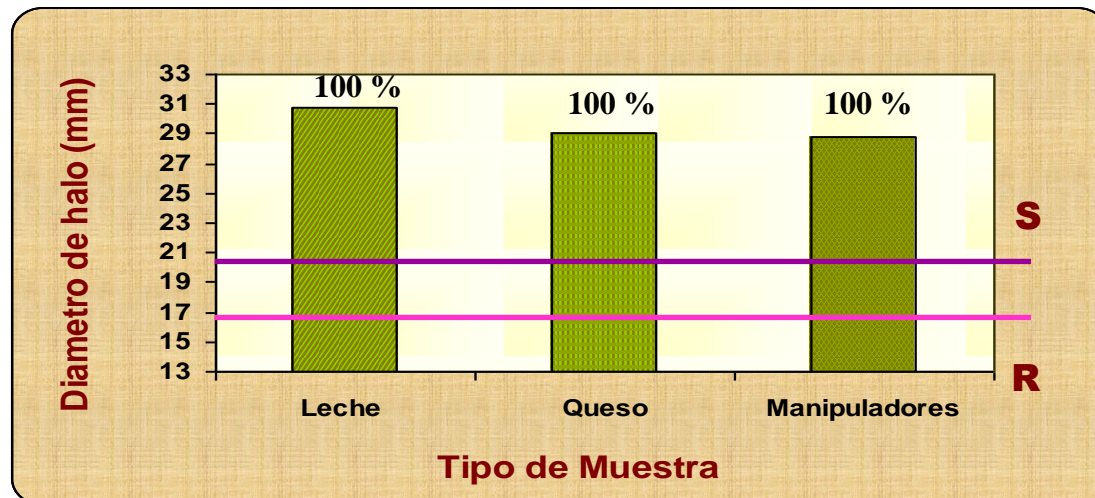


Figura N° 19 Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a la Ciprofloxacina. (R= Resistente; S= Sensible)

En la figura N° 19 se muestra que el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas son sensibles ante la Ciprofloxacina.

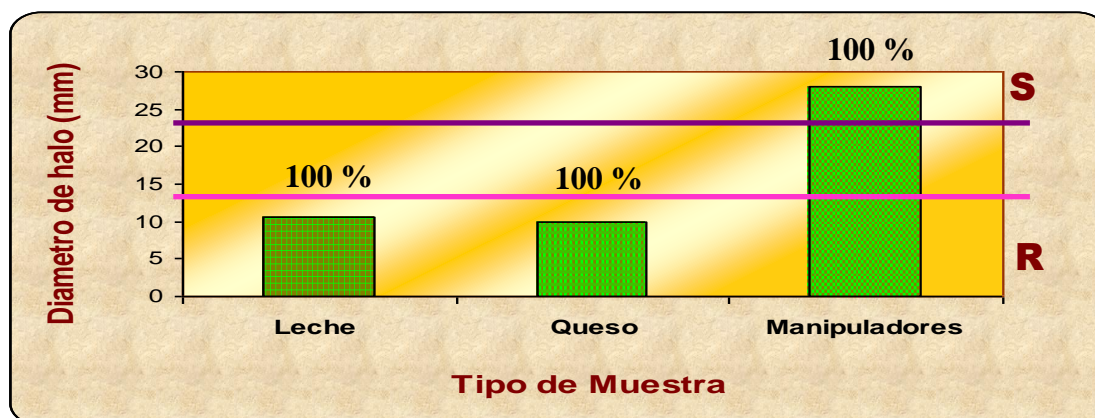


Figura N° 20. Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a la Eritromicina. (R= Resistente; S= Sensible)

En la figura N° 20, podemos observar que el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas tanto de las muestras de leche y queso presentan resistencia ante la eritromicina, mientras que un 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de lavado de manos de manipuladores muestran una sensibilidad ante dicho antibiótico.

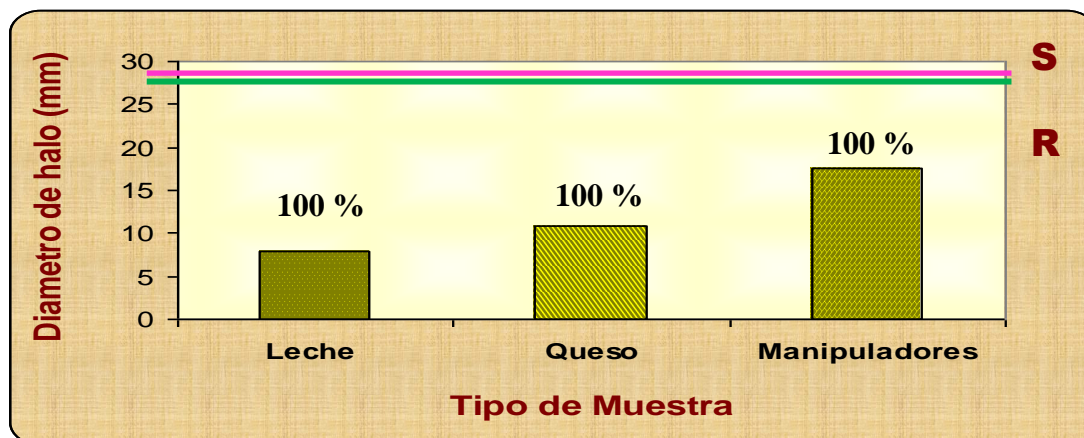


Figura N° 21 Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a la Penicilina G.

(R= Resistente; S= Sensible)

En la figura N° 21, se observa que el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de leche, queso y manipuladores presentan resistencia ante la penicilina G.

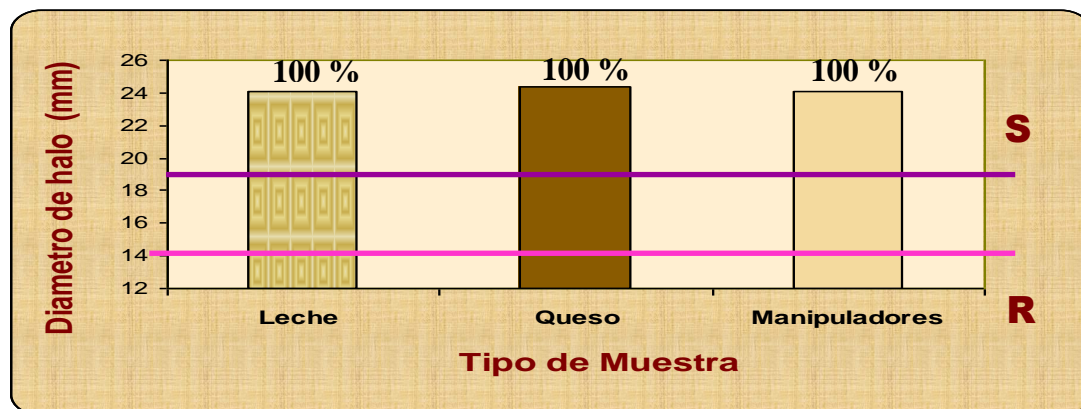


Figura N° 22 Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a la Tetraciclina. (R= Resistente; S= Sensible)

En la figura N° 21, se observa que el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de leche, queso y manipuladores presentan sensibilidad ante la tetraciclina.

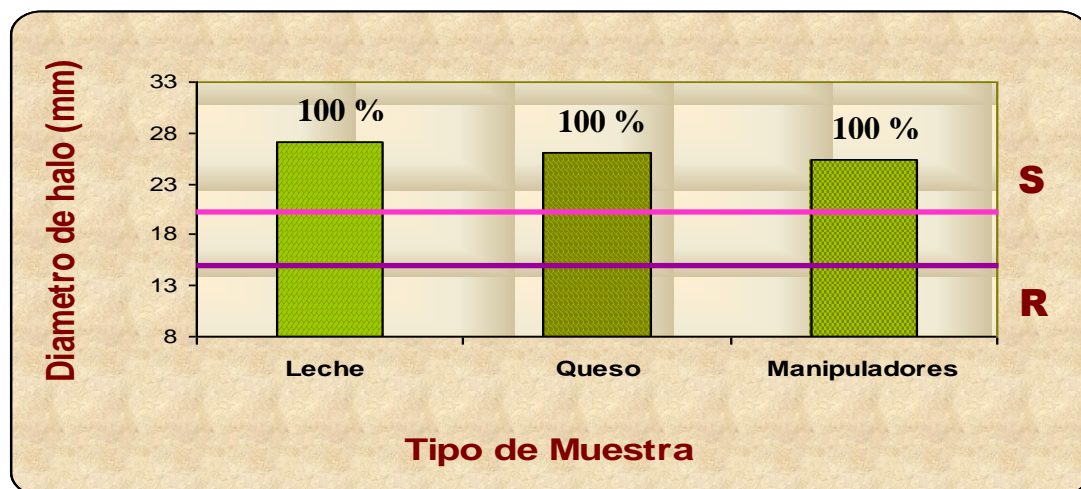


Figura N° 23. Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a la Trimetoprim/Amoxicilina.

Sulfametoxazol. (R= Resistente; S= Sensible)

En la figura N° 23, se observa que el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de leche, queso y manipuladores son sensibles ante el trimetoprim / sulfametoxazol.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de leche y queso fresco, resultaron resistentes en un 100% a la amoxicilina / ácido clavulánico, eritromicina y penicilina G; mientras que las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de lavado de mano de manipuladores solamente presentaron resistencia a la penicilina en un 100% de las muestras.

