



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE  
RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN  
CEPAS DE BACTERIAS DEL GRUPO DE Enterobacterias  
AISLADAS EN QUESO FRESCO ARTESANAL ELABORADOS EN  
ZONAS RURALES DEL CANTÓN RIOBAMBA”**

Trabajo de titulación presentado para optar para grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: ANA ALEXANDRA BARRIONUEVO YUNGAN**

**TUTORA: DRA. ANA ALBUJA**

**RIOBAMBA–ECUADOR**

**2016**

©2016, Ana Alexandra Barrionuevo Yungán

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

---

ANA ALEXANDRA BARRIONUEVO YUNGAN

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

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE BACTERIAS DEL GRUPO DE Enterobacterias AISLADAS EN QUESO FRESCO ARTESANAL ELABORADOS EN ZONAS RURALES DEL CANTÓN RIOBAMBA**, de responsabilidad de la señorita Ana Alexandra Barrionuevo Yungán, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Ana Albuja

**DIRECTOR DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

PhD. Félix Andueza

**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DOCUMENTALISTA**

**SISBIB ESPOCH**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTA DEL TRABAJO DE**

**TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Ana Alexandra Barrionuevo Yungán, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados de los mismos son auténticos y originales. Los datos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 10 de Febrero del 2016

Ana Alexandra Barrionuevo Yungán

0604620310

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo principalmente a Dios que me dio la oportunidad de vivir, y regalarme los padres más buenos del mundo, ellos son el pilar fundamental para cumplir esta meta, por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos más difíciles.

A mis hermanas por el apoyo constante, principalmente a mi hermana Adela aunque hemos pasado momentos difíciles siempre estaba ahí apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto agradezco de todo corazón el que estés conmigo a mi lado.

A mis maestros, gracias a ellos por el apoyo, orientación y experiencia que me brindaron día a día para para cumplir mi sueño de ser Bioquímica Farmacéutica, ustedes me enseñaron que si quiero ser alguien importante en la vida tengo que triunfar como profesional.

Anita

## **AGRADECIMIENTO**

Primero y como más importante me gustaría agradecer sinceramente a mis asesores, Dra. Ana Albuja, PhD. Félix Andueza, mis tutores, por el todo apoyo y confianza brindada durante la realización del trabajo. ¡Muchas Gracias!

Sus conocimientos, orientaciones, manera de trabajar, persistencia, paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador. Han inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales les no podría tener una formación completa.

A quienes participaron en la fase de investigación y experimentación A las Dras. Aida, Paty e Isabel por ayudarme con toda disposición en lo que pudieron, las recordaré con mucho cariño.

A todos, ¡Gracias!

Anita

## TABLA DE CONTENIDO

	Págs.
<b>DERECHO DE AUTOR</b> .....	ii
<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	iii
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD</b> .....	iv
<b>DEDICATORIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vi
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>INDICE DE GRÁFICOS</b> .....	xi
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>SUMMARY</b> .....	xv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
 <b>CAPITULO I</b>	
<b>1 MARCO TEÓRICO</b> .....	5
<b>1.1 Queso</b> .....	5
<b>1.1.1 Consumo y producción mundial</b> .....	5
<b>1.1.2 Concepto y definición</b> .....	6
<b>1.1.3 Clasificación</b> .....	7
<b>1.1.3.1 Según el contenido de humedad</b> .....	7
<b>1.1.3.2 Según el contenido de grasa</b> .....	7
<b>1.1.3.3 Según el tiempo de maduración</b> .....	7
<b>1.1.4 Queso fresco</b> .....	7
<b>1.1.4.1 Valor nutricional del queso fresco</b> .....	8
<b>1.1.4.2 Requisitos microbiológicos de queso fresco</b> .....	9
<b>1.1.5 Enterobacterias</b> .....	10
<b>1.1.5.1 Escherichia coli</b> .....	12
<b>1.1.5.2 Enterobacter spp</b> .....	13
<b>1.1.5.3 Klebsiella spp</b> .....	14
<b>1.1.5.4 Proteus spp</b> .....	15
<b>1.1.5.4 Shigella spp</b> .....	15
<b>1.1.6 Medicamentos veterinarios</b> .....	15

<b>1.1.7</b>	<b>Antibióticos</b> .....	16
<b>1.1.7.1</b>	<i>β</i> -lactámicos.....	16
<b>1.1.7.2</b>	<i>Ampicilina</i> .....	17
<b>1.1.7.3</b>	<i>Inhibidores de betalactamasa</i> .....	18
<b>1.1.7.4</b>	<i>Cefalosporinas</i> .....	18
<b>1.1.7.5</b>	<i>Carbapenemas</i> .....	19
<b>1.1.7.6</b>	<i>Fluoroquinolonas</i> .....	19
<b>1.1.8</b>	<b>Selección del antimicrobiano</b> .....	19
<b>1.1.8.1</b>	<i>Resistencia Antibacteriana</i> .....	20
<b>1.1.8.2</b>	<i>Antecedentes históricos de la resistencia bacteriana</i> .....	20
<b>1.1.8.3</b>	<i>Propagación de la resistencia bacteriana</i> .....	21
<b>1.1.9</b>	<b>Mecanismos de resistencia</b> .....	22

## CAPITULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	23
<b>2.1</b>	<b>Muestreo</b> .....	23
<b>2.2</b>	<b>Cultivo y cuantificación</b> .....	23
<b>2.3</b>	<b>Aislamiento y purificación</b> .....	24
<b>2.4</b>	<b>Pruebas de preliminares</b> .....	24
<b>2.4.1</b>	<i>Tinción Gram</i> .....	24
<b>2.4.2</b>	<i>Producción de catalasa</i> .....	25
<b>2.4.3</b>	<i>Producción de oxidasa</i> .....	25
<b>2.5</b>	<b>Pruebas bioquímicas</b> .....	25
<b>2.5.1</b>	<i>Prueba de TSI (Triple Azúcar Hierro)</i> .....	25
<b>2.5.2</b>	<i>Prueba de citrato</i> .....	26
<b>2.5.3</b>	<i>Prueba SIM (Sulfuro- Indol- Movilidad)</i> .....	27
<b>2.5.4</b>	<i>Prueba LIA (Lisina Hierro Agar)</i> .....	27
<b>2.5.5</b>	<i>Prueba Urea</i> .....	28
<b>2.6</b>	<b>Resistencia/ susceptibilidad a antimicrobianos</b> .....	29

## CAPITULO III

<b>3.</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	31
-----------	--	----



<b>3.1</b>	<b>Recuento de enterobacterias presentes en queso fresco de tipo artesanal.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Cepas Identificadas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Perfil de resistencia/susceptibilidad</b>	<b>35</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>47</b>
	<b>GLOSARIO</b>	
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Págs.</b>
<b>Tabla 1-1:</b> Composición Química del queso 100g.....	8
<b>Tabla 2-1:</b> Valor nutricional de quesos frescos.....	8
<b>Tabla 3-1:</b> Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	9
<b>Tabla 1-3:</b> Cuantificación de enterobacterias.....	31
<b>Tabla 2-3:</b> Enterobacterias y su porcentaje en queso fresco.....	34
<b>Tabla 3-3:</b> Resultado del Antibiograma.....	36
<b>Tabla 4-3</b> Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>E. coli</i> .....	37
<b>Tabla 5-3</b> Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> .....	39
<b>Tabla 6-3</b> Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Enterobacter gergoviae</i> .....	40
<b>Tabla 7-3</b> Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Shigella sonnei</i> .....	41
<b>Tabla 8-3</b> Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	42
<b>Tabla 9-3</b> Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	43
<b>Tabla 10-3</b> Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Proteus mirabilis</i> .....	44

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Pags.</b>
<b>Figura 1-1:</b> Consumo y producción mundial de queso.....	5
<b>Figura 2-1:</b> Proceso de elaboración del queso.....	9
<b>Figura 1-2:</b> Tinción Gram.....	25
<b>Figura 2-2:</b> Esquema metodológico resistencia/ susceptibilidad en cepas de enterobacterias.....	30
<b>Figura 1-3:</b> Porcentaje de cepas de enterobacterias aisladas en queso fresco.....	34
<b>Figura 2-3:</b> Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de <i>E. coli</i> .....	38
<b>Figura 3-3:</b> Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> aislados en queso fresco (n=16).....	39
<b>Figura 4-3:</b> Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de <i>Enterobacter gergoviae</i> aislados en queso fresco (n=4).....	40
<b>Figura 5-3:</b> Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de <i>Shigella sonnei</i> aisladas en queso fresco (n= 4 ).....	41
<b>Figura 6-3:</b> Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de <i>Klebsiella oxytoca</i> aisladas en queso fresco (n= 11).....	43
<b>Figura 7-3:</b> Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de <i>Klebsiella Pneumoniae</i> aisladas en queso fresco (n= 3).....	44
<b>Figura 8-3:</b> Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de <i>Proteus mirabilis</i> aisladas en queso fresco (n= 2).....	45

