



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**PREVALENCIA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS DE
QUESO BLANCO FRESCO EXPENDIDAS EN EL
MUNICIPIO GÜAICAIPURO - ESTADO MIRANDA.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Freddy Aguilar como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutora: MSc. Carolina Palomino

Caracas – Venezuela.

Mayo, 2017.

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL
Br. Freddy Ernesto Aguilar Hernández

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Freddy Ernesto Aguilar Hernández, C.I.: 24.285.317 titulado “**Prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos en muestras de queso blanco fresco expandidas en el municipio Güaicaipuro - Estado Miranda.**” para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**, con una calificación de 20 puntos.

Para dar fe de ello, se levanta la presente acta en Caracas, a los 18 días del mes de mayo de 2017.

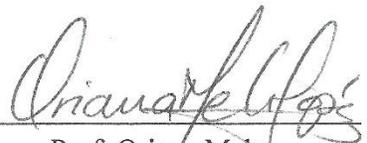


Prof. Carolina Palomino

Tutora



Prof. Raúl Martínez



Prof. Oriana Melo

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizó la susceptibilidad a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de queso blanco fresco que se consume en el municipio Güaicaipuro edo. Miranda-Venezuela. Las cepas fueron aisladas de quesos blandos, semiduros y duros de origen artesanal escogidos de forma aleatoria en expendios comerciales del municipio. Por el método disco difusión en agar, se determinó la resistencia a antibióticos. Como resultado se obtuvo una carga microbiana por encima de 10^3 UFC/g en todos los quesos, valor que esta sobre el promedio máximo permitido según la norma COVENIN, 3821-2003. Se demostró la presencia de *S. aureus* en un 20% de los quesos blancos analizados, así como la presencia de cepas multirresistentes en un 6% de las muestras, de entre las cuales destaca una cepa resistente a 10 de los 13 antibióticos usados. Todas las cepas resistentes, no presentaron patrones de resistencia comunes, mostrando resistencia probable a Oxacilina (76% de las cepas) y Vancomicina (88% de las cepas). Es el primer aporte en el municipio Güaicaipuro que se hace en cuanto a la multirresistencia antibiótica en cepas de *S. aureus* autóctonas de productos lácteos artesanales.

Palabras Clave: *Staphylococcus aureus*, resistencia antibiótica, Oxacilina, Vancomicina, queso blanco, Venezuela.

E-mail: freddye8@hotmail.com

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central de Venezuela por brindarme una educación de excelente nivel académico, y especialmente a todos los profesores que aportaron su tiempo y conocimientos para mi educación durante todos mis años de formación como profesional.

A la familia Colmenares-Rawlins por su inmenso desinterés y apoyo aportado durante esta tesis y mi carrera, en especial a la Sra. Lola Colmenares, por esos cafés y conversaciones a media tarde y a la Sra. María Elena Rawlins por la confianza depositada en mí.

A las familias Ruiz-Carpio y Castro-Vera, por permitirme estar en sus casas al realizar este trabajo de investigación, en especial, a Andrés Ruiz y a Anthony Castro.

A mis amigos de la urbanización La Fontanera, y en especial a Alejandro Carrillo, Williams Marcano y Orlando Aguilar, por las muchas actividades que ayudaron a combatir la presión de realizar esta tesis.

A mis compañeros de estudio, Adriana Colmenares, Jeanniel Campos y Roosevelt Balza, por interminables noches de estudios, diversión y aprendizaje juntos.

A mis compañeras Nailleth Sanabria y Yeimar portillo, por ser un ejemplo a seguir durante toda mi carrera.

A mi jurado Oriana Melo, y a mi Tutora Carolina Palomino, por una guía tan paciente y acertada durante toda esta investigación.

A todo el personal obrero y técnico del instituto de ciencia y tecnología de alimentos de la UCV

A la profesora Zurima González, por su comprensión, paciencia y apoyo

A todos ustedes,

Muchísimas Gracias.

DEDICATORIA

A mis padres,

Ronelsy Hernández y Freddy Aguilar por su incondicional apoyo y guía durante toda mi vida, y enseñarme que de la voluntad viene el éxito.

A mi abuela,

Rosalía Márquez, por ser una gran guía espiritual en mi vida y enseñarme que todo debe hacerse desde el corazón.

A mi hermana,

Betzabeth Vergel, por tantos años de sinceridad, amor y comprensión.

A mi mejor amiga,

Kary Valentina, que ahora descansa entre las estrellas del cielo canino.

A los valientes venezolanos,

Que dieron su vida en las protestas del 2014 y 2017, y a Diego Arellano colega caído.

Al que ilumina mis días,

Wilmer Guipe, por ser una luz durante momentos difíciles.

Y a ti,

Que lees esto.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.1.1 Taxonomía y morfología	2
1.1.2 Características bioquímicas.....	3
1.1.3 Condiciones de crecimiento.....	4
1.1.4 Intoxicación, patogenia y virulencia	4
1.2 Antibióticos	7
1.2.1 β -Lactámicos.....	7
1.2.2 Glicopéptidos.....	8
1.2.3 Aminoglucósidos	8
1.2.4 Macrólidos	8
1.2.5 Tetraciclinas	8
1.2.6 Quinolonas	9
1.2.7 Sulfonamidas y Trimetoprima	9
1.3 Bacterias antibiótico resistentes.....	9
1.4 Causas y consecuencias del aumento de bacterias resistentes a antibióticos	11
1.5 Multirresistencia antibiótica.....	12
1.5.1 Multirresistencia de <i>S. aureus</i>	13
1.6 Queso blanco fresco.....	14
1.6.1 Consumo y elaboración de queso blanco en Venezuela	14
2. ANTECEDENTES	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo General	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGÍA	19

4.1 Lugar de trabajo	19
4.2 Muestra	19
4.2.1 Toma de muestra.....	19
4.2.2 Preparación de la muestra	20
4.3 Aislamiento y recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.4 Identificación del Microorganismo	21
4.4.1 Pruebas confirmatorias	21
4.4.2 Pruebas complementarias	22
4.5 Evaluación de resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
4.5.1 Turbidez estándar para la preparación del inóculo	23
4.5.2 Preparación del inóculo	24
4.5.3 Antibióticos	24
4.5.4 Test de difusión en disco	25
4.6 Análisis de resultados.....	25
4.6.1 Criterio para definir resistencia antibiótica de las cepas de <i>S. aureus</i>	25
4.6.2 Análisis de multiresistencia.....	26
5. RESULTADOS	27
5.1 Aislamiento y recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
5.2 Identificación del microorganismo.....	28
5.3 Evaluación de resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
5.3.1 Análisis estadístico realizado a las cepas evaluadas con los antibióticos Oxacilina y Vancomicina.....	30
5.3.2 Patrones de resistencia	33
5.5.3 Multiresistencia.....	36
6. DISCUSIÓN.....	38
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
7.1 CONCLUSIONES.....	47

7.2 RECOMENDACIONES	48
8. BIBLIOGRAFIA.....	49
9. ANEXOS.....	59
Grupos de antibióticos propuesto por el CLSI	59
Interpretación estándar de diámetro de inhibición para <i>S. aureus</i> , establecidos por el CLSI.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características que distinguen tres especies principales del género <i>Staphylococcus</i>	3
Tabla 2. Parámetros de crecimiento de <i>S. aureus</i>	4
Tabla 3. <i>Staphylococcus aureus</i> : Toxinas y efectos biológicos.....	6
Tabla 4. Requisitos microbiológicos exigidos para queso blanco por la norma COVENIN 3821:2003.....	15
Tabla 5. Cantidad de muestras tomadas según número de habitantes de las parroquias del municipio Güaicaipuro, edo. Miranda.	19
Tabla 6. Grupos establecidos por la CLSI, Antibióticos y potencia usada para el test de difusión por disco.	24
Tabla 7. Rango y promedio de los títulos de <i>S. aureus</i> , obtenidos en queso blanco del municipio Güaicaipuro. Título Máximo permitido por norma COVENIN 3821-2003.	27
Tabla 8. Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney para las cepas tratadas con oxacilina.	31
Tabla 9. Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney para las cepas tratadas con Vancomicina.	33
Tabla 10. Patrones de resistencia a antibióticos, de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de queso blanco proveniente del municipio Güaicaipuro – edo. Miranda.	34
Tabla 11. Patrón de resistencia de cepas de <i>S. aureus</i> Multirresistentes y %Multirresistencia.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aislamiento de <i>S. aureus</i> , mediante siembra en superficie en agar Baird-Parker..	21
Figura 2. Título de <i>S. aureus</i> en las 33 muestras de queso blanco analizadas en el municipio Güaicaipuro.	27
Figura 3. Título promedio (<i>S. aureus</i>) obtenido por cada parroquia del municipio Güaicaipuro	28
Figura 4. Porcentaje y cantidad de cepas identificadas como <i>S. aureus</i> coagulasa A) por cepas aisladas B) por muestras analizadas.	29
Figura 5. Frecuencia de aparición de los diámetros de halos de las cepas de <i>S. aureus</i> probadas por disco-difusión con Oxacilina. En azul cepa aislada de queso blanco, en verde cepa control (ATCC 25923).	31
Figura 6. Frecuencia de aparición de los diámetros de halos de las cepas de <i>S. aureus</i> probadas por disco-difusión con Vancomicina. En azul cepa aislada de queso blanco, en verde cepa control (ATCC 25923).	32
Figura 7. Porcentaje de cepas:	35
Figura 8. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas multirresistentes, en las muestras de queso blanco analizadas.	36

1. INTRODUCCIÓN

En los países en vías de desarrollo es frecuente la incidencia de diversas enfermedades causadas por la ingesta de alimentos que no reúnen la calidad e inocuidad apropiadas. Esta situación prevalece desde la cosecha del alimento hasta el consumo del producto, ya que está sujeto a una serie de exposiciones y operaciones que, sin control adecuado, pueden convertir al alimento en un elemento altamente nocivo y de riesgo para la salud, por ello se considera que la inocuidad de los alimentos es factor importante que repercute directamente en la salud y la calidad de vida de las personas (Kopper y col. 2009).

Siguiendo este orden de ideas, en Venezuela el consumo de queso blanco fresco, un producto lácteo artesanal a base de leche completa sin pasteurizar y, que además muy pocas veces posee algún tipo de control sanitario en su elaboración y/o transporte, es muy frecuente (Oyón, 1982), ya que forma parte de la dieta diaria del venezolano, esto aunado a su composición fisicoquímica, hace a este sistema alimenticio, un vector perfecto de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, esto lo ejemplifica, un estudio realizado sobre alimentos sospechosos de ocasionar incidentes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Venezuela desde 1989-1999, donde se halló que el agente causal encontrado con mayor frecuencia fue *S. aureus* y en la mayoría de los casos, el queso estaba involucrado (Rios, 2003)

En particular, *S. aureus* es microorganismo muy resistente a condiciones ambientales, ya que puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco con una actividad de agua de 0.85, resistir temperaturas de congelamiento de -20°C o desarrollarse en ambientes con una salinidad del 20% (Elika, 2013; ICMSF, 1996; Alejo y col. 2011), haciendo de este microorganismo un peligroso patógeno, siendo la enfermedad estafilocócica transmitida por alimentos, una de las más frecuentes en el mundo (OPS, 2015).

Además, las bacterias pueden presentar una resistencia intrínseca o natural a determinados antibióticos, pudiendo adquirir dicha resistencia por medio de mutaciones o mediante la adquisición de material genético que aporte nuevas funcionalidades bioquímicas (Flórez, A. 2007).

Es importante destacar que la resistencia antibiótica también representa un peligro potencial cuando se encuentra en los microorganismos comensales o beneficiosos, ya que estos pudieran convertirse en reservorios desde dónde los determinantes podrían transferirse a los microorganismos oportunistas y/o patógenos (Flórez, A. 2007).

Así pues, ninguna bacteria patógena humana es tan versátil ni ha desarrollado tantos mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos como *S. aureus*, lo que, unido a su corto tiempo de generación, hace de esta especie un agente poderoso y temido en lo referente a la salud humana (Trilla, 1994).

Por esta razón el trabajo experimental consistió en analizar la susceptibilidad de cepas *S. aureus* aisladas de queso blanco fresco, proveniente de 33 muestras tomadas en el municipio Güaicaipuro- estado Miranda, ante diversos antibióticos.

1.1 *Staphylococcus aureus*

1.1.1 Taxonomía y morfología

El género *Staphylococcus* (perteneciente a la familia *Staphylococcaceae* del orden Bacillales) está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (Cervantes-García y col., 2014), contando con al menos 35 especies conocidas y 17 subespecies (Zendejas-Manzo y col., 2014).

S. aureus es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 μm de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas (Murray y col., 2009) y que además en medios no selectivo presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas

con un color que puede ir desde el crema al amarillo (Seija y col., 2006). Esta especie se caracteriza por ser no esporulada y por no desarrollar cápsula, aunque algunas desarrollan una cápsula de limo (Cervantes-García y col., 2014).

1.1.2 Características bioquímicas

Staphylococcus aureus se caracteriza por ser un microorganismo anaeróbico facultativo, capaz de fermentar la glucosa, desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno mediante el uso de la catalasa, estimular la conversión del fibrinógeno en fibrina coagulando el plasma mediante la acción de la enzima coagulasa y, producir ácido a partir de la fermentación del manitol y la glucosa (Murray y col., 2009).

Además *S. aureus*, produce en condiciones aeróbicas DNAsa termoestable, resistente a 130°C por 16.6 minutos (Bécquer y col., 1996) y fosfatasa alcalina, una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides (Camarena y Sánchez, 2014); estas cualidades (y otras) lo diferencian de especies como *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, como lo podremos ver en el cuadro de la tabla 1.

Tabla 1. Características que distinguen tres especies principales del género *Staphylococcus*.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Producción de coagulasa (s)	+	-	-
Ácido a partir de manitol (anaerobio)	+	-	-
Producción de toxina alfa	+	-	-
Proteína A en la pared celular	+	-	-
Fosfato de ribitol de tipo ácido teicoico en la pared celular	+	-	+
Fosfato de glicerol de tipo ácido teicoico en la pared celular	-	+	V
Crecimiento anaerobio y fermentación de glucosa	+	+	-
Sensibilidad a la novobiocina	+	+	-

Tomado de Acosta 2010. Datos de Hájek y Maršálek: Baird-Parker: Ann.N: Y: Acad.Sci., 236:7, 1974.V: variable, += 90% cepas positivas, -= 90% de cepas negativas

1.1.3 Condiciones de crecimiento

Los estafilococos tienen un crecimiento en amplios rangos de temperaturas que oscilan entre 6,5 a 46° C, siendo el óptimo para *S. aureus* de 30 a 37° C en un medio con pH de 7,0 – 7,5. (Sierra y col., 2002) pudiendo crecer a pH entre 4,5. y 9,3. *S. aureus* puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco con una actividad de agua de 0.85, obteniendo su óptimo de crecimiento con actividad de agua de 0.98 (Elika, 2013).