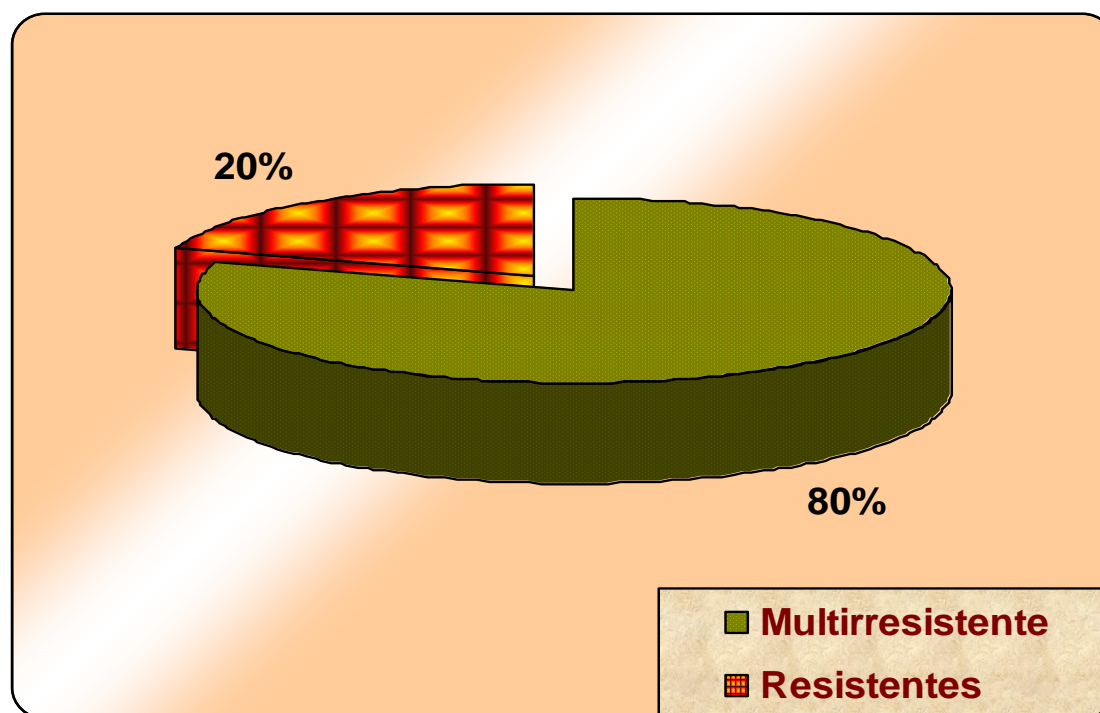


Figura N° 24. Distribución porcentual de la multiresistencia de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.

El término de multirresistencia se refiere cuando una cepa es resistente al menos a dos antimicrobianos, tomando en cuenta lo anterior, en la figura N° 24, el 80% de las cepas aisladas de ***Staphylococcus aureus*** que corresponden a las muestras de leche y queso fresco, presentaron resistencia múltiple ya que mostraron resistencia para al menos 3 antimicrobianos (amoxicilina / ác. clavulánico, eritromicina y penicilina G), mientras que el otro 20% de las cepas aisladas de ***Staphylococcus aureus*** que corresponden al lavado de manos solamente presentaron resistencia a un antimicrobiano (penicilina G).

Los porcentajes de multirresistencia obtenidos fueron muy altos (80%), esto lo podemos atribuir, al uso indiscriminado de antibióticos en los animales ya que estos se utilizan con diversos objetivos como es en el tratamiento y prevención de mastitis en vacas lecheras y para el tratamiento de diversas enfermedades. El 20% de las cepas aisladas de ***Staphylococcus aureus*** que presentaron resistencia indica que la multirresistencia si depende del origen de la muestra.

5.4 Análisis Estadístico (ANOVA)

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa El StatAdvisor, el cual ejecutó un análisis de varianza (ANOVA) con los datos que se obtuvieron de la parte experimental; como variable dependiente se tomó la multirresistencia y los factores los antibióticos y el tipo de muestra.

Tabla Nº 8. Análisis de Varianza para Multirresistencia.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: ANTIBIOTICO	5538.09	5	1107.62	174.87	0.0000
B: MUESTRA	1025.59	2	512.794	80.96	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1509.22	10	150.922	23.83	0.0000
RESIDUOS	836.085	132	6.33397		
TOTAL (CORREGIDO)	11277.8	149			

La tabla Nº 8. **ANOVA**, descompone la variabilidad de la multirresistencia en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre multirresistencia con un 95.0% de nivel de confianza. Lo que demuestra que la multirresistencia depende del origen o tipo de muestra así como también del tipo de antibiótico.

Si en P-valor es mayor de 0.05 los resultados obtenidos están dentro de un comportamiento normal ya que al graficar los valores-P se tienen datos que siguen una línea recta, en cambio los anormales son resultados alejados de la línea recta los cuales son valores menores de 0.05. Esto se puede explicar Mejor con el gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis, que se presenta a continuación.

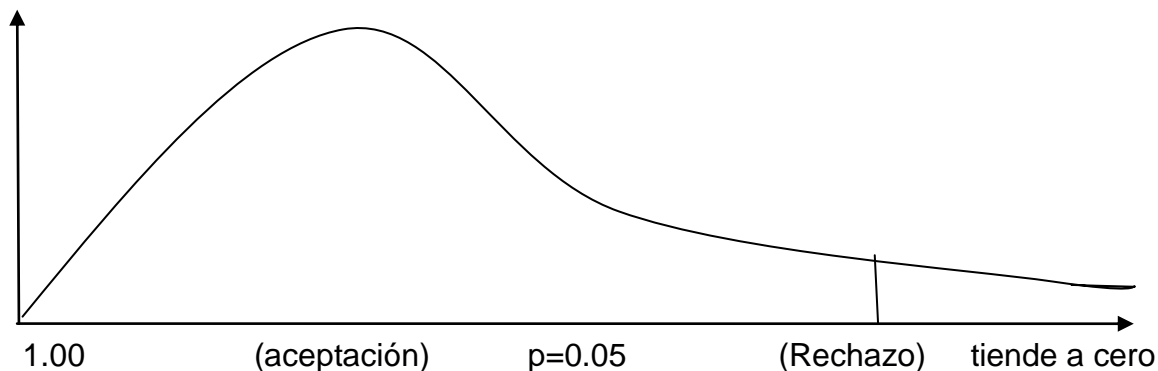


Fig. N° 25 Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis.

Hipótesis Nula

Ho = La multirresistencia no depende del origen de la muestra ni del tipo de antibiótico.

Hipótesis Alternativa

Hi = La multirresistencia depende del origen de la muestra y del tipo de antibiótico.

Con ayuda de la figura N° 25 y tomando en cuenta las hipótesis, podemos analizar lo siguiente:

- 1) El factor A (antibiótico), dio como resultado 0.0000, siendo un valor menor a $p = 0.05$, por lo que está dentro del rango del rechazo. Este resultado indica que el tipo de antibiótico es un factor que afecta la multirresistencia de las cepas aisladas, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

- 2) El factor B (tipo de muestra), dio como resultado 0.0000, siendo un valor menor a $p = 0.05$, por lo que está dentro del rango del rechazo. Este resultado indica que el tipo de muestra es un factor que afecta la multirresistencia de las cepas aisladas, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.
- 3) El valor de la interacción de los dos factores (antibiótico-tipo de muestra), dio como resultado 0.0000, siendo un valor menor de $p = 0.05$, lo que indica que esta dentro del rechazo, por lo que se puede afirmar que esta interacción afecta la multirresistencia de las cepas aisladas, por lo que se acepta la hipótesis alternativa.

CAPITULIO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de la guía de observación demostraron que las queserías en estudio no cumplen con las medidas higiénicas necesarias para la elaboración de productos lácteos; factor que influye en la calidad e higiene de sus productos y que se hace evidente con los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de las muestras.
2. El ***Staphylococcus aureus*** fue aislado e identificado en el 100% de las muestras de leche cruda analizada. Sin embargo, los conteos de este microorganismo (37,333 UFC/mL), presentados en cada muestra no sobrepasan los valores establecidos de 1×10^6 UFC/mL por la NSO 67.01.01:06 para leche cruda.
3. El 100% de las muestras de queso analizadas, presentaron ***Staphylococcus aureus***, y sus recuentos fueron mayores de 65,000 UFC/g, que son mayores que los establecidos por la NSO 67.01.04:05 Quesos no maduros, por lo que no cumplen con la norma y no son aptos para consumo humano.
4. Se aisló e identificó ***Staphylococcus aureus*** en un 100% de las muestras de lavado de manos de los manipuladores analizadas, presentando conteos mayores de 65,000 UFC/mano; sobrepasando lo establecido en la guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto para alimentos y bebidas, de Perú; por lo que las muestras no cumplen según lo

establecido en dicha guía técnica, demostrando la falta de higiene así como de las buenas prácticas de manufactura de las queserías en estudio.