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Págs.</b>
<b>Cuadro 1-1</b> Clasificación de la familia de enterobacterias propuesta por edwards y ewing (1986).....	11
<b>Cuadro 2-1</b> Epidemiología de los miembros de la familia Enterobacteriaceae de importancia clínica.....	12
<b>Cuadro 1-2</b> Características para la diferenciación de especies de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	30
<b>Cuadro 1-3</b> Características bioquímicas de cepas de Enterobacterias.....	33

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Agrupaciones sugeridas de Agentes Antimicrobianos
- Anexo B.** Patrones estándar del halo de inhibición para Enterobacterias
- Anexo C.** Fotografías enterobacterias en Agar Glucosa Bilis Violeta
- Anexo D.** Fotografías de bacilos Gram negativos
- Anexo E.** Resultados de Pruebas Bioquímicas
- Anexo F.** Resistencia/susceptibilidad en cepas de Enterobacterias
- Anexo E.** Queseras artesanales
- Anexo H** Test ANOVA

## RESUMEN

El estudio de resistencia/susceptibilidad en cepas de enterobacterias aisladas de queso fresco elaborados de manera artesanal en zonas rurales del cantón Riobamba, tiene como objetivo determinar el perfil de resistencia/susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de bacterias del grupo de enterobacterias. De las 8 parroquias rurales del cantón Riobamba se eligió tres, las más pobladas y la de mayor área geográfica, San Juan, Quimiag y Pungalá. Las muestras recolectadas fueron sembradas en Agar Glucosa Bilis Rojo Violeta por siembra en profundidad, se cuantificó las colonias obteniéndose como resultado un conteo de  $8.86 \times 10^3$  UFC/g a  $9.88 \times 10^4$  UFC/g, encontrándose fuera de los rangos establecidos por la NTE INEN 1528:2012. Las colonias fueron aisladas en Agar MacConkey y Eosina Azul de Metileno, obteniéndose 53 cepas de enterobacterias: 30% de *Enterobacter cloacae*, 21 % *E. coli* y *Klebsiella oxytoca*, 8% *Enterobacter gergoviae*, 7% *Shigella sonnei*, 5% *Klebsiella pneumoniae* y 4 % *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes*. Las colonias se las identifico mediante tinción Gram, pruebas preliminares de oxidasa y catalasa, la identificación de género y especie se realizó mediante las pruebas bioquímicas: Kligler, citrato, SIM, LIA y urea. Para realizar el antibiograma se utilizó el método de difusión de kirby-bauer con los siguientes antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, ceftriaxona, cefoxitin, imipenem y ciprofloxacina. Se concluye que el 100% de cepas aisladas fueron sensibles a cefotaxima (CTX) y ciprofloxacina (CIP), 96% a ceftazidima (CAZ), 92% a imipenem (IMP), 85% a cefoxitin (FOX), 83% a ceftriaxona (CRO), 53% a amoxicilina/ácido clavulánico y un 10% para ampicilina, este 10% enterobacterias sensibles a ampicilina corresponde a cepas de *E. coli*.

**Palabras clave:** <RESISTENCIA/SUCEPTIBILIDAD>, <QUESO FRESCO>, <ENTEROBACTERIAS>, <PARROQUIAS RURALES DE RIOBAMBA>, <PRUEBAS BIOQUÍMICAS>, <ANTIBIOGRAMA>.

## ABSTRACT

The study of resistance/susceptibility in strains of enterobacteriaceae isolated from fresh cheese produced using traditional methods in rural areas of Riobamba canton, it aims to determine the profile of resistance / susceptibility to antimicrobials in strains of bacteria Enterobacteriaceae group. From the eight rural villages of canton Riobamba were chosen three of the most populous and the largest geographic area, San Juan, Quimiag and Pungalá. The collected samples were seeded in violet red bile agar with glucose to deep seeding, the colonies were quantified obtaining as a result in counting  $8.86 \times 10^3$  CFU/g, a  $9.88 \times 10^4$  CFU/g, finding they were outside of established ranges established by NTE INEN 1528:2012. The colonies were isolated on MacConkey eosin methylene blue agar, obtaining 53 strains of Enterobacteriaceae: *Enterobacter cloacae* 30%, 21% *E. coli* and *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter gergoviae* 8%, *Shigella sonnei* 7%, *Klebsiella pneumoniae* 5%, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter aerogenes* 4%. The colonies are identified by gram staining, preliminary evidence oxidase and catalase, the genus and species identification was performed through biochemical tests, Kligler, citrate, SIM, LIA and urea. For susceptibility testing a method of distributing Kirby-bauer with the following antimicrobials is done: Ampicillin, amoxicillin/ clavulanate, cefotaxime, ceftriaxone, ceftiofloxacin, imipenem, and ciprofloxacin. It is concluded that 100% of the isolate strains were sensitive to cefotaxime (CTX) and ciprofloxacin (CAZ), 92% to imipenem (IMP), 85% to ceftiofloxacin (FOX), 83% to ceftriaxone (CRO), 53% to amoxicillin/ clavulanate and 10% for ampicillin, this 10% sensitive to ampicillin enterobacteriaceae corresponds to strains of *E. coli*.

## Keywords

<RESISTANCE / SUSCEPTIBILITY>, <FRESH CHEESE>, <ENTEROBACTERIACEAE>, <RURAL VILLAGES OF RIOBAMBA>, <BIOCHEMICAL TESTS>, <SUSCEPTIBILITY>.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Identificación del problema**

La emergencia de las enterobacterias resistentes a una amplia variedad de antimicrobianos de importancia clínica es una realidad en nuestro medio. La resistencia bacteriana a los antibióticos (RBA) se ha descrito como una amenaza creciente en la estabilidad mundial y la seguridad de los países (OMS, 2001, <http://www.who.int/mediacentre>), afecta tanto en el ámbito hospitalario como en el comunitario convirtiéndose en un asunto de salud-enfermedad-atención, con fuertes impactos en términos de morbilidad, mortalidad y costos, (Quizhpe et al., 2011:p 4) porque aumenta el empleo de recursos económicos, el paciente permanecerá mayor tiempo hospitalizado y requiere más cuidados (OMS, 2001, <http://www.who.int/mediacentre>).

La RBA es un problema que se deriva de varias causas entre ellas tenemos, alta prevalencia de enfermedades infecciosas, prescripción innecesario de antibióticos para infecciones, incremento en la pobreza, uso inadecuado por parte de los pacientes, alto costo de los medicamentos, falta de servicios básicos, ausencia de controles de calidad, venta libre de medicamentos, (Quizhpe et al., 2011:p 8), o por la utilización masiva de antibióticos de uso terapéutico en la práctica clínica y veterinaria, y su empleo abusivo como agentes profilácticos y promotores de crecimiento en ganadería, acuicultura y agricultura ha favorecido la aparición y transferencia de las resistencias. Existen compuestos que son agregados en la alimentación para promover el crecimiento animal al mejorar los beneficios nutricionales, generando de esta manera la aparición de sus residuos en los alimentos derivados de los animales. (Faria et al., 2002: pp.29-31)

Las defunciones causadas por infecciones respiratorias agudas, padecimientos diarreicos, sarampión, sida, paludismo y tuberculosis constituyen más del 85% del total de morbilidad por infecciones en el mundo. Los patógenos causantes de estas enfermedades presentan resistencia a los medicamentos de primera línea de 0 -100%, los medicamentos de primera y segunda línea también afectan de manera similar a los resultados del tratamiento. (OMS, 2001, <http://www.who.int/mediacentre>)

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca del Ecuador, alrededor del 74 % de la producción de leche cruda es utilizada para consumo humano e industrial, de los cuales el 49% es de consumo humano directo y 25% destinado para industrias caseras de queso fresco. (Castillo y Hualpa, 2009: <http://www.alimentosecuador.com>)



En la fabricación del queso, la carga microbiológica inicial de la leche es muy importante, ya que ésta determina el grado de contaminación que tendrá el queso. Una de las enfermedades más importantes que afecta al ganado bovino es la mastitis, por la cual se produce grandes pérdidas económicas, lo más relevante de esto es la transmisión de la resistencia a antimicrobianos al consumir alimentos que contengan antibióticos. Hay que tener en claro que el uso inapropiado de antimicrobianos constituye un riesgo emergente en la salud pública. (Florentin, 2007: p 19 )