Además, *Staphylococcus aureus* es resistente a la congelación y a la descongelación, sobreviviendo perfectamente a temperaturas de –20 °C, y aunque la viabilidad decrece notablemente durante la conservación en congelación, a temperaturas de –10 °C a 0 °C, las enterotoxinas estafilocócicas son muy estables (ICMSF, 1996), y si sumamos la capacidad de este microorganismo de desarrollarse en ambientes salinos de hasta un 20% de concentración (Alejo y col., 2011), tenemos entonces ante nosotros, una de las bacterias más resistentes a condiciones ambientales.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de *S. aureus*.

Parámetros	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	40 – 45	10 - 48
pH	7 – 8	4,0 – 9,6
aw	0,98	0,85 - > 0.99
NaCl (%)	0	0 - 10
Potencial redox (E _h) (mV)	> + 200	< - 100 - > + 200
Atmósfera	Aerobia (5 – 20% oxígeno disuelto)	Aerobia - anaerobia

Tomado de Alejo y col. 2011.

1.1.4 Intoxicación, patogenicidad y virulencia

Las intoxicaciones causadas por *Staphylococcus aureus* pueden constituir un alto porcentaje del total de los procesos de intoxicación alimentaria, su incidencia suele ser subestimada debido al carácter poco grave del proceso y a la falta de confirmación

microbiológica en la mayoría de los casos. La incidencia estimada a nivel mundial podría estar entre 1-100 casos o más de 100 casos por cada 100.000 habitantes dependiendo de las condiciones higiénicas (Gil y Ruiz, 2010), llegando a ser la principal especie patógena de su género, causando infecciones diversas, tanto de origen comunitario como hospitalario (Camarena y Sánchez, 2014).

La intoxicación alimentaria causada por *Staphylococcus aureus* se debe a la ingestión de alimentos contaminados que contienen las enterotoxinas termoestables producidas por algunas cepas de la bacteria. La aparición de los síntomas de esta intoxicación es usualmente rápida y en la mayoría de los casos severa, dependiendo de la susceptibilidad individual a la toxina, de la cantidad de alimentos contaminados ingeridos, de la cantidad de toxinas presentes en los alimentos consumidos y de la salud general del hospedador. Los síntomas más comunes son náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales y postración (Baeza y col. 2010), Las enterotoxinas estafilocócicas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas solubles en agua, presentan un peso molecular bajo que oscila entre 26 kDa y 30 kDa. Estas toxinas provienen de cepas específicas, aunque una cepa de *Staphylococcus aureus* puede sintetizar múltiples serotipos toxigénicos. Las enterotoxinas están asociadas a intoxicaciones alimentarias, son producidas por el 30% de *S.aureus*. Las enterotoxinas estafilocócicas son termorresistentes, algunas pueden mantenerse estables incluso al calentar los alimentos más de 100 °C durante 30 minutos (Murray y col.,2009), y son resistentes a la hidrólisis por enzimas gástricas y pancreáticas. Se cree que su mecanismo de acción consiste en actuar como superantígenos, con la subsecuente liberación de citocinas responsables de los síntomas alimentarios. Se conocen 7 serotipos enterotoxigénicos diferentes: A, B, C1, C2 C3, D y E (Becquer y col., 1996)

Siguiendo este orden de ideas, son muchos los factores que hacen a *S. aureus* un microorganismo virulento, pudiéndose dividir estos en tres grandes grupos:

En primer lugar, *S. aureus* cuenta con componentes estructurales como una cápsula de polisacáridos, ubicada en la parte más externa de la pared celular, que lo protegen de la

fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares, también posee otra capa extracelular hidrosoluble, formada por monosacáridos, pequeños péptidos y proteínas que ayudan a su adherencia a los tejidos donde el microorganismo coloniza; además peptidoglicanos que aporta estabilidad osmótica y que atrae químicamente a los leucocitos inhibiendo así la fagocitosis y por último en cuanto a componentes estructurales, poseen un recubrimiento de una proteína llamada Proteína A, la cual inhibe la eliminación mediada por anticuerpos (Murray y col. 2009).

En segundo lugar, la virulencia de *S. aureus* está ligada al tipo de toxina que produce como lo podemos ver en la siguiente tabla:

Tabla 3. *Staphylococcus aureus*: Toxinas y efectos biológicos.

Toxinas	Efecto biológico
Citotoxinas (α , β , δ y γ leucocidina)	Mecanismo poro-perforador sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos
Toxina exfoliativa (ETA y ETB)	Proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis
Enterotoxinas (A-E, G-I)	Super antígenos (estimula la proliferación de células T y la liberación de citosinas): estimula la liberación de mediadores químicos en los mastocitos, aumentando el peristaltismo
Toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1	Super antígenos (estimulan la proliferación de células T y la liberación de citosinas); produce extravasación o la destrucción de las células endoteliales

Tomado de Zendejas-Manzo, 2014.

Por último, hay que mencionar el papel que juegan las enzimas de *S. aureus* como factor de virulencia del mismo. Aparte de las ya descritas en la sección 1.1.2 existen otras dos

que juegan un rol importante y son: las hialuronidasas que hidrolizan los ácidos hialurónicos del tejido conjuntivo, induciendo la diseminación de los estafilococos por el tejido, y la fibrinolisisina que disuelve los coágulos de fibrina y las lipasas que degradan lípidos (Murray y col., 2009).

1.2 Antibióticos

Los antibióticos son moléculas naturales (producida por un organismo vivo; hongo o bacteria), sintéticas o semisintéticas, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. Constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, que ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función de un microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. Ellos se pueden clasificar en: a) bactericidas: cuando su acción es letal y conduce a la lisis bacteriana; b) bacteriostáticos: a las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células (Seija y col., 2006). Una clasificación más completa de los antibióticos se logra dividiéndolos según su sitio de acción, lo cual les da origen a sus nombres genéricos:

1.2.1 β -Lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos poseen un anillo central de cuatro átomos denominado anillo β -lactámico. Su principal modo de acción es la inhibición de la síntesis de pared celular. El agregado de grupos sustituyentes al anillo β -Lactámico u otras estructuras cíclicas adicionales determinan si el agente es una penicilina, un cephem, un carbapenem o un monobactam (Malbrán, 2001).

1.2.2 Glicopéptidos

Son una clase de péptidos que contienen azúcares ligados a aminoácidos. Actúan afectando la membrana citoplasmática de los protoplasmas en reposo y en proliferación, alteran la permeabilidad de la membrana, pueden inhibir selectivamente la síntesis de ARN, dándole carácter bactericida sólo para bacterias Gram positivas (Gonzales-Piñera y col., 1998).

1.2.3 Aminoglucósidos

Son antibióticos con la presencia de dos o más amino-azúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo amino-ciclitol se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria (Seija y col., 2006)

1.2.4 Macrólidos

Son antibióticos que poseen un anillo lactónico macrocíclico unido por un enlace glucosídico a desoxizúcares aminados, actúan inhibiendo la síntesis de proteínas de las bacterias, al unirse al sitio P de la subunidad 50S: bloquean el proceso de translocación del peptidil-ARNt; y es de carácter bacteriostático (Abad, 2011).

1.2.5 Tetraciclinas

La nomenclatura genérica de estos compuestos se deriva de las sustituciones de 4 anillos en el núcleo hidronaftaceno. Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a éste es necesaria su difusión pasiva por la membrana celular exterior a través de los poros hidrófilos (Rodríguez y col., 1998).

1.2.6 Quinolonas

Se trata de un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el super-enrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular (Seija y col., 2006).

1.2.7 Sulfonamidas y Trimetoprima

Las sulfonamidas representan el genérico de la sulfanilamida. Estos fármacos contienen un grupo sulfuro unido a un anillo de benceno y grupos NH₂ que le confieren a la molécula la actividad antibacteriana (PUJ, 2015). Cuando ambas se usan en conjunto producen un bloqueo secuencial de la ruta de síntesis del ácido fólico y tienen un efecto sinérgico. Tanto la trimetoprima como las sulfonamidas son bacteriostáticas (De Taboada, 2008).

1.3 Bacterias antibiótico resistentes

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de estos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico (Sussmann y col., 2002).

La resistencia puede ser una propiedad natural (Resistencia intrínseca) de un organismo o conseguida (resistencia adquirida) por mutación o adquisición de plásmidos o transposones, estas configuraciones permiten grandes arreglos de genes de resistencia para la mayoría de los antibióticos al ser transferidos juntos en un sólo evento de conjugación (Frost, 2005).

Las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético mediante el transporte de genes de resistencia a través de varios mecanismos como:

- **Transducción:** Transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago atemperado (genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano) durante su fase de ensamblaje, encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina transducción generalizada y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano, pero se conserva el genoma viral, se habla de transducción especializada (Prescott y col., 2004).
- **Conjugación:** se basa en el intercambio unidireccional de información genética desde una bacteria donante a otra receptora mediante un contacto real, a través de una hebra sexual; estos plásmidos usualmente contienen genes que le confieren resistencia (Seija y col., 2006).
- **Transformación:** Transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (Prescott y col., 2004).
- **Transposición:** Movimiento de una sección de ADN (transposon) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular (Cabrera y col., 2007).

Además, existen cuatro mecanismos de resistencia adquirida que los microorganismos pueden utilizar:

- **Impermeabilidad al antibiótico:** Las porinas son proteínas que funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. La resistencia intrínseca de bacterias como *P. aeruginosa* y *Enterococcus sp.*, se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porinas, las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y el

número de las ya existentes, influyen en la permeabilidad a los antibióticos (Cabrera y col., 2007).

- **Modificación enzimática:** consiste en la modificación del antibiótico mediante una enzima para su posterior destrucción. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan los antibióticos betalactámicos al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula; otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas, son los aminoglicósidos. Donde hay modificaciones catalizadas por O-fosfotransferasas, O-adeniltransferasas y N-acetiltransferasas (Wright y col., 1998; Kapil, 2005).
- **Presencia de bombas de eflujo:** El diseño de eflujo (bomba) es mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos. En las bacterias Gram-negativas es necesario un sistema de eflujo tripartita para expulsar el antimicrobiano hacia el medio externo: una proteína localizada en la membrana citoplasmática, otra en el espacio periplasmático (proteína de fusión de membrana MFP) y una tercera en la membrana externa (factor de membrana externa) OM, este se asocia con resistencia a fluoroquinolonas (Moreira y col., 2004).
- **Alteración o producción de nuevos sitios blanco:** Los cambios en los sitios blanco del antibiótico son uno de los mecanismos más importantes de resistencias; los antibióticos betalactámicos, glicopéptidos y quinolonas, pueden disminuir su eficacia debido a cambios o producción de nuevos sitios blanco, ya que por ejemplo, los betalactámicos actúan al fijarse covalentemente a proteínas que unen penicilina (PBP) en la membrana citoplasmática y, *S. aureus* resistente a meticilina, altera estas proteínas y evita así la acción del antibiótico (Cabrera y col., 2007).

1.4 Causas y consecuencias del aumento de bacterias resistentes a antibióticos

Son muchas las causas de un aumento descontrolado de las bacterias resistentes a los antibióticos en la actualidad, entre las cuales podemos destacar:

- Las medidas ineficientes para el control de infecciones en los centros hospitalarios.
- La falta de campañas educativas en el uso y manejo de los medicamentos de uso humano y veterinario.
- El uso de antibióticos en agricultura y acuicultura ocasiona la presencia de residuos de antibióticos en la carne de los animales y la selección de bacterias resistentes en los intestinos de los animales de consumo humano, llevan a una exposición directa de los consumidores a estos fármacos. Además, se pueden encontrar gérmenes resistentes en los alimentos de origen vegetal cuando se irrigan con aguas residuales o cuando se aplican antibióticos a los cultivos (Cabrera y col. 2007).
- Las malas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de alimentos también propician la propagación de las resistencias (OMS, 2015).

Todo esto trae consigo una preocupante consecuencia, y es que la resistencia a los antibióticos prolonga la duración de las enfermedades y aumenta el riesgo de muerte. Por ejemplo, se calcula que las personas infectadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que las infectadas por cepas no resistentes, así como también aumenta el costo de la atención sanitaria, pues alarga las estancias en el hospital y requiere más cuidados intensivos (Cabrera y col. 2007).

1.5 Multirresistencia antibiótica

Epidemiológicamente los microorganismos multi-resistentes se definen como aquellos que son resistentes a una o más clases de antibióticos (Siegel, 2007), Sin embargo, No existe una definición universalmente aceptada de bacteria multirresistente que sea aplicable a todos estos microorganismos; el concepto puede tener matices diferentes en función de que el enfoque sea clínico, microbiológico o epidemiológico. Desde un punto de vista general, la definición debe incluir al menos dos condiciones: que exista resistencia a más de una familia o grupo de antimicrobianos de uso habitual, y que esa resistencia tenga relevancia clínica (es decir, que suponga o pueda suponer una dificultad para el

tratamiento) y epidemiológica (posibilidad de brotes epidémicos, transmisión del mecanismo de resistencia, etc.) (López-Pueyo y col., 2011).

1.5.1 Multirresistencia de *S. aureus*.

Es importante destacar que ninguna bacteria patógena humana es tan versátil ni ha desarrollado tantos mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos como *S. aureus*, lo que, unido a su corto tiempo de generación, hace de esta especie un agente poderoso y temido en lo referente a la salud humana (Trilla, 1994).

Históricamente *S. aureus* se ha visto embebido en el tema de resistencia antibiótica, por ejemplo, con la introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento a sus infecciones, se logró abatir de manera importante las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, para 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos de estafilococos fueron resistentes a penicilina, y para mediados de 1950, los aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles más elevados de resistencia. Los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multirresistentes fueron recobrados en 1957, y a principios de 1960 los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles (Jessen y col., 1999; Panlilio y col, 1992). Se ha visto que cepas de estafilococos que son resistentes a la meticilina (SARM) poseen patrones de resistencia que abarcan a varios antibióticos. De hecho, la resistencia a la meticilina (o en su efecto oxacilina) es tomada como índice de referencia o marcador de la resistencia a otros antibacterianos (Brumpt, 1989), siendo la gran mayoría de los SAMR no sólo son resistentes a todos los b-lactámicos, sino también a múltiples antibióticos (Velázquez-Meza, 2005).

El proceso molecular que hace posible la resistencia de *S. aureus* a la meticilina/oxacilina se debe a la presencia de una proteína alterada de unión a la penicilina (PBP2a, por sus siglas en inglés de “Penicillin binding protein 2a”), codificada por el gen *mecA*, esta

proteína, de 76 kDa, se caracteriza por su afinidad disminuida para los antibióticos β -lactámicos.

El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil conocido como el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, por sus siglas en inglés), que se inserta en un sitio específico del cromosoma bacteriano (*attB_{scc}*), cerca del origen de replicación de *S. aureus*. Esta característica es de gran relevancia porque le permite replicarse en forma temprana y transcribir los genes de resistencia importados (Jiménez y col, 2009).

