

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



DETERMINACION DE LA RESISTENCIA DEL *Staphylococcus aureus*
AISLADO DE QUESOS NO MADURADOS COMERCIALIZADOS EN EL
MERCADO CENTRAL DE SAN SALVADOR, A LOS ANTIBIOTICOS DE
PRUEBA SELECCIONADOS.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

EVELYN ELIZABETH BENITEZ CRUZ

KARLA GEOVANNA CENTI LIMA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE, 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: CALIDAD AMBIENTAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez.

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS; MICROBIOLOGICO

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Coralia de Los Ángeles González de Díaz.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS OMNIPOTENTE. Por abrirnos las puertas y marcarnos el camino que nos llevó a culminar nuestra carrera, por toda la ayuda, por toda la sabiduría y por toda la fortaleza que nos brindó a través de todos estos años de estudio.

A NUESTRA DOCENTE DIRECTORA.

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz, por el tiempo que nos regaló para poder atender cada una de nuestras inquietudes y por la guía que representó para nosotras a lo largo de todo este proceso que pudimos culminar con éxito.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE AREA:

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, MSc. María Evelin Sánchez de Ramos, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez, por cada una de las observaciones y sugerencias realizadas a lo largo de este trabajo ya que de esta manera pudimos mejorarlo y culminarlo eficazmente.

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

A nuestra amiga, Daniela Calderón, por la comprensión y apoyo incondicional que nos brindó en un momento tan importante.

Evelyn Benítez y Karla Centi.

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO, gracias mi Dios por siempre estar a mi lado, por la sabiduría y fortaleza que me regalaste para poder culminar mis estudios exitosamente, gracias mi Dios por todas las bendiciones que me has dado.

A MI MADRE, Silvia Elizabeth Cruz, por el gran sacrificio y esfuerzo que hizo con todo amor para que yo pudiera ser una Profesional, gracias mi mamita linda por ser ese apoyo incondicional y ese gran ejemplo de seguir adelante a pesar de las dificultades.

A MI ABUELITA, Gladis González, por ser esa mujer tan maravillosa que siempre ha estado conmigo en todo momento, gracias por todo el amor y apoyo que me has regalado.

A MI ABUELITO, David Cruz, que ha sido como un padre para mi, gracias por sus consejos y su apoyo.

A MI HERMANITA, Ingrid Benítez, por estar siempre a mi lado y ayudarme en todo momento.

A mi demás familia, que directa o indirectamente me apoyó a lo largo de mi carrera.

A mi compañera Karla Centi, por toda su comprensión y paciencia que tuvo conmigo a lo largo de este proceso, gracias por su ayuda y esfuerzo para poder terminar exitosamente esta meta.

Evelyn Elizabeth Benítez Cruz.

DEDICATORIA

A MI PADRE CELESTIAL. Por darme la oportunidad de lograr una meta como ésta, por darme las fuerzas, la capacidad, y todos los recursos que necesité en esta etapa de mi vida. Por darme de su amor y de su gracia.

A MIS PADRES. Carlos Centi y Juanita de Centi, por mostrarme cada día cuanto me aman, por preocuparse por mi futuro, por todo el sacrificio que su amor les ha motivado a hacer por mí, amor y sacrificio que hoy me permiten escribir estas líneas.

A MIS HERMANOS. Carlos y Omar Centi, por brindarme su ayuda, por todos los consejos que me dieron, por ser un gran ejemplo para mí al haber alcanzado sus metas con esfuerzo y dedicación.

A MI HERMANA. Wendi Centi, por ser mi mejor amiga, por todas aquellas cosas que hacía para mantenerme despierta cuando perdía la batalla contra el sueño que el cansancio me imponía, por estar ahí siempre que la necesité.

A MIS SOBRINITOS. Marco y Camila Centi, por ser una de mis motivaciones para seguir adelante en esta carrera que ahora he terminado.

A mi compañera de tesis. Evelyn Elizabeth Benítez Cruz, por el apoyo brindado y responsabilidad constante, por compartir esta alegría que hoy nos embarga al alcanzar este sueño.

Karla G. Centi Lima

INDICE

	Página
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xx
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	25
3.1 Quesos	25
3.1.1 Definición	25
3.1.2 Clasificación	25
3.2 Quesos No Madurados	26
3.2.1 Definición de Queso No Madurado	26
3.2.2 Clasificación	27
3.2.3 Materias primas para la elaboración de quesos no madurados	28
3.2.4 Características Generales	28
3.2.5 Características Organolépticas	28
3.2.6 Características Microbiológicas	29
3.2.7 Proceso de Fabricación de quesos no madurados	29
3.3 Higiene en la Industria Artesanal Láctea	29

	Página
3.4 Puntos de control en la elaboración de productos lácteos	31
3.5 Género <i>Staphylococcus</i>	32
3.5.1 Características del grupo	32
3.5.2 Hábitat de los <i>Staphylococcus</i>	32
3.5.3 División de los <i>Staphylococcus</i>	32
3.5.4 Aislamiento	33
3.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> el patógeno de los manipuladores	34
3.7 Intoxicaciones alimentarias	34
3.7.1 Intoxicaciones alimentarias por <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.8 Mastitis	37
3.8.1 Tipos de mastitis	37
3.8.2 <i>Staphylococcus aureus</i> en la mastitis bovina	38
3.9 Cepa patrón ATCC	38
3.9.1 Generalidades de la ATCC	39
3.10 Resistencia Microbiana	39
3.10.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana	40
3.10.2 Factores que determinan la resistencia a antibióticos	43
3.10.3 <i>Staphylococcus</i> resistentes a antibióticos	44
3.11 Técnica de Difusión en Discos	44

	Página
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	47
4.1 Tipo de Estudio	47
4.2 Investigación bibliográfica	47
4.3 Investigación de Campo	48
4.4 Parte Experimental	48
4.4.1 Recuento de viables en placa	49
4.4.2 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
4.4.3 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
4.4.4 Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> .	52
4.4.5 Tratamiento de la cepa patrón de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737	52
4.4.6 Preparación del Estándar 0.5 McFarland	53
4.4.7 Estandarización de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
4.4.8 Determinación de la resistencia a antibióticos (tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina, vancomicina, amikacina y oxacilina)	53
Capítulo V	
5.0 Resultados	56
5.1 Resultados de la lista de chequeo realizada en 20 establecimientos de venta de productos lácteos del Mercado Central de San Salvador	56
5.2 Resultados del Aislamiento e Identificación del <i>Staphylococcus aureus</i>	64
5.3 Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby- Bauer) para las cepas aisladas de las muestras de queso duro y quesillo.	71

	Página
5.4 Resultados de las pruebas realizadas a la cepa patrón de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737	77
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	79
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	82
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Proceso de elaboración de quesos no madurados.
2. Lista de chequeo de las condiciones de almacenamiento y manipulación de quesos no madurados en el Mercado Central de San Salvador.
3. Límites microbiológicos sanitarios para quesos no madurados según norma NSO 67.01.04:06
4. Transporte y preparación de muestra para recuento de viables en placa.
5. Técnica de conteo para recuento de viables en placa.
6. Tinción de Gram.
7. Esquemas de pruebas de identificación de ***Staphylococcus aureus***.
8. Siembra por estrías para aislamiento de bacterias.
9. Técnica de difusión en discos (Kirby-Bauer) para antibiograma.
10. Antibiograma.
11. Pruebas de identificación de la cepa patrón ATCC 29737 de ***Staphylococcus aureus***.
12. Normas del CLSI-NCCLS 2005 para interpretación de los diámetros de zonas.
13. Códigos utilizados en las tablas de resultados de la técnica de difusión en discos (Kirby-Bauer).

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Página
1. Comparación de la CIM ($\mu\text{g/mL}$) con los diámetros de halos de inhibición.	45
2. Principio de difusión de antibiótico en agar.	45
3. Gráfico que muestra la ubicación de quesos no madurados en los establecimientos de venta.	57
4. Gráfico que muestra el porcentaje de quesos no madurados debidamente tapados.	57
5. Gráfico que muestra el porcentaje de establecimientos debidamente aseados.	58
6. Gráfico que muestra el porcentaje de balanzas limpias utilizadas en los establecimientos de venta.	59
7. Gráfico que muestra el porcentaje de quesos que son pesados directamente en las balanzas.	60
8. Gráfico que muestra el porcentaje de los utensilios utilizados para cortar los quesos (queso duro y quesillo).	61
9. Gráfico que muestra el porcentaje de manipuladores que reciben el dinero de los productos (quesos no madurados) vendidos.	62
10. Placa de petri para conteo de viables en placa con colonias características de <i>Staphylococcus aureus</i> .	65
11. Pruebas de identificación: La imagen muestra un resultado positivo para la prueba de la catalasa.	67
12. Pruebas de identificación: La imagen presenta la formación de coágulos, indicando resultados positivos para la prueba de la coagulasa.	67

13. Conteo de las colonias características de <i>Staphylococcus aureus</i> para el recuento de viables en placa.	69
14. Gráfico que muestra los porcentajes de resistencia, sensibilidad intermedia y sensibilidad de las cepas de las muestras de queso duro.	72
15. Gráfico que muestra los porcentajes de resistencia, sensibilidad intermedia y sensibilidad de las cepas aisladas de las muestras de quesillo.	75
16. Medición de los diámetros de halos de inhibición en antibiograma.	76

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Página
1. Tabla resumen de los resultados de la lista de chequeo.	63
2. Aislamiento e Identificación del <i>Staphylococcus aureus</i> de las muestras de Queso Duro.	64
3. Aislamiento e Identificación del <i>Staphylococcus aureus</i> de las muestras de Quesillo.	66
4. Resultados del Recuento en Placa del <i>Staphylococcus aureus</i> en las muestras de Queso Duro.	68
5. Resultados del Recuento en Placa del <i>Staphylococcus aureus</i> en las muestras de Quesillo.	70
6. Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby-Bauer) de las muestras de Queso Duro.	71
7. Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby-Bauer) de las muestras de quesillo.	74
8. Resultados de las pruebas de identificación realizadas a la cepa patrón ATCC 29737.	77
9. Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby Bauer) a la cepa patrón ATCC 29737.	77

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americano
CENSALUD	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
h	horas
min.	minutos
mx.	muestra
NCCLS	Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos
NMP/g	Número Más Probable por gramo
NSO	Norma Salvadoreña Obligatoria
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
rpm	revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
std.	estándar
TIA	Toxiinfección Alimentaria
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

RESUMEN

RESUMEN

En la elaboración artesanal de productos lácteos se requiere de mucha manipulación; por lo tanto es importante cumplir con medidas higiénicas al momento de elaborar éstos productos. Una manipulación inadecuada de lácteos en todo su proceso conlleva a la contaminación de los mismos por bacterias dañinas como el ***Staphylococcus aureus***, un patógeno cuyo principal portador es el ser humano.

Los alimentos contaminados con ***Staphylococcus aureus*** pueden causar una intoxicación alimentaria, que puede ser perjudicial si éste patógeno presenta resistencia a los antibióticos que suelen ser prescritos para tratar la infección adquirida.

El objetivo de esta investigación fue determinar la resistencia del ***Staphylococcus aureus*** aislado de quesos no madurados comercializados en el Mercado Central de San Salvador, a los antibióticos de prueba seleccionados (Tetraciclina, Ciprofloxacina, Clindamicina, Vancomicina, Amikacina y Oxacilina).

Además se realizó una lista de chequeo para poder determinar las condiciones de manipulación y almacenamiento de queso duro y quesillo en los establecimientos de venta de lácteos, por lo que se hizo una prueba piloto en la cual se seleccionaron las muestras para el análisis (20 muestras de queso duro y 20 muestras de quesillo).

Las muestras recolectadas se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador. Posteriormente se procedió a realizar el análisis microbiológico que consistió en el recuento de viables en placa de ***Staphylococcus aureus***. Los resultados obtenidos demostraron que las UFC/g de ***Staphylococcus aureus*** en el 100% de las muestras de queso duro y

quesillo sobrepasaron el límite máximo permitido por la Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:06.de Quesos no Madurados.

Así como a las colonias sospechosas obtenidas en el recuento de viables en placa se les realizaron las pruebas de identificación: tinción de gram, prueba de la catalasa y prueba de la coagulasa; el 95% de los aislamientos en el queso duro y el 85% en el quesillo resultaron ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva.

A las cepas aisladas e identificadas se les realizó la prueba de difusión en discos (Kirby-Bauer) para determinar su resistencia o sensibilidad a los antibióticos de prueba utilizados. Los resultados demostraron que el 100% de las cepas aisladas del quesillo y queso duro son sensibles a la Ciprofloxacina, Clindamicina, Vancomicina, Amikacina y Oxacilina, mientras que solamente 10.5% de las cepas en el queso duro son resistentes a la Tetraciclina y el 6% de las cepas en el quesillo son de sensibilidad intermedia a dicho antibiótico. Estos resultados obtenidos indican el uso inadecuado de antibióticos por parte de la población.

Por lo que se recomienda a la población en general que cumplan los tratamientos con antibióticos adecuadamente para evitar la propagación de cepas resistentes y a la vez para prevenir intoxicaciones alimentarias. A los vendedores que realicen buenas prácticas de higiene en la manipulación y en el almacenamiento de los productos lácteos.

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

La mayoría de productos que se distribuyen en los mercados no cuentan con una calidad higiénica que permita asegurar la inocuidad de éstos, por lo que se pueden originar enfermedades transmitidas por alimentos conocidas como ETAs.

La producción de leche es un área de cuidado porque de ella deriva un buen número de productos muy consumidos, los cuales pueden ser contaminados con agentes patógenos si no se elaboran bajo medidas higiénicas necesarias. Uno de estos patógenos es el ***Staphylococcus aureus*** que produce una enterotoxina capaz de causar intoxicación alimentaria convirtiéndose en un riesgo para los consumidores. A esto se suma el riesgo de la existencia de cepas resistentes a antibióticos por lo que se dificulta el tratamiento terapéutico de las intoxicaciones.

También el uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento del ganado infectado con mastitis es un problema, ya que cepas que pueden haber adquirido resistencia debido a residuos de antibióticos en la leche pueden ser transmitidas a los consumidores a través de los alimentos ⁽¹⁾

Esta investigación permitirá informar a la población sobre algunos de los antibióticos a los cuales el ***Staphylococcus aureus*** ha adquirido resistencia y de esta manera evitar la compra innecesaria de dichos antibióticos para su tratamiento, a su vez de los antibióticos a los cuales este patógeno no ha adquirido ningún mecanismo de resistencia, siendo una buena alternativa para tratar la toxiinfección por ***Staphylococcus aureus***.

La mayoría de productos lácteos son bastante consumidos por la población salvadoreña debido a que se encuentran al alcance de su bolsillo. Si estos

productos lácteos se encuentran contaminados con ***Staphylococcus aureus*** a causa de una inadecuada manipulación o a un mal almacenamiento causará daños a la salud.

Por lo antes mencionado se realizó un análisis a dos de los productos lácteos denominados “Quesos no madurados” como son quesillo y queso duro que se comercializan en el Mercado Central de la ciudad de San Salvador y mediante una lista de chequeo se verificó las condiciones de almacenamiento y manipulación de estos dos productos en los establecimientos de venta de lácteos en dicho mercado. Se seleccionaron 20 muestras de queso duro y 20 muestras de quesillo para determinar la presencia de ***Staphylococcus aureus*** al cual se le evaluó la resistencia a antibióticos (tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina, vancomicina, amikacina y oxacilina) por el método de Kirby-Bauer o prueba de difusión en discos. Dicho análisis se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud CENSALUD de la Universidad de El Salvador entre los meses de julio a agosto de 2012.

Con los resultados se pudo clasificar a la cepa de ***Staphylococcus aureus*** aislada como sensible, moderadamente sensible o como resistente a los antibióticos de prueba, además se compararon dichos resultados con la cepa patrón de ***S. aureus*** ATCC 29737 sensible a los antibióticos seleccionados para una mejor interpretación de los resultados.

En la investigación además de la determinación de la resistencia a antibióticos se realizó el recuento de viables en placa de ***Staphylococcus aureus*** para la obtención de datos que aportaran una idea sobre la calidad microbiológica de las muestras a analizar comparando resultados con la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.04:06.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la resistencia del *Staphylococcus aureus* aislado de quesos no madurados comercializados en el Mercado Central de San Salvador a los antibióticos de prueba seleccionados.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Verificar por medio de una lista de chequeo las condiciones de almacenamiento y manipulación de queso duro y quesillo por parte de los comerciantes en el Mercado Central de San Salvador.
- 2.2.2 Aislar *Staphylococcus aureus* de las muestras seleccionadas.
- 2.2.3 Comparar si los resultados obtenidos del recuento en placa del *Staphylococcus aureus* de las muestras seleccionadas de queso duro y quesillo se encuentran dentro de los límites microbiológicos sanitarios para quesos no madurados según la norma NSO 67.01.04:06.
- 2.2.4 Demostrar si el *Staphylococcus aureus* presenta resistencia a los antibióticos (tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina, vancomicina, amikacina y oxacilina) empleando la técnica de Kirby-Bauer.
- 2.2.5 Relacionar los resultados obtenidos en la técnica de Kirby-Bauer de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* con respecto a los resultados obtenidos de la cepa patrón ATCC 29737 sensible a antibióticos.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Quesos

3.1.1 Definición

De acuerdo a la FAO/OMS: “es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos”. ⁽²⁵⁾

De acuerdo a la composición: “ es el producto, fermentado o no, constituido esencialmente por la caseína de la leche, en forma de gel más o menos deshidratado que retiene casi toda la materia grasa, si se trata de queso graso, un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales “ ⁽²⁵⁾

3.1.2 Clasificación:

Existen muchos tipos de quesos, normalmente se identifican las siguientes clases:

Según el tipo de leche:

- Cruda.
- Pasteurizada.
- Descremada.
- Parcialmente descremada.

Según el tipo de animal:

- Vaca.
- Cabra.
- Oveja.
- Búfala.
- Camella.

Según el tipo de elaboración:

- Industrial.
- Artesanal.

Según el método de coagulación:

- Coagulación por acción enzimática del cuajo (animal, vegetal o microbiano).
- Coagulación por acidificación.
- Coagulación combinada (cuajo y ácido).

Según tiempo de maduración:

- Madurados: Una vez obtenida la cuajada, esta se corta para el proceso de drenado del suero, poco a poco y de forma natural. Luego se somete a una maduración rápida de unos 30 días aproximadamente por la acción de microorganismos que actúan sobre su superficie.
- No madurados: Llegan al consumidor inmediatamente después de ser fabricados.⁽³¹⁾

3.2 Quesos No Madurados ⁽¹⁸⁾**3.2.1 Definición de Queso No Madurado**

Según la norma salvadoreña NSO 67.01.04:06 es el queso que está listo para su consumo después de su elaboración.