Las infecciones nosocomiales, neumonía, septicemias, infecciones de los recién nacidos y pacientes en cuidados intensivos son consideradas infecciones potencialmente mortales, ya que casi la mitad de las personas infectadas con *K. pneumoniae* son resistentes a antibióticos carbapenémicos. (OMS, 2014: <http://www.who.int/mediacentre>)

El incremento de microorganismos patógenos y oportunistas (Zurita, 2010: p. 42 ) resistentes a los antibióticos prolonga la duración de las enfermedades y la estancia en los hospitales, aumenta el riesgo de muerte y el costo de la atención sanitaria. (OMS, 2014: <http://www.who.int/mediacentre>)

La presencia de residuos de antibióticos en leche que se utilizara para la elaboración de queso fresco tiene repercusiones negativas debido a las reacciones de hipersensibilidad que ocasionan en algunos consumidores, igualmente por propiciar el desarrollo de resistencia en microorganismos presentes, produce un efecto similar al que se genera cuando un antimicrobiano es utilizado en dosis sub- terapéuticas en el tratamiento de una infección. El último informe mundial sobre la vigilancia señala que la resistencia está afectando a muchos agentes infecciosos especialmente se centra en bacterias responsables de las infecciones comunes graves, como la *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, causantes de enfermedades como la septicemia, diarrea, neumonía y las infecciones a las urinarias o la gonorrea. (Faria et al., 2002: pp. 34-36)

Debido a la escasa información que se tiene sobre la existencia de bacterias resistente a los antibióticos presentes en alimentos elaborados en el Ecuador, se plantea el presente proyecto de investigación el cual servirá como orientación sobre el perfil de resistencia/susceptibilidad a antimicrobianos, la OMS considera como una problemática mundial, como derivación del uso indiscriminado de los antibióticos y las consecuencias de esta sobre la salud pública. (Florentin, 2007: p 19 )

### **Antecedentes de la investigación**

Flórez, et al., realizo un estudio para identificar la microbiota resistente a antibióticos en queso, estudiando con ello los cambios que se produce a lo largo del tiempo de maduración, quesos

elaborados con leche cruda tiene una gran variedad de microorganismos que interactúan y evoluciona a lo largo de la elaboración y maduración. Por este motivo consideraron que es un buen modelo para el estudio de la resistencia a antibióticos en productos lácteos. Los investigadores realizaron un estudio microbiológico convencional en medios selectivos y diferenciales para el recuento de microorganismos resistentes y sensibles de distintos grupos microbiano, concluyendo concluyó que las enterobacterias y *Staphylococcus spp* eran resistentes a la tetraciclina. (Flórez et al, 2004, <http://digital.csic.es>).

Castillo G. ( 2013; p. 213 ), realizaron un estudio sobre la prevalencia de bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus*, en quesos frescos producidos de manera artesanal en zonas rurales del cantón Riobamba, el estudio se realizó en base a las BPM de las queseras de tipo artesanal ubicadas en zonas rural del cantón Riobamba, y concluyo que los resultados obtenidos de Enterobacterias, comparadas con el índice máximo permisible establecido por la NTE INEN 1528:2012 (2,30 log UFC/g), todas las muestras sobrepasan el límite establecido por dicha norma. Ya que se encontraron recuentos de 3,66 log UFC/g. en este estudio indica que puede deberse a un tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento, con mayor frecuencia a partir de materias primas, equipos sucios o manajo no higiénico, esto con lleva a una multiplicación tanto de microorganismos patógenos y toxigénicos perjudiciales para la salud del consumidor.

Cortecero y Benítez (2011: p 14) realizó un estudio sobre la evaluación de resistencia antimicrobiana en especies bacterianas a antibióticos *Oxitetraciclina* y *Eritromicina* en queso fresco Costeño fabricado artesanalmente, las cepas fueron aisladas y e identificadas. De 8 muestras de quesos, se aislaron cepas de *Enterobacter cloacae resistente a oxitetraciclina como a la eritromicina* y cepas de *klebsiella pneumoniae* de las cuales 25% fue resistente a la tetraciclina y el 100% a la eritromicina. La presencia de cepas de la familia Enterobacteriaceae resistentes en queso fresco, puede causar un riesgo para la salud pública, ya que podría servir como fuente de propagación de estas resistencias.

Flórez García en el año 2007 realizó un estudio sobre el perfil de susceptibilidad y resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Se aisló 29 cepas utilizando el método Etest, para determinar la susceptibilidad y resistencia se utilizó 12 antibióticos distintos. Y se llegó a la conclusión que las bacterias ácido láctico procedentes de quesos presentaron poca resistencia a los antimicrobianos utilizados para dicha determinación. Los lactobacilos heterofermentativos y *Lactoccus lactis* presenta resistencia restringida a vancomicina y rifampicina.

Villalobos y Martínez (2006: [www.scielo.org.ve/scielo](http://www.scielo.org.ve/scielo)) realizaron un trabajo de investigación donde estudiaron la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Listeria spp*. Aisladas de

alimentos queso blanco y atún fresco. El aislamiento de las cepas se realizó en medios selectivos Palcam (Merck) y Oxford (Oxoid). El perfil de susceptibilidad/resistencia a agentes antimicrobianos, se realizó utilizando el método de difusión en discos. Como conclusión se tienen que las cepas bacterianas mostraron sensibilidad al sulfametazol-trimetoprim, gentamicina, cloranfenicol y vancomicina

Alvarado et al (2011; <http://www.scielo.sa.cr>), realizaron un estudio sobre la resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, en el cual determino y comparo los perfiles de resistencia de *S. aureus* aislados de queso y de un centro hospitalario. En los cuales se analizaron 35 muestras de queso fresco a las cuales se le realizaron recuentos de coliformes totales obteniendo como resultado  $9,7 \times 10^6$  UFC/g, coliformes fecales  $6,7 \times 10^5$  UFC/g y *Staphylococcus aureus* ( $2,8 \times 10^5$  UFC/g). Se determinó la presencia/ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 g del producto. A las cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* se realizó la prueba de sensibilidad a los antibióticos mediante el sistema automatizado Vitrk. Se determinó que 23 de las cepas provenientes de muestras clínicas y 7 de las obtenidas a partir del queso presentaban resistencia a más de un antibiótico. Los betalactámicos (ampicilina, oxacilina y penicilina) se observó la existencia de una diferencia significativa, entre las cepas de ambas fuentes, presentándose mayor resistencia en las de origen clínico. Se llegó a la conclusión que ninguna de las cepas analizadas mostró resistencia a vancomicina, trimethoprim/sulfa ni linezolid.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Determinar el perfil de resistencia/susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de bacterias del grupo de enterobacterias aisladas en queso fresco artesanal elaborado en zonas rurales del cantón Riobamba.

### **Objetivos Específicos**

1. Recolectar las muestras de queso fresco de tipo artesanal en las queseras ubicadas San Juan, Pungalá y Quimiag, siguiendo la normativa de muestreo.
2. Evaluar microbiológicamente las muestras de queso fresco tipo artesanal de las queseras ubicadas en San Juan, Pungalá y Quimiag.
3. Aislar e identificar cepas de enterobacterias encontradas en las muestras de estudio.
4. Determinar el perfil de resistencia/susceptibilidad antibacteriana en cepas de bacterias del grupo de enterobacterias encontradas en las muestras de estudio.

# CAPÍTULO I

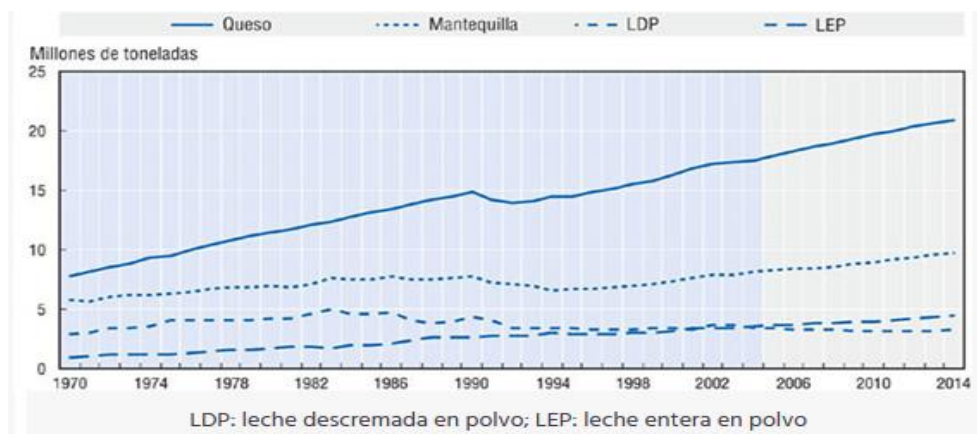
## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Origen del queso

Existe una leyenda que dice que el queso fue descubierto por un mercader árabe que, mientras realizaba un largo viaje por el desierto, puso la leche en una bolsa elaborado a partir de estómagos de rumiantes que tras un cierto tiempo y con la ayuda de la temperatura de desierto y del movimiento nómada la leche se cuajó. Cuando fue a consumirla vio que estaba coagulada y fermentada es así que de manera casual, se vio el efecto coagulante que tenían los jugos estomacales en la leche (Quijano, 2010. p 6).