- 5.** La presencia de cepas multirresistentes en un alimento de consumo masivo, como lo es la leche y los productos lácteos, puede ser un indicador de abuso de antibióticos en los animales, que puede resultar en cepas resistentes las cuales pueden transmitirse al hombre por el consumo de dichos alimentos, representando un problema de salud por el aumento del riesgo de diseminación de estas cepas.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. A los fabricantes artesanales de productos lácteos que deben hacer uso de las buenas prácticas de manufactura para mejorar las condiciones de higiene en la fabricación y almacenamiento de estos alimentos.
2. Capacitar en buenas prácticas de manufactura, en salud e higiene; con ayuda de las unidades de salud y las alcaldías; a los pequeños microempresarios que elaboran estos tipos de alimentos.
3. Al Ministerio de Agricultura y Ganadería y Ministerio de Salud; recomendar hacer nuevos estudios con el objeto de identificar residuos de antibióticos en leche y productos lácteos.
4. Que la Universidad de El Salvador la realice convenios para realizar estudios posteriores con respecto a la transferencia de cepas multirresistentes provenientes de animales hacia los humanos por el consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados.
5. Monitorear mas frecuentemente por parte del Ministerio de Salud los programas de vigilancia para verificar si las cepas de ***Staphylococcus aureus***, así como otros microorganismos proveniente de la leche y productos lácteos, pueden ser resistentes a los antibióticos mas utilizados en la red pública.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Alais Charles. Ciencia de la Leche, Principios de la Técnica Lechera, 3ª Impresión, México, Editorial Continental S.A. de CV. 1981. P. 594.
2. Ancheta, R. Avelar, W. 1992. Evaluación Microbiológica de los tipos de queso capita, cuajada y morolique expendidos en el Mercado Central de San Salvador. Trabajo de Graduación Ing. Agrónomo Zootecnista, El Salvador, Universidad Evangélica de El Salvador. P. 84.
3. Association of Official Analytical Chemistry AOAC, (AOAC). Official Methods of Analysis. 4º Edition, Virginia, USA, Inc. Edited by Sydney Williams. 1984, Publisher by the Association of Official Analytical Chemist.
4. Brooks, G.F, Butel J. S, Ornston L. N. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16ª Ed. México DF – Santa fé Bogotá. Ed. El Manual Moderno. 1999. P. 241, 899.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formely NCCLS). M100-S14, January 2004, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth informational Supplement. Pág. 41-46.
6. Díaz, A. Etelvina, S. 1997. Determinación de la presencia de Coliformes, Salmonella y E. aureus en Leche y Principales Derivados Distribuidos en los Principales Mercados Municipales de las Ciudades de Santa Ana Chalchuapa y Metapán, del Departamento de Santa Ana.

Trabajo de Graduación Lic. Biología, El Salvador, Universidad de El Salvador. P.95.

7. Dirección General de Salud Ambiental, del Ministerio de Salud, de Perú. Guía técnica sobre criterios y procedimientos para el examen microbiológico de superficies en relación con alimentos y bebidas, Lima, Perú. 2007. Consultado el 5 de Abril de 2010. Disponible en: http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_con_sulta/microbiologico.pdf
8. Faria, J. García, A. Márquez, A. Manzanilla, B. Morales, D. García, A. Resistencia a los antimicrobianos de Estafilococos aislados de leche cruda. Revista Científica, 1999. FCV-LUZ v. IX, N° 4, 343-348. Consultado el 4 de Febrero de 2010. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27202/2/articulo12.pdf>
9. Faria, J. Valero, K. D'Pool, G. Garcia, A. Cagnasso, M. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuarto de bovinos mestizos de doble propósito. Revista Científica, 2005. FCV-LUZ v. XV. N° 3, 227-234. Consultado el 4 de Febrero de 2010. Disponible en: <http://www.redalyc.uaemex.mex>
10. Henneberg W. E, Karl J. Elementos de Microbiología Lactológica, 6º Edición, Zaragoza, España; Editorial Acribia, 1971. P. 150.
11. Koneman, W. Allen, S. Janda, W. Schreckenberger, P. Diagnostico Microbiológico, Quinta Edición. Buenos Aires Argentina, Editorial Panamericana. 2003. P. 528-819.

12. Lemus, D. Maniscalchi, M. Hassoun, M. Vizcaya, H. Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui, Caracas, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Jun. 2008. v. 28 n.1. Consultado el 10 de Marzo de 2010 Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt&pid=S1315-25562008000100010
13. Lerche Martin. Inspección Veterinaria de la Leche, Zaragoza, España, Editorial Acribia. 1969. P. 33-38, 47, 48,67-70,146-150,378.
14. Lujan, D. Valentín, M. Molina, M. Evaluación de la presencia de Staphylococcus aureus en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima – Perú. Instituto de Investigación Nutricional, Laboratorio de Microbiología, Lima – Perú. 2006. Consultado el 25 de Marzo de 2010 Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos_frescos-1.htm
15. Martínez, H. 2004. Determinación de la Calidad de Leches Crudas y Quesillos Elaborados Artesanalmente en Plantas Productoras de Lácteos del Área Metropolitana de San Salvador. Trabajo de Graduación Lic. Química y Farmacia, El Salvador, Universidad de El Salvador. P. 35-54.
16. Mendenhall, W. Elementos de muestreo, México DF. , Grupo editorial Iberoamericana. 1987. P.614.
17. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud, Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. 2002, Manual de procedimientos

para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión, Serie de Normas Técnicas No. 30, Lima, Perú. P.67.

18. Mossel, D. A, Frazier, C. Westhoff, C. Microbiología de los alimentos. Segunda edición, Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A. 2003. P. 703.
19. Pérez Gavilán Jorge. Bioquímica y microbiología de la leche, México D.F., Editorial Limusa. 1984. P. 107.
20. Ratto, María Alina. Examen Microbiológico de Leche y Productos Lácteos, Alemania, Editorial G-I-T, Verlag Ernst Giebeler. 1982, P. 43
21. Scott R. Fabricación de Queso, Zaragoza, España, Editorial Acribia. 1991. P.355.
22. Schonherr, W. Manual Práctico de Análisis de Leche, Zaragoza, España; Editorial Acribia. 1959. P. 594.
23. Stedman, Diccionario de ciencias médicas, 25ª edición, editorial médica Panamericana. 1993. P. 1526.
24. Varnan, Alan .H. Suther J. P. Leche y Productos Lácteos, Tecnología Química y Microbiológica, Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. 1995. P.476.
25. <http://www.bvsops.org.uy/pdf/aureus.pdf> Citado el 20 de Abril de 2010.
Stafilococcus aureus, (en línea) Enciclopedia.
26. http://www.ceba.com.co/vicarmamitis_o_mastitis.htm .Citado el 05 de Mayo de 2010. Mamitis o Mastitis Estafilocócica, (en línea) Enciclopedia.

27. <http://www.food-info.net/es/dairy/cheese-production.htm> .Citado el 05 de Mayo de 2010. Producción de queso, (en línea) Enciclopedia.
28. <http://www.infoq.org.sv/dbnormas/NSO%2067.01.01.06.pdf> Citado el 18 de Mayo de 2010. Norma Salvadoreña NSO 67.01.01.06. Leche cruda. (en línea) Especificaciones.
29. http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/sica_67.01.04.05.pdf Citado el 18 de Mayo de 2010 Norma Salvadoreña NSO 67.01.04.05 Quesos no maduros. (en línea) Especificaciones.
30. <http://www.minnie.uab.es/~veteri/21273/Practica%202.2009-10.pdf> Citado el 25 de Mayo de 2010, Fundamentos teóricos de la prueba de difusión en disco de Kirby- Bauer (en línea) Enciclopedia.
31. <http://www.monografias.com/trabajos15/micrococcaceae/micrococcaceae.shtml> Consultado el 25 de Mayo de 2010 Características Bioquímicas de los *Micrococos* y *Estafilococos*. Métodos Adicionales de Aislamiento (en línea) Enciclopedia.
32. http://www.mspas.gob.sv/pdf/memoria_lab2007_2008/Capitulo_4.pdf Consultado el 25 de Mayo de 2010, Investigación de brote de *intoxicación alimentaria* por queso, en el Municipio de Quezaltepeque, La Libertad, febrero 2008 (98 personas intoxicadas). (en línea) Informe de Labores 07-08.pdf
33. http://www.mspas.gob.sv/vigi_graf.asp Consultado el 28 de Mayo de 2010, Casos de *Intoxicación Alimentaria* Comparación Anual 1989 - 2006. Fuente:

Unidad de Epidemiología. (en línea) Reporte Epidemiológico Semanal - SISNAVE

- 34.** http://www.uso_de_antibióticos_en_la_ganadería_lechera.htm Consultado el 28 de Mayo de 2010. Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera (en línea) Revista.
- 35.** <http://www.zonadiet.com/comida/queso.htm> Consultado el 30 de Mayo de 2010 Los quesos. Composición, elaboración y propiedades nutricionales (en línea) Revista.
- 36.** <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2002/08/22/3051.php> Consultado el 30 de Mayo de 2010 La vulnerabilidad del queso fresco (en línea) Revista.

GLOSARIO

GLOSARIO ⁽²³⁾

- **Acino:** Acino o alveolo es la unidad funcional de producción en la que una sola capa de células secretoras de leche se encuentran agrupadas en una esfera con una depresión en el centro.
- **Aerobio:** Organismo que crece en presencia de oxígeno. Puede ser facultativo u obligado.
- **Anaerobio:** Organismo que solo crece o metaboliza en ausencia de oxígeno molecular.
- **Agar:** Extracto polisacárido desecado del alga roja *Rhodophyceae*, usado en microbiología como solidificante de los medios.
- **Antibiótico:** Sustancia de origen microbiano que, en cantidades muy pequeñas tiene actividad microbiana.
- **Bacterias:** Microorganismo procariótico unicelular pertenecientes al reino monera. Casi todos son desintegradores, aunque algunos son parásitos o autótrofos.
- **Bacterias psicotrofas:** Son las bacterias capaces de sobrevivir e incluso prosperar en un ambiente frío. Se encuentran en los suelos, en las aguas superficiales, aguas profundas y en los alimentos. La mayoría mueren a manos de la pasteurización, sin embargo, pueden estar presentes en la leche como contaminantes post-pasteurización debido a menos que las prácticas de saneamiento adecuados.