Pueden ser obtenidos mediante:

- Coagulación total o parcial de la proteína de leche, leche desnatada (descremada), leche parcialmente desnatada (semidescremada), nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla, o de cualquier combinación de estos productos, por acción del cuajo u otros

coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación.

3.2.2 Clasificación

El producto se clasificará de acuerdo a su composición y características físicas en los siguientes tipos:

- Queso cottage
- Queso cottage bajo en grasa
- Queso ricotta
- Queso crema
- Queso crema bajo en grasa
- Queso fresco
- Queso duro
- Queso de capas
- Queso mozzarella
- Quesillo alto y bajo en grasa
- Queso de suero o requesón
- Queso mantequilla.

Según su consistencia:

- Duro
- Semi duro (duro blando)
- Blando/suave

3.2.3 Materias primas para la elaboración de quesos no madurados

Para la elaboración de quesos no madurados se pueden utilizar los siguientes ingredientes (deben de cumplir con las normas salvadoreñas correspondientes o en su ausencia con las normas del Codex Alimentarius):

- Leche pasteurizada, entera, semidescremada o descremada, leche evaporada, crema; también se podrá emplear leche sometida a otros procesos térmicos y cuyas características microbiológicas sean equivalentes o mejores a la leche pasteurizada.
- Enzimas y/o cultivos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico (fermentos lácticos); cuajo u otras enzimas coagulantes apropiadas y sal yodada.
- Aditivos alimentarios.

3.2.4 Características Generales

Los quesos no madurados deben ser elaborados con ingredientes inocuos en cualquiera de sus etapas del proceso, y estar libre de cualquier defecto que pueda afectar su comestibilidad y buen aspecto del producto final.

3.2.5 Características Organolépticas

La apariencia, la textura, el color, el olor, y el sabor de los quesos no madurados deben de ser los característicos para el tipo de queso que corresponda y deben de ser libres de los efectos indicados a continuación:

- Defectos en el sabor: rancio, agrio, fermentado, mohoso, quemado o cualquier otro sabor extraño o anormal.
- Defectos en el olor: fermentado, amoniacal, fétido, rancio o cualquier otro olor anormal.

- Defectos en el color: no uniforme, manchado o moteado, provocado por crecimiento de mohos o microorganismos que no correspondan a las características del queso que se trate.
- Defectos en la textura: no propia o con cristales grandes de lactosa con consistencia ligosa (viscosa, pegajosa) acompañada de un olor desagradable.
- Defectos en la apariencia: no propia, con cristales de lactosa, sucia o con desarrollo de mohos u otros hongos.

3.2.6 Características Microbiológicas

El producto no debe contener microorganismos en número mayor a lo especificado en el cuadro de Límites Microbiológicos Sanitarios para quesos no madurados de la NSO 67.01.04:06₍₁₈₎ (ver anexo N°3) donde se indica que el recuento máximo permitido de ***Staphylococcus aureus*** (enterotoxigénico) y de Coliformes fecales es de 1×10^3 UFC/g y de 10 NMP/g, respectivamente.; asimismo que debe haber ausencia de ***Escherichia coli***, ***Salmonella*** y ***Listeria monocytogenes***.

3.2.7 Proceso de fabricación de quesos no madurados

La elaboración de quesos no madurados incluye varias operaciones (ver anexo No.1), la principal es que no lleva un proceso de maduración, ya que la característica principal de este tipo de quesos es que llegan al consumidor inmediatamente después de ser fabricados. ⁽²⁵⁾

3.3 Higiene en la industria Artesanal Láctea

El surgimiento del sector lácteo en el país data desde la época colonial, originándose principalmente por empresas artesanales, es decir empresas familiares poco convencionales cuya producción tenía por objetivo suplir sus

propias necesidades, con el tiempo se convirtió en procesos más complejos, cuya meta ya no era satisfacer sus propias necesidades sino comercializar sus productos; convirtiéndose en empresas de mayor tamaño, las cuales fueron utilizando técnicas más adecuadas para la producción y transformación de lácteos, siendo sus derivados los siguientes: quesos, quesillo, requesón, crema, mantequilla.

Unos de los mayores problemas con que se contaba en esos tiempos y que aun en la actualidad existe es el de no contar con las condiciones higiénicas adecuadas para la extracción, producción y comercialización de lácteos; como por ejemplo el uso de una gabacha, una mascarilla, un gorro y botas de hule para el personal que labora y en el caso del lugar de producción el de no contar con drenajes adecuados, iluminación adecuada, agua potable, pediluvios, etc.

(15 , 34)

El problema descrito anteriormente tiene como consecuencia obtener productos lácteos de mala calidad higiénica, es decir, que los productos lácteos que serán consumidos por la población presentaran microorganismos patógenos o dañinos causantes de enfermedades, entre ellos podemos mencionar los siguientes:

-*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.

Salmonella y **Staphylococcus aureus** son los principales agentes patógenos implicados en los brotes de toxiinfecciones alimentarias (TIA).⁽²⁷⁾

3.4 Puntos De Control En La Elaboración De Productos Lácteos

Los principales puntos de control en la elaboración de productos lácteos son los relativos a la revisión inicial de las materias primas (la leche) y los tratamientos térmicos a los que la leche puede ser sometida. La primera etapa es común en todos los productos lácteos, mientras que la segunda no se aplica necesariamente en la producción artesanal.

Los quesos elaborados a partir de leche no pasteurizada deben ser objeto de especial atención por el elevado riesgo que pueden conllevar. La termización de la leche no puede considerarse un punto de control crítico ya que muchos microorganismos patógenos, como **Listeria monocytogenes**, **Salmonella** spp o **E. coli** O157:H7, pueden sobrevivirla.

La leche debe ser de alta calidad microbiológica, carente de microorganismos. Debe ser mantenida en condiciones adecuadas de conservación (preferentemente a temperaturas inferiores a 4°C durante no más de 48 horas).⁽²⁹⁾

3.5 Género *Staphylococcus*

3.5.1 Características del grupo

Los estafilococos son cocos grampositivos (de 0.5 a 1.5 μm de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 ó 4 células) y más característicamente en grupos irregulares en forma de racimos (su denominación procede del griego *staphyle*, racimo de uvas) ⁽¹⁾

Como todos los cocos importantes desde el punto de vista médico, carecen de flagelos, no tienen motilidad y no forman esporas. Crecen mejor en condiciones aerobias, pero son anaerobios facultativos. En comparación con los estreptococos, producen catalasa.

En la actualidad en el género *Staphylococcus* se reconocen 32 especies, solo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico: ***S. aureus***, ***S. epidermidis***, ***S. saprophyticus***. ⁽⁷⁾

3.5.2 Hábitat de los *Staphylococcus*

Los estafilococos están ampliamente difundidos en la naturaleza. Su hábitat natural es la piel y las membranas mucosas de los mamíferos y las aves. También pueden encontrarse de forma transitoria en el tracto intestinal.

3.5.3 División de los *Staphylococcus*

Los estafilococos, según produzcan o no la enzima coagulasa, se dividen en dos grandes grupos:

1. Estafilococos coagulasa positivos (ECP)
2. Estafilococos coagulasa negativo (ECN)

Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de los estafilococos, de tal manera que, en general, se considera que los ECP son patógenos y que los ECN no lo son. ⁽¹⁾

Los estafilococos patógenos casi siempre causan hemólisis y coagulación del plasma; producen varias enzimas y toxinas extracelulares.

El tipo más común de envenenamiento alimentario es causado por una enterotoxina termoestable de los estafilococos. Estos desarrollan con rapidez resistencia a muchos antimicrobianos. ⁽¹¹⁾

3.5.4 Aislamiento

Existen varios medios selectivos para los estafilococos, como el agar sal manitol y el medio de Baird-Parker, que se utiliza principalmente para análisis de alimentos. Las colonias aparecen normalmente a las 24 horas de incubación pueden alcanzar los 4 mm de diámetro. Estas colonias son redondas, lisas y brillantes y en agar sangre opacas, lo que las diferencia de las colonias de los estreptococos beta-hemolíticos, que son más pequeñas y translúcidas. El ***S. aureus*** forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso. ⁽¹⁾

3.6 *Staphylococcus aureus*

El ***Staphylococcus aureus*** tiene un metabolismo de tipo fermentativo y anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo. Son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gases. Fermentan también el manitol con formación de ácidos y puede hacerlo en anaerobiosis. Su temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pH mucho más extremos. Soportan tasas elevadas de cloruro sódico, hasta un 15%.

Poseen una enzima, la coagulasa, que los diferencia del resto de las especies del género; ésta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina. Poseen igualmente una desoxirribonucleasa o DNasa, una nucleasa exocelular que despolimeriza el ADN. A esta enzima se la denomina termonucleasa por ser termoresistente en las cepas de ***S.aureus***.

También presentan la proteína A, una proteína de unión inespecífica a anticuerpos que está relacionada con su virulencia. ^(11, 24)

3.6.1 *Staphylococcus aureus*, el patógeno de los manipuladores.

Pese a su amplia distribución y a la facilidad con la que llega a los alimentos y extiende una eventual contaminación, sus efectos son agudos y aparatosos pero remiten rápidamente. Los manipuladores de alimentos pueden favorecer su rápida extensión.

Staphylococcus aureus es un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales y extremadamente difícil de erradicar. El frío impide formar la toxina que desencadena la infección bacteriana en humanos. Una vez que el microorganismo llega al alimento, el control es relativamente sencillo, ya que si la temperatura de refrigeración es adecuada y no se rompe la cadena del frío, el microorganismo no será capaz de formar toxina. ^(11, 28)

3.7 Intoxicaciones alimentarias.⁽²⁷⁾

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Estas enfermedades se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos, parásitos o bien las sustancias tóxicas que ellos producen.

Las ETAs pueden ser intoxicaciones o infecciones:

Infección transmitida por alimentos: enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos (virus, bacterias, parásitos) perjudiciales vivos. Por ejemplo: ***Salmonella***, el virus de la Hepatitis A, ***Triquinella spirallis***.

Intoxicación causada por alimentos: enfermedad que resulta de la ingestión de toxinas o venenos que están presentes en el alimento ingerido, que han sido producidas por hongos o bacterias aunque estos microorganismos ya no estén presentes en el alimento. Por ejemplo: toxina botulínica, la enterotoxina de ***Staphylococcus***.

Los síntomas más comunes de las ETAs son vómitos, dolores abdominales, diarrea y fiebre, también pueden presentarse síntomas neurológicos, ojos hinchados, dificultades renales, visión doble, etc. Estos síntomas pueden variar dependiendo de la cantidad de bacterias o de toxinas presentes en el alimento, de la cantidad de alimento consumido y del estado de salud de la persona, entre otros factores. Para las personas sanas, la mayoría de las ETAs son enfermedades pasajeras, que sólo duran un par de días y sin ningún tipo de complicación, pero para las personas más susceptibles como son los niños, los ancianos, las mujeres embarazadas o los que se encuentran enfermos pueden ser más severas, dejar secuelas o incluso hasta provocar la muerte.

3.7.1 Intoxicaciones alimentarias por *S. aureus*

Los humanos son el depósito natural de ***S. aureus***. Esta bacteria se encuentra en la mucosa nasal y oral, además del pelo, heridas y ampollas. La contaminación de alimentos se da por fallas en la higiene personal y manipulación inadecuada de los alimentos⁽²⁷⁾. El envenenamiento con alimentos por toxina estafilocócica ha sido una secuela del descuido de las personas al exponer los alimentos a temperaturas que permiten la multiplicación bacteriana.

El alimento resulta ser contaminado por la persona que lo preparó y que es portadora nasal o tiene una lesión estafilocócica. Si el platillo se ha refrigerado de manera inadecuada, los estafilococos que contiene se multiplican y producen la enterotoxina. A causa de la resistencia de esta al calor, la toxicidad persiste incluso aunque el alimento se cueza antes de servirlo e ingerirlo.⁽⁷⁾

Una causa importante de intoxicación estafilocócica es la producción de enterotoxinas cuando se desarrolla **S. aureus** en alimentos que contienen carbohidratos y proteínas. La ingestión de 25 µg de enterotoxina B provoca vómito y diarrea. El envenenamiento alimentario causado por enterotoxina estafilocócica se caracteriza por un breve período de incubación (1 a 8 horas); náuseas severas, vómito y diarrea; y convalecencia rápida. Esto causa postración pero no suele haber fiebre. La recuperación es rápida, salvo en algunos casos de personas ancianas y en las que tienen otra enfermedad.⁽¹¹⁾ En casos severos puede ocasionar dolores de cabeza, dolores musculares, alteraciones temporales de la presión sanguínea y arritmia cardíaca.⁽²⁷⁾

En el país se dio el siguiente caso de intoxicación estafilocócica: en el departamento de La Paz., en San Luis de la Herradura, un niño de nueve años falleció luego de haber resultado intoxicado con productos lácteos (queso y crema); además, se intoxicaron sus cinco hermanos de 2 a 10 años y su padre de 55 años; se encontró como agente responsable al **Staphylococcus aureus**⁽⁵⁾

Alimentos asociados a intoxicaciones estafilocóccicas: Carnes y derivados; aves y derivados del huevo; ensaladas con huevos, atún, pollo, papa y pastas; productos de panificación como pasteles rellenos con crema, tortas de crema, además de leche cruda y productos lácteos.

3.8 Mastitis₍₁₎

La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es comúnmente una consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón. Es considerada una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero, y es una de las más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche producida y un aumento en los costos de tratamiento y servicios veterinarios, y pérdida de animales.

3.8.1 Tipos de mastitis

-Clínica: La mastitis clínica es una anomalía fácilmente observada por los granjeros en cualquiera de los dos casos: la leche y/o la ubre. Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento, la leche presenta una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente. La mastitis clínica debida a *Escherichia coli* (*E. coli*), estreptococos ambientales, y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) continua siendo un problema importante.

-Subclínica La mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas de la leche. Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche, composición alterada de la leche y la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche.

3.8.2 *Staphylococcus aureus* en la mastitis bovina.

El *Staphylococcus aureus* es la principal causa de infección intramamaria en los rumiantes por lo que se le considera el agente causal más importante y frecuente de la mastitis bovina. Aunque varios patógenos bacterianos pueden causar la mastitis, el *S. aureus* es el primer agente etiológico en la mayor parte del mundo surgido como el más prevalente, y una vez establecido en la glándula mamaria es muy difícil de erradicar, causa las pérdidas económicas más considerables en la industria de la leche.

La mastitis causada por *S. aureus* es casi imposible de controlar con terapia de antibióticos únicamente.

La resistencia cuesta dinero, medios de subsistencia y vidas humanas, y amenaza con socavar la eficacia de los programas de atención de la salud.

3.9 Cepa patrón ATCC

Cepas Certificadas: es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.

La adquisición de las Cepas de Referencia que son cepas certificadas es a partir de una colección internacional reconocida, con su respectivo Registro y Certificado. Entre ellas tenemos las siguientes:

- CEPAS NCTC: National Collection of type Cultures. Londres.
- CNCM: Collection Nationale de Cultures of Microorganismes. Paris, Francia.
- ATCC: American Type Culture Collection. Rockville, EU
- CCTM: Collection Nationale de Cultures de Microorganismes. Institut Pasteur

- NCYC: National Collection of Yeast Cultures. Norwik UK.
- NCIBM: National Collections of industrial and Marine Bacteria.
- CECT: Colección española de cultivos tipos.

3.9.1 Generalidades de la ATCC

La colección que almacena la ATCC se inició en 1925, sobre una colección de bacteriología iniciada en 1911. Es una organización en la que participan actualmente 21 sociedades científicas. En la actualidad mantiene colecciones de Bacteriología, Cultivos celulares, Plásmidos, Ácidos nucleicos y Genotecas, Micología y Botánica, Protistología y Virología. ⁽³⁷⁾

3.10 Resistencia microbiana.

La resistencia antibiótica puede ser de dos tipos: natural o intrínseca y puede ser también adquirida.

La resistencia natural es una situación no variable; es una capacidad propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes gramnegativos son resistentes a la vancomicina.

Por el contrario la resistencia adquirida es una capacidad que se obtiene en el camino por así decirlo, es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la meticilina. ⁽²¹⁾ Esta resistencia adquirida es la que representa una amenaza cuando se trata una infección ya que el antibiótico va

dirigido a eliminar el agente infeccioso pero existe el peligro que este ya sea resistente al fármaco y no cumpla con las expectativas terapéuticas.

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética pues pueden desarrollar otras vías metabólicas alternativas utilizando factores de crecimiento distintos de los de las células no resistentes.⁽²¹⁾

Pueden adquirir nuevos mecanismos de resistencia mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes.⁽²²⁾

3.10.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

Existen varios mecanismos de resistencia, los cuales se detallan a continuación:

Destrucción o Inactivación a través de enzimas:

El principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas (enzimas) y los betalactámicos (familia de antibióticos), pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos (familia de antibióticos).⁽²²⁾ Las bacterias crean resistencia a gran variedad de antimicrobianos de diversas estructuras para lo cual utilizan frecuentemente la producción de enzimas que destruyen o inactivan a los antimicrobianos mediante el tipo de reacciones mencionadas arriba.

El mecanismo mejor conocido es el que conduce a la destrucción del anillo β -lactámico por acción de las enzimas β -lactamasas que en grampositivas, especialmente los estafilococos (género al que pertenece la bacteria objeto de estudio de este trabajo), es común encontrar dichas enzimas en los plásmidos y suelen ser inducibles y extracelulares que se liberan en dos pasos: por la lisis de la bacteria debido al antibiótico y por la hidrólisis del antibiótico por la enzima.⁽²¹⁾

Modificaciones en el sitio blanco:

Este tipo de resistencia se debe a alteraciones en determinadas enzimas o en la capacidad de fijación a los ribosomas, existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo. Entre estas tenemos: modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico, es decir que las enzimas diana son alteradas de forma que disminuye la afinidad del antibiótico por el microorganismo, como por ejemplo las alteraciones en las PBP de ***Streptococcus pneumoniae*** que confiere resistencia a penicilina e incluso a ceftriaxona; la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales, como PBP2' en ***Staphylococcus*** spp. Meticilinoresistentes.⁽²²⁾

Desarrollo de vías metabólicas alternativas:

Los cambios en las vías metabólicas también se traducen en resistencia en unas cuantas combinaciones antimicrobiano-microorganismo; por ejemplo la dihidrofolato reductasa alternativa en las cepas resistentes a trimetoprim.⁽²²⁾

Todas estas modificaciones son debidas a cambios en el genotipo, estos cambios pueden ser de 2 tipos:

- SIN MATERIAL GENÉTICO EXTRAÑO.