1.6 Queso blanco fresco.

Según la norma venezolana COVENIN 3821:2003 se entiende como queso blanco, al producto elaborado a base de leche pasteurizada, entera, parcialmente descremada o la mezcla pasteurizada de leche fresca mezclada con sólidos totales de leche o derivados lácteos, adicionada o no de fermentos lácticos, sometida al cuajo, que después de escurrido parcial del suero da origen a un producto sólido; también define queso blanco fresco como el mismo producto descrito anteriormente el cual está listo para el consumo poco después de su elaboración.

Además, según la Tabla de Composición de Alimentos (TCA) publicada por el Instituto Nacional de Nutrición (INN) en 1998, por cada 100 gramos de queso blanco duro de leche completa podemos encontrar, 37.2 g de humedad, 24.9 g de proteína, 31.5 g de grasa, 1.4 g de carbohidratos y 5 g de cenizas, además de 848 mg de calcio, 650 mg de fósforo, 0.8 mg de hierro, 360 mg de vitamina A, 0.05 mg de tiamina, 0.53 de riboflavina y 0.1 mg de niacina; aportando un total de 389 Kcal.

1.6.1 Consumo y elaboración de queso blanco en Venezuela

El queso blanco es un alimento importante en Venezuela, debido a su elevado consumo, y porque se produce en casi todo el territorio nacional durante la mayor parte del año (Mendoza y Oyon, 2002).

Es importante destacar que el queso blanco, es elaborado a partir de leche cruda siguiendo esquemas artesanales empíricos no estandarizados, lo que se traduce en un producto con una pobre calidad sanitaria, si a esto sumamos una distribución/comercialización no sujeta a controles, un almacenamiento inadecuado (sin refrigeración o refrigeración no controlada) (Oyón, 1982; Arispe y Westhoff, 1984; Páez, 1997), sus características fisicoquímicas y las condiciones óptimas de crecimiento de *S. aureus*, convierten al queso blanco producido en nuestro país, en un sistema óptimo para el desarrollo de bacterias y, por ende, en un vehículo perfecto para la transmisión de patógenos.

En Venezuela la norma COVENIN 3821:2003, es la que dicta los criterios a seguir para una elaboración correcta del queso blanco, estableciendo los siguientes criterios microbiológicos:

Tabla 4. Requisitos microbiológicos exigidos para queso blanco por la norma COVENIN 3821:2003.

Requisitos	n	c	Límite		Método de ensayo
			M	M	
Coliformes NMP/g (*) (1)	5	2	93,0	930,0	COVENIN 1104
Coliformes ufc/g (*) (2)	5	2	1×10^2	1×10^3	COVENIN 3276
Coliformes fecales NMP/g (*) (1)	5	2	9,0	93,0	COVENIN 1104
<i>Escherichia coli</i> ufc/g (*) (2)	5	0	< 10,0	-	COVENIN 3276
<i>Escherichia coli</i> NMP/g (*) (3)	5	2	9,0	93,0	COVENIN 1104
<i>Escherichia coli</i> ufc/g (*) (3)	5	2	10,0	1×10^2	COVENIN 3276
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g (**)	5	2	1×10^2	1×10^3	COVENIN 1292
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g (**)	5	5	0	-	COVENIN 3718
Salmonella en 25g (**)	5	0	0	--	COVENIN 1291
Mohos ufc/g (*)	5	2	1×10^2	1×10^3	COVENIN 1337
Levaduras ufc/g (*)	5	2	1×10^2	1×10^3	COVENIN 1337

Donde podemos ver que para *Staphylococcus aureus* se permite un máximo de 1×10^3 ufc por cada gramo de queso blanco.

2. ANTECEDENTES

En la siguiente sección se presentan consideraciones importantes de trabajos realizados anteriormente, que se encuentran relacionados con el tema de estudio de esta tesis, que permitieron apoyar la realización de esta investigación.

En Venezuela, Lemus y colaboradores en 2008 detectaron especies estafilocócicas oxacilino resistentes en quesos blanco duro y blando, fabricados artesanalmente en diversos municipios de la zona norte del estado Anzoátegui. Las cepas de *Staphylococcus* fueron aisladas e identificadas empleando métodos convencionales y la susceptibilidad a oxacilina y otros antibióticos por el método de difusión en disco, encontró que, de 130 quesos evaluados, se aislaron 171 cepas estafilocócicas, donde el 15,2% (26 cepas) eran resistentes a oxacilina, donde 2 cepas oxacilino resistente correspondían a *S. aureus* (1.2%).

Siguiendo este orden de ideas, Acosta en 2010, analizó la susceptibilidad a antibióticos de *S. aureus* aislado de quesos artesanales e industriales del municipio Valledupar-Cesar en Colombia y demostró la presencia de *S. aureus* en hasta en un 88% de los quesos analizados. En cuanto a la resistencia antibiótica, estableció 4 patrones diferentes de resistencia en las cepas de *S. aureus* aisladas de los quesos, siendo el patrón Tetraciclina Resistente común para cinco cepas, el resto de los patrones fueron únicos (Penicilina resistente, Cloranfenicol resistente y Eritromicina resistencia intermedia). Todas las cepas mostraron sensibilidad a oxacilina, gentamicina, ciprofloxacina, cefoxitin, clindamicina, vancomicina, rifampin, e imipenen

Rivera-Salazar y colaboradores, en 2011 evaluaron la susceptibilidad a antibióticos de *S. aureus*, aisladas de quesos comercializados en las ciudades de Maracaibo y San Francisco del estado Zulia-Venezuela. En los ensayos se detectaron cepas de *S. aureus* multirresistentes; los antibióticos con mayor frecuencia de cepas resistentes fueron: Penicilina, Oxacilina, Tetraciclina, Eritromicina, Amikacina, Kanamicina, Ciprofloxacina y Clindamicina. Todos los aislados fueron sensibles a Trimetoprim/Sulfametoxazole,

Imipenem y Gentamicina. Una cepa fue caracterizada como *Staphylococcus aureus* Metilino-Resistente (SARM). Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) encontradas fueron: Penicilina G: $\leq 6-140$ $\mu\text{g}/\text{mL}$; Oxacilina: $< 0,625-6,56$ $\mu\text{g}/\text{mL}$; Amikacina: $32,00$ $\mu\text{g}/\text{mL}$; Clindamicina: $10,31-45,00$ $\mu\text{g}/\text{mL}$; Tetraciclina: $7-195$ $\mu\text{g}/\text{mL}$; Eritromicina: $\leq 15-210,00$ $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Más recientemente, en 2016 López, Determinó de la resistencia microbiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima Metropolitana, haciendo el uso del método de difusión en disco de Kirby-Bauer, donde encontró que sus muestras poseían contaminaciones mayores a 10^5 UFC/g, de las cuales 31 cepas de *S. aureus* coagulasa positivas aisladas mostraron resistencia a penicilina (96,77%), oxacilina (77,42%), gentamicina (3,23%) y norfloxacino (3,23%). También mostraron sensibilidad a vancomicina (100%), gentamicina (96,77%) y norfloxacino (96,77%).

3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados y alcanzados en este Trabajo de Grado fueron:

3.1 Objetivo General:

- Evaluar la prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos en muestras de queso fresco tomadas del Municipio Güaicaipuro, Estado Miranda.

3.2 Objetivos Específicos:

- Aislar cepas de *Staphylococcus aureus* en muestras de queso recolectadas en los expendios comerciales.
- Determinar el título promedio de *Staphylococcus aureus*, de las muestras analizadas en agar Baird-Parker.
- Identificar las cepas presuntivas de *Staphylococcus aureus*, previamente aisladas, a través de pruebas bioquímicas preliminares y confirmativas.
- Detectar cepas de *Staphylococcus aureus resistentes* a antibióticos a través del método de disco difusión.
- Detectar cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a antibióticos.
- Evaluar la resistencia y multirresistencia a antibióticos en un cultivo puro de *Staphylococcus aureus* (Cepa control).

4. METODOLOGÍA

4.1 Lugar de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microorganismos Patógenos de la Sección de Biotecnología y Control Microbiano, ubicado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), el cual se encuentra ubicado en Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela. En este lugar se suministraron los materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo necesarios para la elaboración de este trabajo.

4.2 Muestra

La muestra fue queso blanco fresco llanero duro o blando adquirido en establecimientos de venta de alimentos de las 7 parroquias del municipio Güaicaipuro, del estado Miranda, Venezuela, tomadas en el mes de julio de 2016.

4.2.1 Toma de muestra

Se tomaron un total de 33 muestras de queso blanco duro o blando, de manera aleatoria y proporcional al número de habitantes de cada parroquia del municipio Güaicaipuro, de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 5. Cantidad de muestras tomadas según número de habitantes de las parroquias del municipio Güaicaipuro, edo. Miranda.

Parroquia	Nro. Habitantes*	Nro. Muestras
Los Teques	194725	20
Cecilio Acosta	19350	3
Paracotos	14449	2
San Pedro	12916	2
Tácata	4513	2
Altagracia	3874	2
El Jarillo	2415	2
Total	252242	33

*: Tomado del XIV censo de población y vivienda venezolana (INE, 2011)

Una vez adquiridas las muestras, estas fueron transportadas, asépticamente y bajo refrigeración, al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, en forma inmediata para su preparación y análisis.

4.2.2 Preparación de la muestra

En condiciones asépticas se pesaron 25 gramos de queso fresco llanero en una bolsa de polietileno, previamente tarada, se adicionaron 225mL de agua peptonada al 0,1%, para su homogenizado en el Stomacher por aproximadamente 1 minuto.

4.3 Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*

El aislamiento y recuento del microorganismo se efectuaron siguiendo el método establecido en la norma COVENIN, 1292-2004. Este consiste en sembrar un volumen dado de una muestra representativa, homogénea y preparada del alimento a analizar y/o diluciones de la misma en placas de Petri, utilizando medios de cultivo selectivos apropiados para cada microorganismo, en nuestro caso agar Baird Parker.

Después del período de incubación, se eligieron las placas que poseían entre 20 y 200 colonias características de *S. aureus* (colonias gris oscuro o negras brillantes rodeadas de una zona reducida blanca y por una zona de aclaramiento que se extienda en el medio opaco) para determinar el título bacteriano de *S. aureus*.

Se realizaron y sembraron diluciones seriadas desde la dilución 10^{-2} a la dilución 10^{-8} , como se muestra a continuación:

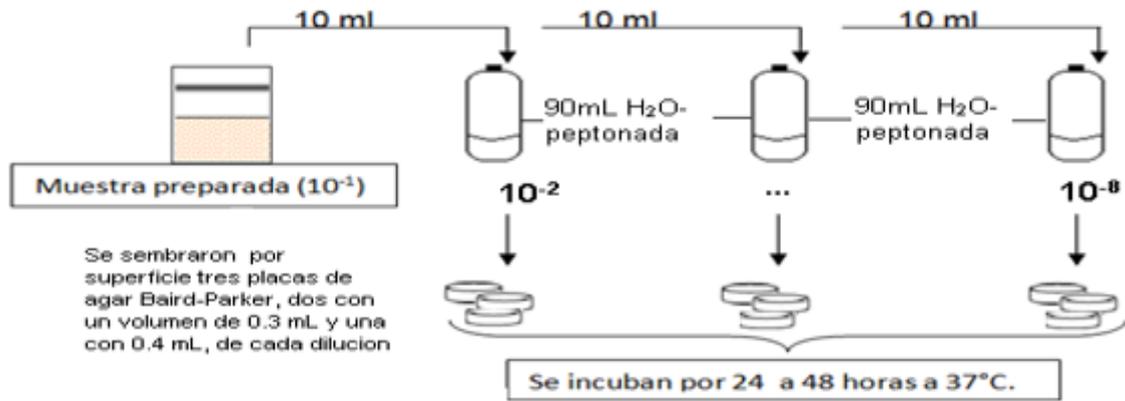


Figura 1. Aislamiento de *S. aureus*, mediante siembra en superficie en agar Baird-Parker.

4.4 Identificación del Microorganismo

Es importante destacar, que antes de cada una de las pruebas realizadas en esta sección, se seleccionaron entre 5 y 12 colonias de las placas con agar Baird-Parker de cada muestra. Estas se transfirieron a tubos con 0.3 mL de caldo cerebro corazón, fueron incubadas por 24 horas a 35°C, para pasar una asada de este caldo a cuñas con medio tripticasa de soya, que también fueron incubadas por 24 horas a 35°C, para asegurar cepas aptas para la confirmación de *S. aureus*.

Cada una de las cepas aisladas fue sometida al proceso de identificación de *S. aureus* establecido por la norma COVENIN, 1292-2004, usando primero las pruebas confirmatorias allí establecidas, y luego las complementarias, de la siguiente manera:

4.4.1 Pruebas confirmatorias

4.4.1.1 Tinción Gram

Se tomó una asada de las cepas de interés, y se distribuyeron en porta objetos limpios haciendo uso de un palillo de madera, se fijaron la muestra utilizando un mechero. Se agregó azul-violeta y se esperó un minuto, se enjuagó con agua no directamente sobre la muestra. Se agregó lugol y se esperó un minuto aproximadamente. Se agregó alcohol acetona, se esperó entre 20 y 30 segundos, y se enjuagó con agua. Se realizó la tinción de contraste, agregando safranina y se esperó un minuto, se enjuagó con agua. La cepa

fue considerada Gram-positiva, al presentar una coloración violeta-azul, al ser examinada en el microscopio a un aumento de 100x.

4.4.1.2 Coagulasa

- Las cepas positivas para la tinción Gram, se pasaron a tubos con caldo infusión cerebro-corazón, se emulsionaron cuidadosamente y se incubaron a 35°C por 24 horas.
- En tubos de ensayo de 12 x 75 mm estériles, se colocaron 0.3 mL de plasma de conejo con EDTA, a estos tubos se les añadió 0.1 mL del caldo cerebro-corazón previamente inoculado e incubado, para llevarlos a baño maría a 37 °C por 4-24 horas.
- Cada hora, durante las primeras 4 horas, se examinó si en los tubos había formación de un coágulo que ocupara el 70% o más del volumen colocado en el tubo, o de uno que al voltear el tubo no se desplazara; las cepas que presentaron dichas características fueron consideradas como cepas positivas de *S. aureus*, mientras que el resto, se dejaron incubando durante las 20 horas restantes, y al formarse el coágulo deseado, eran entonces también confirmadas como *S. aureus*.
- Es importante destacar que en esta prueba se realizaron controles negativos, con tubos con plasma y caldo cerebro-corazón sin inocular, y controles positivos de *S. aureus* con la cepa control ATCC 25923.

4.4.2 Pruebas complementarias

4.4.2.1 Catalasa

Se tomó una asada de las cepas de interés, y se extendieron en porta objetos limpios usando un palillo de madera, se le colocaron de 2 a 3 tres gotas de peróxido de hidrógeno en cada porta objeto, y al observarse formación de burbujas, las cepas eran consideradas como Catalasa positivo.