- **Coliformes:** Bacilos gram-negativos, no esporulantes, facultativos, que fermentan la lactosa en formación de gas en un lapso de 48 horas a 35°C.
- **Colonia:** Desarrollo visible macroscópicamente de microorganismos en un medio de cultivo sólido.
- **Cultivo:** Cepa o clase particular de un organismo que crece en un medio de laboratorio.
- **Enterotoxina:** Toxina que afecta el intestino.
- **Estafilococos:** Bacterias esféricas (cocos) generalmente en racimos irregulares.
- **Gramnegativos:** Dícese de las bacterias o tejidos que no retienen el colorante o son decolorados por el alcohol en el método de coloración de gram.
- **Grampositivos:** Dícese de las bacterias o tejidos que conservan la coloración por el método de gram, al tratarlos con alcohol.
- **Incubación:** Mantenimiento de cultivos de microorganismos en condiciones favorables de temperatura para su desarrollo.
- **Intermedio:** cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).
- **Leche:** Es un fluido normalmente secretado por los mamíferos femeninos para la nutrición de su cría durante el periodo de lactancia.

- **Lóbulo:** Es un grupo de 10 a 100 alvéolos que drenan por medio de un conducto en común. Los lóbulos en sí se encuentran organizados en unidades de mayor tamaño, que des cargan la leche dentro de un conducto colector de mayor tamaño que conduce a la cisterna de la glándula, que descansa directamente encima del pezón de la glándula.
- **Lumen:** Es la cavidad interna donde se encuentra la leche secretada dentro del conducto colector de la glándula mamaria.
- **Mastitis:** Se refiere a la inflamación de la glándula mamaria de la vaca. Se caracteriza por alteraciones física química y casi siempre bacteriológica de la leche, teniendo alteraciones patológicas en la ubre que generalmente son de origen infeccioso.
- **Medio:** Sustancia utilizada par proporcionar alimento para el desarrollo y multiplicación de los microorganismos.
- **Microorganismo:** Animal o planta de pequeñísimo tamaño, visible con auxilio del microscopio; especialmente cualquier bacteria o protozoo.
- **Multirresistencia:** Bacteria resistente a más de 2 familias de antibióticos a las que habitualmente no lo es.
- **Pasteurización:** Proceso que utiliza calor moderado para reducir el nivel microbiano en materiales sensibles al calentamiento.
- **Queso:** Se obtiene por adición a la leche de un fermento o de un ácido el cual coagula la caseína y separa el suero.

- **Queso fresco:** es el queso no maduro ni escaldado, moldeado de textura relativamente firme, levemente granular; preparado con leche entera, semidescremada, o descremada, cuajado con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácteos. También se designa como queso blanco.
- **Resistente** si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- **Sensible:** si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- **Toxina:** Sustancia de naturaleza proteica altamente tóxica de estructura química desconocida y de efectos específicos. La mayor parte e las toxinas son formadas por bacterias.

ANEXOS

ANEXO Nº 1.

Tabla Nº 9. Escala de McFarland ⁽⁵⁾

Tubo	BaCl2 al 1%	H2SO4 al 1%	[] bacteriana * 10 ⁸
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

Nota: La escala del tubo 0.5 tiene una densidad de 0.08 a 0.10 a una longitud de onda de 625 nm.

ANEXOS Nº 2

Tabla Nº 10. Antibióticos y diámetros críticos para *Staphylococcus spp.* (5, 17)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Penicilina G	10 unidades	≤ 28	-	≥ 29
Oxacilina (S. aureus)	1 µg	≤ 10	11 – 12	≥ 13
(Estafilococos coagulasa negativos)	1 µg	≤ 17	-	≥ 18
Amoxicilina-acido clavulánico	20/10 µg	≤ 19	-	≥ 20
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	≥ 15
Teicoplanina	30 µg	≤ 10	11 – 13	≥ 14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15
FLUOROQUINOLONAS				
Norfloxacin	10 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21
TETRACICLINAS				
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14 – 22	≥ 23
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	≤ 14	15 – 20	≥ 21
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Rifampicina	5 µg	≤ 16	15 – 19	≥ 20
Nitrofurantoína	300 µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Trimetroprim / Sulfametoxazol	1.25 / 23.75 µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16

R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible

Cepa de Referencia para el Control de Calidad Interno *Staphylococcus aureus* ATCC 2592

ANEXO N° 3

Tabla N° 11. Límites aceptables (mm) de los diámetros de los halos de inhibición – límites de control en pruebas de disco difusión.(17)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Amikacina	30 mg	19-26	20-26
Amoxicilina/Ácido clavulánico	20/10 mg	19-25	28-36
Ampicilina	10 mg	16-22	27-35
Ampicilina/sulbactam	10/10 mg	20-24	29-37
Azitromicina	15 mg	-	21-26
Aztreonam	30 mg	28-36	-
Cefaclor	30 mg	23-27	27-31
Cefalotina	30 mg	15-21	29-37
Cefazolina	30 mg	23-29	29-35
Cefepime	30 mg	29-35	23-29
Cefixima	5 mg	23-27	-
Cefoperazona	75 mg	28-34	24-33
Cefotaxima	30 mg	29-35	25-31
Cefoxitina	30 mg	23-29	23-29
Ceftazidima	30 mg	25-32	16-20
Ceftriaxona	30 mg	29-35	22-28
Cefuroxima	30 mg	20-26	27-35
Cloranfenicol	30 mg	21-27	19-26
Ciprofloxacina	5 mg	30-40	22-30
Clindamicina	2 mg	-	24-30
Doxiciclina	30 mg	18-24	23-29
Eritromicina	15 mg	-	22-30
Esparfloxacina	5 mg	30-38	27-33
Estreptomicina	10 mg	12-20	14-22
Estreptomicina	300 mg	-	-
Gentamicina Q	10 mg	19-26	19-27
Gentamicina	120 mg	-	-
Imipenem	10 mg	26-32	-
Kanamicina	30 mg	17-25	19-26
Levofloxacina	5 mg	29-37	25-30
Meropenem	10 mg	28-34	29-37
Acido Nalidíxico	30 mg	22-28	-
Nitrofurantoina	300 mg	20-25	18-22
Norfloxacina	10 mg	28-35	17-28
Ofloxacina	5 mg	29-33	24-28
Oxacilina	1 mg	-	18-24
Penicilina	10 unidades	-	26-37
Rifampicina	5 mg	8-10	26-34
Estreptomicina Q	10 mg	12-20	14-22
Teicoplanina	30 mg	-	15-21
Tetraciclina	30 mg	18-25	24-30
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1.25/23.75 mg	24-32	24-32
Vancomicina	30 mg	-	17-21

ANEXO Nº 4

**Guía de Observación para el diagnóstico de las condiciones
higiénicas de las queserías en estudio.**



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA **CENSALUD**
GUÍA DE OBSERVACIÓN PARA EL DIAGNOSTICO DE LAS CONDICIONES
HIGIÉNICAS DE LAS QUESERÍAS EN ESTUDIO.

Lugar: _____

Fecha: _____

ASPECTOS A EVALUAR	SI	NO	CANTIDAD
1. Cuenta con el espacio suficiente para el desarrollo de las actividades.			
2. Cuenta con servicio de agua potable.			
3. Cuantas veces se hace limpieza en el lugar de trabajo.			
4. Utilizan desinfectantes para limpiar el área de trabajo.			
5. Cada cuanto tiempo utilizan estos desinfectantes: a) Mensual b) Semanal c) Diario			
6. Cuentan con el equipo de indumentaria adecuada como: a) Malla para el cabello b) Guantes c) Mascarillas d) Botas de hule e) Delantales f) Ropa especial			
7. El personal que labora usa maquillaje, aritos u otros accesorios			
8. Cuantas veces se lavan las manos el personal que labora			
9. Lavan los utensilios necesarios antes y después de la elaboración del queso.			
10. Lavan los depósitos de la leche antes y después de utilizarlos			
11. Los recipientes que utilizan para el transporte de la leche tienen tapadera.			
12. Condiciones de almacenamiento de la leche y el queso: a) Refrigerado b) No refrigerado			

ANEXO N° 5. Etiquetas para el muestreo

**Universidad de El Salvador
Facultad de Química y Farmacia
Etiqueta para el Muestreo**

Tesis Grupo: _____

Código de quesería _____ Código de la muestra _____

Tipo de muestra: _____

Fecha: _____ Hora: _____

Muestra tomada por: _____ Testigo: _____

ANEXO Nº 6.