Estos cambios son irreversibles, hereditarios, espontáneos o inducidos por agentes externos, que se dan en la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN de un organismo, es decir que se trata de una mutación en el cromosoma bacteriano.

- CON MATERIAL GENÉTICO EXTRAÑO.

Estos cambios se llevan a cabo mediante la transmisión de caracteres hereditarios de una bacteria dadora a otra receptora. Los mecanismos mediante los que se da la transmisión son los siguientes:

Transformación. Transferencia directa de ADN monocatenario de otras bacterias liberadas por lisis, que alteran el genotipo de la célula a la que pasan. Mecanismo por el cual una bacteria llamada «competente» incorpora ADN desnudo presente en el medio.

Transducción. Transferencia de ADN bicatenario incluido en un bacteriófago y transferido a otra bacteria.

Conjugación. Proceso que conlleva la transferencia unilateral de material genético entre bacterias del mismo género o de diferentes géneros por genes de resistencia a uno o más antibióticos portados en plásmidos que vehiculizan y confieren resistencia a los antimicrobianos (implica un contacto físico directo entre bacteria donante y bacteria receptora y por lo cual el plásmido pasa de una a otra). ^(8,21)

Alteraciones de la permeabilidad:

Este tipo de resistencia sobre todo busca impedir el ingreso o la permanencia del fármaco en cantidad suficiente como para ejercer su efecto pues consigue impedir la entrada, altera sistemas de transporte o salida del fármaco de una forma activa. Se pueden incluir aquí tres tipos:

-Alteraciones de las membranas bacterianas:

Se ve fundamentalmente en gramnegativos, donde la membrana externa de la envoltura celular es de naturaleza lipídica por lo que es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias necesitan de proteínas transmembrana con función de porina para poder penetrar pero las bacterias resistentes son capaces de disminuir la expresión de dichas porinas con lo que se disminuye el flujo de llegada del antibiótico. Se considera que en este caso los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico.

La ocurrencia simultánea de este mecanismo unido a otro, por ejemplo hidrólisis enzimática (aún en niveles discretos), sí puede conferir altos niveles de resistencia y ocasionar fallos terapéuticos.

-Alteraciones en la entrada de antibióticos dependiente de energía:

Como ocurre en la primera etapa de ingreso de los aminoglucósidos.

-Aumento de la salida de antibióticos:

La bacteria utiliza sistemas de bombeo activos asociados a la membrana con el fin de forzar la salida del antibiótico. Este mecanismo impide al antibiótico alcanzar concentraciones adecuadas en el interior de la bacteria para ejercer su actividad. ^(21,22)

3.10.2 Factores que determinan la resistencia a antibióticos.

Los factores implicados en la incidencia creciente de resistencia son el efecto selectivo del uso de antimicrobianos, la diseminación de la infección en poblaciones humanas y la capacidad de los plásmidos para pasar de una especie a otra, incluso de un género a otro.

Después de la segunda guerra mundial cuando el uso de la penicilina se introdujo al público en general casi todas las cepas de ***Staphylococcus aureus*** eran susceptibles, después de esa época las proporciones han cambiado mucho hasta el punto en que 80 a 90 % de los aislamientos actuales son resistentes a la penicilina. Es posible que las cepas resistentes existan desde antes de la introducción de un antimicrobiano, pero con frecuencia tan baja que es improbable detectarlas. Por ej. ***S. aureus*** productor de penicilasa se encontró en colecciones de cultivos previos al desarrollo y empleo de este antimicrobiano, es probable que las clonas resistentes aumenten y, si son virulentas, se diseminen.⁽⁷⁾

3.10.3 *Staphylococcus* resistentes a antibióticos.

De los estafilococos se puede decir:

-Resistentes a muchas penicilinas (penicilina G, ampicilina y fármacos similares) debido a la producción de β -lactamasa bajo el control de un plásmido que se transfiere por transducción y quizá también por conjugación.

-Resistentes a nafcilina (a meticilina y oxacilina) vinculado con la ausencia o inaccesibilidad de ciertas proteínas de unión a la penicilina (PBP) en los microorganismos.

- Frecuente resistencia mediada por plásmidos a tetraciclinas, eritromicinas, aminoglucósidos y a otros fármacos. ⁽⁹⁾

3.11 Técnica de difusión en discos.

La técnica de difusión en discos (prueba de Bauer-Kirby) es una técnica utilizada para determinar la sensibilidad de una cepa bacteriana a determinados antibióticos de prueba. Las pautas para el tratamiento antibiótico están destinadas por lo común a esta técnica, la cual es un método simplificado para aproximarse a la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) con correlatos interpretativos (ver figura N°1) basado en la medición del diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de papel impregnado con el antibiótico. Una vez el disco impregnado con el antibiótico entra en contacto con el agar el papel de filtro absorbe agua de la superficie húmeda de éste, entonces el antibiótico difunde al medio que lo rodea encontrándose más concentrado en las cercanías del disco y menos concentrado a medida se aleja de él (ver figura N°2). Cuando se alcanza una masa de bacterias crítica, la actividad inhibidora del antibiótico es superada y se produce el crecimiento bacteriano. ⁽¹⁰⁾

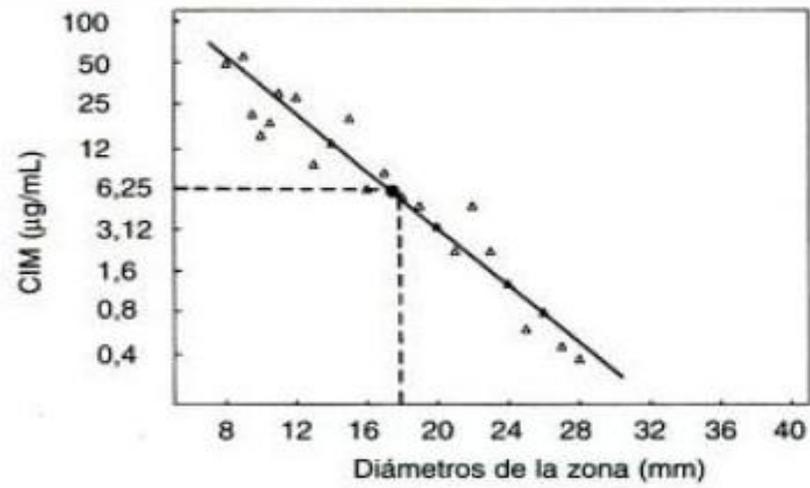


Figura N°1. Comparación de la CIM ($\mu\text{g/mL}$) con los diámetros de halos de inhibición.

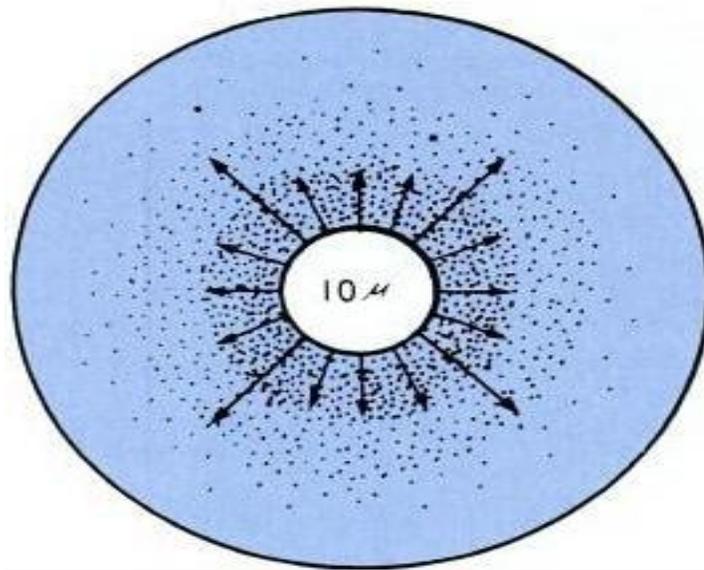


Figura N°2. Principio de difusión de antibiótico en agar.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de Estudio: Prospectivo, Transversal y Experimental.

El tipo de estudio fue Prospectivo porque el análisis realizado servirá como antecedente para futuras investigaciones relacionadas con el tema que se enfocó en determinar si el *Staphylococcus aureus* que se aisló de quesos no madurados comercializados actualmente en el Mercado Central de San Salvador presentaba resistencia a los antibióticos prescritos para el tratamiento de las infecciones causadas por dicha bacteria.

Transversal; porque se llevó a cabo durante un periodo aproximado de 9 meses en el año 2012.

También se considera experimental porque se llevaron a cabo pruebas de laboratorio donde se realizó un estudio microbiológico que comprendió: el conteo de colonias de *Staphylococcus aureus* (conteo de viables en placa) para verificar si las muestras en estudio se encontraban dentro de los límites permitidos por la norma NSO 67.01.04:06, el aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* (tinción de Gram, prueba de la catalasa y prueba de la coagulasa) y la determinación de su resistencia a los antibióticos de prueba (tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina, vancomicina, amikacina, y oxacilina) por la técnica de Kirby-Bauer.

4.2 Investigación Bibliográfica

Las bibliotecas en las cuales se realizó la investigación bibliográfica fueron las siguientes:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. (USAM).
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Internet.

4.3 Investigación De Campo: Universo y Muestra

Universo: Los Quesos No Madurados distribuidos en los establecimientos de venta de productos lácteos del Mercado Central de San Salvador.

Muestra: Queso duro y quesillo.

Muestreo: Se llevó a cabo una Prueba Piloto en los 40 establecimientos de venta de productos lácteos que se encuentran en el Mercado Central de San Salvador; se seleccionaron 20 muestras de quesillo y 20 de queso duro obteniendo un total de 40 muestras; la cantidad de muestra que se recolectó de cada una de ellas fue de 4 onzas que equivale a 113.4 g (se tomó 25 g de cada producto para el análisis). Mediante una lista de chequeo se evaluaron 20 establecimientos de venta, de los cuales se obtuvieron las muestras a analizar.

Los resultados obtenidos en la prueba piloto pueden servir en estudios posteriores para realizar un muestreo aleatorio simple.

4.4 Parte experimental

Las muestras se transportaron en hielera en bolsas estériles hasta el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) donde se realizaron los análisis. ⁽²⁾

4.4.1 Recuento de viables en placa^(2,10)

-Para el recuento de viables en placa se hizo una dilución de cada una de las muestras, para ello se pesó de forma aséptica 25 g de queso duro y 25 g de quesillo en una bolsa estéril para stomacher; luego se agregaron 225 mL de agua peptonada dentro de la bolsa.

-Se colocó la bolsa en el Stomacher a 260 rpm durante 2 min. y se pasó el contenido a un frasco de dilución. De esta forma se obtuvo la dilución 10^{-1} (0.1g/mL).

4.4.2 Determinación de *Staphylococcus aureus*^(2,10)

Del recuento de viables en placa se tomó 1mL de la dilución 10^{-1} (0.1g/mL) repartido en 3 alícuotas de 0.3, 0.3 y 0.4 mL que sirvieron para inocular 3 placas de petri que contenían Agar Baird Parker, utilizando la técnica de extendido:

-Se distribuyó la alícuota sobre la superficie del agar utilizando un rastrillo de vidrio estéril en forma de L girándolo sobre su propio eje de modo que se cubriera toda la superficie de forma homogénea.

-Se dejó la placa por un máximo de 10 min. hasta que el inóculo fuera absorbido por el agar.

-Después se invirtió la placa para mantenerla en incubación a 35°C por 45-48 h.

-Pasado el tiempo de incubación se procedió al recuento de viables en placas y se determinó las unidades formadoras de colonias UFC/g de *Staphylococcus aureus* en las muestras seleccionando las placas que contenían de 20 a 200 colonias y las que eran demasiado numerosas para contar se reportaron como >6500 por el inverso de la dilución 10^{-1} (ver anexo N°5).

-Después del recuento de viables se compararon los resultados con la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.04:06 (ver anexo N°3).

4.4.3 Identificación de *Staphylococcus aureus*.

Tinción de Gram^(9,35)

Con tinción de Gram se tiñeron las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* y se observó al microscopio donde se visualizó células grampositivas, esféricas, agrupadas en forma de racimos que identificaron al *Staphylococcus aureus* (ver anexo N°6).

-Para la tinción se hizo un frotis picando una colonia sospechosa de *Staphylococcus aureus*, la cual se colocó en una gota de solución salina sobre un portaobjeto.

-Después se pasó el portaobjeto varias veces sobre la llama del mechero para fijar la preparación.

-Sobre una bandeja para tinción se agregaron los colorantes de tinción. Primero una gota de Cristal Violeta y se dejó por un minuto. Luego se lavó con agua destilada.

-Después se agregó lugol como mordiente para fijar mejor el color del Cristal Violeta, después de dejarlo por un minuto, se lavó con agua destilada.

-Luego se añadió alcohol-acetona para decolorar por aproximadamente unos diez segundos, pasado este tiempo rápidamente se agregó una gota del colorante de contraste safranina y se dejó por aproximadamente treinta segundos.

-Por último se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire. Luego se observó la preparación en el microscopio con el objetivo de inmersión.

Prueba de la catalasa_(2,11)

-Se colocó una gota de solución de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos.

-Con el asa se picó una de las colonias sospechosas de **S. aureus** de las placas que se utilizaron para el recuento de viables en placa.

-La colonia sospechosa se colocó sobre la gota de peróxido.

La producción de burbujas de gas (oxígeno) indicó un resultado positivo.

Prueba de la coagulasa_(2,11)

-De las colonias sospechosas obtenidas del recuento en placa se tomaron de 4 a 5 colonias, las cuales fueron transferidas a un tubo que contenía 0.2-0.3 mL de caldo infusión cerebro-corazón BHI para la prueba de la coagulasa (ver anexo N°7).

-Se incubó el tubo a 35°C de 18-24 h.

-Después del tiempo de incubación se agregó al tubo 0.5 mL de plasma coagulasa reconstituida con EDTA y se mezcló completamente.

-Fue necesario incubar nuevamente a 35°C y examinar periódicamente cada 6h para verificar la formación de un coagulo que permanecía firme y completo cuando el tubo se invertía, lo que confirmó la presencia de **S. aureus**.

4.4.4 Aislamiento de *Staphylococcus aureus*⁽⁹⁾

Una vez realizado el recuento se procedió a picar de las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* para transferirlas a un tubo con 10 mL de caldo nutritivo, siempre se flameó la boca de éste antes y después de cada inoculación, luego se incubó por 24 h a 35-37°C. Después del tiempo de incubación de esta suspensión de bacterias se tomó una asada de forma aséptica y se aisló utilizando la técnica de siembra por estría (ver anexo N°8).

4.4.5 Tratamiento de la cepa patrón de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737

-La cepa patrón de *Staphylococcus aureus* utilizada fue la cepa ATCC 29737 que se encontraba en un microvial, de este microvial se tomó una asada y se inoculó en una placa de petri con Agar Baird Parker por la técnica de estriado para verificar su crecimiento en dicho medio selectivo.

-Se incubó la placa de Petri a 35° C por 24 horas.

Después del tiempo de incubación se tomó de las colonias de la placa con Baird Parker para la realización de las pruebas de identificación:

-Tinción de Gram, Prueba de la catalasa y Prueba de la coagulasa (de igual forma que para las cepas aisladas de las muestras).

-De esta forma se verificó si la cepa había experimentado alguna contaminación y además sirvió para comparar resultados con los obtenidos de las cepas en las muestras de estudio.

-Se procedió a la estandarización de la cepa patrón para el ajuste de turbidez y la posterior aplicación de la técnica de Kirby – Bauer de igual forma que para las cepas en las muestras de estudio como se detalla a continuación.

4.4.6 Preparación del Estándar 0.5 McFarland⁽¹²⁾

La solución estándar se preparó agregando 0.5 mL de BaCl₂ 1% a 99.5 mL de H₂SO₄ 1%. Se agitó fuertemente y se distribuyó 5 mL del estándar preparado en un tubo que serviría como patrón de comparación.

4.4.7 Estandarización de las cepas de *Staphylococcus aureus*⁽¹²⁾

Para la estandarización de las cepas aisladas de las muestras de queso duro y quesillo se hizo lo siguiente:

-De las colonias de *Staphylococcus aureus* aisladas en agar nutritivo por la técnica de siembra por estría, se picó de 4 a 5 colonias con un asa de inocular y se transfirieron a un tubo que contenía de 4 a 5 mL de caldo tripticasa de soya.

-Se incubó el tubo a 35 °C hasta que la turbidez coincidiera con la del estándar de BaSO₄ 0.5 McFarland (10⁸ UFC/mL).

-Para comparar la turbidez se observaron ambos tubos contra un fondo blanco en el que se habían trazado líneas negras contrastantes.

-Se agregó caldo tripticasa de soya a aquellos tubos en que la turbidez era mayor a la del estándar de BaSO₄ 0.5 McFarland.

4.4.8 Determinación de la resistencia a antibióticos (tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina, vancomicina, amikacina y oxacilina)⁽¹²⁾

Para la prueba de susceptibilidad a los antibióticos se hizo lo siguiente:

-Después del ajuste de turbidez dentro de los siguientes 15 minutos se sumergió un hisopo estéril en el caldo el cual se presionó sobre las paredes internas del tubo para quitar el exceso.

-Con el hisopo ya impregnado de la suspensión estandarizada aproximadamente a 10^8 UFC/mL, se inoculó a temperatura ambiente la superficie seca de una placa con Agar Mueller- Hinton.

-Se pasó el hisopo por toda la superficie, rotando 3 veces la placa aproximadamente 60° después de cada inoculación con lo cual se aseguró una distribución uniforme del inóculo.

-Se tapó la placa y se esperó no más de 15 minutos para que la superficie del agar se secase.

-Luego se colocaron los discos de antibióticos con ayuda de una pinza estéril presionando suavemente y colocándolos de modo que quedaran separados por no menos de 24 mm de centro a centro.

-Las placas fueron invertidas e incubadas a 35°C en incubadora con aire ambiente por un tiempo de 16-18 horas (ver anexo N° 9).

-Pasado este tiempo de incubación se procedió a la lectura del diámetro de los halos de inhibición con un pie de rey cuidando de observar la placa en línea directamente vertical para evitar lecturas equivocadas por paralelismo. Se midió cuidadosamente la zona de inhibición completa alrededor del disco, incluyendo el diámetro del disco en la medición (ver anexo N°10).