#### 1.1.1 Consumo y producción mundial

EL queso es uno de los principales productos agrícolas del mundo, según la FAO en el 2004 menciona que la producción anual de queso alrededor del mundo fue de 18 millones de toneladas. La cantidad de producción de queso es superior al del café, hojas de té, granos de Cacao y tabaco juntas.(Quesos, 2014; <http://quesos.es/historia>).



**Figura 1-1:** Consumo y producción mundial de queso

Fuente: (Rodríguez y Duran, 2014)

La producción mundial de queso se encuentra liderada por Estados Unidos con 30%, Alemania 13% y Francia 12 (Quesos, 2014; <http://quesos.es/historia>), Italia 6,3% y los países bajos 4,2%. El mayor

productor sudamericano y noveno en el mundo es Argentina, con el 2,6% de la producción mundial. Ecuador tiene una participación del 0,04% del total mundial (Nieto, 2002; p 54)

El principal factor de consumo de leche y productos lácteos se debe al aumento demográfico e ingresos económicos, la demanda aumenta por la serie de productos nuevos, el auge de las cámaras frigoríficas ya que aumenta tiempo de conservación. Las zonas donde más se produce son también las que poseen el mayor consumo per cápita. En América del Norte dentro de la cual está Canadá y Estados Unidos el consumo alcanza los 250,9 kg/persona/año, en Europa es de 210,4 kg/persona/año. En América Central el consumo es 95,9 kg/persona/año, en Asia y África registran que ocupan los últimos lugares, con 41,0 y 36,3 kg/persona/año (Nieto, 2002; p 69).

### **1.1.2 Concepto y definición**

Según la FAO/OMS define al queso como el producto fresco o madurado, solido o semisólido obtenido por la coagulación y separación del suero de la leche por medio del cuajo o por fermentación láctica, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos”. (González, 2002; <http://infolactea>.)

La legislación española (orden de 29 de noviembre de 19985, BOE núm 292) define al queso, “Queso el producto fresco o maduro, sólido o semisólido, derivado de la separación del suero después de la coagulación de la leche, leche desnatada total o parcialmente, de la nata del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos por adición del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa la lactosa” (Castillo y Lagarriga, 2014; p 19 )

En Ecuador el real decreto 1113/2006, define el queso como el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, derivado de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros productos coagulantes apropiados, antes del desuerado o tras la eliminación parcial de la parte acuosa (Gil, 2010; pp 21-22).

En Ecuador la NTE INEN 1528:2012 define al queso como un producto blando, duro y extraduro, madurado o no madurado, teniendo en cuenta que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante coagulación total o parcial de la proteína de la leche, o utilizando de técnicas que ayuden a la coagulación de la proteína de la leche, siempre y cuando se obtenga un queso de las mismas características que el anteriormente mencionado (NTE INEN 1528, 2012, p 4).

### 1.1.3 Clasificación

#### 1.1.3.1 Según el contenido de humedad

- **Duro:** Son quesos que tiene una humedad baja entre 34 – 13%
- **Semiduro:** Son quesos de humedad mediana que esta entre 45 – 34%
- **Semiblando:** Presenta una humedad de 55 – 45%
- **Blando:** presenta una humedad de 80 – 55% (Vázquez et al, 2005. pp. 5-6 )

#### 1.1.3.2 Según el contenido de grasa

Expresado en porcentaje masa/masa sobre el extracto seco total, los quesos se denominan:

- **Magro:** Con menos del 10 % de materia grasa
- **Semigraso:** con un mínimo de 20% de materia grasa
- **Graso:** Con un mínimo de 40% de materia grasa
- **Extragraso:** Con un mínimo de 45% de materia grasa
- **Doble graso:** Con un mínimo de 60% de materia grasa. (Vázquez et al, 2005. p 85 )

#### 1.1.3.3 Según el tiempo de maduración

- **Queso fresco o suerado:** es aquel que tiene más de 7 días pero menos de 25 días.
- **Queso oreado:** tiene entre 21 y 90 días
- **Queso medio curado:** su maduración esta aproximadamente entre 3 y 2 meses del año.
- **Queso curado:** el periodo de maduración es superior a los 6 meses del año. (Vázquez et al, 2005. p 85 )

### 1.1.4 Queso fresco

Se utiliza el término fresco para definir un queso que no ha madurado después de su producción, suele consumirse en estado fresco, textura relativamente firme, ligeramente granular y presenta habitualmente gran cantidad de humedad ya que el agua queda retenida por el proceso de fabricación utilizada, una de las causas es por la acidificación de la leche y no por el cuajo; escaso desuerado de la cuajada, adición de poca sal, etc. (González, 2010; p 18)

En Ecuador la NTE-INEN 1528: 2012. Establece la definición de queso fresco como “Es el queso no madurado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche

entera, semidescremada, coagulada con enzimas u otros coagulantes apropiados, habitualmente sin cultivos lácticos. (NTE INEN 1528, 2012; p. 2)

Se denomina queso fresco al que no requiere curación, tratándose, pues de los ingredientes frescos y coagulados de la leche (Gruner et al, 2008; p. 108)

**Tabla 1-1: Composición Química del queso 100g**

Componente	Porcentaje
Agua	60,0%
Grasa	19,0%
Proteína	17,0%
Carbohidratos	2,0%
Sales minerales	2,0%

Fuente: (Viteri, et al., 2012; <http://www.slideshare.net>)

#### 1.1.4.2 Valor nutricional del queso fresco

Al ser el queso un producto procedente de la leche, su composición es parecida, destacando su contenido en proteínas de alto valor biológico, calcio, fósforo, y vitaminas, especialmente vitamina A. Con el desuerado de la cuajada se van a perder los constituyentes hidrosolubles, lactosa, la mayoría de las vitaminas del grupo B, sales minerales y proteínas que no hayan flocculado en el proceso de cuajado. (Vázquez et al, 2005. p 86) .

El contenido en minerales del queso es mayor que en la leche, destacando la cantidad de calcio, que en quesos maduros puede alcanzar 10 veces más que en el valor de la leche. (Gil, 2010; p 23).

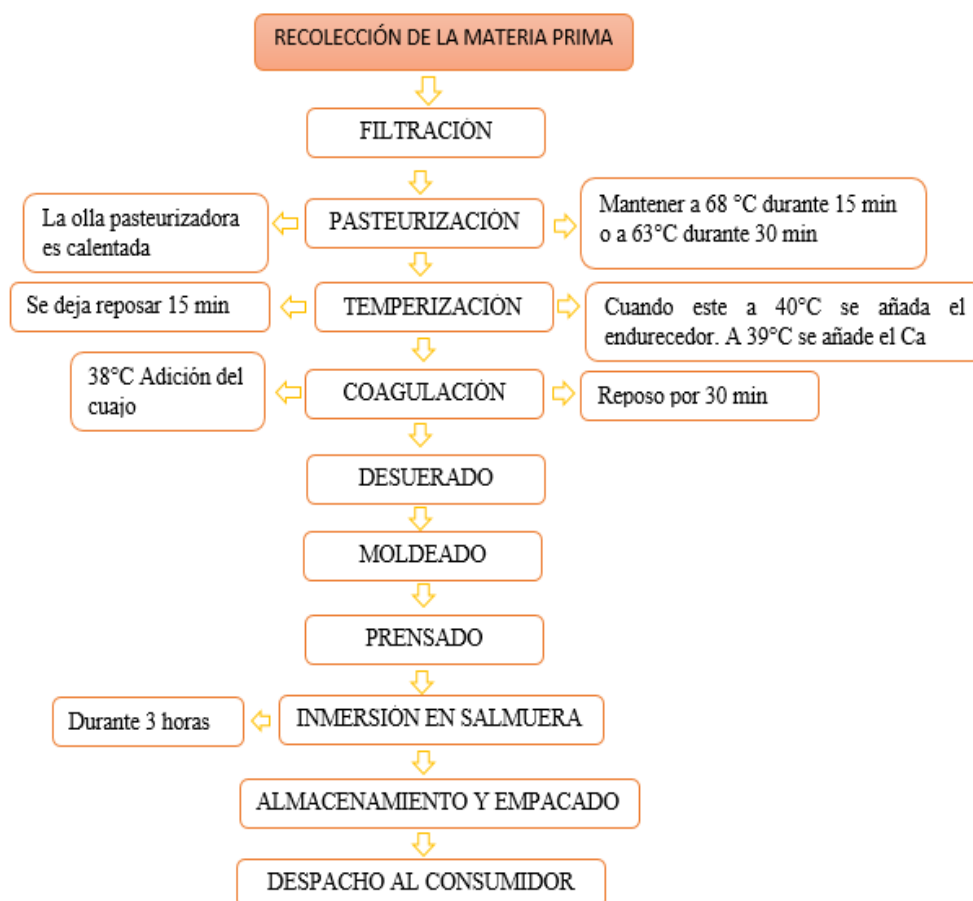
De hecho son uno de los alimentos fundamentales dentro de la cadena alimenticia, por el gran aporte en proteínas y minerales tales como el calcio. Por ejemplo 100 gramos de queso aportan 185 mg de calcio.