ESQUEMAS DE PARTE EXPERIMENTAL

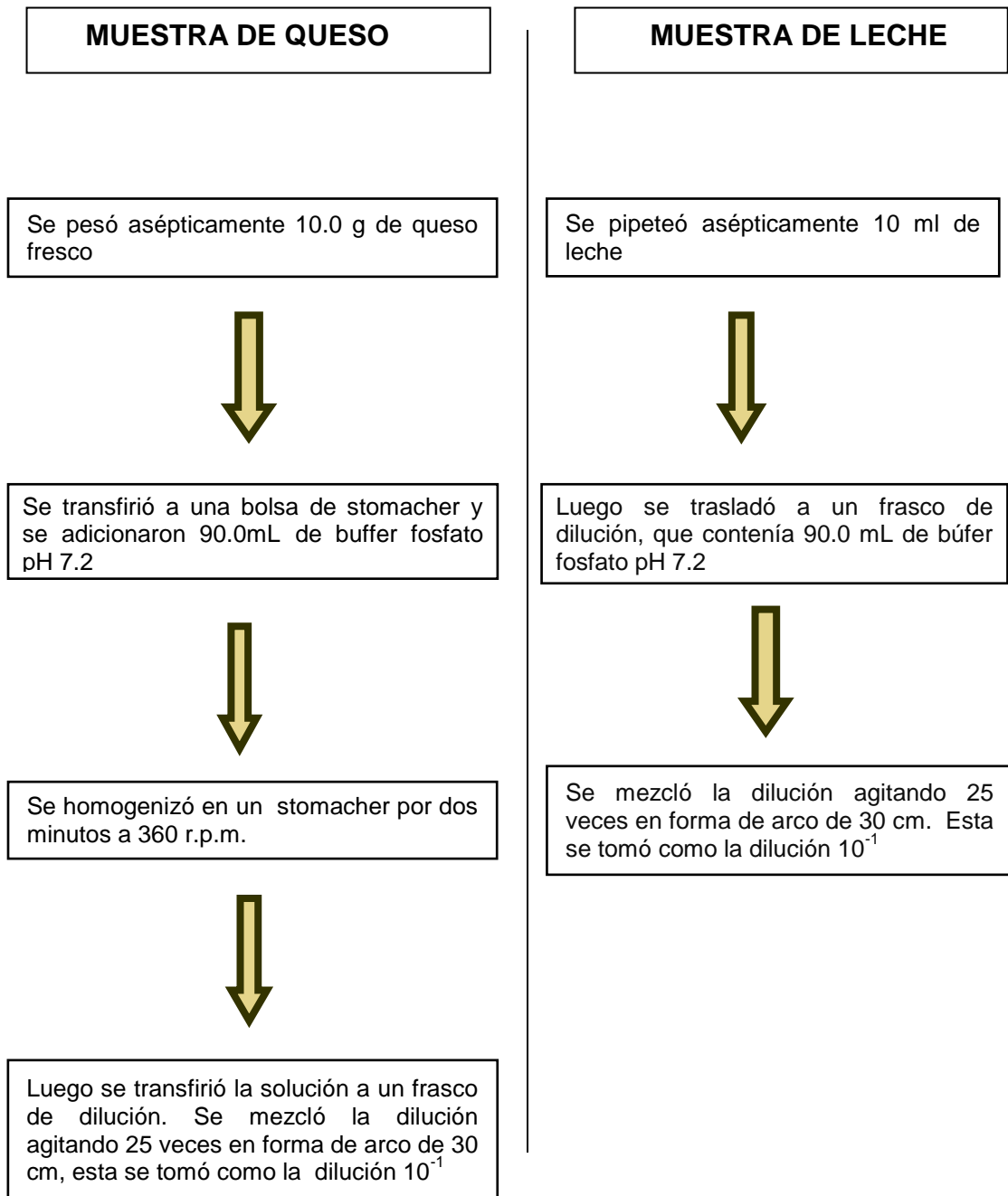


Fig. Nº 26. Preparación de las diluciones de las muestras de queso fresco artesanal y leche cruda.

TOMA DE MUESTRA DE LAVADO DE MANOS



Se vertió el agua peptonada buferada del frasco (100 mL) en una bolsa plástica estéril.



Se solicitó al manipulador que introdujera las manos a muestrear (una a una) hasta la altura de la muñeca y que realizara un frotado de los dedos y particularmente de las uñas y la palma de las mano durante un minuto



Luego de retirar las manos se anudó la bolsa. Esta se tomó como la dilución de 10^{-1} .

Fig. Nº 27. Preparación de las diluciones de toma de muestra de lavado de manos.

Aislamiento del *Staphylococcus aureus* para cada una de las muestras.

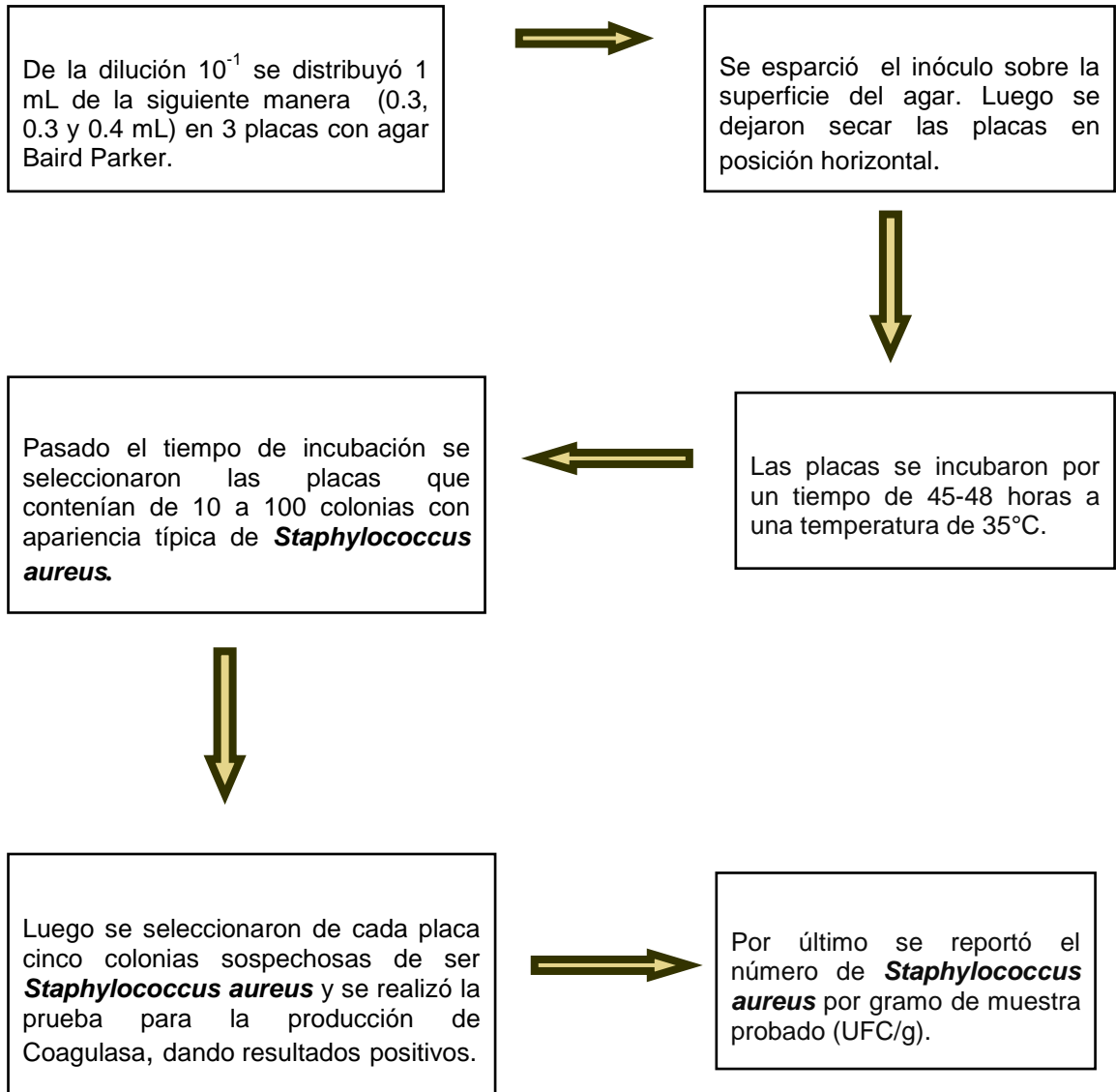


Fig. Nº 28. Aislamiento del *Staphylococcus aureus* para cada una de las muestras.

Pruebas de confirmación para el *Staphylococcus aureus*

PRUEBA DE LA COAGULASA



Se transfirieron colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* en tubos pequeños que contenían de 0.3 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)



Se incubaron

35°C por un tiempo de 18 a 24 horas.



Luego se agregó 0.5 mL de Coagulasa de Plasma humano al cultivo de BHI y se mezcló completamente.



Se incubaron a una temperatura de 35°C y se examinaron por un período de 24 horas hasta la formación de coágulo.



(+) (-)

PRUEBA DE LA CATALASA



Se tomó el centro de una colonia sospechosa de *Staphylococcus aureus* de 18-24 horas y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y seco.



Se agregó con gotero una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %. Se observó la formación inmediata de burbujas lo cual se tomó como resultado positivo.



(+) (-)

Fig. Nº 29. Pruebas de confirmación para el *Staphylococcus aureus*.