Con los resultados de los diámetros de inhibición se catalogó al microorganismo como resistente, susceptible o de sensibilidad intermedia basándose en la tabla de interpretación de resultados dada por el Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos (NCCLS por sus siglas en inglés) ⁽²⁹⁾, específicamente con discos impregnados de tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina, vancomicina, amikacina y oxacilina (ver anexo N° 12).

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

5.1 Resultados de la lista de chequeo realizada en 20 establecimientos de venta de productos lácteos del Mercado Central de San Salvador.

Para poder verificar si el almacenamiento y manipulación que se les da al queso duro y al quesillo en el Mercado Central de San Salvador se realiza bajo medidas higiénicas, se evaluaron los establecimientos de venta seleccionados con una lista de chequeo (ver anexo N°2) cuyos resultados se presentan a continuación:

-¿Se encuentran el queso duro y el quesillo protegidos de la luz solar?

El 100% de los establecimientos de ventas de lácteos evaluados mantienen sus productos alejados de la luz solar, pero esto no indica que los productos pueden estar libres de contaminación microbiana.

-¿Se encuentran los productos (queso duro y quesillo) en refrigeración?

En ninguno de los establecimientos los productos lácteos se encuentran en refrigeración, lo cual a parte de favorecer el crecimiento microbiano aumenta el riesgo de formación de la enterotoxina estafilocócica ya que para que se produzca en el alimento contaminado es necesario que se mantenga a más de 10 °C durante media hora.⁽¹⁰⁾

-Si no están en refrigeración ¿En qué lugar se encuentran ubicados?

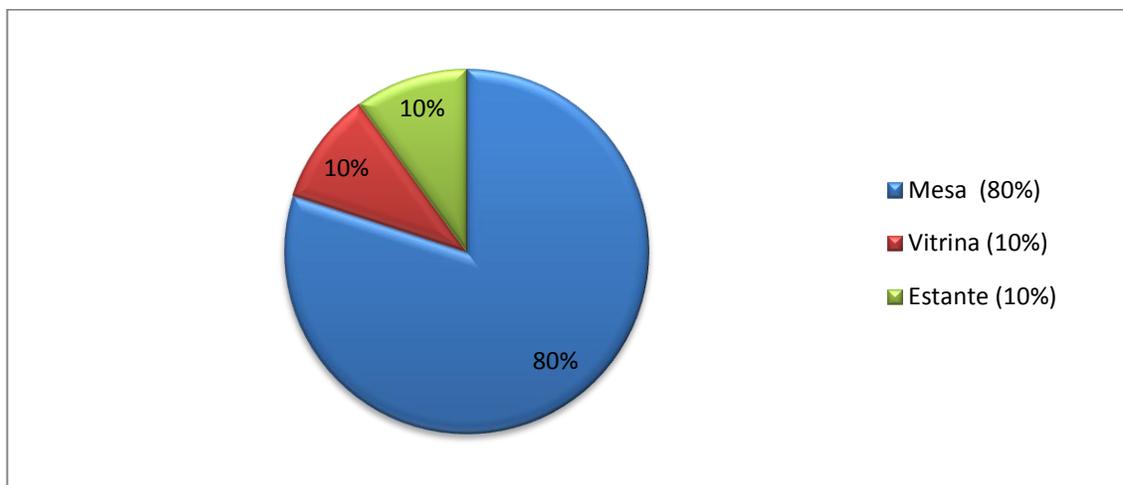


Figura N°3. Gráfico que muestra la ubicación de quesos no madurados en los establecimientos de venta.

De los veinte establecimientos de productos lácteos a los que se evaluaron con la lista de chequeo, dieciséis de ellos (80%) mantienen ubicados sus productos lácteos en mesa, dos (10%) en vitrina y dos (10%) en un estante.

-¿Están los productos debidamente tapados?

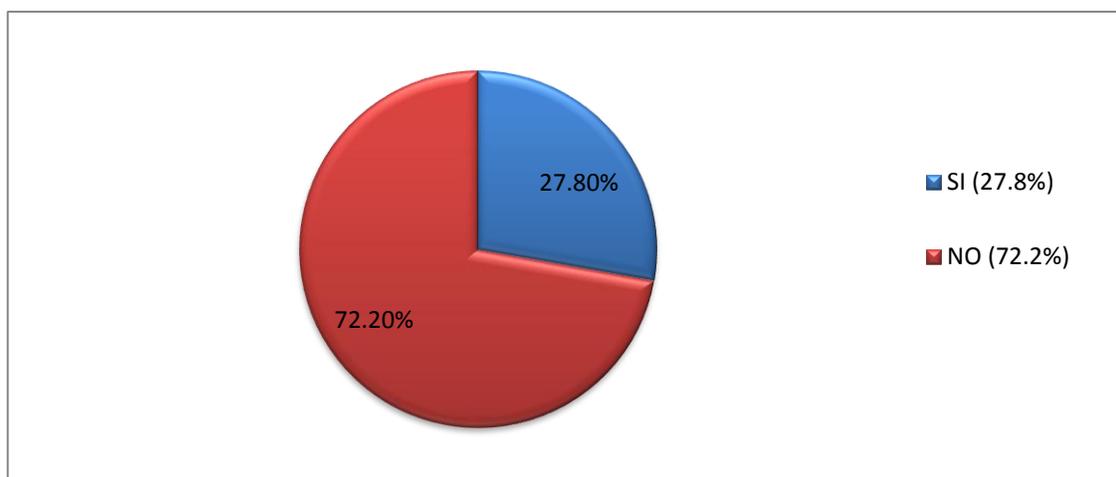


Figura N°4. Gráfico que muestra el porcentaje de quesos no madurados debidamente tapados

De los productos lácteos que no se encuentran en vitrina en cinco establecimientos de venta (27.8%) los quesos no madurados se encontraron debidamente tapados con un mantel, esto no indica que los productos se encuentran a salvo de cualquier contaminación; los restantes trece establecimientos (72.2%) mantenían sus productos con plásticos que no cubrían totalmente dicho producto, y mallas que fácilmente cualquier insecto podría introducirse dentro ellos. (ver figura N° 4)

-¿El establecimiento de venta se encuentra debidamente aseado?

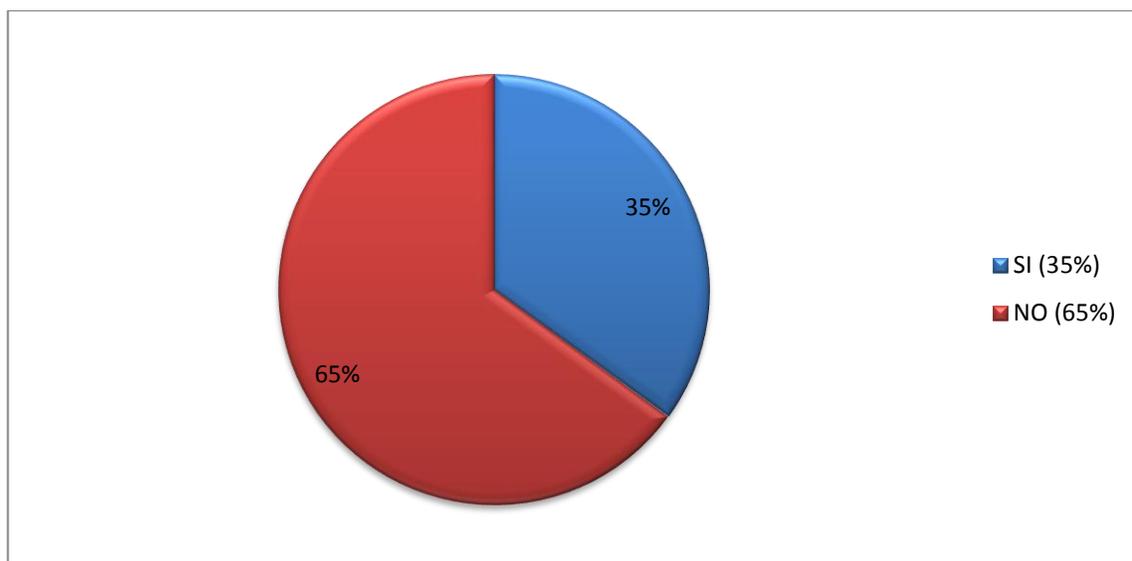


Figura N°5. Gráfico que muestra el porcentaje de establecimientos debidamente aseados.

Trece establecimientos (65%) no se encontraron debidamente aseados ya que a sus alrededores se encontró basura (bolsas en el suelo), moscas sobre mesas, estantes, balanzas. Y los siete restantes (35%) si se encontraron debidamente limpios (no había basura, moscas a sus alrededores).

-¿Utilizan guantes los vendedores para manipular los quesos?

En todos los establecimientos ningún vendedor hace uso de guantes para manipular los quesos, esto es una de las razones por las cuales los productos se pueden contaminar y por lo tanto aumentar el crecimiento microbiano.

-¿Utilizan la vestimenta necesaria (malla, delantal) los manipuladores de los quesos en el establecimiento?

En todos los establecimientos ninguno de los manipuladores de los productos lácteos utiliza toda la vestimenta adecuada ya que la mayoría solo tenía puesto un delantal, mientras que no utilizaban malla para evitar contaminación de los lácteos con cabello u otros residuos de este.

-¿Las balanzas que se utilizan se encuentran limpias?

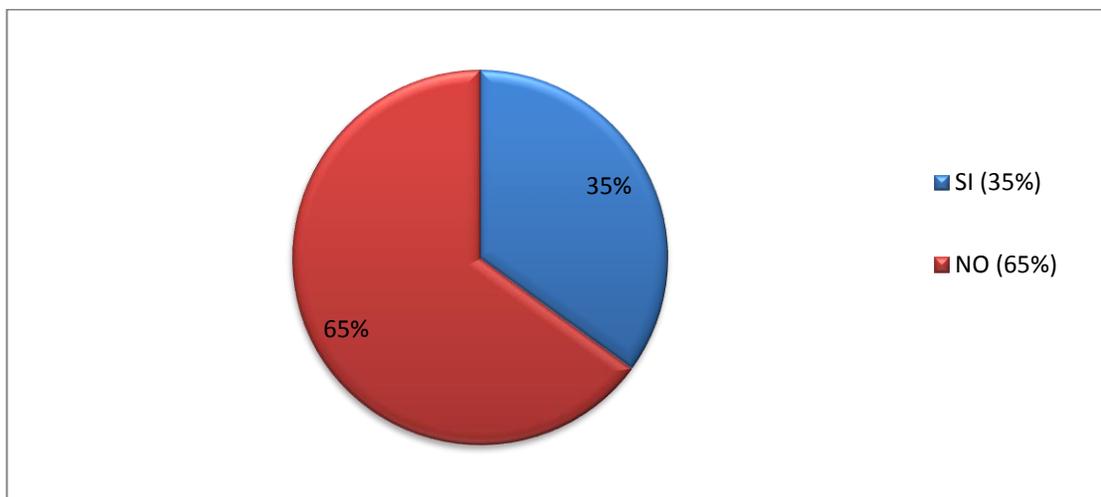


Figura N°6. Gráfico que muestra el porcentaje de balanzas limpias utilizadas en los establecimientos de venta.

En siete establecimientos (35%) las balanzas utilizadas se encontraban limpias no tenían residuos de los diversos lácteos comercializados, mientras que en los trece establecimientos restantes (65%) las balanzas no se encontraban limpias ya que tenían residuos de otros productos (harina). (Ver figura N° 6)

-¿Los quesos son pesados directamente en la balanza?

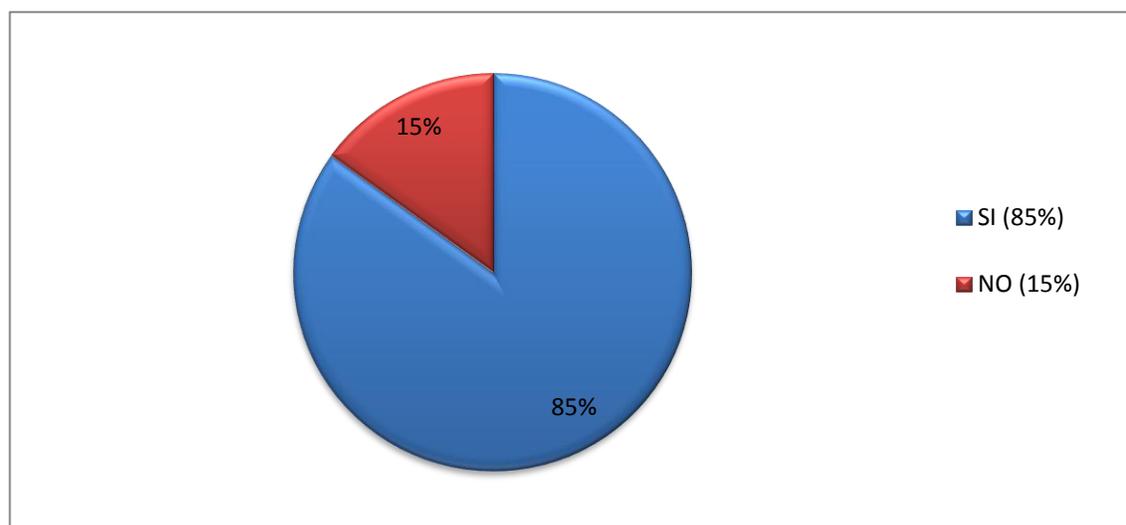


Figura N°7. Gráfico que muestra el porcentaje de quesos que son pesados directamente en las balanzas.

En diecisiete establecimientos (85%) los quesos se pesaron directamente en la balanza y luego fueron tomados por el manipulador con la mano en la bolsa en que serían entregados al comprador; en los tres establecimientos restantes (15%) los quesos se pesaron en la bolsa que se comercializa el producto.

-¿Qué tipo de utensilios son utilizados para cortar el queso duro y el quesillo?

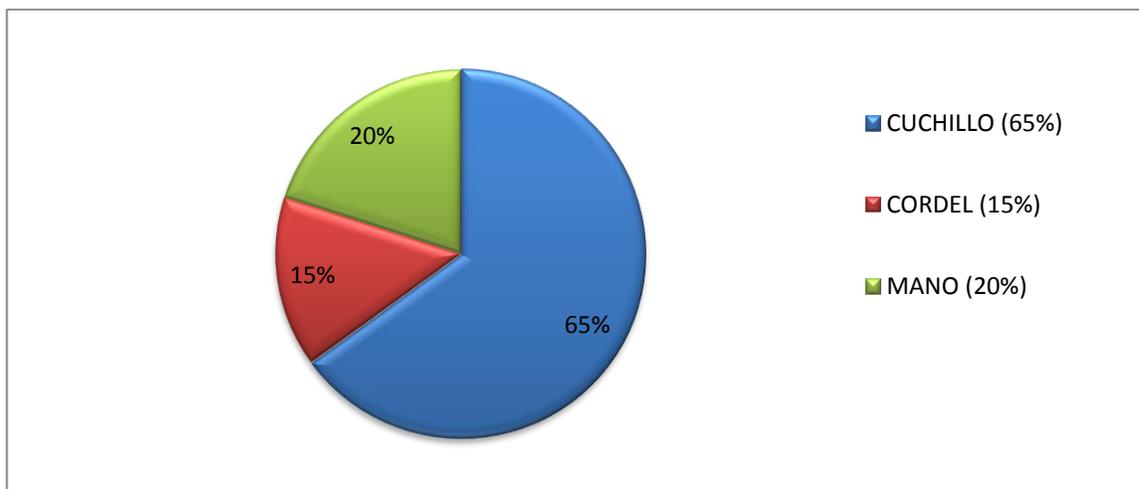


Figura N°8. Gráfico que muestra el porcentaje de los utensilios utilizados para cortar los quesos (queso duro y quesillo).

En tres establecimientos utilizaron cordel (15%) para cortar las marquetas de quesos esto puede ser una causa para aumentar la probabilidad de contaminar el producto debido a que no es un utensilio higiénico para ser utilizado, en cuatro establecimientos (20%) utilizaron la mano para cortar el quesillo aumentando la probabilidad de contaminación y en los restantes trece establecimientos (65%) utilizaron cuchillos para partir el producto.

-¿Se utilizan los mismos utensilios para manipular la variedad de productos?

El 100% de los establecimientos de venta de los productos lácteos utilizan los mismos utensilios (cuchillo) para cortar las diferentes variedades de lácteos, favoreciendo una contaminación cruzada.

-¿El manipulador es la misma persona que recibe el dinero del producto vendido?

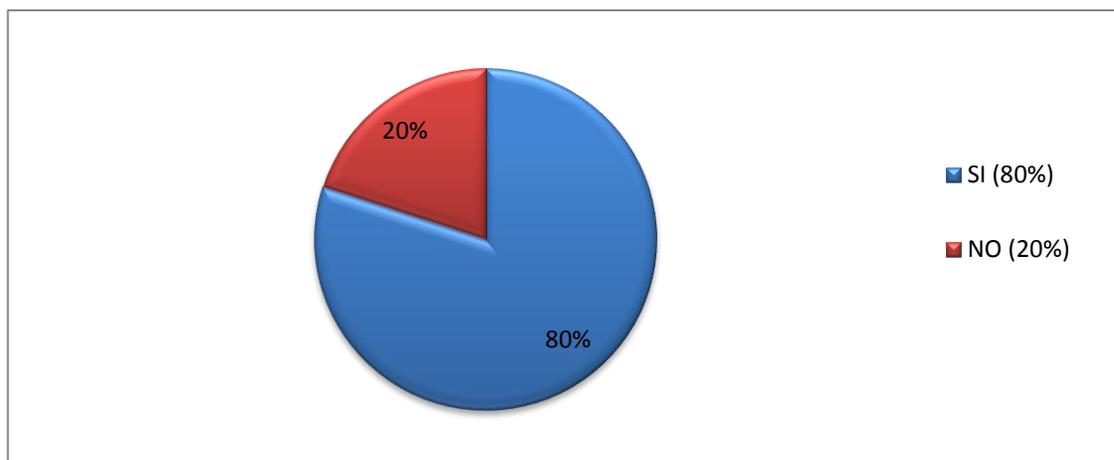


Figura N°9. Gráfico que muestra el porcentaje de manipuladores que reciben el dinero de los productos (quesos no madurados) vendidos.

En cuatro establecimientos (20%) el manipulador de los quesos no era la misma persona quien recibe el dinero, mientras que en los otros dieciséis establecimientos (80%) si es la misma persona quien realiza la manipulación y quien recibe el dinero provocando una contaminación del producto.