**Tabla 2-1: Valor nutricional de quesos frescos**

100 gramos de queso fresco aportan											
Calorías del queso fresco	Proteínas	Hidratos de carbono	Grasas	Vitaminas				Minerales			
				Ac. Fólico	B 2	B 3	B 6	Sodios	Calcio	Selenio	Fósforo
175 calorías	16 g	5 g	12 g	14,3 mcg	0,18 mg	1,12 mg	0,09 mg	1,200 mg	185 mg	15 mcg	600 mg

Fuente: (Pérez, 2015; <http://www.naturasan.net>)

El queso por ser un producto derivado de la leche tiene las mismas propiedades nutricionales que presenta la leche, con la diferencia que en el queso se encuentra mayor cantidad de grasa y proteínas concentradas; el queso es rico en fósforo y calcio que ayudan a una buena formación de huesos y dientes sanos y fuertes. Los valores nutricionales pueden variar dependiendo del contenido de grasa y proteína presentes en el queso. (La página de Bedri, 2015; <http://www.bedri.>)



**Figura 2-1.** Proceso de elaboración del queso  
Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

#### 1.1.4.2 Requisitos microbiológicos de queso fresco

En Ecuador la NTE INEN 1528:2012 Norma General para quesos frescos no madurados. Establece los requisitos microbiológicos, en la cual indica índices máximos permisibles con los cuales un alimento se considere apto o no para consumo humano.

**Tabla 3-1. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados**

Requisito	n	M	M	C	Método de ensayo
Enterobacteriaceae, UFC/g	5	$2 \times 10^2$	$10^3$	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	5	10	$10^2$	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1



<i>Salmonella</i> en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15
<p><b>Donde:</b></p> <p>n= número de muestras a examinar</p> <p>M= índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad</p> <p>m=índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad</p> <p>c=número de muestras permisibles con resultados entre m y M</p>					

**Fuente:** (NTE INEN 1528, 2012; p 4 )

### 1.1.5 *Enterobacterias*

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas de interés médico, formado por bacilos Gram negativos de 1.0 a 6.0 µm, no son esporulados, son aerobios y anaerobios facultativos. Muchos de ellos forma capsulas, la mayoría producen fimbrias y *pilis*, ninguno produce esporas, fermentan la glucosa con formación de ácido y en algunos también gas. Reduce los nitratos a nitritos y no tienen citocromooxidasa (Cortecero y Benítez, 2011; p 35).

Son microorganismo ubicuos de distribución mundial, ya que se encuentra en suelo, el agua, la vegetación y formando parte de la flora intestinal normal en casi todos los animales, incluido el ser humano. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* están asociados a enfermedades cuando se aíslan en el hombre, mientras que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* son parte de la microbiota saprófita normal que causa infecciones oportunistas (Romero, 2007; p. 743)

Cuando las enterobacterias se introducen en cualquier parte del cuerpo estéril produce enfermedades como neumonía, infecciones en las vías urinarias, septicemia, infecciones neonatales, infecciones heridas y de cirugías. Se comportan como patógenos oportunistas sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Olivas, 2004; p 29).

En los miembros de esta familia es muy frecuente la presencia de plásmidos, transposones y profagos, que pueden codificar factores que comportan modificaciones estructurales, como la expresión de nuevos antígenos, o metabólicas, como la utilización de nuevos sustratos, que dan lugar cepas antigénica o metabólicamente atípica. Algunos profagos también pueden codificar factores (estructuras o toxinas) que interviene en la patogenicidad, como ocurre en el caso de la *Escherichia coli* y *Shigella*. Asimismo diferentes transposones, libres o incorporados a replications mayores como plásmidos o bacteriófagos, pueden codificar enzimas que inactivan a los antibióticos confiriendo resistencia a los mismos. (Prieto et al., 2004; p. 224)

## Pared celular de las enterobacterias

La pared celular es una capa rígida que rodea completamente la membrana citoplasmática, mantiene la forma de la célula y previene la lisis celular que ocurriría como resultado de la elevada presión osmótica intracelular comparada con la del ambiente externo. La pared celular está compuesta por un polímero complejo entrecruzado, peptidoglucano (mureina, mucopéptido), consistente de polisacáridos y polipéptidos (Bertram, 2002; p 850).

**Cuadro 1-1:** Clasificación de la familia de enterobacterias propuesta por edwards y ewing (1986)

TRIBU	GENERO	ESPECIE
I Escherichieae	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. blattae</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i> . <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. dysenteriae</i>
II Edwardielleae		<i>E. tarda</i> , <i>E. hoshinae</i> , <i>E. ictaluri</i>
III Salmonelleae		<i>S. enterica</i> subespecie entérica, <i>salamae</i> , <i>arizonae</i> , <i>diarizonae</i> , <i>bongoori</i>
IV Citrobactereae	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. amalonaticus</i>
V Klebsielleae	<i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Hafnia</i> <i>Serratia</i>	<i>k. pneumoniae</i> , <i>K. azonae</i> , <i>K. oxytoca</i> <i>E. cloacea</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. gergoviae</i> <i>H. alvei</i> <i>S. marcescens</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. ficaria</i>
VI proteaceae	<i>Proteus</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> <i>M. morganii</i> <i>P. alcalifaciens</i> , <i>P. stuart</i>
VII Yersineae	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. aldovae</i>
VII Erwiniaee	<i>Erwinia</i>	<i>E. amylovora</i> , <i>E. carotovora</i>

FUENTE: (García y Zamudio, 1998; pp. 71-72).

## Epidemiología

Los microorganismos habitan en una amplia variedad de nichos que incluyen el tubo digestivo del ser humano y de otros animales de sangre caliente y en diversos sitios ambientales. En algunos son agentes de zoonosis y causan infecciones en poblaciones animales. Así como varias los reservorios de estos microorganismos, varias sus modos de transmisión a los seres humanos. Estos microorganismos pueden transmitirse de un paciente a otro y estas infecciones dependen de estado de debilidad de un paciente hospitalizado y lo adquiere en el hospital. Pero existe otros casos donde por ejemplo tenemos la *Escherichia coli* es la causa principal de las infecciones

nosocomiales, pero también es la causa principal de infecciones urinarias en personas no hospitalizadas (Bailey y Scoot, 2007: p. 323).

**Cuadro 2-1:** Epidemiología de los miembros de la familia Enterobacteriaceae de importancia clínica

Microorganismos	Habitad(reservorio)	Modo de transmisión
<i>Escherichia coli</i>	Microbiota normal del intestino de los seres humanos y otros animales, también puede habitar en el aparato genital femenino.	Varían en el tipo de infección. En el caso de las infecciones no gastrointestinales, los microorganismos pueden ser endógenos o diseminarse de persona a persona, sobre todo en el ámbito hospitalario. En el caso de las infecciones gastrointestinales, es el modo de transmisión varía con el tipo de <i>E. coli</i> y puede involucrar la diseminación fecal – oral entre seres humanos a través de alimentos o agua contaminados o consumo de carne mal cocida o leche de ganado bovino colonizado
Especies de <i>Shigella</i>	Solo se encuentra en los seres humanos durante una infección, no forma parte de la microbiota intestinal normal	Diseminación interpersonal por vía fecal – oral, sobre todo en zonas de hacinamiento y áreas con condiciones sanitarias deficientes
<i>Salmonella typhi</i> y <i>paratyphi</i>	Solo se encuentra en los seres humanos pero no forma parte de la flora intestinal normal	Diseminación interpersonal por vía fecal – oral por ingestión de alimentos o agua contaminados con heces humanas
Especies <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Morganella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i>	Microbiota humana gastrointestinal normal	Diseminación endógena, o interpersonal, sobre todo en los pacientes hospitalizados.