4.4.2.2 Fermentación del manitol

Se colocó por punción una asada de cada cepa, en tubos estériles con tacos de agar rojo de fenol, con una concentración del 1% de manitol, para asegurar las condiciones de anaerobiosis una vez inoculado el tubo, se colocó 1 mL de parafina estéril a cada tubo, para su posterior incubación a 35 °C por 24 horas. Las cepas que lograron cambiar el color de las cuñas de rojo a amarillo, fueron consideradas como manitol fermentativas.

4.4.2.3 Fermentación de la glucosa

Se colocó por punción una asada de cada cepa, en tubos estériles con tacos de agar rojo de fenol, con una concentración del 1% de glucosa, para asegurar las condiciones de anaerobiosis una vez inoculado el tubo, se colocó 1 mL de parafina estéril a cada tubo, para su posterior incubación a 35 °C por 24 horas. Las cepas que lograron cambiar el color de las cuñas de rojo a amarillo, fueron consideradas como glucosa fermentativas.

4.5 Evaluación de resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus*

Se utilizó el método de disco-difusión descrito por Bauer y col. en 1966, y la estandarización y recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI):

4.5.1 Turbidez estándar para la preparación del inóculo

- Se agregaron 0,5 ml de BaCl₂ 0,048M (1,175% P/V BaCl₂. 2H₂O) a 99,5 ml de H₂SO₄ 0,18 M (0,36 N) (1% V/V).
- Se verificó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro, siendo la absorbancia a 625 nm de 0,08 - 0,10.
- Se distribuyeron de 4 - 6 ml de esta solución dentro de tubos similares a los que se usaron para preparar inóculos. Se mantuvieron los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.
- Antes de usados fueron agitados vigorosamente para obtener una turbidez homogénea.

4.5.2 Preparación del inóculo

Se seleccionaron de 4 a 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo con agar manitol, y se inocularon 4mL de caldo tripticasa soya hasta alcanzar el estándar de turbidez 0.5 de McFarland, el cual corresponde a una población de 10^8 UFC/mL.

4.5.3 Antibióticos

Los antibióticos que se utilizaron para realizar la evaluación de resistencia, se escogieron según el manual M100-S25, de normas de desempeño para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de la CLSI del 2015 (ver Anexo 1), y fueron:

Tabla 6. Grupos establecidos por la CLSI, Antibióticos y potencia usada para el test de difusión por disco.

Grupo	Antibiótico	Contenido de disco
A) Prueba de carácter primario , se reporta una cepa si hay resistencia por algún antibiótico.	Azitromicina	15 µg
	Eritromicina	15 µg
	Oxacilina	1 µg
	Penicilina	10 U
	Sulfametaxol/trimetoprim	23.75 µg / 1.25 µg
B) Prueba de carácter primario , reportar cepa si hay resistencia por dos o más antibióticos.	Tetraciclina	30 µg
	Rifampin	5 µg
	Vancomicina	30 µg
C) Prueba de carácter complementario , reportar cepa si hay resistencia por dos o más antibióticos	Cloranfenicol	30 µg
	Ofloxacina	5 µg
	Ciprofloxacina	5 µg
	Levofloxacina	5 µg
	Gentamicina	10 µg

4.5.4 Test de difusión en disco

- Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo se sembraron las placas de Muller Hinton con un hisopo estéril presionando el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo.
- Se inoculó la superficie seca del Muller Hinton por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Se esperó de 2 a 3 minutos antes de aplicar los discos de antibióticos.
- Los discos de papel impregnados con antibióticos utilizados, estaban refrigerados a 8 °C o congelados a -14°C, y fueron retirados de dichas condiciones al menos dos horas antes de su uso.
- Se colocaron los discos con los 13 antibióticos (3 o 4 por placa) sobre la superficie del agar inoculado con pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro.
- Se incubaron las placas sin invertir a 35°C por 24 horas.

4.6 Análisis de resultados

4.6.1 Criterio para definir resistencia antibiótica de las cepas de *S. aureus*

Para definir si una cepa presentaba resistencia, resistencia intermedia o sensibilidad a los antibióticos utilizados, se utilizó el criterio establecido por la CLSI en su estándar de interpretación de zonas de inhibición para el género estafilococo, en su manual M100-S25 (ver Anexo 2).

Sin embargo, debido a que el método usado en este Trabajo de Grado, no posee la sensibilidad necesaria para comparar resultados con los criterios establecidos por la CLSI, para los antibióticos vancomicina y oxacilina, se decidió realizar una prueba no paramétrica (debido a que se comprobó que la muestra no poseía una distribución normal, usando la prueba de Shapiro-Wilk con 95% de confianza) de U de Mann-Whitney para muestras independientes, con un 95% de confianza (usando el programa SPSS versión 23), a

aquellas cepas aisladas de queso blanco que presentaron un diámetro de halo menor al reportado para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 en estos dos antibióticos, para comprobar si el diámetro de los halos eran significativamente diferente, al diámetro obtenido en la cepa control de *S. aureus* ATCC 25923, y poder definir si las cepas aisladas de queso blanco eran “Probablemente Resistentes”, a vancomicina y oxacilina, por tanto estos antibióticos no fueron tomados en cuenta para el índice de Multirresistencia detallado en la siguiente sección.

4.6.2 Análisis de multirresistencia

La Multirresistencia a antibióticos se calculó para cada cepa a través del índice porcentual de resistencia múltiple a antibióticos, el cual se encuentra expresado a continuación:

$$\%MAR = \frac{N^{\circ} \text{ de antibioticos para los cuales la cepa presenta resistencia}}{N^{\circ} \text{ de antibióticos al cual se expuso la cepa (11 antibióticos)}} * 100$$

Para este índice, solo se tomó en cuenta aquellas cepas que mediante al método de disco difusión, fueron resistentes de acuerdo a los criterios establecidos por la CLSI en su estándar de interpretación de zonas de inhibición para el género estafilococo, del manual M100-S24.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*

En la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos del aislamiento y recuento de *S. aureus* proveniente de las 33 muestras de queso blanco tomadas en el municipio Güaicaipuro; en la tabla 7 se observa el mayor y menor título obtenido, el título promedio, y el título máximo permitido para queso blanco por la norma COVENIN 3821-2003.

Tabla 7. Rango y promedio de los títulos de *S. aureus*, obtenidos en queso blanco del municipio Güaicaipuro. Título Máximo permitido por norma COVENIN 3821-2003.

	Mínimo	Máximo	Promedio	COVENIN 3821-2003
Título (UFC/g)	$2.07 \cdot 10^3$	$4.62 \cdot 10^7$	$3.26 \cdot 10^6$	10^3

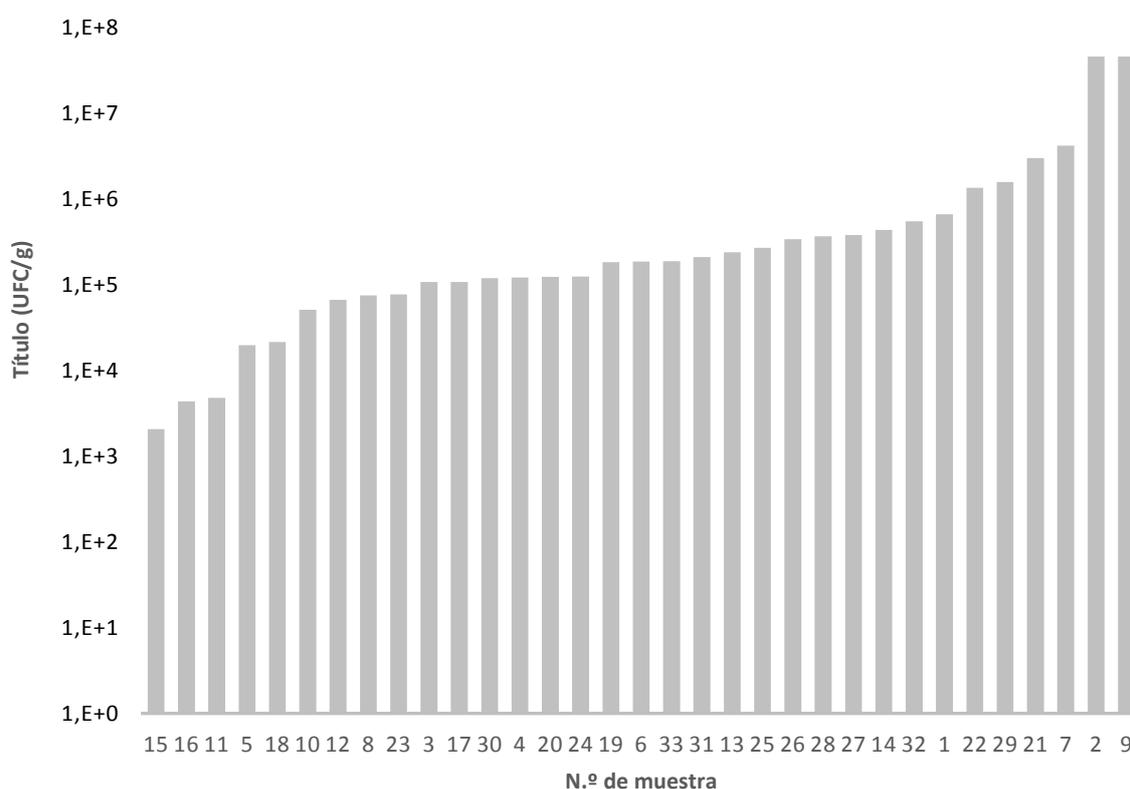


Figura 2. Título de *S. aureus* en las 33 muestras de queso blanco analizadas en el municipio Güaicaipuro.

En la figura número 2, se puede observar en detalle todos los títulos de *S. aureus* obtenidos por muestra de queso analizada, donde podemos destacar que la muestra con mayor título fue la muestra número 9 y con menor título la muestra 15, además, todas las muestras

analizadas se encuentran por encima del título máximo permitido para queso blanco por la norma COVENIN 3821-2003.

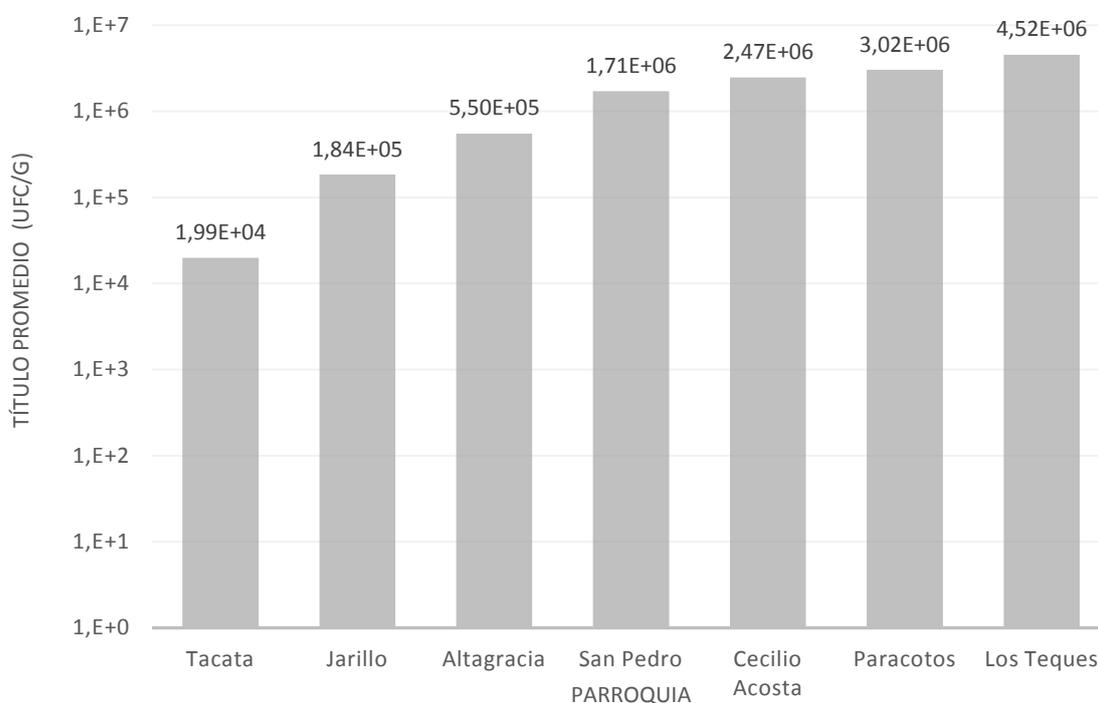


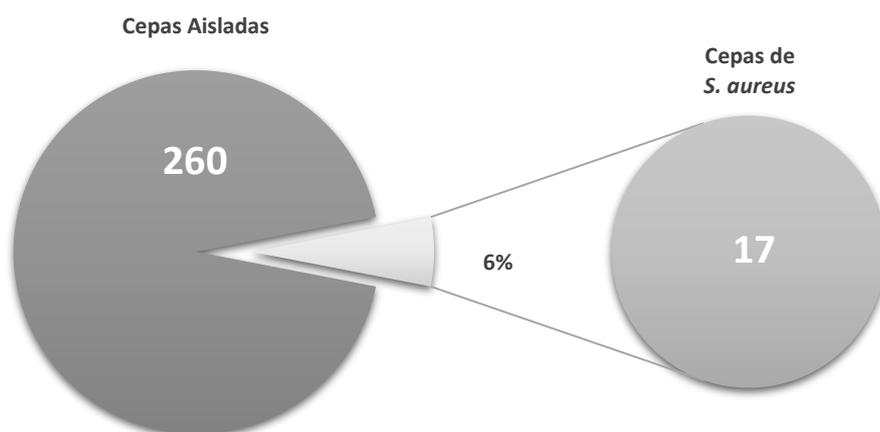
Figura 3. Título promedio (*S. aureus*) obtenido por cada parroquia del municipio Güaicaipuro

En la figura número 3, se observa el título de *S. aureus* promedio obtenido para cada parroquia muestreada en el municipio Güaicaipuro, destacando que la parroquia Los Teques posee el mayor título promedio, con $4.52 \cdot 10^6$ unidades formadoras de colonia por gramo de queso blanco, por lo contrario, la parroquia TÁCATA mostró el menor título promedio con $1.99 \cdot 10^4$ UFC/g.

5.2 Identificación del microorganismo

Una vez realizado el aislamiento de *S. aureus*, y de haber tomado las 260 cepas provenientes de las 33 muestras, para realizar las pruebas bioquímicas pertinentes en la identificación de *S. aureus*, se obtuvo lo mostrado en figura 4, la cual, nos indica la cantidad de cepas identificadas como *S. aureus* coagulasa positivo, y la cantidad de muestras que poseían dicho microorganismo.