Según los resultados aportados por la lista de chequeo en todos los establecimientos de venta de lácteos evaluados se encuentra una deficiente aplicación de medidas higiénicas por lo que los productos expendidos en dichos lugares se encuentran expuestos a una contaminación microbiana poniendo en duda la inocuidad de los mismos. A continuación se presenta una tabla que muestra un resumen de los resultados obtenidos de la lista de chequeo con que se evaluó las condiciones de almacenamiento y manipulación de los productos lácteos en los establecimientos de venta seleccionados del Mercado Central de San Salvador.

Tabla N°1. Tabla resumen de los resultados de la lista de chequeo.

Pregunta	% Respuesta		
	SI ___ NO ___		
Los productos (queso duro y quesillo) se encuentran protegidos de la luz solar.	SI ___ NO ___	100%	0%
Los productos (queso duro y quesillo) se encuentran en refrigeración	SI ___ NO ___	0%	100%
Si no se encuentran en refrigeración ¿En qué lugar se encuentran ubicados?	Mesa Vitrina Estante	80% 10% 10%	
¿Están los productos debidamente tapados?	SI ___ NO ___	27.8%	72.2%
El establecimiento de venta se encuentra debidamente aseado	SI ___ NO ___	35%	65%
Los vendedores del establecimiento utilizan guantes para manipular los quesos	SI ___ NO ___	0%	100%
Los manipuladores de los quesos en el establecimiento utilizan la vestimenta necesaria (malla, delantal).	SI ___ NO ___	0%	100%
Las balanzas que se utilizan se encuentran limpias	SI ___ NO ___	35%	65%
Los quesos son pesados directamente en la balanza	SI ___ NO ___	85%	15%
¿Qué tipo de utensilios son utilizados para cortar el queso duro y el quesillo?	Cuchillo Alambre Manos	65% 15% 20%	
Se utilizan los mismos utensilios para manipular la variedad de productos	SI ___ NO ___	100%	0%
El manipulador es la misma persona que recibe el dinero de los productos vendidos	SI ___ NO ___	80%	20%

5.2 Resultados del Aislamiento e Identificación del *Staphylococcus aureus*.

Tabla N°2. Aislamiento e Identificación del *Staphylococcus aureus* de las muestras de Queso Duro.

MUESTRA QUESO DURO	TINCIÓN DE GRAM	CATALASA	COAGULASA
1A	(+)	(+)	(+)
2A	(+)	(+)	(+)
3A	(+)	(+)	(+)
4A	(+)	(+)	(+)
5A	(+)	(+)	(+)
6A	(+)	(+)	(-)
7A	(+)	(+)	(+)
8A	(+)	(+)	(+)
9A	(+)	(+)	(+)
10A	(+)	(+)	(+)
11A	(+)	(+)	(+)
12A	(+)	(+)	(+)
13A	(+)	(+)	(+)
14A	(+)	(+)	(+)
15A	(+)	(+)	(+)
16A	(+)	(+)	(+)
17A	(+)	(+)	(+)
18A	(+)	(+)	(+)
19A	(+)	(+)	(+)
20A	(+)	(+)	(+)

En las placas con Baird Parker para las muestras de queso duro se observó colonias características de ***Staphylococcus aureus***, negras, brillantes, con un halo claro alrededor, gomosas al tacto con el asa (ver figura N°10); a estas colonias características se les hicieron las pruebas de identificación de las cuales se encontró que el 100% eran cocos gram positivos y catalasa positiva (ver figura N°11) encontrándose que del total de aislamientos en el queso duro un 95% de estos reportó la presencia de ***Staphylococcus aureus***, lo cual fue confirmado por un resultado positivo de la prueba de la coagulasa (ver figura N°12).

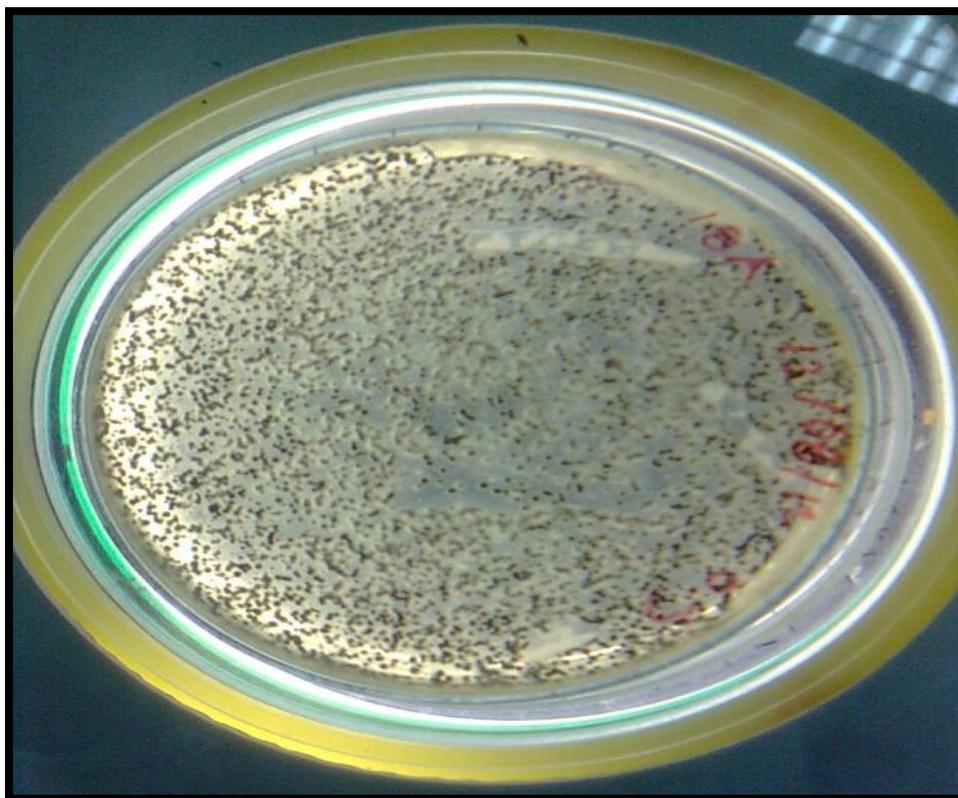


Figura N°10. Placa de petri para conteo de viables en placa con colonias características de ***Staphylococcus aureus***.

Tabla N°3. Aislamiento e Identificación del *Staphylococcus aureus* de las muestras de Quesillo.

MUESTRA QUESILLO	TINCIÓN DE GRAM	CATALASA	COAGULASA
1B	(+)	(+)	(+)
2B	(+)	(+)	(+)
3B	(+)	(+)	(+)
4B	(+)	(+)	(+)
5B	(+)	(+)	(+)
6B	(+)	(+)	(+)
7B	(+)	(+)	(+)
8B	(+)	(+)	(+)
9B	(+)	(+)	(+)
10B	(+)	(+)	(+)
11B	(+)	(+)	(+)
12B	(+)	(+)	(+)
13B	(+)	(+)	(+)
14B	(+)	(+)	(+)
15B	(+)	(+)	(-)
16B	(+)	(+)	(+)
17B	(+)	(+)	(-)
18B	(+)	(+)	(+)
19B	(+)	(+)	(-)
20B	(+)	(+)	(+)

En las pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus*, para las muestras de queso se observó que en las placas de Baird Parker había colonias negras, brillantes, con un halo claro alrededor, gomosas al tacto con el asa (ver figura N°10) y se encontró que un 85% de los aislamientos en el queso reportó un resultado positivo de la prueba de la coagulasa (ver figura N°12) confirmando la presencia de *Staphylococcus aureus*.



Figura N°11. Pruebas de identificación: La imagen muestra un resultado positivo para la prueba de la catalasa.

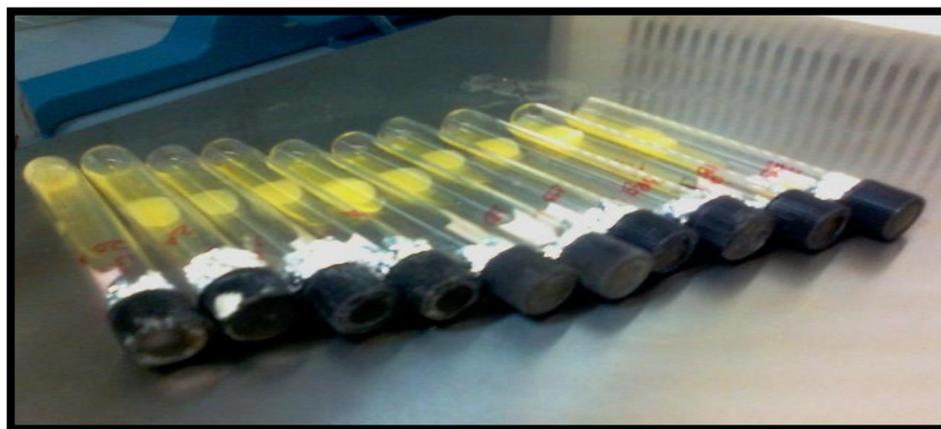


Figura N°12. Pruebas de identificación: La imagen presenta la formación de coágulos, indicando resultados positivos para la prueba de la coagulasa.

Tabla N°4. Resultados del Recuento en Placa del *Staphylococcus aureus* en las muestras de Queso Duro.

Muestra Queso duro	Conteo de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Especificación según norma NSO 67.01.04:06: Recuento máximo permitido de 10^3 UFC/g
1A	2100	No cumple
2A	4900	
3A	2500	
4A	> 65000	
5A	> 65000	
7A	43000	
8A	8800	
9A	35000	
10A	17000	
11A	1600	
12A	> 65000	
13A	42000	
14A	> 65000	
15A	> 65000	
16A	37000	
17A	1700	
18A	9000	
19A	50000	
20A	51000	

Ninguna de las muestras de queso duro analizadas se encuentra dentro del recuento máximo recomendado (10^3 UFC/g) por la Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:06 (ver anexo N°3) para *Staphylococcus aureus*, sin embargo las muestras 11A y 17A se encuentran muy cerca del límite permitido con recuentos de 1600 UFC/g y 1700 UFC/g respectivamente. (ver figura N°13).



Figura N°13. Conteo de las colonias características de *Staphylococcus aureus* para el recuento de viables en placa.

Tabla N°5. Resultados del Recuento en Placa del *Staphylococcus aureus* de la muestras de Quesillo.

Muestra Quesillo	Conteo de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Especificación según norma NSO 67.01.04:06: Recuento máximo permitido de 10 ³ UFC/g
1B	> 65000	No cumple
2B	> 65000	
3B	> 65000	
4B	> 65000	
5B	> 65000	
6B	12000	
7B	> 65000	
8B	18000	
9B	28000	
10B	16000	
11B	20000	
12B	> 65000	
13B	2100	
14B	> 65000	
16B	> 65000	
18B	> 65000	
20B	> 65000	

El menor recuento para las muestras analizadas de quesillo fue de 2100 UFC/g que corresponde al recuento de la muestra 13B, aun así no se encuentra dentro de los límites permitidos por la norma salvadoreña. También se observa que las muestras de quesillo presentan recuentos mayores que las muestras analizadas de queso duro, esto puede deberse a que es más fácil para los manipuladores el cortar dicho producto con sus propias manos como lo muestran los datos aportados por la lista de chequeo con que se evaluó los establecimientos de venta.

5.3 Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby- Bauer) para las cepas aisladas de las muestras de queso duro y quesillo.

Tabla N°6. Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby- Bauer) de las muestras de Queso Duro.

Muestra Queso Duro	Diámetro de halos de inhibición (mm)						Interpretación						Diámetro de halos de inhibición (mm) de la cepa patrón ATCC 29737					
	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox
1A	29	27	28	18	28	25	S	S	S	S	S	S	28	32	27	18	31	26
2A	29	24	24	17	27	17	S	S	S	S	S	S						
3A	31	28	32	18	30	18	S	S	S	S	S	S						
4A	31	28	30	18	30	28	S	S	S	S	S	S						
5A	30	29	28	17	30	26	S	S	S	S	S	S						
7A	30	33	29	17	32	29	S	S	S	S	S	S						
8A	30	32	22	18	31	14	S	S	S	S	S	S						
9A	33	35	30	19	29	31	S	S	S	S	S	S						
10A	33	34	32	19	33	28	S	S	S	S	S	S	Interpretación					
11A	13	35	29	20	34	21	R	S	S	S	S	S	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox
12A	31	35	29	20	33	27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13A	30	32	28	17	29	28	S	S	S	S	S	S						
14A	13	33	24	17	30	28	R	S	S	S	S	S						
15A	17	34	27	18	29	24	SI	S	S	S	S	S						
16A	30	33	30	17	31	31	S	S	S	S	S	S						
17A	31	33	27	18	32	19	S	S	S	S	S	S						
18A	33	32	29	20	29	28	S	S	S	S	S	S						
19A	32	34	29	19	31	25	S	S	S	S	S	S						
20A	33	35	29	20	33	29	S	S	S	S	S	S						

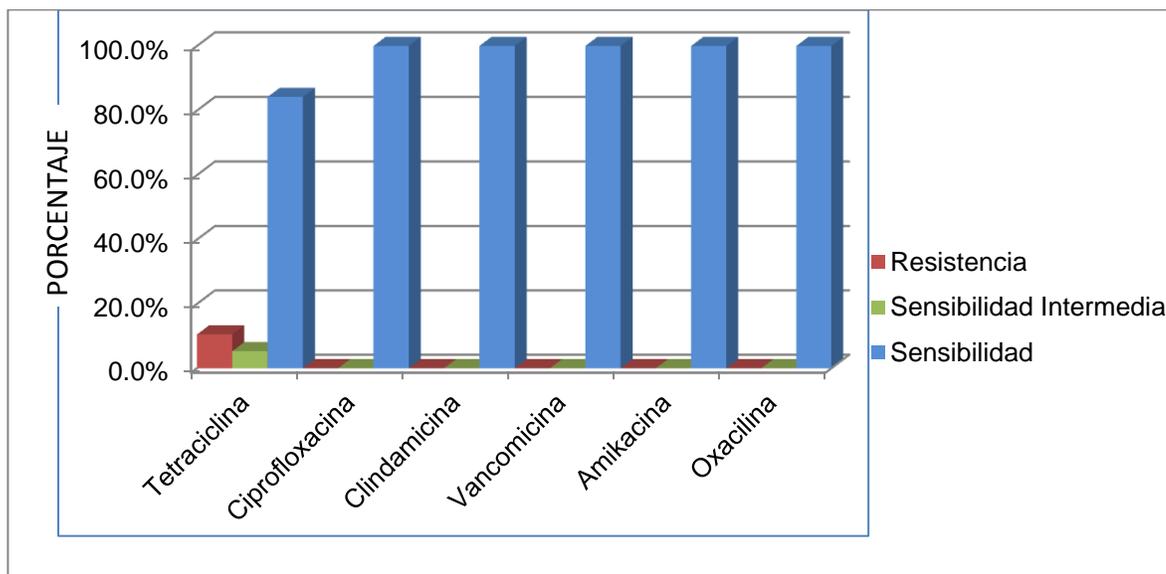


Figura N°14. Gráfico que muestra los porcentajes de resistencia, sensibilidad intermedia y sensibilidad de las cepas de las muestras de queso duro.

En la tabla N° 6 se presentan los resultados del antibiograma de las cepas de ***Staphylococcus aureus*** aisladas de las muestras de queso duro. Los resultados indican que las cepas aisladas de dos muestras de queso duro (11A y 14A) presentan resistencia a uno de los seis antibióticos de prueba utilizados para el análisis (tetraciclina) esto puede verificarse al comparar los diámetros obtenidos de estas cepas con los diámetros que da la norma del Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos NCCLS (ver anexo N°12) que indican que para que una cepa sea reportada como resistente a la acción de la tetraciclina debe presentar un diámetro menor o igual a 14mm y los antibiogramas de las cepas de las muestras 11A y 14A reportan un diámetro de 13 mm en ambos casos, es decir que el halo de inhibición del crecimiento tuvo un diámetro pequeño debido a que la cepa tiene la capacidad de resistir a la acción de la tetraciclina la cual no impidió el crecimiento de las cepas alrededor del disco impregnado del antibiótico; por el contrario estas mismas cepas

presentan sensibilidad a los cinco antibióticos restantes (vancomicina, oxacilina, amikacina, ciprofloxacina, clindamicina).

La resistencia a tetraciclinas es mediada por plásmidos y es frecuente en estafilococos; aun así el porcentaje de resistencia encontrado entre las muestras en estudio es muy bajo, de tan sólo el 10.5% para el total de aislamientos de ***Staphylococcus aureus*** en el queso duro (ver figura N°14).

También se observa que la muestra 15A contiene una cepa que es de sensibilidad intermedia a la acción de la tetraciclina pues presenta un diámetro de 17 mm (ver anexo N°12), y es sensible a los demás antibióticos.

Las otras muestras de queso duro (1A, 2A, 3A, 4A, 5A,7A, 8A, 9A, 10A, 12A, 13A, 16A, 17A, 18A, 19A, 20A) presentaron cepas sensibles a los seis antibióticos utilizados con diámetros similares a los obtenidos en el antibiograma de la cepa patrón de ***Staphylococcus aureus*** ATCC sensible a antibióticos.

En el cuadro N°2 se presentan las normas de El Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos (NCCLS por sus siglas en inglés) para la interpretación de los diámetros de zona de los halos de inhibición en un antibiograma, para los seis antibióticos de prueba seleccionados para este proyecto de investigación (ver anexo N° 12).

Los códigos asignados a cada antibiótico en las tablas N°6, N°7 y N°9 así como también el código que se utiliza para designar la resistencia, sensibilidad intermedia y sensibilidad de las cepas se presentan en el cuadro N°3 en el anexo N°13.

Tabla N°7. Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby- Bauer) de las muestras de queso.

Muestra Quesillo	Diámetros de halos de inhibición (mm)						Interpretación						Diámetros de halos de inhibición (mm) de la cepa patrón ATCC 29737					
	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox
1B	30	26	27	19	31	25	S	S	S	S	S	S	28	32	27	18	31	26
2B	28	27	27	17	29	25	S	S	S	S	S	S						
3B	30	21	27	15	21	19	S	S	S	S	S	S						
4B	28	24	22	17	23	20	S	S	S	S	S	S						
5B	29	29	28	18	30	25	S	S	S	S	S	S						
6B	30	31	26	17	26	16	S	S	S	S	S	S						
7B	31	33	30	18	31	19	S	S	S	S	S	S						
8B	33	33	29	20	33	29	S	S	S	S	S	S						
9B	31	29	26	21	30	20	S	S	S	S	S	S						
10B	31	33	28	19	31	31	S	S	S	S	S	S	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox
11B	17	31	25	20	35	28	SI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12B	30	35	22	22	31	25	S	S	S	S	S	S						
13B	33	34	25	21	34	20	S	S	S	S	S	S						
14B	30	32	28	17	28	27	S	S	S	S	S	S						
16B	28	28	26	16	26	21	S	S	S	S	S	S						
18B	30	32	26	17	30	30	S	S	S	S	S	S						
20B	31	29	26	16	31	28	S	S	S	S	S	S						

La tabla N°7 presenta los resultados del antibiograma de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de queso en donde se puede observar que la mayoría de las cepas aisladas son sensibles a los antibióticos de prueba utilizados.