FUENTE: (Bailey y Scoot, 2007: pp. 326-327).

### Patogenia y espectro de enfermedades

Los miembros clínicamente importantes de la familia *Enterobacteriaceae* puede considerarse de dos grupos: los patógenos oportunistas y los patógenos manifiestos. Los patógenos oportunistas más frecuentes son *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Serratia*. Estos microorganismos producen factores de virulencia importante, como endotoxinas, que pueden participar en infecciones mortales. Sin embargo como por lo general no originan enfermedades en los huéspedes humanos sanos, se consideran oportunistas. Aunque la *E. coli* es un habitante normal del intestino, se considera como patógeno porque producen causas toxinas potentes y causas infecciones gastrointestinales graves (Bailey y Scoot, 2007: p. 324).

#### 1.1.5.1 *Escherichia coli*

También conocida como *E. coli*, es un bacilo muy pequeño Gram negativo, tienen forma de varilla, miden alrededor de 2,5 µm de largo, a medida que va creciendo esta se hace más larga y se

divide por la mitad. Esta bacteria no tiene núcleo, posee orgánulos externos, filamentos rectos y delgados, llamado pili, que le permite adjuntar a sustratos específicos, y más gruesas, filamentos helicoidales, y flagelos que les permiten nadar (FAO, ssf. <http://www.fao.org/fileadmin>).

*E. coli* se encuentra frecuentemente en los intestinos inferiores de animales de sangre caliente, incluidos en los de los hombres, una vez expulsados pueden vivir en el agua, suelo y sedimentos. La *E. coli* se la utiliza como indicador principal para detectar, medir y evaluar la inocuidad tanto del agua como de alimentos, la presencia de ella en estos es indicador de contaminación fecal. (FAO, ssf. <http://www.fao.org/fileadmin>).

Las personas se exponen a sufrir una contaminación con *E. coli* cuando consumen alimentos contaminados, los más frecuentes son como carne molida cruda o mal cocida, agua contaminada, productos frescos y productos lácteos no pasteurizados (FAO, ssf. <http://www.fao.org/fileadmin>). Existen cepas que pueden causar daño intestinal, extraintestinal o ambos, produciendo diferentes síndromes entre ellos el síndrome diarreico (Castro, 2014. ).

### **Mecanismo de resistencia**

*E. coli* presenta una betalactamasa de clase C (tipo Amp-C), el gen que codifica esta betalactamasa es capaz de romper distintos antibióticos betalactámicos, se encuentra codificada en el cromosoma de dicha bacteria. (Vignoli, p. 646)

#### **1.1.5.2 *Enterobacter* spp**

Pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram negativos aerobios móviles, flagelados peritricamente, fermentadora de glucosa y lactosa, productora de gas. Es una especie que se encuentra con mayor frecuencia en muestras clínicas, toman gran notoriedad como patógenos en 1976 después de un brote nacional de septicemia en 378 pacientes de 25 hospitales, como resultado de soluciones intravenosas contaminadas (Ausina y Moreno, 2005: p. 388 )

Hay 14 especies y las más importantes son: *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*; se asocian con meningitis neonatal y sepsis, y se consideran causa de superinfecciones e infecciones oportunistas. Originan infecciones del tracto urinario, heridas y neumonías (Romero, 2007, p. 746). Son importantes como indicadores de higiene en la planta láctea.

### **Patogenia**

Son conocidos por actuar como patógenos oportunistas causantes de infecciones nosocomiales, que afectan al tracto urinario, tracto respiratorio, heridas, neumonías y quemaduras, pueden

producir septicemias, bacteriemia y meningitis. Presentes con mayor frecuencia en pacientes que han recibido tratamiento antimicrobiano, y no han cumplido adecuadamente como el médico lo indica, por tal motivo los microorganismos se vuelven resistentes a dichos medicamentos, se presenta con mayor frecuencia en personas en cuidados intensivos (Quezada, 2013, pp. 14-15).

### 1.1.5.3 *Klebsiella spp*

*Klebsiella* es una bacteria Gram negativa, inmóvil, anaerobias facultativas y contiene una cápsula de polisacáridos. Las bacterias del género *Klebsiella* producen una gran cantidad de infecciones sobre todo la neumonía, infecciones al tracto urinario, septicemia, e infecciones de tejidos blandos (Romero, 2007, p. 746)

De todas las especies dos son de importancia médica: *Klebsiella pneumoniae* y *klebsiella oxytoca*, estas se localizan en el aparato respiratorio y digestivo, producen infecciones en las vías urinarias, en las quemaduras, diarrea en neonatos y abscesos pulmonares (Romero, 2007, p. 747)

***Klebsiella pneumoniae***: Son bacterias Gram negativas, puede ocasionar hasta un 10% de enfermedades infecciosas oportunistas, especialmente infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones en las urinarias, neumonías, sepsis, infecciones en tejidos blandos, principalmente en pacientes con obstrucción de las vías urinarias, diabético (Galí, 2010, p. 12)

### **Infecciones producidas por *Klebsiella***

El género *Klebsiella* está formado por un grupo de bacterias con dos especies que producen enfermedades en el hombre la *K. pneumoniae* y la *K. oxytoca* las cuales colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son responsables de infecciones de las vías urinarias, respiratorias y síndrome de sepsis. La mayoría de estas infecciones son nosocomiales y generalmente se observan en pacientes debilitados por enfermedades crónicas (Galí, 2010. pp. 11- 12)

### 1.1.5.4 *Proteus spp*

#### **Características microbiológicas**

*Proteus mirabilis* es parte de la familia Enterobacteriaceae. Es un pequeño bacilo Gram negativo y un anaerobio facultativo. *Proteus mirabilis* se caracteriza por su motilidad enjambre, su capacidad de fermentar la maltosa, y su incapacidad para fermentar la lactosa. *P. mirabilis* tiene la capacidad de alargarse en sí y secretar un polisacárido cuando está en contacto con las superficies sólidas, lo que es extremadamente móviles en artículos tales como equipos médicos.

## **Enfermedad:**

La infección más común que involucra *Proteus mirabilis* se produce cuando la bacteria se mueve a la uretra y la vejiga urinaria. Aunque *Proteus mirabilis* conocido sobre todo para causar infecciones del tracto urinario sobre todo pacientes que deben permanecer un largo período de tiempo con un catéter implantado.

*Proteus mirabilis* puede causar infecciones en heridas, septicemia y neumonías, sobre todo en pacientes hospitalizados. *Proteus* forma parte de la flora normal como la *E. coli*, se transmite por contaminación de agua o leche con contaminación fecal por aguas negra u otras fuente. (Gomes, 2012, <http://es.slideshare.net/>)

### **1.1.5.5 *Shigella* spp**

#### **Infecciones por *Shigella***

Es una infección provocada por el consumo de alimentos contaminados con células viables de organismos del genero *Shigella*, aunque se señala que es muy frágil, desapareciendo rápidamente en heces ácidas, en heces alcalinas es capaz de resistir varios días. Su incidencia es del 10 por 100 a nivel mundial. (Hernández y Sastre, 1999: pp. 516-517)

La tasa de morbilidad es elevada en niños menores de 10 años y en adultos en más de 50 y afecta sobre todo al hombre y a los primates. En los alimentos puede sobrevivir varios días, dependiendo del tipo de alimento. 19-72 días en queso a 4<sup>0</sup> C. 517. (Hernández y Sastre, 1999: pp. 516-517)

### **1.1.6 *Medicamentos veterinarios***

Son sustancias o composiciones de sustancias que poseen propiedades curativas o preventivas de las enfermedades animales. Entre ellos se destacan los antibióticos, medicamentos antiparasitarios, anabolizantes, aditivos de piensos y sustancias utilizadas para mejoras la calidad de los alimentos animales o su conservación. Los contaminantes llegan a los animales productores de alimentos a través de piensos, pastos o por el agua de bebida (Hernández y Sastre, 1999, p. 519).