A)



B)

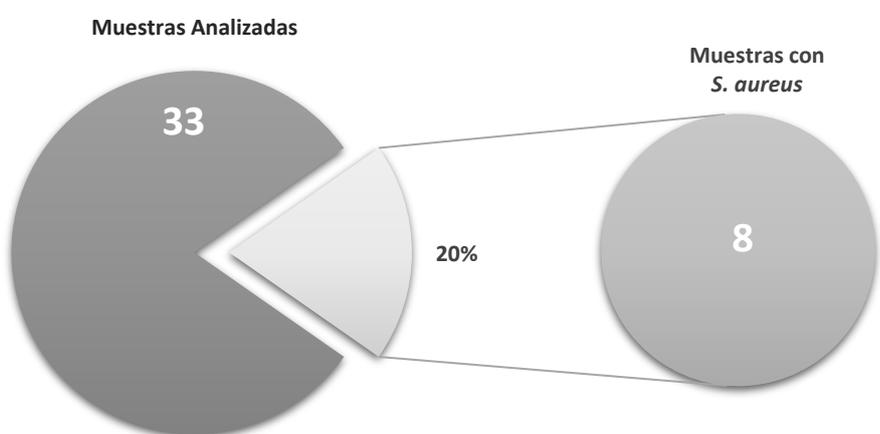


Figura 4. Porcentaje y cantidad de cepas identificadas como *S. aureus* coagulasa A) por cepas aisladas B) por muestras analizadas.

A continuación, en la tabla 8, se muestra el código con el cual serán identificadas las cepas confirmadas como *S. aureus*, las muestras de las cuales fueron aisladas y la parroquia de origen; destacando que la parroquia Los Teques posee el 64.7% de las cepas identificadas como *S. aureus*, siguiendo la parroquia San Pedro con 23.5%, y por ultimo las parroquias Paracotos y Tácata ambas con 5.8%.

Tabla 8. Codificación de cepas identificadas como *S. aureus*, muestra y parroquia de origen.

Cepa	N.º de muestra	Parroquia de origen	Cepa	N.º de muestra	Parroquia de origen
1	1	Los Teques	10	29	San Pedro
2	1	Los Teques	11	29	San Pedro
3	12	Los Teques	12	29	San Pedro
4	22	Los Teques	13	31	Los Teques
5	25	Los Teques	14	32	Altagracia
6	25	Los Teques	15	33	Los Teques
7	25	Los Teques	16	33	Los Teques
8	27	Paracotos	17	33	Los Teques
9	29	San Pedro			

5.3 Evaluación de resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus*

5.3.1 Análisis estadístico realizado a las cepas evaluadas con los antibióticos Oxacilina y Vancomicina.

Para este análisis se usó la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes, con un 95% de confianza, con el programa SPSS versión 23, este estadístico permitió saber si el diámetro de los halos de las cepas de *S. aureus* provenientes de las muestras de queso blanco, eran significativamente diferentes al diámetro de los halos de la cepa control, los resultados a continuación.

5.3.1.1 Oxacilina

Los halos de inhibición para las 17 cepas provenientes de queso blanco, presentaron un diámetro promedio de 16.2 mm, 4 de estas cepas poseían un diámetro de halo muy parecido al de la cepa control, mientras que las restantes están por debajo del rango de diámetro obtenido para la cepa control de *S. aureus*-ATCC 25923, el cual fue de 18 a 22 milímetros, estas 13 cepas, constituyeron la población utilizada para el estadístico de prueba, en contraste a los diámetros obtenidos en la cepa control.

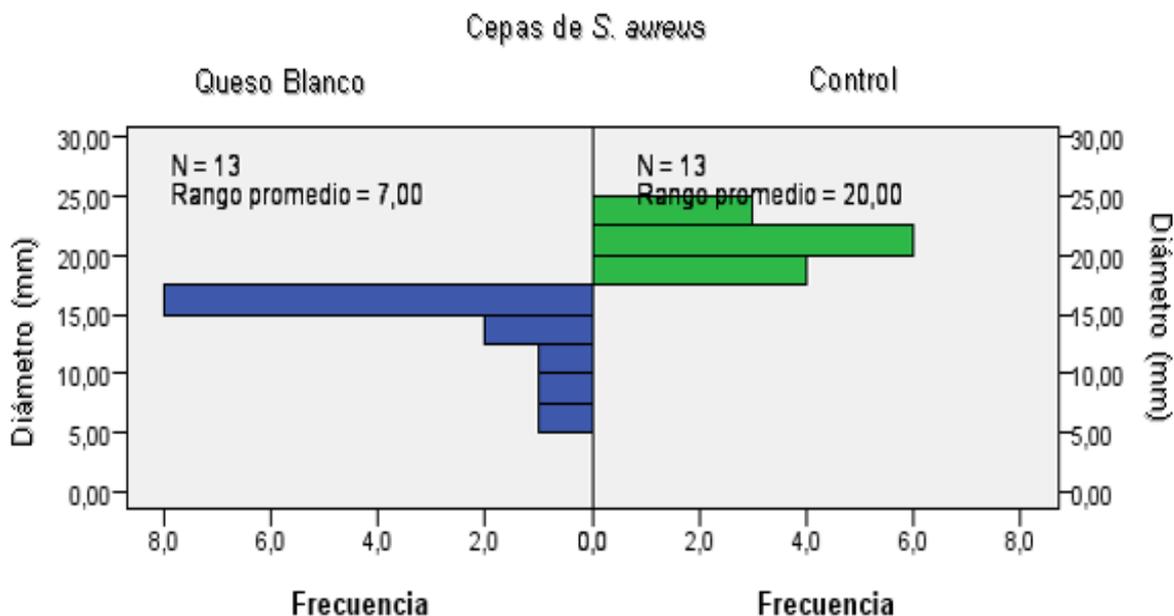


Figura 5. Frecuencia de aparición de los diámetros de halos de las cepas de *S. aureus* probadas por disco-difusión con Oxacilina. En azul cepa aislada de queso blanco, en verde cepa control (ATCC 25923).

Así pues, en la figura 5 podemos ver la frecuencia con que aparecen los diámetros de halo para ambas cepas y sus rangos promedios, destacando que con una frecuencia del 80%, las cepas de *S. aureus* provenientes de queso blanco, poseían un diámetro de entre 15 y 17 mm, mientras que la cepa control obtuvo una frecuencia del 60%, en la aparición de halos de 20 a 22 mm. En la tabla 9 podemos observar los resultados obtenidos de la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes, obteniéndose un nivel de significancia menor de 0.05.

Tabla 8. Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney para las cepas tratadas con oxacilina.

Hipótesis nula	Prueba	Significancia*	Decisión
los diámetros de halo en las cepas provenientes de queso blanco son iguales a los diámetros de halo	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	$1.923 \cdot 10^{-7}$	Rechazar Hipótesis nula

. *: Significación asintótica, el nivel de significación es 0.05.

Al aceptar que las 13 cepas analizadas, presentaron un diámetro de halo probabilísticamente diferente al diámetro de la cepa control, se decidió que estas eran “Probablemente Resistente” (P) a Oxacilina.

5.3.1.2 Vancomicina

Los halos de inhibición para las 17 cepas provenientes de queso blanco, presentaron un diámetro promedio de 12.8 mm, 2 de estas cepas poseían un diámetro de halo muy parecido al de la cepa control, mientras que las restantes están por debajo del rango de diámetro obtenido para la cepa control de *S. aureus*-ATCC 25923, el cual fue de 17 a 21 milímetros, estas 15 cepas, constituyeron la población utilizada para el estadístico de prueba, en contraste a los diámetros obtenidos en la cepa control.

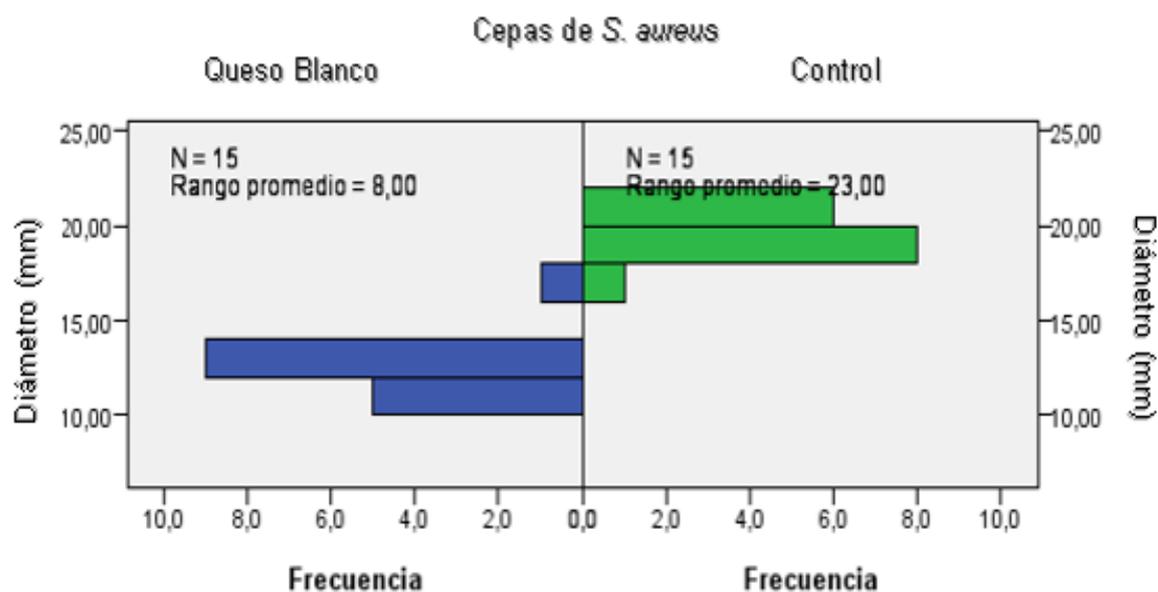


Figura 6. Frecuencia de aparición de los diámetros de halos de las cepas de *S. aureus* probadas por disco-difusión con Vancomicina. En azul cepa aislada de queso blanco, en verde cepa control (ATCC 25923).

Así pues, en la figura 6 podemos ver la frecuencia con que aparecen los diámetros de halo para ambas cepas y sus rangos promedios, destacando que con una frecuencia del 90%, las cepas de *S. aureus* provenientes de queso blanco, poseían un diámetro de entre 12 y

14 mm, mientras que la cepa control obtuvo una frecuencia del 80%, en la aparición de halos de 17 a 20 mm.

Siguiendo este orden de ideas, en la tabla 9 podemos observar los resultados obtenidos de la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes, obteniéndose un nivel de significancia menor de 0.05.

Tabla 9. Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney para las cepas tratadas con vancomicina.

Hipótesis nula	Prueba	Significancia*	Decisión
los diámetros de halo en las cepas provenientes de queso blanco son iguales a los diámetros de halo de la cepa control.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	1.289*10⁻⁸	Rechazar Hipótesis nula

. *: Significación asintótica, el nivel de significación es 0.05.

Al aceptar que las 15 cepas analizadas, presentaron un diámetro de halo probabilísticamente diferente al diámetro de la cepa control, se decidió que estas eran probablemente resistentes a Vancomicina.

5.3.2 Patrones de resistencia

A continuación, en la tabla 11 se muestran los patrones de resistencia obtenidos, a los 13 antibióticos probados con las 17 cepas aisladas de queso blanco, y la cepa control, de lo cual podemos destacar que solo dos cepas (3 y 4) fueron sensible a todos los antibióticos probados, y tan solo una (17) presentó resistencia (completa, intermedia o probable) a todos los antibióticos usados en esta investigación, de resto todas las demás cepas presentaron patrones muy distintas entre ellas, y no hubo patrones comunes.

Tabla 10. Patrones de resistencia a antibióticos, de cepas de *S. aureus* aisladas de queso blanco proveniente del municipio Güaicaipuro – edo. Miranda.

Grupos (CLSI)	Antibióticos	Cepa																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	C
A	Azitromicina	I	I	S	S	I	I	I	I	I	I	I	R	S	S	R	R	R	S
	Eritromicina	I	I	S	S	I	I	I	I	I	I	I	R	S	S	R	R	R	S
	Oxacilina	P	P	S	S	P	P	P	P	P	S	P	P	P	S	P	P	P	S
	Penicilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S
	Sulfametazol/ Trimetoprim	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
B	Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	I	S	R	S
	Rifampin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
	Vancomicina	P	P	S	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	S
C	Cloranfenicol	I	I	S	S	I	S	I	I	I	I	I	I	S	I	I	I	I	S
	Ofloxacina	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	I	R	S
	Ciprofloxacina	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	I	S	I	I	I	R	S
	Levofloxacina	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	R	I	R	S
	Gentamicina	I	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	I	I	R	S

S: sensible, I: resistencia intermedia, R: resistente, P: probablemente resistente (U de Mann-Whitney, $\alpha=0.5$) // C: Cepa Control ATCC 25923

Siguiendo este orden de ideas, en la figura 7 se puede apreciar el porcentaje de cepas resistentes, con resistentes intermedia o probablemente resistente, dependiendo de los antibióticos usados en esta investigación. Destacando que un 24% de las cepas fue resistente a Azitromicina y a Eritromicina, 76% presentaron resistencia intermedia a Cloranfenicol, 76% probablemente resistente a Oxacilina y, 88% probablemente resistente a Vancomicina. La figura 7 se muestra a continuación:

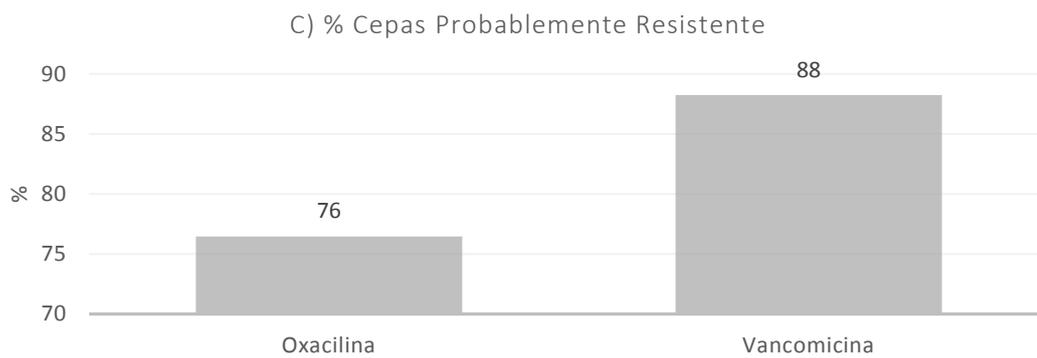
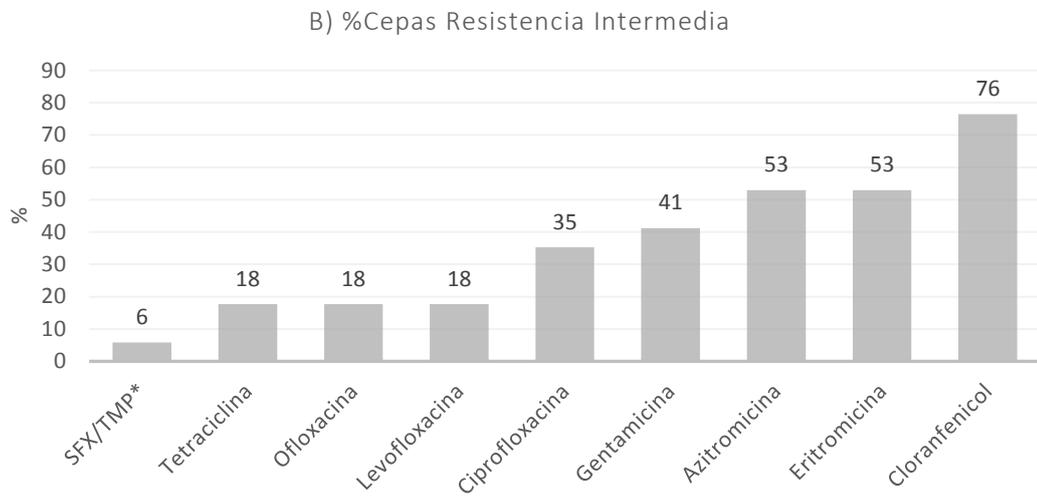
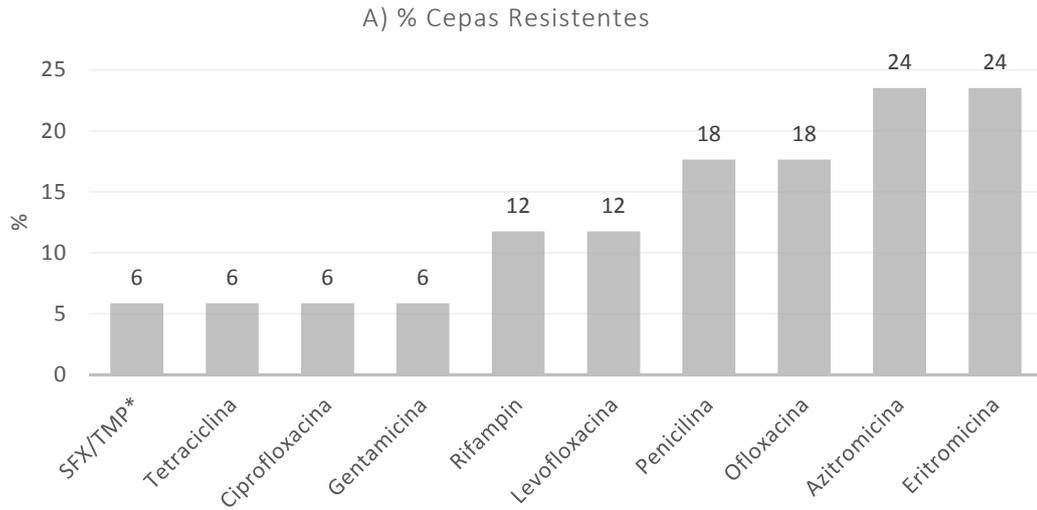


Figura 7. Porcentaje de cepas:

A) Resistentes B) Resistentes intermedio C) Probablemente resistente

5.5.3 Multirresistencia

A continuación, en la tabla 12 se muestran a detalle el patrón de resistencia de aquellas cepas multirresistentes aisladas de queso blanco.

Tabla 11. Patrón de resistencia de cepas de *S. aureus* Multirresistentes y %Multirresistencia

CEPA AISLADA (N°)	PATRÓN DE RESISTENCIA	PORCENTAJE DE MAR (%)
12	AZM-ERI- OFX	27,27
15	AZM-ERI- RIF-OFX-LVX	45,45
16	AZM-ERI-PEN	27,27
17	AZM-ERI-PEN-SXT-TCY-RIF-OFX-CIP-LVX-GEN	90,90

Azitromicina (AZM), Eritromicina (ERI), Ofloxacina (OFX), Levofloxacina (LVX), Rifampin (RIF), Penicilina (PEN), SXT (trimetoprima-sulfametoxazol), Tetraciclina (TCY), GEN (Gentamicina)

En la tabla 11 se aprecian los perfiles de resistencia múltiple, con su respectiva distribución por aislado y asimismo se señala el porcentaje de MAR obtenido para cada uno. Se observan 4 patrones diferentes que incluyeron un mínimo de tres antibióticos y un máximo de 10. Se observa que ningún patrón se repite en las cepas aisladas. No obstante, en los cuatros perfiles obtenidos se aprecia la presencia de Azitromicina y Eritromicina

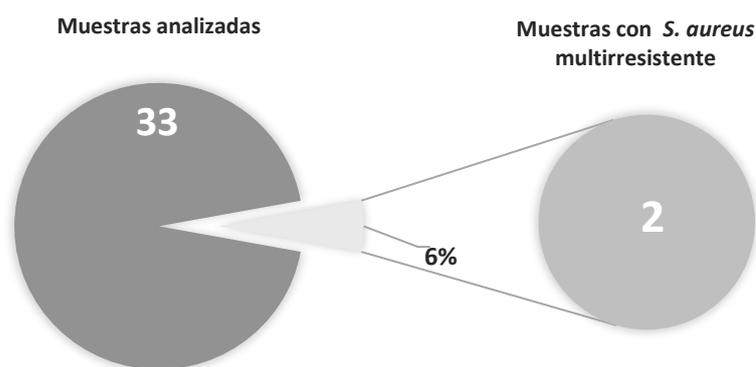


Figura 8. Porcentaje de cepas de *S. aureus* aisladas multirresistentes, en las muestras de queso blanco analizadas.

Por último, en la figura 8 podemos observar que el 6% de las muestras analizadas de queso blanco fresco, provenientes del municipio Güaicaipuro, estado Miranda, Venezuela, presentaron multirresistencia antibiótica a dos o más familias de los antibióticos usados y establecidos por la Clinical and Laboratory Standards Institute.

6. DISCUSIÓN

El queso es una de las principales fuentes proteicas de mayor consumo de las cuales se aíslan con mayor frecuencia estafilococos coagulasa positivos; la humedad y nutrientes brindan un sustrato ideal para el crecimiento y desarrollo de *S. aureus* (Puig y col. 2015), un microorganismo muy versátil, capaz de adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos y generar resistencia que fácilmente puede propagar en la comunidad a través del consumo de los alimentos contaminados (Pahissa, 2009), además produce enterotoxinas termoestables que generan una intoxicación alimentaria (Jay y col., 2009).

La contaminación del queso con *S. aureus*, es un problema cuyo origen es multifactorial, puede ocurrir directamente desde los animales de consumo, los cuales al estar infectados contaminan los productos alimentarios que derivan de ellos (Argudín y col., 2010). Por otra parte, la utilización de leche cruda y sin pasteurizar, la falta de métodos estandarizados e higiénicos, en la elaboración de queso, representan también factores de riesgo (Valero y col. 2010). Es importante destacar que puede darse una contaminación post-elaboración del producto, debido a una manipulación indebida (sin guantes y gorro) o a una exposición indiscriminada al ambiente (superficie de trabajo), en los lugares donde se comercializa (Puig y col., 2015). Además, un mal almacenamiento (sin refrigeración) en la distribución del producto o en el comercio de venta, puede hacer que una pequeña población de *S. aureus* aumente exponencialmente (FDA, 2012), debido a que las bacterias se reproducen velozmente, en estos sistemas donde poseen muchos nutrientes para su desarrollo, lo que constituye un riesgo latente en cuanto a la transmisión de este patógeno.

Así entonces, la presencia de un número promedio elevado de *S. aureus* en agar Baird-Parker (3.26×10^6 UFC/g), en las muestras de queso analizadas en el presente trabajo, indica prácticas de higiene deficientes durante la elaboración y/o conservación inadecuada durante la comercialización de este sistema alimenticio. Estos resultados se consideran insatisfactorios, porque no sólo inciden en la calidad del producto sino también en un posible riesgo sanitario. Sin embargo, es importante destacar que no hay evidencia

suficiente para vincular los productos ensayados con el riesgo de intoxicación alimentaria, puesto que, no se demostró la capacidad del microorganismo de producir enterotoxinas en el sistema alimenticio.

Aun así, en resultados obtenidos por otros investigadores en Venezuela, se han encontrado presencia de *S. aureus* y su enterotoxina en niveles importantes. Se puede destacar lo encontrado por Arispe y Westhoff (1984). Estos autores encontraron, aproximadamente, en uno de cada cuatro quesos blancos analizados, la presencia de *S. aureus* enterotoxigénico. En aquellas muestras que poseían un título bacteriano de al menos 10^5 UFC/g, también, Valero-Leal y col. en 2012, reportaron que en los dos quesos con presencia de *S. aureus* productor de enterotoxinas, la media del recuento fue de $1,25 \times 10^5$ UFC/g. Estos datos resultan importantes, ya que, en esta investigación, 24 de los 33 quesos analizados presentaron un título mayor a 10^5 UFC/g (ver figura 2). Además, 10^5 UFC/g constituye un título en el cual la FDA, indica que hay malas condiciones sanitarias, y que el alimento, puede ser dañino para la salud. Es importante destacar que todas las muestras analizadas en esta investigación presentaron un título bacteriano mayor al título máximo permitido por la norma venezolana COVENIN 3821-2003 el cual es de 10^3 UFC/g (ver tabla 7).

Los resultados anteriores son de esperar, debido a que se conserva una preferencia de uso por leches crudas, para la elaboración de quesos; la razón de esto es que con la pasteurización se desnaturalizan las proteínas endógenas de la leche, y esto promueve la eliminación de microorganismos propios del área geográfica, indispensables, para la maduración y la diferenciación de colores propios de las diferentes variedades de queso (González, 2002).

Siguiendo este orden de ideas, en esta investigación se encontró que el 6% de las cepas aisladas, corresponden a cepas de *S. aureus* (ver figura 4), porcentaje mucho menor a lo obtenido por otros investigadores en queso blanco de Venezuela, por ejemplo, Lemus y col. (2008), obtuvieron que el 32% de sus cepas aisladas fueron de *S. aureus*, y Acosta en

el año 2010, reportó un 12% de prevalencia de *S. aureus* entre las cepas aisladas; esto puede evidenciar, que la prevalencia de estafilococos coagulasa positivos es menor a la de estafilococos coagulasa negativos, en este tipo de alimento. Las 17 cepas confirmadas como *S. aureus* coagulasa positiva provenían: once (65%) de la parroquia los Teques, cuatro (24%) de la parroquia San Pedro, una (6%) de la parroquia Paracotos, y una (6%) de la parroquia Altagracia (ver tabla 8).

Asimismo, al comparar el porcentaje de muestras contaminadas con *S. aureus*, obtenido en esta investigación (100%, ver figura 2), con lo reportado por otros autores, se puede evidenciar que el porcentaje es bastante mayor a lo reportado en el tema en Venezuela, por ejemplo, Valero-leal y col. (2012) obtuvieron un 78% de muestras contaminadas con *S. aureus*, Acosta (2010) un 50% , y Diaz-Rivero y González (2001) reportaron un 70% de contaminación, lo que nos indica que los quesos analizados en esta investigación, carecían de una buena condición sanitaria.

Por otro lado, es importante destacar que la leche (por tanto, el queso) es un producto biológico obtenido de animales y, por ende, plantea problemas de origen en su contaminación, ya que, a la salida de la glándula mamaria, en este producto ya hay presencia de microorganismos (Pinzón, 2004); microorganismos que pueden poseer resistencia antibiótica, debido a la presión selectiva de un tratamiento inadecuado con antibióticos, en respuesta a alguna enfermedad que pudiese presentar el animal.

Lo que nos lleva al antibiograma realizado en esta investigación, la resistencia a penicilina se reporta con una prevalencia en el estudio del 18%. La Penicilina ha sido el tratamiento de elección para la mastitis bovina desde 1940, y a nivel mundial se reporta este fenotipo de resistencia como el más comúnmente observado (Valero y col., 2010). Estudios similares obtuvieron porcentajes mayores al obtenido en este estudio, como el de Puig y col. (2015), 52,9%, Alvarado y col. (2011), 52,5%, y Rivera y col. (2011) con un 44% en cepas de *S. aureus* resistentes a Penicilina aisladas de queso. La Penicilina y los cuatro

antibióticos de los cuales se habla a continuación pertenecen al grupo A de prueba establecido por la CLSI (2015).

El CLSI establece que *S. aureus* resistente a Metilina/Oxacilina (SARM), es aquella cepa de *S. aureus* que expresa el gen *mecA* u otro mecanismo de resistencia a metilina, como cambios en la afinidad de proteínas de unión a la penicilina por oxacilina. Además, es considerado resistente a agentes β -lactámicos, es decir penicilina, y combinaciones de inhibidores de β -lactámico/ β -lactamasa. En el presente estudio el uso de discos de oxacilina pudo indicar una probable detección de cepas de SARM, aunque para asegurar esto se debe confirmar la presencia del gen específico mediante pruebas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados del estudio presentaron resistencia probable (76%) superiores a lo obtenido por Puig y col. en 2015 (24,1%), Rivera-Salazar col. en 2011 (20%), Alvarado y col. (15%), pero comparable con el 77% obtenido por López en 2016, en quesos de Lima-Perú.

La presencia de SARM en alimentos ya no es desconocida y es considerada un riesgo potencial para la salud del consumidor, según Herrera y Santos en 2015, y Fonseca y col. en 2011, quienes detectaron SARM en 9 y 1 muestras de queso, respectivamente. Esto resulta de gran importancia por ser el SARM un patógeno capaz de ocasionar una gran variedad de manifestaciones clínicas en el hombre, desde infecciones leves en la piel, bacteriemia, neumonía, endocarditis, síndrome del shock tóxico e, incluso, la muerte (Herrera y Santos, 2015).

Es importante ser vigilantes, en vista que actualmente existe preocupación mundial acerca de la diseminación de cepas de SAMR. Esta alarma de salud pública se debe a que su erradicación no es nada fácil, por su amplia capacidad de multirresistencia a antimicrobianos (Acosta, 2010).

En cuanto a los últimos tres antibióticos (del grupo A, del CLSI) usados en esta investigación, podemos destacar que el 24% de las cepas presentaron resistencia

completa a Azitromicina y Eritromicina, y un 53% de las cepas poseían resistencia intermedia a estos antibióticos (ver figura 7), lo cual es de esperarse debido a que la mayoría de las cepas que presentan resistencia a Oxacilina, también son resistentes a estos dos antibióticos macrólidos (Gil, 2010). Este porcentaje de resistencia es mucho mayor a lo obtenido en Venezuela por Acosta en 2010 (7%), y Rivera-Salazar y col. en 2011 (8%), pero comparable con el 30% obtenido por Puig y col. en Cuba en el año 2015. Por otro lado, sólo una cepa (6%) presentó resistencia al antibiótico Sulfametazol/Trimetoprim, e igualmente sólo una (6%), presentó resistencia intermedia a dicho antibiótico (ver figura 7), data importante debido a que ninguna cepa de las analizada por, Acosta en 2010, Alvarado y col. y Rivera-Salazar y col. ambas en 2011, presentaron resistencia a este antibiótico. Sin embargo, ya para el año 2015. Puig y col. reportaron un 6.6% de cepas resistentes a este antibiótico, lo cual podría significar la aparición de un nuevo patrón de resistencia, y afirmaría lo señalado por López (2016), que el Sulfametazol/Trimetoprim y la Eritromicina, son usados con frecuencia en el ganado bovino para contrarrestar problemas de mastitis bovina, y por tanto, podría desarrollarse rápidamente una resistencia a estos antibióticos.