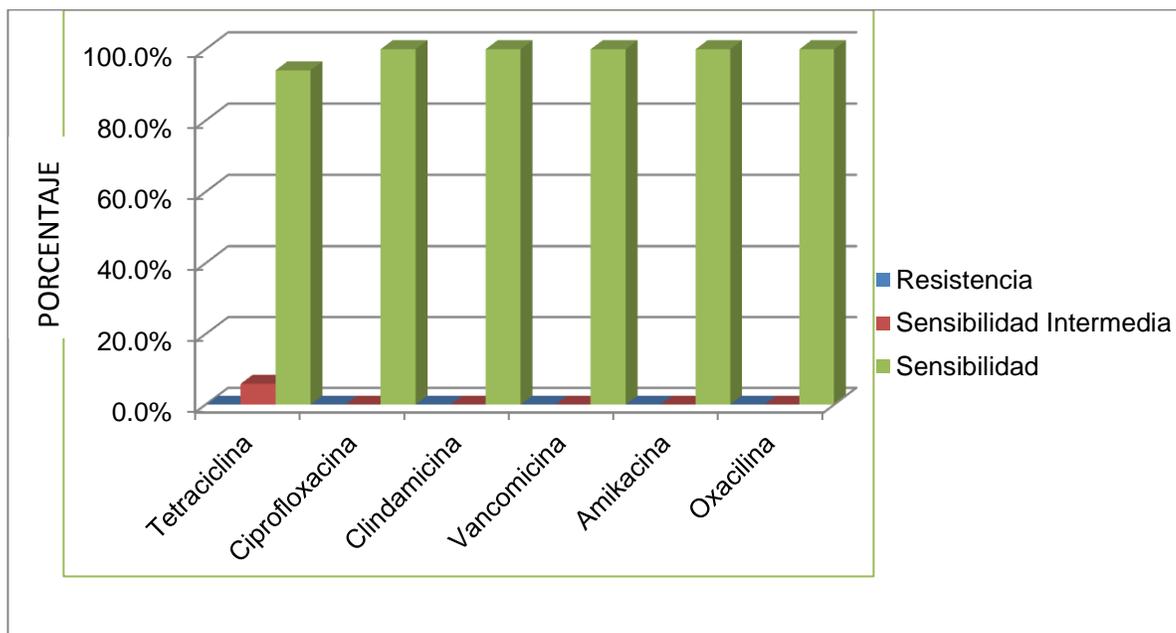


Figura N°15. Gráfico que muestra los porcentajes de resistencia, sensibilidad intermedia y sensibilidad de las cepas aisladas de las muestras de queso.

Los resultados indican que las cepas aisladas de todas las muestras de queso que se utilizaron para la técnica de difusión en discos (1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 16B, 18B, 20B) presentaron sensibilidad a los seis antibióticos de prueba (tetraciclina, vancomicina, oxacilina, amikacina, ciprofloxacina, clindamicina) pues los antibiogramas muestran diámetros de halos de inhibición bastante grandes, es decir que no hubo crecimiento cerca de los discos impregnados de los antibióticos lo cual implica que el crecimiento de las cepas fue inhibido por la acción de los agentes antimicrobianos. Los antibiogramas de las muestras fueron similares al antibiograma de la cepa patrón de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 sensible a antibióticos (ver anexo N°10).

Solamente la cepa de la muestra 11B presentó sensibilidad intermedia a la tetraciclina con un diámetro de 17 mm; esta cepa representa aproximadamente el 6% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de queso, el 94% restante corresponde al porcentaje de cepas sensibles a los agentes antimicrobianos utilizados para el antibiograma (ver figura N°15).

De las muestras de queso duro y de queso no se detectó ninguna cepa que presentara resistencia a la acción de la oxacilina, la cual puede utilizarse en la profilaxis de la mastitis bovina.⁽²⁵⁾

La figura N°16 muestra un ejemplo de antibiograma para las cepas aisladas de las muestras y el instrumento de medición utilizado (pie de rey) para medir los diámetros de los halos de inhibición.

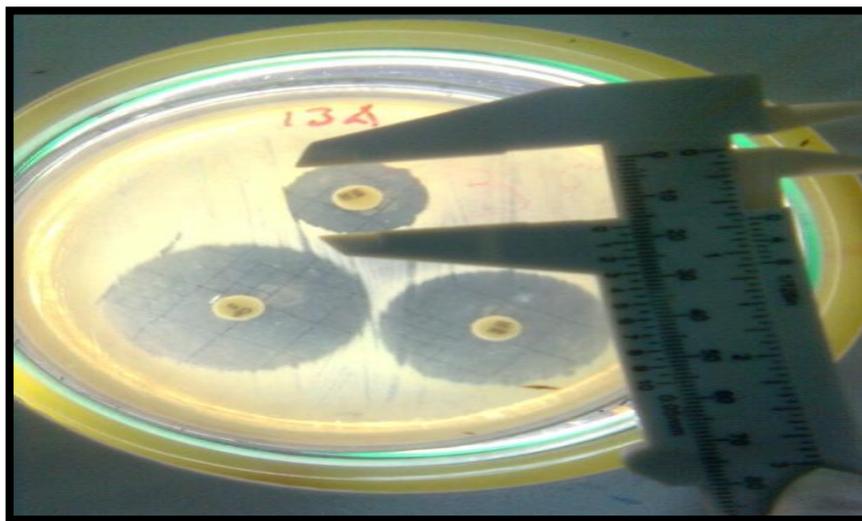


Figura N°16. Medición de los diámetros de halos de inhibición en antibiograma.

5.4 Resultados de las pruebas realizadas a la cepa patrón de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737.

Tabla N°8. Resultados de las pruebas de identificación realizadas a la cepa patrón ATCC 29737.

Tinción de Gram	Prueba de la Catalasa	Prueba de la Coagulasa
(+)	(+)	(+)

Tabla N°9. Resultados de la técnica de Difusión en Discos (Kirby Bauer) a la cepa patrón ATCC 29737.

Diámetro de halo de inhibición (mm)						Interpretación					
Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox	Te	Ci	Cd	Va	Ak	Ox
28	32	27	18	31	26	S	S	S	S	S	S

La tabla N°7 y N°8 muestran los resultados obtenidos de las pruebas realizadas a la cepa patrón ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus*, los cuales sirvieron para compararlos con respecto a los resultados obtenidos de las cepas aisladas de las muestras.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de la Lista de Chequeo indicaron que las condiciones de almacenamiento y manipulación por parte de los comerciantes de productos lácteos (quesos no madurados) en el Mercado Central de San Salvador no son las adecuadas debido a que el manipulador así como el almacenamiento de estos productos no cumplen con las medidas higiénicas necesarias para evitar la contaminación del queso duro y del quesillo.
2. Un 95 % del total de aislamientos en el queso duro y un 85% en el quesillo presentaron ***Staphylococcus aureus***, lo cual se debe a la mala manipulación que se le da a estos productos.
3. El 100% de las muestras analizadas de quesillo y queso duro que presentaron ***Staphylococcus aureus***, reportó un número incontable de colonias de este patógeno sobrepasando al límite permitido por la Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:06 de quesos no madurados, estos resultados pudieron deberse a las inadecuadas condiciones de almacenamiento de estos productos y así como también a una mala manipulación.
4. Los halos de inhibición en el antibiograma de las cepas de ***Staphylococcus aureus*** aisladas de las muestras de queso duro y quesillo presentaron un diámetro bastante grande, lo que indica la sensibilidad de estas cepas a la mayoría de los antibióticos de prueba seleccionados como: amikacina, vancomicina, oxacilina, ciprofloxacina y clindamicina.

5. Las cepas aisladas de ***Staphylococcus aureus*** de las muestras de queso duro y quesillo no presentan un mecanismo de resistencia contra la mayoría de los antibióticos utilizados en el análisis; probablemente porque estos no son utilizados en el país para el tratamiento de infecciones causadas por dicho patógeno en el ser humano y tampoco en el tratamiento de la mastitis bovina.

6. Las cepas resistentes a determinados antibióticos puede ser un indicador del uso inadecuado de éstos por la población; tal es el caso de la tetraciclina un antibiótico muy utilizado en el tratamiento de infecciones bacterianas, por lo que en la interpretación de los análisis se detectaron cepas resistentes a este agente antimicrobiano y por lo tanto no puede ser utilizado como tratamiento.

7. Los diámetros de los halos de inhibición en el antibiograma de las cepas analizadas son comparables con los diámetros de halos de inhibición de la cepa patrón ATCC 29737 sensible a los antibióticos de prueba, lo cual demuestra que no existe resistencia.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Al Ministerio de Salud monitorear las condiciones higiénicas de manipulación y almacenamiento de queso duro y quesillo por parte de los vendedores de productos lácteos en el Mercado Central de San Salvador.
2. Que el Ministerio de Salud y la Alcaldía Municipal de San Salvador capaciten a los vendedores de productos lácteos del Mercado Central de San Salvador por medio de charlas educativas sobre las buenas prácticas de higiene que deben de realizar al momento de manipular los productos lácteos; así como también sobre el buen almacenamiento de los mismos.
3. Que los vendedores de productos lácteos realicen buenas prácticas de higiene en la manipulación y en el almacenamiento de estos productos.
4. A la población en general que cumplan los tratamientos con antibióticos tal como se lo indican los médicos tanto en el tratamiento de infecciones en humanos como en animales para evitar la propagación de cepas resistentes.
5. Emplear para el tratamiento de intoxicaciones alimentarias causadas por ***Staphylococcus aureus*** el uso de los antibióticos siguientes: amikacina, vancomicina, oxacilina, ciprofloxacina y clindamicina.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bedolla García, E.A. Resistencia antibiótica de ***Staphylococcus aureus*** aislados de leche de vacas con mastitis de Téjaro Michoacán. Trabajo de graduación. Médico Veterinario Zootecnista. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2011. [consultado 10 de marzo de 2012]; Disponible en: <http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Tesis/2011/Octubre/resistencia%20antibitica%20de%20staphylococcus%20aureus%20islados%20de%20leche%20de%20vacas%20con%20mastitis%20de%20tjaro%20michoacn.pdf>
2. Benneth R W, Lancette G A. ***Staphylococcus aureus***. En: FDA. Bacteriological Analytical Manual. 7ª ed. AOAC; 1992. p161-165.
3. Bonilla G. Estadística II: Métodos Prácticos de Inferencia Estadística. 2ª ed. El Salvador: UCA Editores; 1992. p 86, 90-92.
4. Branson D. Métodos en bacteriología clínica: Manual de tests y procedimientos. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1974. p170, 176, 251.
5. Calderón G. Estudio de casos- Enfermedades transmitidas por alimentos en El Salvador. [consultado 10 de marzo de 2012]; Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s03.pdf>
6. Casal J, Mateu E. Tipos de muestreo. Rev. Epidem. Med. Prev. [revista científica on-line] 2003 [consultado 30 de marzo de 2012]; Volumen 1 [pp.3-7]. Disponible en: <http://minnie.uab.es/~veteri/21216/TiposMuestreo1.pdf>

7. Champoux J J, Nedhardt FC, Drew WL, Plorde JJ. Microbiología Médica. 4ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana. p 235-246, 285-294.
8. Embid A. Resistencia de las Bacterias a los Antibióticos. [consultado 15 de febrero de 2012]; Disponible en :<http://www.amcmh.org/PagAMC/medicina / articulospdf/53ResistenciaBacterias.pdf>
9. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada I. 2010. p 7-9,33
10. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada II. Practica #8. 2010.
11. Jawetz E, MelnickJ, Adelberg E. Microbiología Médica de Jawetz. 16ª ed. México DF: Editorial El Manual Moderno; 1999. p219-224
12. Koneman E W, Allen S D, Dowell VR, Janda W M, Sommers H M, Winn W C. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas Color. 3ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1992. p564-613
13. Maldonad, R; Llanca, L. Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio Girardot, estado Aragua, Venezuela [revista científica on-line]. 2008 agosto [consultado 18 de marzo de 2012]; Volumen 18 (4) Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S079822592008000400014&script=sci_arttext.
14. Martínez H A, Zavaleta Márquez C Y. Determinación de la calidad de leches crudas y quesillos elaborados artesanalmente en plantas productoras de lácteos, área metropolitana de San Salvador. Trabajo de

graduación. Licenciatura en Química y Farmacia. El Salvador. Universidad de El Salvador. 2004

15. Meyer M, Salinas K, Olmos U, Berlijn J, Medina J. Manuales para educación agropecuaria: Elaboración de productos lácteos. México: Editorial Trilla; 1982. p63, 68, 81-81, 87.
16. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Ministerio de Agricultura y Ganadería de la República de El Salvador. Memorias del Seminario "Aspectos Higiénicos sanitarios de la leche y productos lácteos", San Salvador; 3-8 de Mayo 1993. San Salvador: p85-89
17. Morales Meza M, Ruiz C. Diferencias en la resistencia a los antimicrobianos de cepas de ***Staphylococcus aureus*** obtenidas de diversas fuentes de aislamiento. Revista del Centro de Investigación Universidad La Salle [revista científica on-line]. 2006 enero- junio [consultado 18 de marzo de 2012]; Volumen 7 (025). Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/342/34202504/34202504.html>
18. Productos Lácteos. Quesos no madurados. Especificaciones. NSO 67.01.04:06. Diario Oficial de El Salvador, n° 15, (23 de enero de 2008). [consultado 27 de enero de 2012] Disponible en: <http://www.diariooficial.gob.sv/diarios/do-2008/01-enero/23-01-2008.pdf>
19. Rivas Saravia K B, Roque Arévalo S J, Tobar Martínez D V. Determinación de la calidad microbiológica del requesón que se comercializa en los principales supermercados de la zona metropolitana de San Salvador. Trabajo de graduación. Licenciatura en Química y Farmacia. El Salvador. Universidad de El Salvador. 2008

20. Rivera-Salazar, J; Mujica de Fernández, I; Aranaga-Natera, V; Navarro-Ocando, C; Zabala-Díaz, I; Atencio-Bracho, L. ***Staphylococcus aureus*** procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos [revista científica on-line]. 2011 mayo-junio [consultado 18 de marzo de 2012]; Volumen XXI (3) [pp. 202-210]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95918239003>
21. Solís Sánchez J.A. PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas [Libro en DVD]. 53ª ed. México: 2007
22. Velázquez L. Farmacología Básica y Clínica. 17ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004
23. Vignoli R, Seija V. Principales Mecanismos de Resistencia. [consultado 15 de febrero de 2012]; Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
24. W. Wolter, Castañeda V.H.*, Kloppert B., y Zschoeck M. La Mastitis Bovina [Internet] Alemania: Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse; [acceso 2 de septiembre de 2012]. Disponible en: <http://geb.unigiessen.de/geb/volltexte/2002/912/pdf/p020003.pdf>
25. http://elsalvador.usaid.gov/uploaded/mod_documentos/Regional_Diagnostico%20del%20Subsector%20Lacteo_1.pdf [consultado el 18 de marzo de 2012] Diagnostico Ambiental del subsector lácteo El Salvador. 2008
26. http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus [consultado el 10 de febrero de 2012] ***Staphylococcus aureus***.

27. <http://www.anmat.gov.ar/consumidores/Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos.pdf>. [consultado el 15 de julio de 2012] Enfermedades transmitidas por alimentos.
28. http://www.argenbio.org/doc/tecnologia_para_la_elaboracion_de_queso.pdf[consultado el 05 de abril de 2012]. Tecnología para la elaboración de Queso.
29. <http://www.brizuela-lab.com.ar/tablan.htm> [consultado el 05 de abril de 2012]. Tabla de interpretación de los resultados; Método de difusión en agar (normas CLSI - NCCLS año 2005)
30. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2002/08/22/3051.php> [consultado el 27 de enero de 2012]. La vulnerabilidad del queso fresco.
31. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2003/11/22/9514.php>[consultado el 26 de febrero de 2012]. ***Staphylococcus aureus***, el patógeno de los manipuladores.
32. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2004/08/11/13957.php> [consultado el 26 de febrero de 2012]. Riesgos y peligros en los productos lácteos.
33. <http://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/LACTEOS/NSO67.01.04.06%20QUESOS%20NO%20MADUROS.pdf>[consultado el 28 de diciembre de 2011]. Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:06. Productos Lácteos. Quesos No Madurados.

34. http://www.delbuencomer.com.ar/index_archivos/quesos.htm[consultado el 28 de diciembre de 2011]. Arte y Ciencia. Enciclopedia Gourmet.. Clasificación de quesos.
35. <http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%20%20Tinci%C3%B3n%20de%20Gram.pdf>[consultado el 20 de marzo de 2012]. Tinción diferencial de Gram
36. <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm> [consultado el 20 de marzo de 2012]. Técnicas de tinción. fundamentos.
37. <http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/19.pdf> [consultado el 12 de julio de 2012]. Glosario. Conceptos microbiológicos.
38. <http://www.wisis.ufg.edu.sv/www.wisis/documentos/TE/658.403-S218d/658.403-S218d-CAPITULO%20I.pdf> [consultado 28 de abril de 2012]. Generalidades sobre el sector lácteo.
39. www.labcarecolombia.com/descargas_2.php?id=59 [consultado el 12 de julio de 2012]. Las cepas ATCC. Herramientas indispensables en el control de calidad interno en microbiología.

GLOSARIO

GLOSARIO (9,10,18,27,37)

Antibiograma: Perfil de sensibilidad de una bacteria a un conjunto de agentes antimicrobianos.

Antibiótico: Cualquier agente antimicrobiano producido por un microorganismo. Este inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo. Por ejemplo la penicilina del *Penicillium notatum*. En la naturaleza existe un gran número de antibióticos, pero solamente unos pocos son seguros para uso humano.

Antimicrobiano: Cualquier sustancia natural, semi-sintética o de origen sintético que inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo.