#### **Impacto del usos de antibióticos en la producción animal**

Tras el éxito de los antibióticos en la medicina humana, estos fueron utilizados para el tratamiento de enfermedades y para acelerar el crecimiento tanto de animales como de plantas. En el año 1946, investigadores estadounidenses demostraron que la estreptomycin y la sulfasuxidina en dosis sub-terapéuticas producían aceleración en el crecimiento en pollos por tal razón fueron utilizaos por décadas (Quizhpe et al., 2011: pp. 4-5)

Esta teoría fue confirmada cuando se demostró que los residuos de la fermentación de la tetraciclina era la responsable de acelerar el crecimiento, cabe destacar que inicialmente se pensaba que este efecto de aceleramiento se producido por la vitamina B<sub>12</sub>. (Quizhpe et al., 2011: pp. 4-5).

### **1.1.7 Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias que en pequeñas cantidades/concentraciones sin peligro significativo para el huésped, impide el crecimiento y multiplicación de las bacterias, microorganismos y hongos (Koolman y Klaus, 2004: p.256).

Cuando el antibiótico inhibe el crecimiento de los microorganismos se conoce como acción bacteriostática, mientras que cuando el antibiótico mata a las células blancas se habla de una acción bactericida. La gran mayoría de los antibióticos se obtiene de la producción de microorganismos, principalmente de bacterias del género *Streptomyces* y algunos hongos. Un problema cada vez mayor de antibioterapia es la aparición de microorganismos resistentes. (Koolman y Klaus, 2004: p.256).

La notable potencia y actividad específica de los fármacos antimicrobianos se debe a su selectividad sobre blancos específicos que son únicos en los microorganismos o más importantes en ellos que en los seres humanos. Entre estos blancos están las enzimas que sintetizan la pared celular de hongos y bacterias, los ribosomas bacterianos, las enzimas requeridas para la síntesis de nucleótidos y la replicación de DNA y la maquinaria de la replicación viral (Bertram, 2002; p 848).

Los microorganismos pueden adaptarse a las presiones ambientales en una diversidad de manera eficaces y su respuesta a los antibióticos no es la excepción. Una consecuencia inevitable del uso de los antimicrobianos es la selección de microorganismos resistentes. El uso y el abuso inapropiado de los antibióticos produjo un incremento en la prevalencia de patógenos multirresistentes. (Bertram, 2002; p 848).

#### **1.1.7.1 $\beta$ -lactámicos**

##### **Mecanismo de acción**

Las penicilinas como todos los antibióticos betalactámicos, inhiben el crecimiento bacteriano por interferir en un paso específico en la síntesis de la pared celular. Los antibióticos betalactámicos son análogos estructurales del sustrato natural de la D-Ala-D-Ala y se une covalentemente a las PFP en el sitio activo. Después que el antibiótico betalactámico se ha unido a la PFP, se inhibe la reacción de la transpeptidación, la síntesis del peptidoglucano se bloquea y la célula muere (Bertram, 2002; p 850).

## Resistencia

La resistencia a las penicilinas y otros betalactámicos se debe a uno de los mecanismos generales:

- Inactivación del antibiótico por betalactamasa
- Modificación del sitio de unión de las PFP
- Acceso difícil del antimicrobiano al sitio de su unión con las PFP
- La presencia de una bomba de egreso

La producción de betalactamasa es el mecanismo de resistencia más común, más de 100 betalactamasas se identificaron, algunas como las producidas por *Staphylococcus aureus* y especies de *Haemophilus* y por *E. coli*, están relativamente relacionadas con la especificidad del sustrato y con la hidrólisis de las penicilinas, pero no con las de las cefalosporinas. Otras betalactamasas producidas por *Enterobacter*, son de un espectro más amplio e hidrolizan tanto a las cefalosporinas como a las penicilinas (Bertram, 2002; p 850).

Los antibióticos betalactámicos atraviesan la membrana e ingresan a los Gran negativos vía los canales proteicos de su membrana externa (porinas). La ausencia de estos canales o la regulación a la baja de su producción quizá impida o disminuya de manera muy importante la entrada del antibiótico al espacio intracelular. La penetración es impedida usualmente, aunque no es suficiente para conferir resistencia, debido a que los antibióticos a la larga entran a la célula para impedir el crecimiento (Bertram, 2002; p 850).

### 1.1.7.2 Ampicilina

La ampicilina es un antibiótico beta-lactámico de espectro moderado, cuyos mecanismos de acción se da en el interior en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario en la formación de la pared bacteriana. (Mosquito et al, 2011, p 649)

La ampicilina es útil para tratar infecciones graves producidas por microorganismos susceptibles a la penicilina como cepas de bacilos Gram negativos como *E. coli* especies de *Salmonella*.

**Mecanismo de resistencia:** Uno de los principales mecanismos de resistencia hacia beta-lactámicos en la hidrólisis enzimática que es debida a la presencia de enzimas llamadas “beta-lactamasa” que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo beta-lactámico inactivando de esta manera al antibiótico antes de que genere cualquier efecto. (Mosquito et al, 2011, p 648)



## **Beta-lactamasas en enterobacterias**

Dentro de las 890 beta-lactamasas que actualmente se han caracterizado, las familias más comunes dentro de las enterobacterias son: *bla*TME, *bla*SHV, *bla*OXA-1 Y *bla*CARB. Las dos primeras pertenecientes al grupo 2b, es decir son penicilasas, inhibidas por el ácido clavulánico y que en algunos casos también tiene acción contra cefalosporinas de tercera generación. (Mosquito et al, 2011, p 649)

## **Problemas relacionados con el uso y el abuso de las penicilinas**

Varios miles de toneladas de penicilinas se han administrado a los seres humanos durante los últimos 40 años. Las penicilinas son las empleadas y de uso excesivo especialmente en los hospitales, con penicilinas producen organismos resistentes a la penicilina de manera selectiva. Las penicilinas de amplio espectro también erradican la flora normal y por eso predisponen al paciente a la colonización y superinfecciones de especies oportunistas resistentes a los antibióticos que están presentes dentro del ambiente hospitalario (Bertram, 2002, pp. 856-857).

### **1.1.7.3 Inhibidor de betalactamasa**

#### **Ácido clavulánico**

La adición de un inhibidor de betalactamasa incrementa la actividad de estas penicilinas, incluyendo a las cepas productoras de betalactamasa como *Staphylococcus aureus*, así como algunas bacterias Gram negativas productoras de betalactamasa. Son activos contra *Shigella*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. No son buenos inhibidores contra betalactamasa clase C, producidas por *Enterobacter* (Bertram, 2002, p 856).

### **1.1.7.4 Cefalosporinas**

Las cefalosporinas son químicamente similares a las penicilinas, en mecanismos de acción y toxicidad. Las cefalosporinas son más estables que las penicilinas a muchas betalactamasas bacterianas y por eso tienen un espectro de acción más amplio. Como regla general de los compuestos de primera generación tiene mejor actividad contra Gram positivos y, los últimos compuestos, tiene una actividad mejor contra los aerobios Gram negativos (Bertram, 2002, p. 858).

- **Cefalosporina de primera generación:** Estos antibióticos contra cocos Gram positivos, pero no son activos contra cepas de *Staphylococcus* resistentes a meticilina. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* son a menudo susceptible, pero es deficiente la actividad contra *Enterobacter*.

- **Cefalosporina de segunda generación:** En general, son activos contra microorganismos que son afectados por los antibióticos de primera generación, pero tiene una mayor cobertura sobre Gram negativos.
- **Cefalosporina de tercera generación:** incluyen cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona. Las características principales de estos antibióticos son la amplia cobertura de su espectro sobre Gram negativos. Como los antibióticos de segunda generación, los de tercera generación se hidrolizan por betalactamasa cromosomal constitutiva producida por *Enterobacter*. (Bertram, 2002, pp. 858-861).

#### 1.1.7.5 Imipenem

Los carbapenemas están estructuralmente relacionados con los antibióticos betalactámicos. El Imipenem y el Meropenem están disponibles siendo el primer de un amplio espectro con una buena actividad contra muchos bacilos Gram negativos, es resistente a la mayoría de betalactamasas, pero no a las metalo betalactamasas. (Bertram, 2002, pp. 858-863).