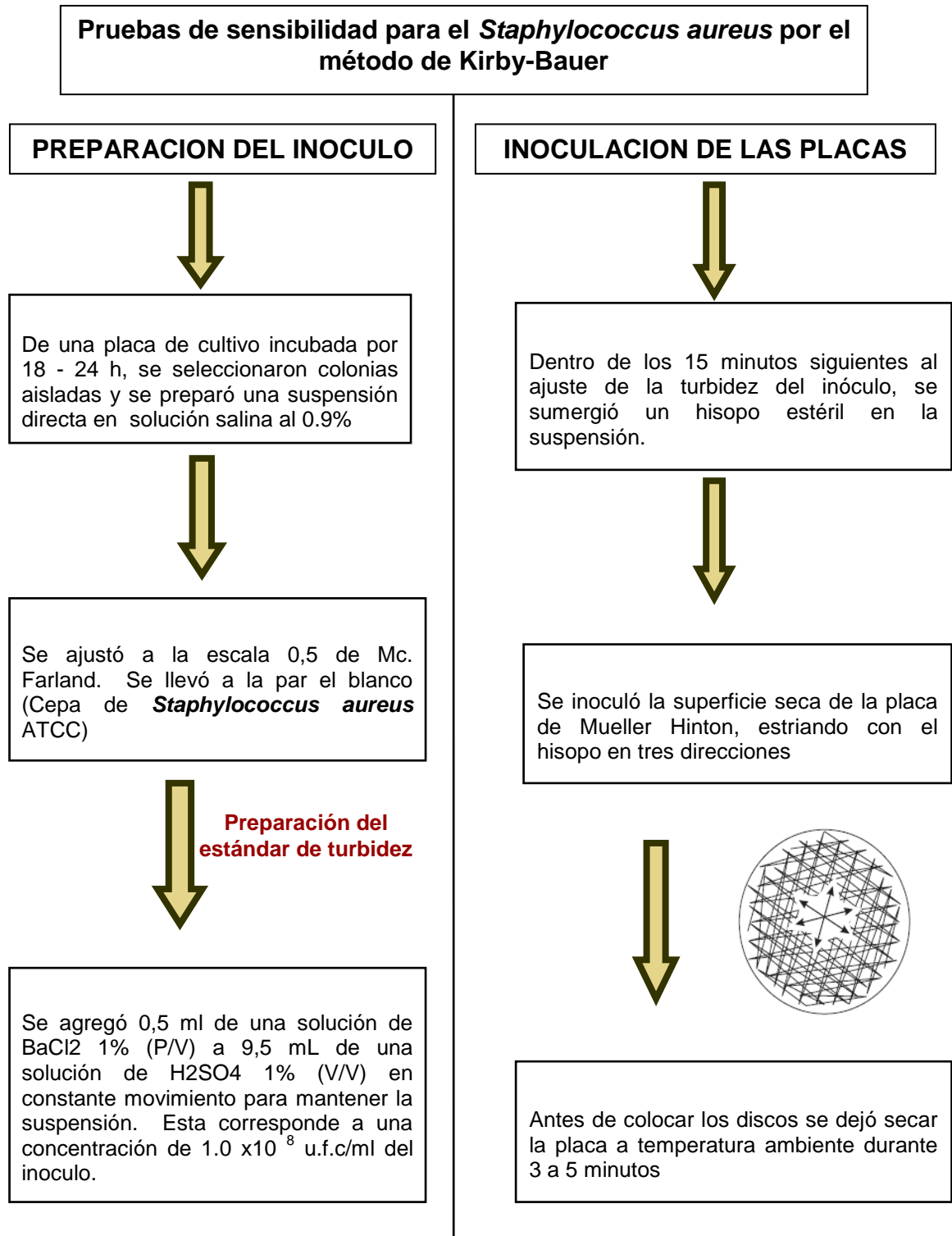


Fig. Nº 30. Pruebas de sensibilidad para el *Staphylococcus aureus* por el método de Kirby-Bauer.

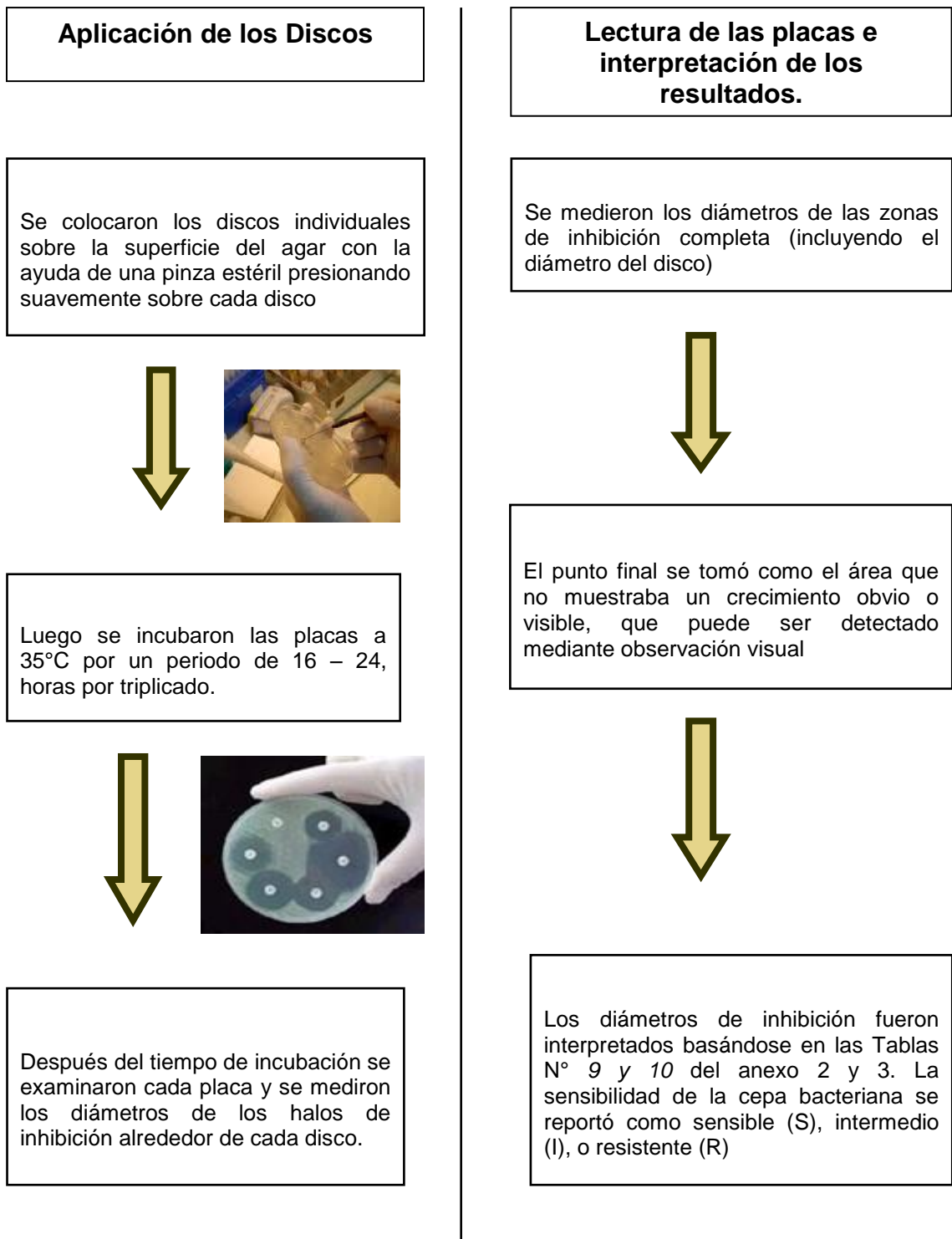


Fig. N° 31. Aplicación de los discos, lectura de las placas e interpretación de resultados.

ANEXO Nº 7

NORMATIVAS DE COMPARACION DE LECHE, QUESO

Y MANIPULADORES

Norma Salvadoreña NSO 67.01.01.06. Leche cruda. (28)

Clasificación

La leche cruda de vaca se clasificara, según sus características microbiológicas, en las siguientes clases:

Clase A Clase B Clase C

Características microbiológicas. La leche a ser pasteurizada deberá cumplir con los requisitos microbiológicos especificados en la tabla siguiente:

Tabla Nº. 12. Requisitos microbiológicos.

Requisito	Clase A	Clase B	Clase C
Recuento de microorganismos por cm ³ , antes de la pasteurización	400,000 máximo	800,000 máximo	1 x 10 ⁶ máximo

Norma Salvadoreña NSO 67.01.04.05 Quesos no maduros.

Especificaciones. (29)

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:

El producto no podrá contener microorganismos en número mayor a lo especificado en la tabla:

Tabla Nº 13. Características microbiológicas

Microorganismo	n (1)	c (2)	m (3)	M (4)
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/g	5	1	10 ²	10 ³
Coliformes totales, UFC/g	5	2	200	500
Coliformes fecales, UFC/g	5	1	< 10	10
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	0	0	0
Salmonella en 25 gramos	5	0	0	0

(1) n = Número de muestras que deben analizarse.

(2) c = Número de muestras que permite que tengan un recuento mayor que **m** pero no mayor que **M**.

(3) m = Recuento máximo recomendado.

(4) M = Recuento máximo permitido.

**Dirección General de Salud Ambiental, del Ministerio de Salud, de Perú.
2007. Guía técnica sobre criterios y procedimientos para el examen
microbiológico de superficies en relación con alimentos y bebidas, Lima,
Perú. (7)**

Tabla Nº 14. Interpretación de resultados de acuerdo a los límites
microbiológicos (7)

SUPERFICIES				
MÉTODO DE ENJUAGUE	Vivas		Pequeñas o Internas	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)
Coliformes totales	< 100 ufc / manos	< 100 ufc / manos	< 25 ufc / superficie muestreada (**)	< 25 ufc / superficie muestreada (**)
<i>Stafilococcus aureus</i>	< 100 ufc / manos	< 100 ufc / manos		
Patógenos	Ausencia / manos	Ausencia / manos	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(**) Para 4 utensilios.