Betalactamasas: Enzimas producidas por microorganismos que destruyen la actividad de los agentes beta-lactámicos a través de la hidrólisis de la porción del anillo beta-lactámico. Hay muchos tipos de beta lactamasas cada una de las cuales tiene actividad específica contra los agentes beta-lactámicos.

ETAs o ETA: Enfermedades transmitidas por los alimentos. Son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos, o bien por las sustancias tóxicas que aquellos producen.

Cepa sensible: Implica que el microorganismo debe responder a las dosis usuales del agente antimicrobiano administrado por una vía apropiada, incluso la vía oral.

Cepa moderadamente susceptible: Implica que el aislamiento puede ser inhibido por concentraciones de la droga alcanzadas por la administración parenteral de dosis máximas.

Cepa resistente: Implica que la bacteria no es inhibida por concentraciones de la droga que puedan alcanzarse y, por lo tanto, la droga no debe ser seleccionada para el tratamiento, excepto en ciertos líquidos corporales donde puedan acumularse grandes concentraciones del antibiótico.

Enterotoxina: Son superantígenos termoestables y resistentes a la acción de las enzimas del intestino. Se desconoce el mecanismo exacto de acción de ellas pero aumentan el peristaltismo.

Estándar de McFarland: El Estándar 0,5 de McFarland corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Es usado cuando se ajustan suspensiones del inóculo para pruebas de susceptibilidad.

Mastitis: Es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es comúnmente una consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón.

MIC o CIM (Concentración inhibitoria mínima): Es la concentración más baja de un agente antimicrobiano requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo

Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.04:06: Norma que tiene por objeto establecer las características y especificaciones que deben cumplir los quesos frescos o no madurados.

NCCLS: El Instituto para la normatización de Laboratorios Clínicos anteriormente conocido como El Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos (NCCLS); es una organización sin fines de lucro, con miembros representando a varias disciplinas. Es una organización educativa que enseña a través de foros el desarrollo, promoción y uso de normas nacionales e internacionales relacionadas con las pruebas de susceptibilidad, su uso apropiado y la interpretación de los resultados.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBP (siglas en ingles) son **Proteínas Ligaduras de Penicilina o PLP**, un grupo de enzimas de membrana que son responsables de las uniones cruzadas del peptidoglicano en la pared celular. Su sitios de acción se localizan en el espacio periplásmico.

ANEXOS

ANEXO N°1

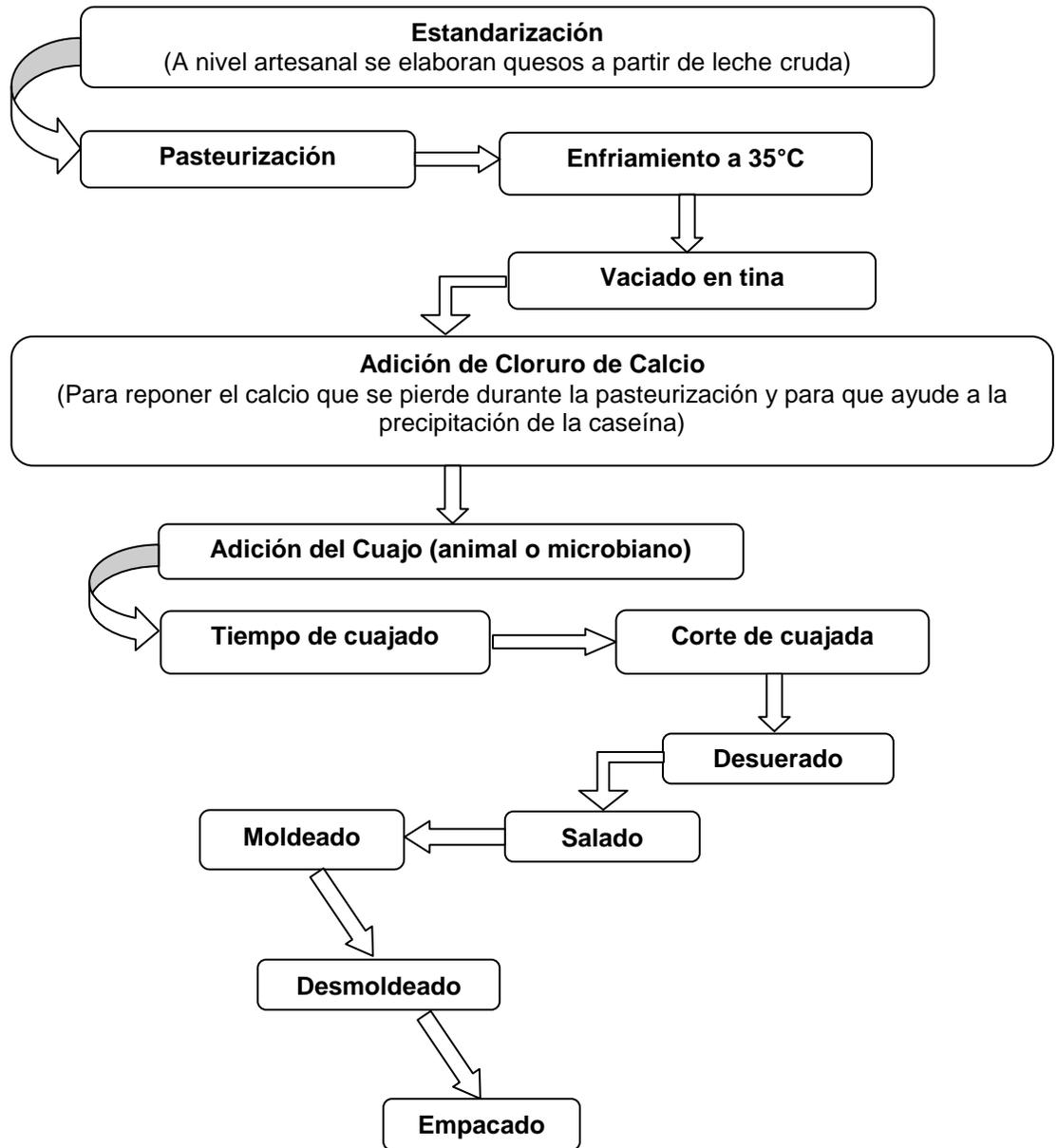


Figura N°17. Proceso de elaboración de quesos no madurados.

ANEXO N°2



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



“LISTA DE CHEQUEO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACION DE QUESOS NO MADURADOS EN EL MERCADO CENTRAL DE SAN SALVADOR”

Venta de lácteos N° _____

1. Los productos (queso duro y quesillo) se encuentran protegidos de la luz solar

SI ____ NO ____

2. Los productos (queso duro y quesillo) se encuentran en refrigeración

SI ____ NO ____

3. Si no se encuentran en refrigeración ¿En qué lugar se encuentran ubicados?

a) Vitrina

b) Mesa

c) Estante

4. Si la respuesta anterior fue b) o c) ¿Están los productos debidamente tapados?

SI ____ NO ____

Observación:

5. El establecimiento de venta se encuentra debidamente aseado

SI ____ NO ____

Observación:

6. Los vendedores del establecimiento utilizan guantes para manipular los quesos

SI ____ NO ____

Observación:

7. Los manipuladores de los quesos en el establecimiento utilizan la vestimenta necesaria (malla, delantal)

SI ____ NO ____

Observación:

8. Las balanzas que se utilizan se encuentran limpias

SI ____ NO ____

9. Los quesos son pesados directamente en la balanza

SI ____ NO ____

Observación:

10. ¿Qué tipo de utensilios son utilizados para cortar el queso duro y el quesillo?

Cuchillo

Otros

Observación:

11. Se utilizan los mismos utensilios para manipular la variedad de productos

SI ____ NO ____

Observación:

12. El manipulador es la misma persona que recibe el dinero de los productos vendidos

SI ____ NO ____

Observación:

ANEXO N°3

Cuadro N°1. Límites microbiológicos sanitarios para quesos no madurados según norma NSO 67.01.04:06 ⁽¹⁸⁾

Microorganismos	n¹⁾	c²⁾	m³⁾	M⁴⁾
<i>Staphylococcus aureus, coagulasa positiva (enterotoxigénico) UFC/g</i>	5	1	10 ²	10 ³
<i>Coliformes fecales, NPM/g</i>	5	2	3	10
<i>Escherichia coli, UFC/g</i>	5	0	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella, en 25 gramos</i>	5	0	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes, en 25 gramos</i>	5	0	Ausencia	Ausencia

- 1) **n** = Número de muestras que deben de analizarse.
- 2) **c** = Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor que “**m**” pero no mayor que “**M**”
- 3) **m** = Recuento máximo recomendado.
- 4) **M** = Recuento máximo permitido.

ANEXO N°4

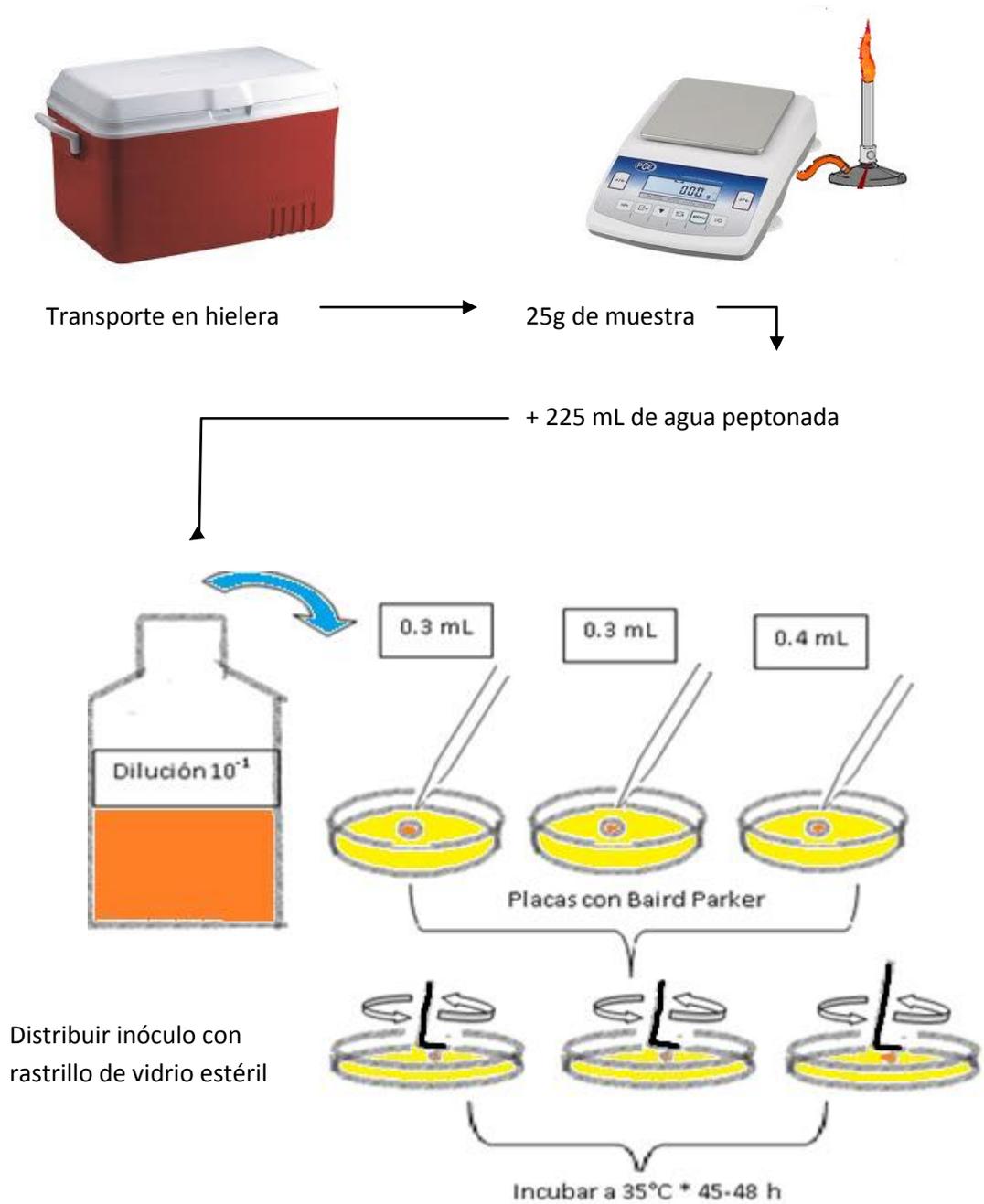


Figura N°18. Transporte y preparación de muestra para recuento de viables en placa.

ANEXO N°5

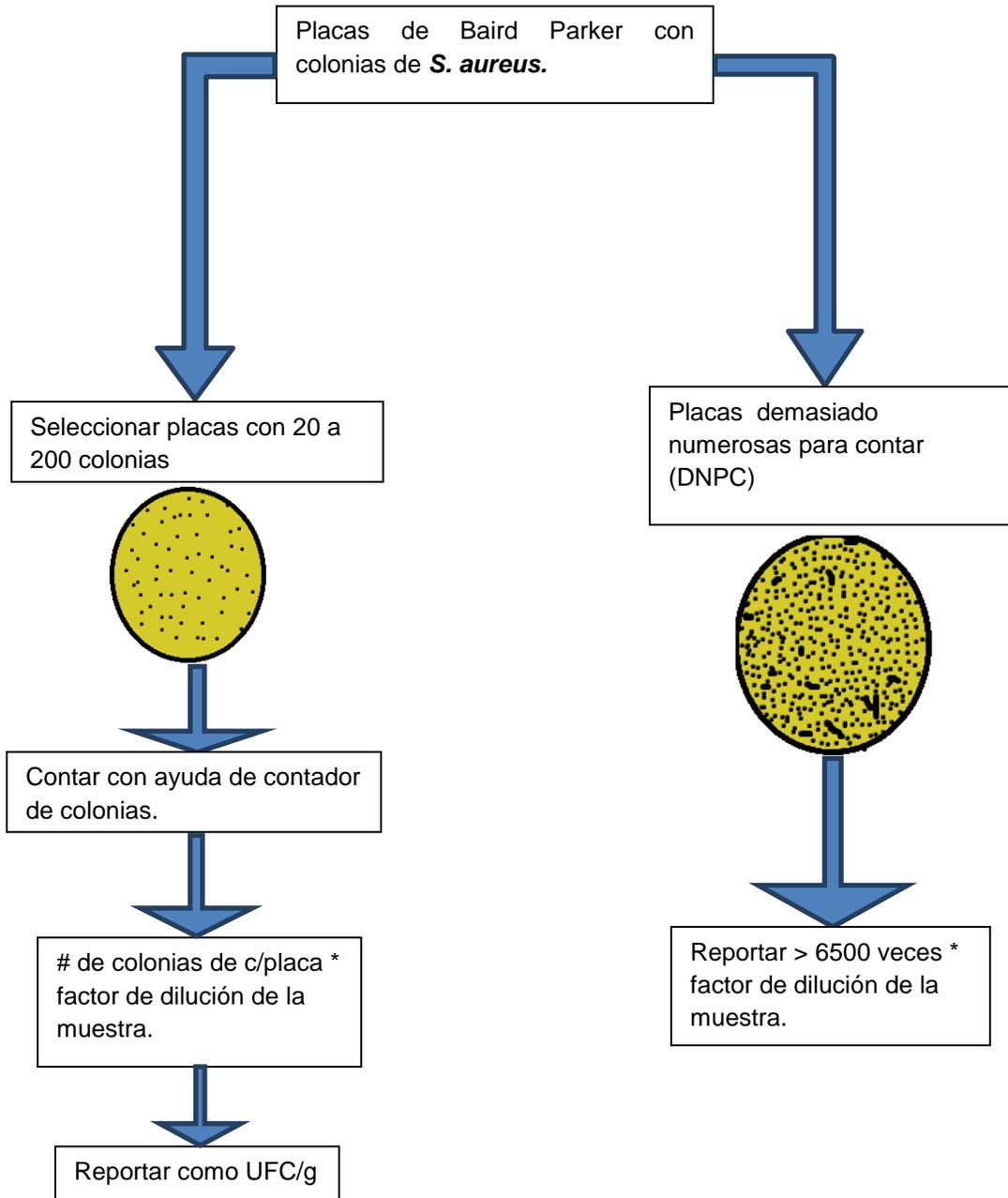


Figura N°19. Técnica de conteo para recuento de viables en placa.

ANEXO N°6

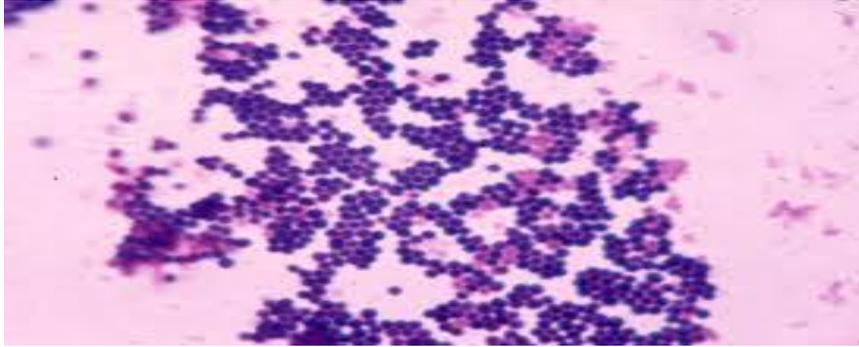


Figura N°20. Tinción de Gram para *Staphylococcus aureus*.