Siguiendo este orden de ideas, analizando lo obtenido en los antibióticos probados pertenecientes al Grupo B del CLSI, podemos destacar que un 88% de las cepas aisladas de *S. aureus*, presentaron resistencia probable a la Vancomicina, hecho preocupante debido a que Acosta (2010), Rivera-Salazar y col.(2011), Alvarado y col. (2011), Yugcha (2016) y López (2016), reportaron sensibilidad absoluta para este antibiótico, y aunque la sensibilidad del método en este trabajo de investigación no fue suficiente para determinar si las cepas son totalmente resistentes, el hecho de exista una probabilidad de que el 88% de las cepas aisladas, presenten una resistencia a este antibiótico, constituye un grave problema en la salubridad pública del municipio Guaicaipuro, ya que los glicopéptidos (como la vancomicina) han sido el pilar del tratamiento de las infecciones por *S. aureus* meticilino resistentes (Rodríguez, 2005). Además, en este grupo, se encontró una cepa

resistente a Tetraciclina (6%), y dos a Rifampin (12%), porcentajes muy parecidos a los reportados por Rivera-Salazar y col. en 2011 (12% y 8% respectivamente).

En cuanto el tercer y último grupo de antibióticos de prueba propuesto por el CLSI (Grupo C), podemos destacar que se presenta una sensibilidad a la Gentamicina del 47% en el presente trabajo, lo cual no es lo comúnmente obtenido en otras investigaciones como las de Alvarado y col. en 2011, y Rivera-Salazar y col. en 2011 (100%). La obtención de una cepa resistente (6%) y de 7 (41%) cepas con resistencia intermedia a este antibiótico, similar a la resistencia obtenida por Puig y col. en 2015 (0,7%), valida lo señalado por Solimano (2011), el cual indica que la Gentamicina, usada con frecuencia en el ganado bovino para contrarrestar problemas respiratorios e infecciones gastrointestinales, puede generar resistencia de manera rápida. Asimismo, se encontró resistencia intermedia a Cloranfenicol en el 76% de los casos, porcentaje mayores a los reportados por Acosta en 2010 (14%) y Rivera-Salazar y col. en 2011(8%); y aunque el Cloranfenicol es prohibido en países del primer mundo por su alta toxicidad en la medicina humana y veterinaria, resultados como los encontrados en este trabajo, indican que en países no desarrollados como Venezuela, el uso indiscriminado de este, puede aumentar la incidencia de resistencia al antibiótico como lo indicaba Embid ya hace casi dos décadas en 1998.

Por último, se usó la Levofloxacin, la Ofloxacin y la Ciprofloxacina, para evaluar la susceptibilidad al grupo de las quinolonas. Cabe mencionar que este grupo de antibióticos son los medicamentos más utilizados en la medicina veterinaria (Cancho, 2010). La alta sensibilidad a la Ciprofloxacina, 94%, hace que el antibiótico sea útil en el tratamiento a una infección con estas bacterias, pero existe la posibilidad de mostrar resistencia como lo obtenido en el presente estudio (6%). En estudios anteriores también se encontró una alta sensibilidad (Benítez y Centi, 2012; Cedillos y Guerra, 2012), y baja resistencia como lo registrado por Rivera-Salazar y col. en 2011 (4%) y Puig y col. en 2015 (4,4%).

Siguiendo este orden de ideas, en la figura numero 7 podemos ver el porcentaje de resistencia intermedia a los antibióticos probados, resultados que no podemos dejar de

lado ya que en general, las cepas intermedias podrían considerarse como resistentes y sólo en caso de no existir otras opciones se podrán utilizar los antibióticos, así calificados, con la dosis máxima permisible (Herrera, 2004). Así pues, podemos destacar que se encontró resistencia intermedia a 9 antibióticos de los 13 usados, siendo el Cloranfenicol (76%), la Eritromicina (53%), Azitromicina (53%) y la Gentamicina (41%), los antibióticos más comunes dentro de las cepas intermedias.

En general, si vemos la figura 7, podemos observar que aquellos antibióticos que surten mayor efecto en la inhibición del crecimiento o desarrollo de las cepas de *S. aureus* aisladas de queso blanco en este trabajo, fueron los antibióticos Sulfametazol/Trimetoprim y Tetraciclina, debido a que poseen el porcentaje más bajo de cepas resistentes o con resistencia intermedia.

Pero un hallazgo realmente preocupante en este trabajo de investigación, lo representa el aislamiento de 4 cepas de *S. aureus* multirresistente a antibióticos, de las cuales, destaca una que resultó resistente 91% de los antibióticos usados (Cepa N. °17) y otra al 55% (Cepa N. °1). Esto nos indica que ya la población de *S. aureus*, que actualmente está asociada al queso blanco que se comercializa y consume en el municipio Güaicaipuro, podría adquirir la capacidad de poseer resistencia antibiótica a muchos más antibióticos, y representar un grave problema de salubridad pública.

La interpretación lógica de los resultados de la múltiple resistencia a antibióticos es que todas las cepas aisladas podrían haberse originado a partir de entornos en los que se utilizan a menudo antimicrobianos (Singh y col., 2010) Cabe destacar que lo descrito en este trabajo de grado, marca un precedente en el registro de cepas de *S. aureus* multirresistentes aisladas de queso, debido a que en ninguna de las investigaciones de Venezuela y Latinoamérica, consultadas para esta investigación, se encontró una resistencia tan amplia a todos los grupos de antibióticos propuesto por la CLSI, por ejemplo, Acosta en 2010, sólo reportó una cepa con resistencia a dos antibióticos, Alvarado y col. en 2011, una cepa resistente a 4 antibióticos, Rivera-Salazar y col. en 2011 una cepa con

resistencia a 5 antibióticos, Puig y col. en 2015 cinco cepas resistentes a 5 antibióticos y López en 2016 sólo una cepa resistente a 3 antibióticos.

La comparación anterior es realmente dramática debido a que en este trabajo además de encontrarse cepas con una resistencia comprobada amplia, se encontró una resistencia probable a Vancomicina del 88 %, y aunque en los últimos años se han desarrollado nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones por patógenos Gram positivos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) (considerándose ambos un verdadero reto terapéutico), continúa siendo escasa la información clínica de respaldo al uso de agentes terapéuticos que la superen en eficacia. El Linezolid, la Daptomicina y la Tigeciclina son agentes que tienen actividad contra los cocos Gram positivos y que fueron aprobados e introducidos en la terapia clínica en la década pasada, en casos de resistencia a la Vancomicina. Además, se han probado o están en las fases finales de desarrollo otros agentes como las cefalosporinas de última generación (Ceftarolina y Ceftobiprol) (Rincón y col., 2014).

La era de las super-bacterias (bacterias resistentes a muchos antibióticos) está a la vuelta de la esquina, y resultados como los encontrados en este trabajo, lo respaldan. Es bastante preocupante debido a que se estima que sólo en Estados Unidos y la Unión Europea, mueren alrededor de 23 a 25 mil personas por año debido a infecciones con bacterias multirresistentes. Y si lo anterior no es lo suficientemente preocupante, podemos destacar que la OMS en febrero de 2017, publicó una lista de patógenos prioritarios que necesitan de la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, de entre las cuales; no sorprende ver a *Staphylococcus aureus* entre el grupo de bacterias que necesita de una atención elevada en este campo, debido a su resistencia a la meticilina, sensibilidad intermedia y resistencia a la Vancomicina.

Para finalizar, este trabajo de investigación demuestra el potencial riesgo que supone el consumo de queso blanco, debido a la contaminación presente y la propagación de resistencia a antibióticos. El hallazgo de cepas de *S. aureus* con resistencia a más de una familia de antibiótico, y de una cepa resistente al 91% de los antibióticos usados, indica la necesidad de promover el uso racional de éstos en la medicina veterinaria y clínica, con el fin de evitar la aparición y propagación de más cepas multirresistentes. Además, evidencia la necesidad de intensificar los controles higiénico-sanitarios, así como la adopción de buenas prácticas de manufactura y la aplicación de procedimientos basados en los principios de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) en toda la cadena alimentaria, por ende, es importante se adopten medidas educativas, legales y preventivas dirigidas a los manipuladores de alimentos.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- El título promedio de *Staphylococcus aureus*, de las muestras analizadas del municipio Güaicaipuro en agar Baird-Parker, fue de $3.26 \cdot 10^6$ UFC/g. Recuento significativo, considerando que la norma venezolana establece un límite máximo de 10^3 UFC/g.
- La parroquia con mayor recuento de *Staphylococcus aureus*, fue la parroquia los Teques con un título de $4.52 \cdot 10^6$ unidades formadoras de colonia por gramo de queso blanco. La parroquia con menor recuento fue TÁCATA con $1.99 \cdot 10^4$ UFC/g
- 17 cepas fueron confirmadas como *Staphylococcus aureus* en muestras de queso recolectadas en los expendios comerciales del Municipio Güaicaipuro. De las cuales el 64.7 % provenían de la parroquia Los Teques, 23.5 % de la parroquia San Pedro, 5.8 % de Paracotos y 5.8 % de Altagracia.
- Se encontró una prevalencia del 20 % de *Staphylococcus aureus*, en las muestras de queso blanco analizadas del municipio Güaicaipuro, porcentaje menor a lo encontrado en investigaciones similares en Venezuela y Latinoamérica.
- 76% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de queso blanco, presentaron resistencia probable a oxacilina y 88% resistencia probable a vancomicina, hecho preocupantes debido a que ninguna de las investigaciones consultadas se encontró resistencia para Vancomicina.
- 4 cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron multirresistencia a antibióticos, resaltando que una de ella fue resistente al 91% (10/13) de los antibióticos usados y otra al 55 % (6/13), dato importante para Venezuela ya que no se han reportado cepas con tan amplia resistencia antibiótica.

- La prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a antibióticos en las muestras de queso fresco tomadas del Municipio Güaicaipuro, Estado Miranda, fue del 6%.
- El cultivo puro de *Staphylococcus aureus* (Cepa control), no mostro resistencia a los antibióticos utilizados, lo que de alguna manera soporta el hecho de que las cepas resistentes provienen de entornos donde se utilizan antimicrobianos.

7.2 RECOMENDACIONES

- Mejorar el proceso de investigación, ampliando la cantidad de muestras analizadas, para aumentar la probabilidad de aislar cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a antibióticos.
- Ampliar el área de estudio y realizar esta investigación en otros municipios del país.
- Enriquecer la investigación, demostrando la presencia de la entero-toxina producida por *Staphylococcus aureus*, en las muestras analizadas y correlacionarlas con el porcentaje de sal del sistema alimenticio.
- Realizar el test de resistencia antibiótica, por dilución en placa, para Vancomicina y Oxacilina, y así poder establecer una resistencia fiable a estos antibióticos.
- Profundizar en la identificación de las cepas de *Staphylococcus aureus*, haciendo uso de metodologías moleculares como la PCR.
- Hacer llegar la información que resulte peligrosa, a aquellos distribuidores que facilitaron las muestras analizadas, y entregar folletos informativos sobre el tema, para concientizar a la población en general.
- Comunicar, en la medida de lo posible, a los entes pertinentes los hallazgos de cepas multirresistentes.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abad, F. 2011. Antibióticos Macrólidos y Lincosaminas. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Acosta, I. 2010. caracterización de la susceptibilidad a antibióticos y del perfil plasmídico en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos artesanales e industriales consumidos en el municipio de Valledupar Cesar-Colombia. Trabajo de grado, Universidad del Zulia, Zulia, Venezuela.
- Alejo, J., Muñoz, M., Correa, D., Klotz, B., Herrera, F., Martínez, J., Rey, J. y colaboradores. 2011. evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá, Colombia.
- Alvarado, V., Mora, M., Arias, M., Rojas, N., Chaves, C. 2011. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, Costa Rica. Revista costarricense de Salud Pública. **20(2)**: 102-106. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140914292011000200006&lng=en
- Argudín, M., Mendoza, M., Rodicio, M. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. **2(7)**:1751-73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22069659>.
- Arispe, I., Westhoff, D., 1984. Manufacture and quality of Venezuelan white cheese. *Journal of FoodScience*. **49**:1005- 1010.
- Baeza, R., Rossler, C., Mielnicki, D., Zamora, M., Chirife, J. 2010. Predicción del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en un alimento cárnico dejado a temperatura ambiente por varias horas: aplicación a varias ciudades argentinas de climas cálidos. Proyecto de Investigación. Universidad Católica Argentina. Buenos aires, Argentina.

- Bécquer, A. Leyva, C., Lara, C. 1996. Detección de la desoxirribonucleasa termoestable (termonucleasa) directamente en el alimento. Rev. Cub. Aliment Nutr 1996; **10(2)**
- Benitez, E., Centi, K. 2012. Determinación de la resistencia del *Staphylococcus aureus* aislado de quesos no madurados comercializados en el mercado central de San Salvador, a los antibióticos de prueba seleccionados. Trabajo especial de grado. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Brumpt, W. 1989. Methicillin-resistant *S. aureus*. N Engl J Med 1989. **320**:188.
- Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Med. **38 (2)**: 149-158.
- Camarena, J., Sánchez, R. 2014. infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia, España.
- Cancho, B., García, M., Simal, J. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. Ciencia y Tecnología Alimentaria. **3(1)**: 39-47. España. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/11358120009487647>
- Cedillos, R., Guerra, J. 2012. Determinación de la multiresistencia microbiana de *Staphylococcus aureus*, aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración del queso fresco artesanal proveniente de dos queserías. Trabajo de especial de grado. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador.
- Cedillos, R., Guerra, J. 2012. Determinación de la multiresistencia microbiana de *Staphylococcus aureus*, aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración del queso fresco artesanal proveniente de dos queserías. Trabajo especial de grado. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador.