ANEXO Nº 8

TABLAS DE RESULTADOS DE LA PARTE EXPERIMENTAL

Tabla N° 15. Diámetros de halos de los diferentes antibióticos probados para el *Staphylococcus aureus* aislado de leche cruda.

Muestra	Código	DIAMETROS DE HALOS EN (mm)					
		P	A	E	C	T	S
1A	1A ₁	7.0	7.0	10.0	32.0	24.0	26.0
	1A ₂	7.0	7.0	12.0	32.0	24.0	28.0
	1A ₃	7.0	7.0	12.0	32.0	26.0	28.0
2A	2A ₁	7.0	7.0	12.0	32.0	22.0	26.0
	2A ₂	7.0	7.0	10.0	31.0	20.0	27.0
	2A ₃	7.0	7.0	12.0	32.0	23.0	27.0
3A	3A ₁	7.0	7.0	12.0	32.0	22.0	28.0
	3A ₂	7.0	7.0	12.0	32.0	23.0	27.0
	3A ₃	7.0	7.0	10.0	32.0	23.0	27.0
4A	4A ₁	7.0	7.0	11.0	29.0	22.0	26.0
	4A ₂	7.0	7.0	10.0	28.0	24.0	26.0
	4A ₃	7.0	7.0	10.0	30.0	24.0	26.0
5A	5A ₁	7.0	7.0	11.0	31.0	23.0	24.0
	5A ₂	7.0	7.0	11.0	31.0	22.0	26.0
	5A ₃	7.0	7.0	11.0	30.0	23.0	26.0
Sumatoria		105.0	105.0	166.0	466.0	345.0	398.0
Promedio		7.0	7.0	11.07	31.07	23.0	26.53

A = Leche de Quesería Sabrina
P = Penicilina G
A = Amoxicilina / ácido clavulánico
E = Eritromicina
C = Ciprofloxacina
T = Tetraciclina
S = Trimetoprim / sulfametoxazol

Tabla Nº 16. Diámetros de halos de los diferentes antibióticos probados para el *Staphylococcus aureus* aislado de leche cruda.

Muestra	Código	DIAMETROS DE HALOS EN (mm)					
		P	A	E	C	T	S
1X	1X ₁	16.0	18.0	9.0	31.0	27.0	28.0
	1X ₂	16.0	17.0	11.0	32.0	27.0	28.0
	1X ₃	16.0	15.0	11.0	31.0	28.0	29.0
2X	2X ₁	7.0	7.0	11.0	30.0	27.0	28.0
	2X ₂	7.0	7.0	11.0	31.0	27.0	28.0
	2X ₃	7.0	7.0	10.0	31.0	26.0	29.0
3X	3X ₁	7.0	9.0	11.0	32.0	27.0	28.0
	3X ₂	7.0	9.0	10.0	32.0	24.0	27.0
	3X ₃	7.0	10.0	9.0	32.0	24.0	28.0
4X	4X ₁	7.0	15.0	10.0	31.0	24.0	27.0
	4X ₂	7.0	14.0	11.0	31.0	24.0	27.0
	4X ₃	7.0	14.0	11.0	30.0	24.0	27.0
5X	5X ₁	7.0	11.0	10.0	27.0	24.0	28.0
	5X ₂	7.0	8.0	9.0	27.0	23.0	28.0
	5X ₃	7.0	8.0	10.0	28.0	23.0	26.0
Sumatoria		132.0	169.0	155.0	456.0	379.0	416.0
Promedio		8.8	11.27	10.33	30.40	25.27	27.73

X= Leche de Quesería Doña Juana

P = Penicilina G

A = Amoxicilina / ácido clavulánico

E = Eritromicina

C = Ciprofloxacina

T = Tetraciclina

S = Trimetoprim / sulfametoxazol

Tabla Nº 17. Diámetros de halos de los diferentes antibióticos probados para el *Staphylococcus aureus* aislado de queso fresco artesanal.

Muestra	Código	DIÁMETROS DE HALOS EN (mm)					
		9P	A	E	C	T	S
1B	1B ₁	17.0	18.0	10.0	30.0	28.0	28.0
	1B ₂	17.0	18.0	10.0	30.0	26.0	28.0
	1B ₃	17.0	18.0	9.0	31.0	26.0	27.0
2B	2B ₁	7.0	7.0	10.0	29.0	24.0	27.0
	2B ₂	7.0	7.0	11.0	30.0	24.0	28.0
	2B ₃	7.0	7.0	10.0	29.0	23.0	28.0
3B	3B ₁	7.0	7.0	9.0	29.0	23.0	26.0
	3B ₂	7.0	7.0	9.0	31.0	23.0	26.0
	3B ₃	7.0	7.0	9.0	30.0	25.0	27.0
4B	4B ₁	18.0	18.0	11.0	28.0	26.0	25.0
	4B ₂	18.0	18.0	11.0	28.0	25.0	25.0
	4B ₃	18.0	18.0	10.0	29.0	25.0	25.0
5B	5B ₁	7.0	7.0	9.0	28.0	24.0	25.0
	5B ₂	7.0	7.0	10.0	28.0	25.0	26.0
	5B ₃	7.0	7.0	10.0	28.0	24.0	26.0
Sumatoria		168.0	171.0	148.0	438.0	371.0	397.0
Promedio		11.20	11.40	9.87	29.20	24.73	26.47

B= Queso fresco de Quesería Sabrina

P = Penicilina G

A = Amoxicilina / ácido clavulánico

E = Eritromicina

C = Ciprofloxacina

T = Tetraciclina

S = Trimetoprim / sulfametoxazol

Tabla N° 18. Diámetros de halos de los diferentes antibióticos probados para el *Staphylococcus aureus* aislado de queso fresco artesanal.

Muestra	Código	DIAMETROS DE HALOS EN (mm)					
		P	A	E	C	T	S
1Y	1Y ₁	7.0	7.0	9.0	27.0	24.0	26.0
	1Y ₂	7.0	7.0	10.0	27.0	23.0	27.0
	1Y ₃	7.0	7.0	10.0	27.0	24.0	28.0
2Y	2Y ₁	7.0	7.0	10.0	30.0	24.0	24.0
	2Y ₂	7.0	7.0	10.0	29.0	24.0	24.0
	2Y ₃	7.0	7.0	10.0	29.0	24.0	24.0
3Y	3Y ₁	18.0	19.0	9.0	28.0	25.0	26.0
	3Y ₂	16.0	19.0	11.0	28.0	25.0	25.0
	3Y ₃	14.0	19.0	11.0	28.0	25.0	27.0
4Y	4Y ₁	16.0	19.0	11.0	31.0	25.0	26.0
	4Y ₂	16.0	19.0	11.0	31.0	22.0	26.0
	4Y ₃	12.0	18.0	12.0	31.0	24.0	27.0
5Y	5Y ₁	7.0	7.0	10.0	29.0	24.0	25.0
	5Y ₂	7.0	7.0	10.0	29.0	24.0	26.0
	5Y ₃	7.0	7.0	11.0	30.0	24.0	25.0
Sumatoria		155.0	176.0	155.0	434.0	361.0	386.0
Promedio		10.33	11.73	10.33	28.93	24.07	25.73

Y= Queso fresco de Quesería Doña Juana

P = Penicilina G

A = Amoxicilina / ácido clavulánico

E = Eritromicina

C = Ciprofloxacina

T = Tetraciclina

S = Trimetroprim / sulfametoxazol

Tabla Nº 19. Diámetros de halos de los diferentes antibióticos probados para el *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de lavado de manos de manipuladores.

Muestra	Código	DIAMETROS DE HALOS EN (mm)					
		P	A	E	C	T	S
1C	1C ₁	18.0	25.0	28.0	30.0	25.0	25.0
	1C ₂	18.0	25.0	28.0	30.0	23.0	25.0
	1C ₃	18.0	25.0	29.0	30.0	23.0	26.0
2C	2C ₁	18.0	25.0	28.0	29.0	25.0	25.0
	2C ₂	18.0	25.0	29.0	29.0	25.0	25.0
	2C ₃	18.0	25.0	29.0	28.0	25.0	24.0
1Z	1Z ₁	18.0	25.0	29.0	29.0	24.0	25.0
	1Z ₂	17.0	25.0	29.0	28.0	25.0	27.0
	1Z ₃	18.0	25.0	28.0	29.0	24.0	27.0
2Z	2Z ₁	17.0	27.0	28.0	28.0	24.0	26.0
	2Z ₂	16.0	26.0	26.0	29.0	24.0	25.0
	2Z ₃	18.0	26.0	26.0	27.0	23.0	24.0
3Z	3Z ₁	18.0	25.0	26.0	28.0	23.0	25.0
	3Z ₂	17.0	27.0	28.0	29.0	24.0	25.0
	3Z ₃	17.0	27.0	29.0	28.0	24.0	26.0
Sumatoria		247.0	383.0	420.0	432.0	361.0	380.0
Promedio		16.47	25.53	28.0	28.8	24.07	25.33

C= Manipuladores de Quesería Sabrina
Z= Manipuladores de Quesería Doña Juana
P = Penicilina G
A = Amoxicilina / ácido clavulánico
E = Eritromicina
C = Ciprofloxacina
T = Tetraciclina
S = Trimetoprim / sulfametoxazol

Tabla Nº 20. Antibióticos y diámetros de halos críticos para el *Staphylococcus aureus* aislado de leche cruda