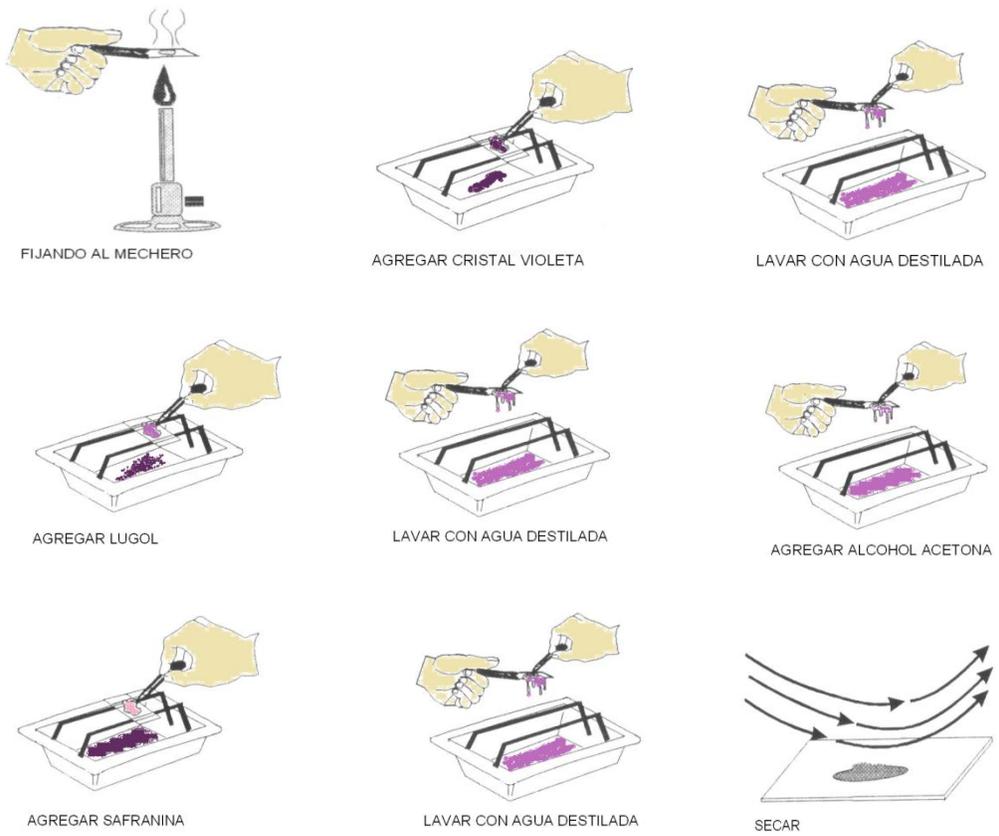


Figura N°21. Procedimiento para la tinción de Gram.

ANEXO N°7

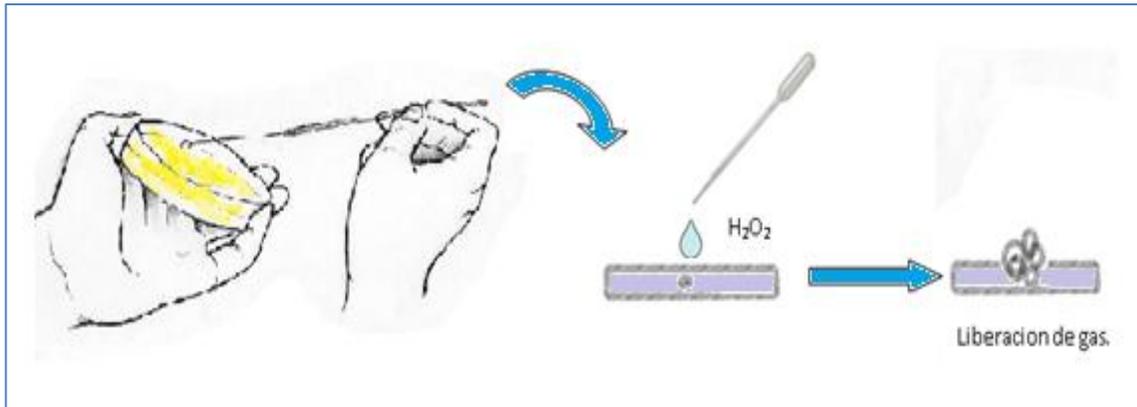


Figura N°22. Prueba de la catalasa.

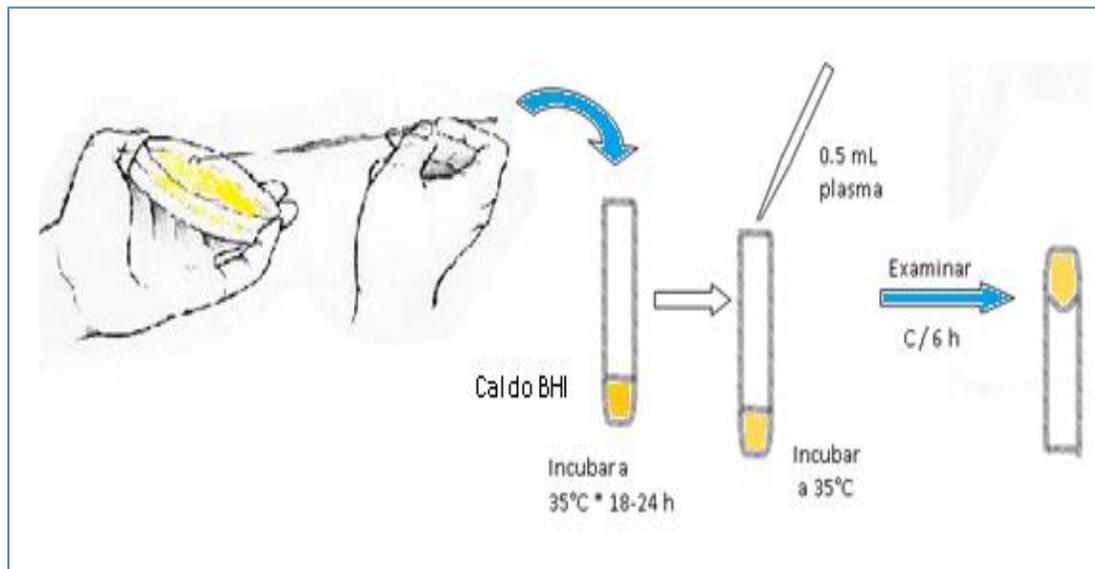


Figura N°23. Prueba de la coagulasa.

ANEXO N°8

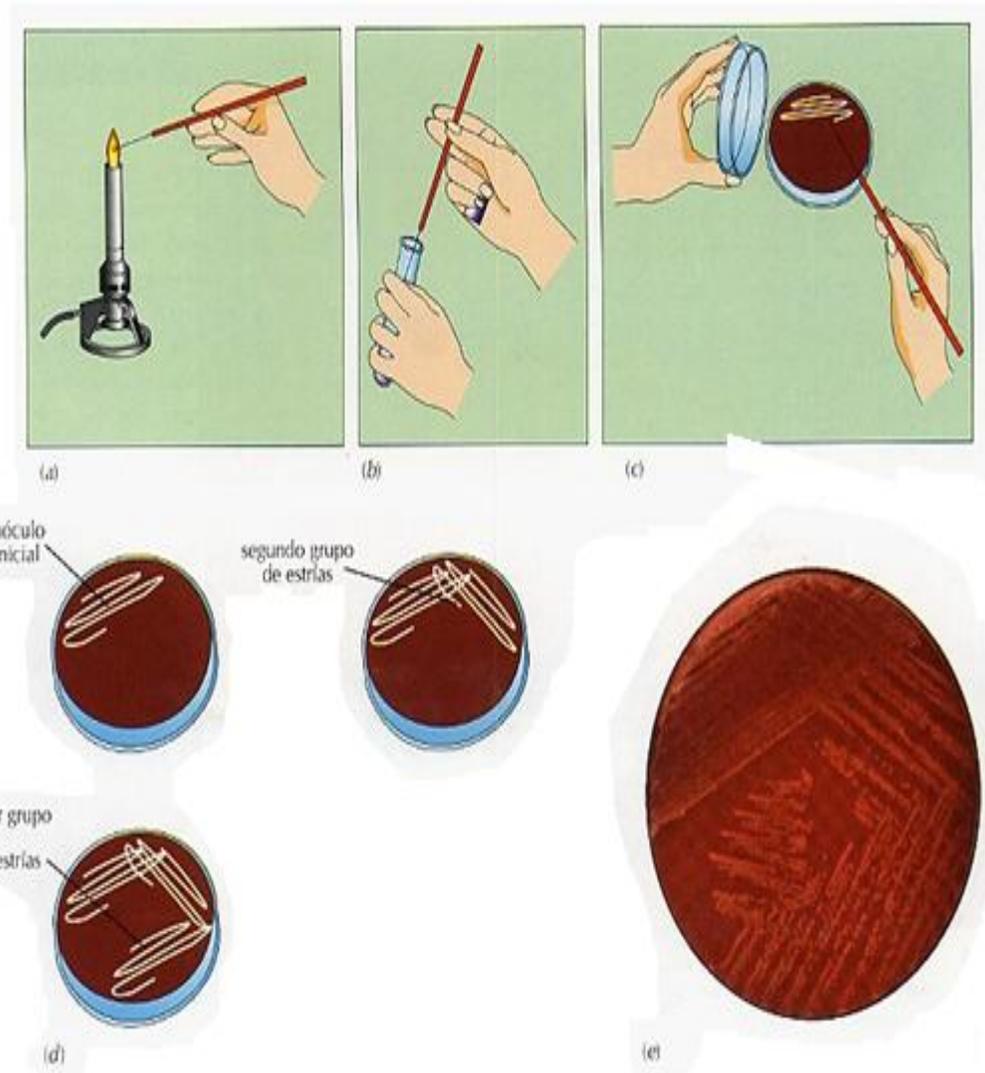


Figura N°24. Siembra por estría para aislamiento de bacterias.

ANEXO N°9

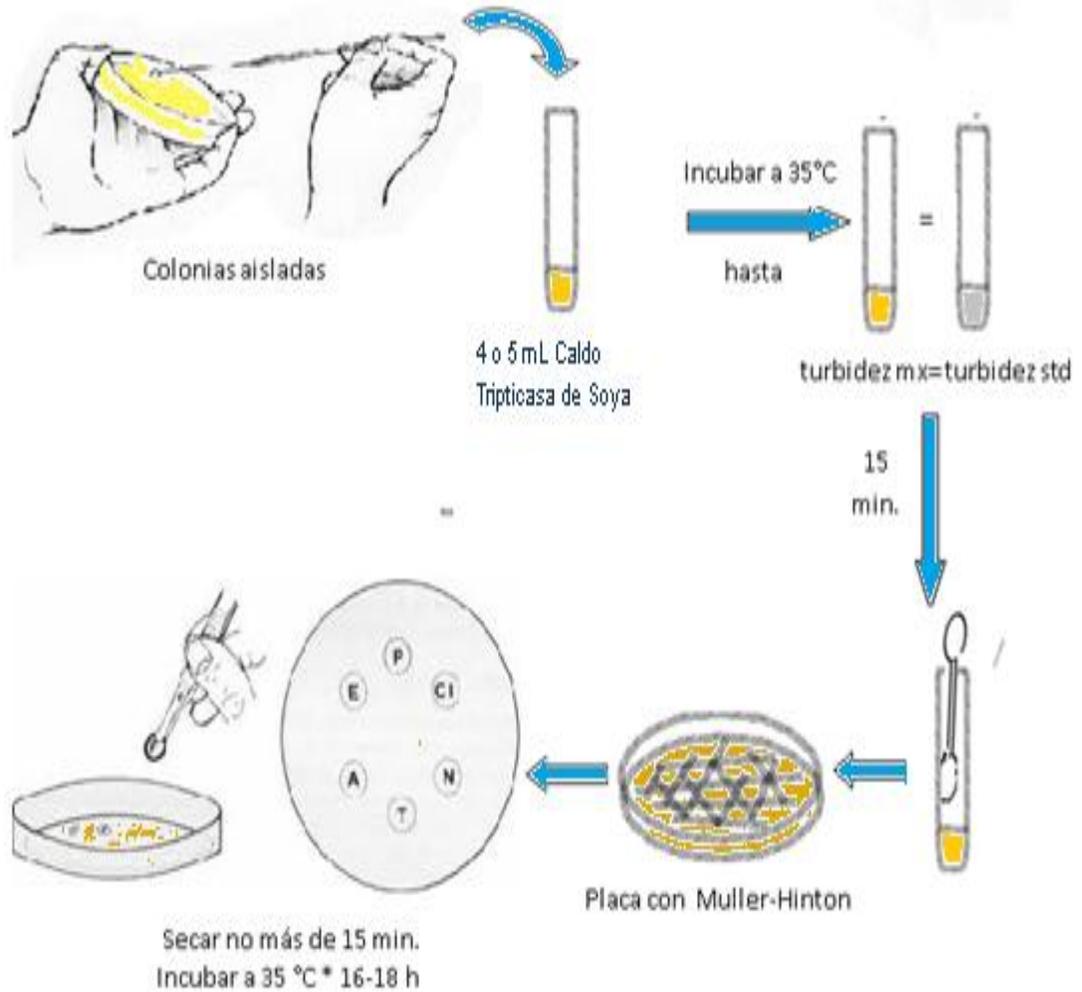


Figura N°25. Técnica de difusión en discos (Kirby-Bauer) para antibiograma.

ANEXO N°10

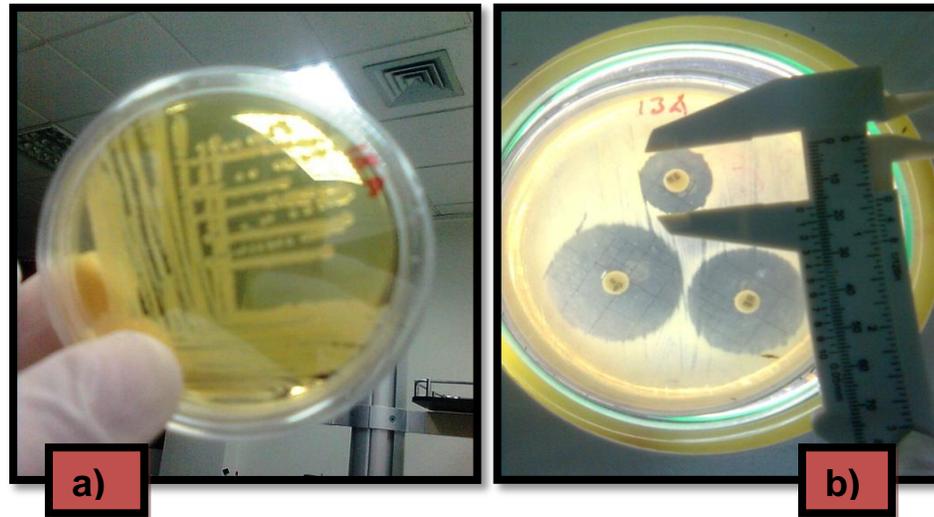


Figura N°26. Aislamiento y Antibiograma. (a) Placa con aislamiento en agar nutritivo. (b) Medición de los diámetros de halos de inhibición en antibiograma de las muestras.

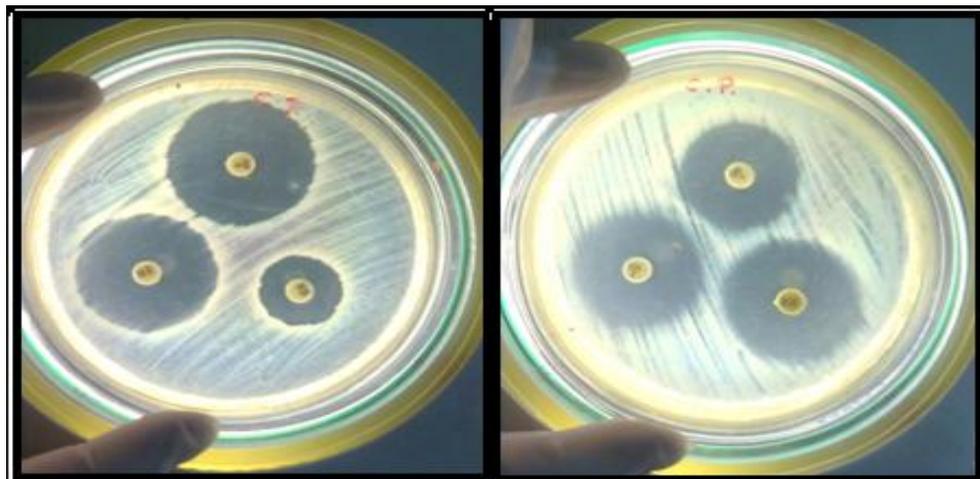


Figura N°27. Antibiograma obtenido de la cepa patrón de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 a los antibióticos de prueba seleccionados.

ANEXO N°11



Figura N°28. Prueba de la catalasa a la cepa patrón ATCC 29737 de ***Staphylococcus aureus*** comparado contra el resultado de la misma prueba pero sin adición de inóculo.

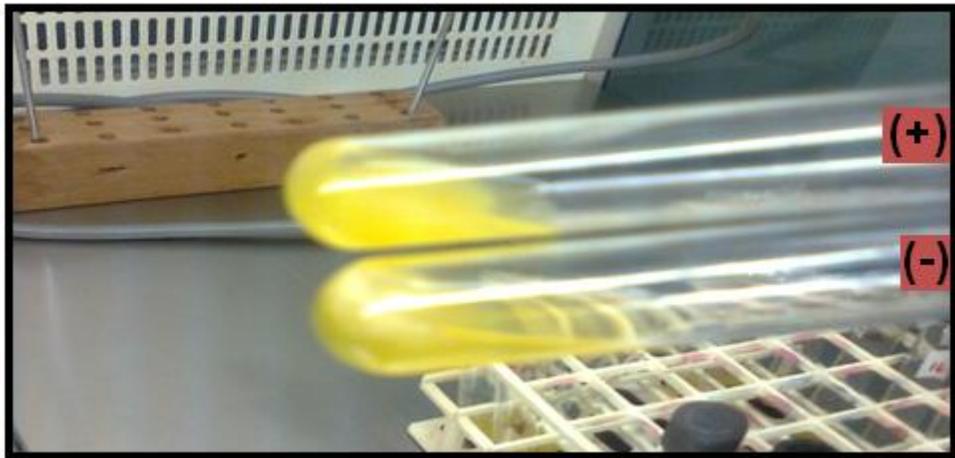


Figura N°29. Prueba de la coagulasa a la cepa patrón ATCC 29737 de ***Staphylococcus aureus*** comparado contra el resultado negativo de una de las cepas aisladas de las muestras.

ANEXO N°12

Cuadro N°2. Normas del CLSI-NCCLS 2005 para interpretación de los diámetros de zonas⁽²⁹⁾

AGENTE ANTIMICROBIANO	CARGA	RESISTENTE Menor o = (mm)	INTERMEDIO (mm)	SENSIBLE Mayor o = (mm)
AMIKACINA	30 µg	14	15-16	17
CIPROFLOXACINA	5µg	15	16-20	21
CLINDAMICINA	2µg	14	15-20	21
OXACILINA	1 µg	10	11-12	13
TETRACICLINA	30 µg	14	15-18	19
VANCOMICINA	30 µg	14	----	15

ANEXO N°13

Cuadro N°3. Códigos utilizados en las tablas de resultados de la técnica de difusión en discos Kirby-Bauer.

CÓDIGO	NOMBRE	CÓDIGO	NOMBRE	CÓDIGO	NOMBRE
Te	Tetraciclina	Va	Vancomicina	R	Resistente
Ci	Ciprofloxacina	Ak	Amikacina	S	Sensible
Cd	Clindamicina	Ox	Oxacilina	SI	Sensibilidad Intermedia