- Cervantes-García, E., García-González, R., Salazar-Schettino, P. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. **61 (1)**: 28-40
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S25. Pennsylvania, USA; **35(3)**:64-69.
- De Taboada, C. 2008. identificación y patrón de sensibilidad de patógenos gram positivos en muestras de secreción faringea en niños con faringitis y faringoamigdalitis aguda del servicio de pediatría del hospital regional arequipa “julio pinto manrique” xi - dirtepol 2007-2008. Tesis de licenciatura, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.
- Diaz-Rivero, C., González, B. 2001. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. REPN. **2(3)**. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/ii/3/articulos/saureus-1.html>
- Espinoza, D., Maniscalchi, M., Hassoum, M., Vizcaya. H. 2008. Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui, Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. **28**:48-54.
- Embid, F. 1998. Resistencia de las bacterias a los antibióticos. Rev. Med. Hols. **53**: 45-55
- Flórez, B. 2007. Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, Asturias, España.
- Fonseca, C., Matté, M., Dropa, M., Mamizuka, E., De Almeida, L., Lincopan, N., Matté G., Leal, P. 2011. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the mecA gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. Foodborne Pathogens and

Disease. **8(4):** 561-563. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21453120>

- Food and Drug Administration. 2012. Bad Bug Book. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2º Edición. pp. 87-91. Disponible en:
<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm>
- Frost, L., Leplae, R., Summers, A., Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* **3:** 722-732.
- Gil, A., Ruiz, M. 2010. Tratado de nutrición, Tomo II. Editorial Médica Panamericana. 2da edición. Madrid, España.
- González, M. 2002. Tecnología para la elaboración de queso blanco amarillo y yogurt. Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación/Autoridad de la Micro. Pequeña y Mediana empresa. Soná. Veraguas-República de Panamá. 16 pp.
- González-Piñera, J., Barreto, J., Rodríguez, A., Machado, A., Mora, E., Lescay, M. 1998. Glicopéptidos. *ACT. MED.* **8(1):**54-7.
- Herrera, F., Santos, J. 2015. Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes en queso doble crema artesanal. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica.* **18(1):**29-37. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012342262015000
- Herrera, H. 2004. Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera,* **39(1),** 61-65.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). 2011. XIV censo nacional de población y vivienda: Resultados por Entidad Federal y Municipio del Estado Miranda. Ministerio del poder popular de planificación. Caracas, Venezuela.

- Instituto Nacional de Nutrición. 1998. Tabla de composición de alimentos, Caracas, Venezuela.
- International Commission on Microbiological Specifications (ICMSF). 1996. Microorganisms in Foods 5, Characteristics of Microbial Pathogens.
- Jay, J., Loessner, M., Golden, D. Microbiología Moderna de los Alimentos. Cap. 23, Gastroenteritis Estafilocócica. 5° Edición, Ed. Acribia S.A., Royo, 23-50006, Zaragoza, España. pp. 541-557.
- Jessen, O., Rosendal, K., Buloww, P. 1999. Changing sthaphylococci and staphylococcal infections: A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. N Engl J Med 1999. **281**:627-635.
- Jiménez, J., Correa, M. 2009. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. IATREIA. **22 (2)**:147-158.
- Kapil A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian J Med Res.* **121**: 83-91.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: estudios de caso en Costa Rica, el Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, Roma, Italia.
- López, R. 2016. Determinación de la resistencia microbiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima metropolitana. Tesis especial de grado. Universidad mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Lopéz-Pueyo, M., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., Garnacho-Montero, J. 2001. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Med Intensiva.* **35 (1)**: 41-53.

- Malbran, C. 2001. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Ministerio de salud, Buenos aires, Argentina.
- Mendoza, C., Rafael, Oyón. 2002. Estudio comparativo de dos coberturas para queso llanero maduro. Rev. Fac. Agrom. **28**: 1-11.
- Moreria, M., De Souza, E., De Moraes, C., 2004. Multidrug efflux systems in gram-negative bacteria. Braz J Microbiol. **35**:19-28.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. 2009. Microbiología médica. Elsevier. Barcelona, España.
- NORMA VENEZOLANA COVENIN. 2003. 3821. Alimentos. Queso Blanco. Caracas, Venezuela.
- NORMA VENEZOLANA COVENIN. 2004. 1292. Alimentos. Asilamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. Caracas, Venezuela.
- Oyón, R., 1982. Queso Llanero: Descripción y Composición. Informe Final de Proyecto DDCT-TA-3, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Páez, R., Lucy, V. 1997. Análisis de Peligros Potenciales y Control de los Puntos Críticos en la Distribución de Queso Blanco Duro Criollo (Llanero) en el Estado Aragua. Trabajo de ascenso. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
- Pahissa, A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 2009. 1º Edición. Editorial ICG Marge, SL, Valencia 558, Barcelona, España. pp. 34-45.
- Panlilio, A., Culver, H., Gaynes, R. 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975-1991. Infect Control HospEpidemiol. **13**:582-586.
- Pinzón, A. 2004. Montaje de una Planta piloto para la producción y comercialización de leche pasteurizada en empaque biodegradable en la meseta de Popayán. Trabajo especial de grado. UNAD. p. 11,25 y 29.

- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2004. Microbiología. McGraw Hill Interamericana. 5ta edición. Madrid, España.
- Puig, Y., Espino, M., Leyva, V., Apórtela, N., Pérez, Y., Soto, P. 2015. Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas en alimentos y manipuladores. RCAN. Revista. Cubana Alimentación y Nutrición. **25(2)**: 245-260. Disponible en: www.revicubalimentanut.sld.cu/Vol_25_2/Articulo_25_2_245_260.pdf
- Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L., Reyes, J., Munita, J., y Areas, C. 2014. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. Biomédica. **34 (01)**: 191–208.
- Ríos, M. 2003. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA): Impacto y vigilancia epidemiológica. II Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Maracay, Venezuela. pp. 44.
- Rivera-Salazar, J., Mujica, I., Aranaga-Natera, V., Navarro-Ocando, C., Zabala-Díaz, I., Atencio-Bracho, L. 2011. *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos. Rev. Cient. FCV-LUZ. **21 (3)** : 202-210.
- Rodríguez, C., Vesga, O. 2005. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. Rev. Biomédica. **25**:575-87.
- Rodríguez, M., González-Piñera, J., Barreto, Jesus., Lim, N., Areu, A., Pardo, a.1998. Tetraciclinas. Act. Med. **8 (1)**: 75-9.
- Seija, V. Vignoli, R., Betancor, L, Gaeda, M., Flores, K. 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Departamento de Bacteriología y Virología, UdelaR. 2da Edición. Montevideo, Uruguay.
- Siegel, J., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. 2007. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings. Am J Infect Control. **35**: 165—93.

- Sierra, J., Marco, F., Ruiz, J., De Anta, M., Vila, J. 2002. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. **8**:781-790.
- Solimano, G., Fernández, C., Romero, R., Falcón, N. 2011. Antibacterianos de empleo frecuente en ganado bovino destinado a la producción de leche y carne en Lima, Perú. Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Pública. **2 (2)**: 81-94. Disponible en: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/viewFile/150/86>
- Singh, S., Sing, Y., Mohan, S. y Bharti, P. 2010. Prevalence of Salmonella in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. Food Research International. **43**: 2027-2030.
- Sussman, O., Mattos, L., Restrepo, A. 2002. Resistencia bacteriana. Universitas Med. **43 (1)**: 91-96.
- Trilla, A. 1994. Epidemiology of nosocomial infections in adult's intensive care units. Intensive Care Med Suppl. **3**:51-4.
- Valero, K., Olivares, Y., Perozo, A., Valbuena, E., Boscán, L., Colina G. 2010. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. Revista Científica, FCV-LUZ. **20 (4)**: 367-376. Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S07982259201000040006&lng=es
- Valero-Leal, K., Rivera-Salazar, J., Valbuena, E., Boscán, L., Valeris, R., Castro, G., Briñez, W. 2012. Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del estado Zulia. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXII, 4: 303 – 314.

- Velázquez-Meza, M. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud pública Méx. **47 (5)**: 381-38.
- Wright, G., Berghuis, A., Mobashery, S. 1998. Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. Adv Exp Med Biol. **456**: 27-69.
- Yugcham, S. 2016. Determinación de la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y multiresistentes aislados en quesos frescos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba. Trabajo especial de grado, Escuela superior politécnica del Chimborazo. Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador.
- Zendejas-Manzo, G., Avalos-Flores, H., Soto-Padilla, M. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed. **25**:129-143.

Consultas Electrónicas:

- Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria (Elika). *Staphylococcus aureus* [en línea]. País Vasco. 2013. http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf [Consulta: 29 de Marzo de 2016].
- Organización Mundial para la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos. France 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> [Consulta: 29 de Marzo de 2016].
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Intoxicación alimentaria estafilocócica [en línea]. 2015. <http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2n.html> [Consulta: 29 de Marzo de 2016].
- Pontificia Universidad Javeriana. Clase de: "Fluoroquinolonas, Sulfonamidas, Trimetoprim y Antisépticos Urinarios". [En línea]. Bogotá, Colombia. 2015. <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c76.htm> [Consulta: 29 de Marzo de 2016].

- Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [en línea]. 2017.
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/> [Consulta: 29 de Marzo de 2017].

9. ANEXOS

Anexo N.º 1:

Grupos de antibióticos propuesto por el CLSI

Table 1A. Suggested Groupings of Antimicrobial Agents With FDA Clinical Indications That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Microbiology Laboratories in the United States

	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. ^m	
GROUP A PRIMARY TEST AND REPORT	Ampicillin ^d	Ceftazidime	Azithromycin ^b or clarithromycin ^b or erythromycin ^b	Ampicillin ⁿ Penicillin ^o	
			Clindamycin ^b		
			*†Oxacillin ^{i,k} †Cefoxitin ^{i,k} (surrogate test for oxacillin)		
	Cefazolin ^e	Gentamicin Tobramycin	Penicillin ⁱ		
Gentamicin Tobramycin	Piperacillin	Trimethoprim- sulfamethoxazole			
GROUP B PRIMARY TEST REPORT SELECTIVELY	Amikacin	Amikacin	Ceftaroline ^h	*Daptomycin ^j	
			*Daptomycin ^j		
	Amoxicillin-clavulanate Ampicillin-sulbactam Piperacillin-tazobactam Ticarcillin-clavulanate	Cefepime	Linezolid	Doxycycline Minocycline ^b Tetracycline ^a	Linezolid
	Cefuroxime				Vancomycin
	Ciprofloxacin Levofloxacin		*†Vancomycin		
	Cefepime	Doripenem Imipenem Meropenem	Rifampin ^g		
	Cefotetan Cefoxitin	Piperacillin-tazobactam Ticarcillin			
	Cefotaxime ^{d,e} or ceftriaxone ^{d,e}				
	Ciprofloxacin ^d Levofloxacin ^d				
	Doripenem Ertapenem Imipenem Meropenem				
	Piperacillin				
Trimethoprim-sulfamethoxazole ^d					
GROUP C SUPPLEMENTAL REPORT SELECTIVELY	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Chloramphenicol ^b	Gentamicin (high-level resistance screen only)
			Aztreonam Ceftazidime		
	Ceftaroline		Ciprofloxacin or levofloxacin or ofloxacin	Streptomycin (high-level resistance screen only)	
	Chloramphenicol ^{b,d}		Moxifloxacin		
	Tetracycline ^a		Gentamicin ⁱ		

Anexo N.º 2:

Interpretación estándar de diámetro de inhibición para *S. aureus*, establecidos por el CLSI

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)		
			S	I	R
PENICILLINASE-LABILE PENICILLINS					
(7) Penicillin-susceptible staphylococci are also susceptible to other β -lactam agents with stable penicillinase-labile penicillins, including ampicillin, amoxicillin, azlocillin, carbenicillin, mezlocillin.					
A	Penicillin	10 units	≥ 29	–	≤ 28

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)		
			S	I	R
PENICILLINASE-STABLE PENICILLINS (Continued)					
A	Oxacillin For <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i> .	30 μ g cefoxitin (surrogate test for oxacillin)	–	–	–
A	Oxacillin For CoNS except <i>S. lugdunensis</i> .	30 μ g cefoxitin (surrogate test for oxacillin)	≥ 22	–	≤ 21
A	Oxacillin For CoNS except <i>S. lugdunensis</i> .	30 μ g cefoxitin (surrogate test for oxacillin)	–	–	–
A	Oxacillin For CoNS except <i>S. lugdunensis</i> .	30 μ g cefoxitin (surrogate test for oxacillin)	≥ 25	–	≤ 24
CEPHEMS (PARENTERAL)					
B	Ceftaroline	30 μ g	≥ 24	21–23	≤ 20

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)		
			S	I	R
GLYCOPEPTIDES (Continued)					
B	Vancomycin	-	-	-	-
Inv.	Teicoplanin	30 µg	≥14	11-13	≤10
LIPOPEPTIDES					
B	Daptomycin	-	-	-	-
AMINOGLYCOSIDES					
(22) For staphylococci that test susceptible, aminoglycosides are used only in combination with					
C	Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12
O	Amikacin	30 µg	≥17	15-16	≤14
O	Kanamycin	30 µg	≥18	14-17	≤13
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13-14	≤12
O	Tobramycin	10 µg	≥15	13-14	≤12

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)		
			S	I	R
MACROLIDES					
(23) Not routinely reported on organisms isolated from the urinary tract.					
A	Azithromycin or clarithromycin or erythromycin	15 µg	≥ 18	14–17	≤ 13
A		15 µg	≥ 18	14–17	≤ 13
A		15 µg	≥ 23	14–22	≤ 13
O	Telithromycin	15 µg	≥ 22	19–21	≤ 18
O	Dirithromycin	15 µg	≥ 19	16–18	≤ 15
TETRACYCLINES					
(24) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline. tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.					
B	Tetracycline	30 µg	≥ 19	15–18	≤ 14
B	Doxycycline	30 µg	≥ 16	13–15	≤ 12
B	Minocycline	30 µg	≥ 19	15–18	≤ 14
FLUOROQUINOLONES					
(25) <i>Staphylococcus</i> spp. may develop resistance during prolonged therapy with quinolones. four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.					
C	Ciprofloxacin or levofloxacin or ofloxacin	5 µg	≥ 21	16–20	≤ 15
C		5 µg	≥ 19	16–18	≤ 15
C		5 µg	≥ 18	15–17	≤ 14
C	Moxifloxacin	5 µg	≥ 24	21–23	≤ 20
U	Lomefloxacin	10 µg	≥ 22	19–21	≤ 18
U	Norfloxacin	10 µg	≥ 17	13–16	≤ 12
O	Enoxacin	10 µg	≥ 18	15–17	≤ 14
O	Gatifloxacin	5 µg	≥ 23	20–22	≤ 19
O	Grepafloxacin	5 µg	≥ 18	15–17	≤ 14
O	Sparfloxacin	5 µg	≥ 19	16–18	≤ 15
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥ 19	16–18	≤ 15

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)		
			S	I	R
NITROFURANTOINS					
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥17	15–16	≤14
LINCOSAMIDES					
A	Clindamycin	2 µg	≥21	15–20	≤14
FOLATE PATHWAY INHIBITORS					
A	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11–15	≤10
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≥17	13–16	≤12
U	Trimethoprim	5 µg	≥16	11–15	≤10
PHENICOLS					
C	Chloramphenicol	30 µg	≥18	13–17	≤12
ANSAMYCINS					
B	Rifampin	5 µg	≥20	17–19	≤16
STREPTOGRAMINS					
O	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≥19	16–18	≤15
OXAZOLIDINONES					
B	Linezolid	30 µg	≥21	–	≤20