Código de muestra	DIAMETROS DE HALOS EN (mm)							
	Promedios	Penicilina G (10 unidades)			Promedios	Amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg)		
		R (≤ 28)	I ---	S (≥29)		R (≤ 19)	I ---	S (≥20)
1A	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
2A	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
3A	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
4A	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
5A	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
1X	16.00	+	-	-	16.66	+	-	-
2X	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
3X	7.00	+	-	-	9.33	+	-	-
4X	7.00	+	-	-	14.33	+	-	-
5X	7.00	+	-	-	9.00	+	-	-
Código de muestra	Promedios	Eritomicina (15 µg)			Promedios	Ciprofloxacina (5 µg)		
		R (≤ 13)	I 14-22	S (≥23)		R (≤ 15)	I 16-20	S (≥21)
	1A	11.33	+	-	-	32.00	-	-
2A	11.33	+	-	-	31.66	-	-	+
3A	11.33	+	-	-	32.00	-	-	+
4A	10.33	+	-	-	29.00	-	-	+
5A	11.00	+	-	-	30.66	-	-	+
1X	10.33	+	-	-	31.33	-	-	+
2X	10.66	+	-	-	30.66	-	-	+
3X	9.66	+	-	-	32.00	-	-	+
4X	11.33	+	-	-	30.66	-	-	+
5X	9.60	+	-	-	27.30	-	-	+
Código de muestra	Promedios	Tetraciclina (30 µg)			Promedios	Trimetoprim /sulfa 1.25/23.75 µg		
		R (≤ 14)	I 15-18	S (≥19)		R (≤ 10)	I 11-15	S (≥16)
	1A	24.67	-	-	+	27.33	-	-
2A	21.67	-	-	+	26.66	-	-	+
3A	22.67	-	-	+	27.33	-	-	+
4A	23.33	-	-	+	26.00	-	-	+
5A	22.66	-	-	+	25.33	-	-	+
1X	27.33	-	-	+	28.33	-	-	+
2X	26.66	-	-	+	28.33	-	-	+
3X	25.00	-	-	+	27.66	-	-	+
4X	24.00	-	-	+	27.00	-	-	+
5X	23.33	-	-	+	27.33	-	-	+

A = Leche de la Quesería Sabrina

R = Resistente

S = Sensible

Tabla Nº 21. Antibióticos y diámetros de halos críticos para el *Staphylococcus aureus* aislado de queso fresco.

Código de muestra	DIAMETROS DE HALOS EN (mm)							
	Promedios	Penicilina G (10 unidades)			Promedios	Amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg)		
		R (≤ 28)	I ---	S (≥ 29)		R (≤ 19)	I ---	S (≥ 20)
1B	17.00	+	-	-	18.00	+	-	-
2B	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
3B	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
4B	18.00	+	-	-	18.00	+	-	-
5B	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
1Y	16.00	+	-	-	16.66	+	-	-
2Y	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
3Y	16.00	+	-	-	19.00	+	-	-
4Y	14.66	+	-	-	18.66	+	-	-
5Y	7.00	+	-	-	7.00	+	-	-
Código de muestra	Promedios	Eritomicina (15 µg)			Promedios	Ciprofloxacina (5 µg)		
		R (≤ 13)	I 14-22	S (≥ 23)		R (≤ 15)	I 16-20	S (≥ 21)
	1B	9.66	+	-	-	30.33	-	-
2B	10.33	+	-	-	29.33	-	-	+
3B	9.00	+	-	-	30.00	-	-	+
4B	10.66	+	-	-	28.33	-	-	+
5B	9.66	+	-	-	28.00	-	-	+
1Y	9.66	+	-	-	27.00	-	-	+
2Y	10.00	+	-	-	29.33	-	-	+
3Y	10.33	+	-	-	28.00	-	-	+
4Y	11.33	+	-	-	31.00	-	-	+
5Y	10.33	+	-	-	29.33	-	-	+
Código de muestra	Promedios	Tetraciclina (30 µg)			Promedios	Trimetoprim /sulfa 1.25/23.75 µg		
		R (≤ 14)	I 15-18	S (≥ 19)		R (≤ 10)	I 11-15	S (≥ 16)
	1B	26.66	-	-	+	27.66	-	-
2B	23.66	-	-	+	27.66	-	-	+
3B	23.66	-	-	+	26.33	-	-	+
4B	25.33	-	-	+	25.00	-	-	+
5B	24.33	-	-	+	25.66	-	-	+
1Y	23.67	-	-	+	27.00	-	-	+
2Y	24.00	-	-	+	24.00	-	-	+
3Y	25.00	-	-	+	26.00	-	-	+
4Y	23.66	-	-	+	26.33	-	-	+
5Y	24.00	-	-	+	25.33	-	-	+

A = Queso de la Quesería Sabrina

R = Resistente

S = Sensible

X = Queso de la Quesería Doña Juana

I = Intermedio

Tabla Nº 22. Antibióticos y diámetros de halos críticos para el *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de lavado de manos de manipuladores.

Código de muestra	DIAMETROS DE HALOS EN (mm)							
	Promedios	Penicilina G (10 unidades)			Promedios	Amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg)		
		R (≤ 28)	I ---	S (≥29)		R (≤ 19)	I ---	S (≥20)
1C	18.00	+	-	-	25.00	-	-	+
2C	18.00	+	-	-	25.00	-	-	+
1Z	17.66	+	-	-	25.00	-	-	+
2Z	17.00	+	-	-	26.33	-	-	+
3Z	17.33	+	-	-	26.33	-	-	+
Código de muestra	Promedios	Eritomicina (15 µg)			Promedios	Ciprofloxacina (5 µg)		
		R (≤ 13)	I 14-22	S (≥23)		R (≤ 15)	I 16-20	S (≥21)
	1C	28.33	-	-	+	30.00	-	-
2C	28.66	-	-	+	28.66	-	-	+
1Z	28.66	-	-	+	28.66	-	-	+
2Z	26.66	-	-	+	28.33	-	-	+
3Z	27.66	-	-	+	28.33	-	-	+
Código de muestra	Promedios	Tetraciclina (30 µg)			Promedios	Trimetoprim /sulfa 1.25/23.75 µg		
		R (≤ 14)	I 15-18	S (≥19)		R (≤ 10)	I 11-15	S (≥16)
	1C	23.66	-	-	+	25.33	-	-
2C	25.00	-	-	+	24.66	-	-	+
1Z	24.33	-	-	+	26.33	-	-	+
2Z	23.66	-	-	+	25.00	-	-	+
3Z	23.66	-	-	+	25.33	-	-	+

C = Muestras de enjuague de manos de manipuladores de la Quesería Sabrina

Z = Muestras de enjuague de manos de manipuladores de la Quesería Doña Juana

R = Resistente

I = Intermedio

S = Sensible

ANEXO N° 9

PROCESAMIENTO DEL QUESO FRESCO ARTESANAL



1. Recepción de la leche



2. Cuajado de la leche



3. Quebrado del cuajo



4. Desuerado del cuajo



5. Prensado del cuajo



6. Amasado y salado del queso fresco



7. Moldeado del queso fresco

Fig. Nº 32. Procesamiento del queso fresco artesanal.

Anexo Nº 10. Aislamiento del *Staphylococcus aureus* en Agar Bair Parker.



Fig. Nº 33. Aislamiento del *Staphylococcus aureus* en leche cruda de vaca.

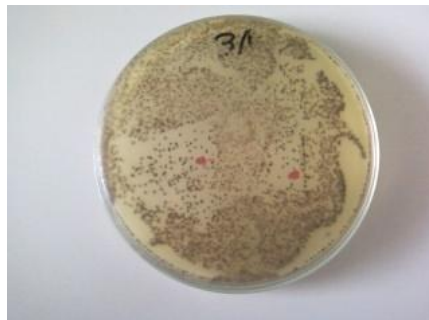


Fig. Nº 34. Aislamiento del *Staphylococcus aureus* en queso fresco.

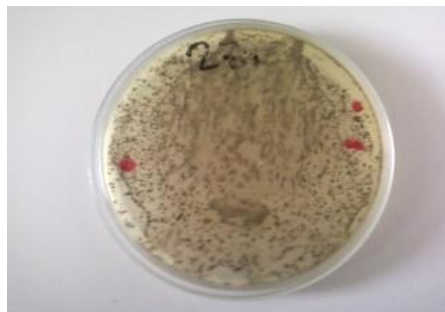


Fig. Nº 35. Aislamiento del *Staphylococcus aureus* en manipuladores.

Anexo № 11. Prueba de sensibilidad para las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* por el método de Kirby Bauer.



Fig. № 36. Disco de sensibilidad de amoxicilina / ac. clavulanico ante de *Staphylococcus aureus* aislado de manipuladores ambas queserías en estudio.

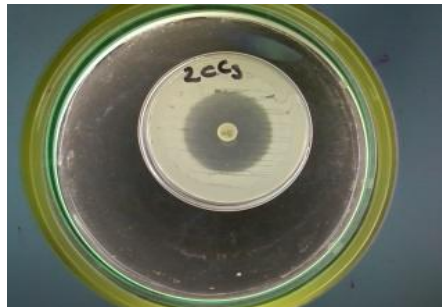


Fig. № 37. Disco de sensibilidad de ciprofloxacina ante *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de lavado manos de manipuladores



Fig. № 38. Disco de sensibilidad de eritromicina ante *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de lavado manos de manipuladores.