La resistencia a los antibióticos carbapenémicos, último recurso terapéutico para las infecciones potencialmente mortales por *Klebsiella pneumoniae* (una bacteria intestinal común) se ha extendido a todas las regiones del mundo. *K. pneumoniae* es una causa importante de infecciones nosocomiales, como las neumonías, las septicemias o las infecciones de los recién nacidos y los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. Esa resistencia hace que en algunos países los antibióticos carbapenémicos ya no sean eficaces en más de la mitad de las personas con infecciones por *K. pneumoniae*. (OPS y OMS, 2011; <http://www.paho.org/panaftosa>)

#### 1.1.7.6 Fluoroquinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos, de las cuales cabe destacar el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas, como ciprofloxacina cuyo centro de actividad se centra en las bacterias Gram negativas.

La resistencia se debe a una o más mutaciones en la región de unión de la quinolona con la enzima girasa o por un cambio en la permeabilidad del microorganismo. La DNA girasa es el blanco primario en *E. coli*, con un único mutante producido por la sustitución aminoácido en la subunidad A de la girasa. (Bertram, 2002, p. 899).

#### 1.1.8 Selección del antimicrobiano

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se han convertido en procedimientos de rutina en la práctica clínica y la información generada a partir de ellas es primordial para la

vigilancia de los diferentes perfiles de susceptibilidad y la detección de nuevos mecanismos de resistencia. Las recomendaciones del Instituto de Estándares del laboratorio clínico de los Estados Unidos (CLSI), para cada grupo de microorganismo abarcan los agentes con eficacia probada cuyas pruebas son aceptables *in vitro*. Se establecen también consideraciones para agentes antimicrobianos en pruebas específicas, eficacia clínica, prevalencia de la resistencia y recomendación para la selección de antimicrobianos de primera línea y agentes alternativos. (VER ANEXO A) (NORMAS CLSI M100-S25, 2015, p. 48)

**Grupo A:** Incluye los agentes antimicrobianos apropiados para ser incluidos de manera rutinaria en las pruebas y reportes de sensibilidad para un grupo específico de microorganismos.

**Grupo B:** Incluye agentes que son clínicamente importantes, deben ser probados rutinariamente; sin embargo, su informe debe ser selectivo. Tal es el caso de organismos resistentes a los agentes.

**Grupo C:** Incluye agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que deben ser probados en instituciones con cepas endémicas o epidémicas resistentes a algunos de los antimicrobianos primarios o en caso de pacientes alérgicos a estos medicamentos, en caso de tratamiento de microorganismos inusuales o para efectos de informarlos al comité de infecciones como ayuda epidemiológica (NORMAS CLSI M100-S20, 2010, p. 10)

#### **1.1.8.1 Resistencia Antibacteriana**

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno por el cual un microorganismos se hace resistente a los efectos de los medicamentos antimicrobianos a los que originalmente era vulnerable, por esta manera que los tratamientos tradicionales se vuelven inútiles y las infecciones perduran, e incrementan el riesgo de propagación. (OPS y OMS, 2015: <http://www.who.int/mediacentre>)

OMS señala que la resistencia se produce cuando las microorganismos sufren algunos cambios, se reproducen de manera errónea o existe intercambio de características de resistencia, que hacen que los antibióticos dejen de funcionar de forma adecuada para tratar las infecciones (OMS, 2014: <http://www.paho.org/hq/index>.)

#### **1.1.8.2 Antecedentes históricos de la resistencia bacteriana**

La explicación más clara acerca de cómo surge y se desarrolla el fenómeno de la resistencia bacteriana, tiene soporte básico en las leyes darwinianas sobre el fenómeno de la selección natural de las especies. En el año 1928 con el descubrimiento de Alexandre Fleming sobre la actividad antimicrobiana de la penicilina, y su baja toxicidad sobre células animales. Alexander Fleming también en el año 1945 alerta al mundo sobre el potencial peligro de la resistencia bacteriana, y advirtió que el mal uso de la penicilina podría ser causante de la propagación de formas mutantes de microorganismos resistentes a dichos medicamento (Peña et al., 2011: <http://revpanorama.sld.cu/inde>).

En la actualidad, el tratamiento de las enfermedades infecciosas es un verdadero reto para los médicos alrededor del mundo. Anteriormente el medicamento era eficaz y mejoraba la calidad y alargaba la vida del paciente, en la actualidad por la ineficacia de dichos medicamentos por la presencia de bacterias resistentes esos pueden ocasionar la muerte y alargar el periodo del tratamiento del paciente. La resistencia bacteriana se asocia a mutaciones cromosómicas, o a elementos extracromosomales adquiridos a partir de otras bacterias o del ambiente (Peña et al., 2011: <http://revpanorama.sld.cu/inde>).

A partir del año 1943, los veterinarios comienzan a experimentar con la penicilina, especialmente la bencilpenicilina o penicilina G para tratar animales enfermos, por el amplio margen de seguridad, acción bactericida, gran potencia antimicrobiana. Tras el transcurso de algunos años, la industria agropecuaria observa que el uso de bajas cantidades de este fármaco puede acelerar el crecimiento de animales saludables. En el año de 1969 se demostró que el uso inadecuado de este fármaco es el responsable de transferir de genes de resistencia desde el ambiente al humano. El uso de antimicrobianos en animales tiene un vínculo con la resistencia bacteriana en humanos (Peña et al., 2011: <http://revpanorama.sld.cu/inde>).

### **1.1.8.2 Propagación de la resistencia bacteriana**

La resistencia a los antibióticos siempre han formado parte de la evolución de las bacterias como medio de supervivencia entre competidores productores de antibiótico, las bacterias crearon estrategias de supervivencia debido al empleo de antimicrobianos en la práctica médica. Estas estrategias de resistencia bacteriana son codificadas por uno o más genes y estos genes de resistencia son compartidos con facilidad entre cepas de la misma especie, entre especies de géneros diferentes.

Cuando surge un mecanismo de resistencia, sea por mutación o por transferencia de genes, en una determinada cepa o bacteria, es posible que este mecanismo se transfiera a otros microorganismos mediante vías de comunicación genética. Por lo mismo cualquier microorganismo aislado puede adquirir numerosos genes y volver resistente a todo el espectro de agentes antimicrobianos disponibles (Bailey y Scott, 2007; p. 192).

### **Factores que constituyen al surgimiento y desimanación de resistencia a los antimicrobianos entre las bacterias**

- Aparición de nuevos genes
- Desimanación de genes viejos a huéspedes nuevos

- Mutación de genes viejos que producen resistencia más potente (resistencia medida por betalactamasa a cefalosporinas de última generación en *Escherichia coli* y especies de *Klebsiella*)
- Aparición de bacterias oportunistas intrínsecamente resistentes (Bailey y Scott, 2007; p. 185)

### 1.1.9. *Mecanismos de resistencia*

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, esta no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de especie bacteriana. Así existen cepas de *E. coli* resistentes a la ampicilina. (Vignoli, p. 550)

1. **Inactivación del antibiótico por enzimas:** las bacterias producen enzimas que inactiva al antibiótico; las más importantes son las betalactamasa.
2. **Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana:** las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

**Alteración por parte de la bacteria de su punto diana:** impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia a quinolonas), del ARNr 23S (macrolidos) de las enzimas PBPSs (Proteínas fijadoras de penicilinas) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos). (Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, 1998. <http://www.msssi.gob.es>)

## CAPITULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Muestreo

El muestreo se realizó según la NTE INEN 1529-2:2013 en la cual nos indica paso a paso la toma, envío y preparación de las muestras para el análisis microbiológico. Las muestras fueron tomadas de las queseras provenientes de parroquias rurales del cantón Riobamba (San Juan, Pungalá y Quimiag) de mayor producción de queso. En tres periodos de tiempo, al inicio del mes, a mediados y a al final del mes. Las muestras una vez recolectadas fueron transportadas en un termo con hielo en recipientes estériles. El trabajo microbiológico y de resistencia/ susceptibilidad se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias, escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2 Cultivo y cuantificación

El conteo de las colonias se realizó según la NTE INEN 1529-13:2013 control microbiológico de los alimentos. Enterobacterias. Recuento en placa por siembra en profundidad.

Cálculo den número (N) de unidades formadoras de colonias (UFC) de Enterobacterias por centímetro cúbico o gramo de muestra. Utilizar la siguiente fórmula.

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestras sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Donde

$\sum c$  = suma de las colonias enterobacterias contadas o calculadas en todas las placas elegidas.

$n_1$  = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada

$n_2$  = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada

$d$  = dilución de los cuales se obtuvieron los primero recuentos

$v$  = volumen del inculo sembrado en cada placa

Para una mejor observación de las colonias se sembró las diluciones correspondientes en Agar MacConkey con un asa calibrada a 0.5µl y se inoculó 24 horas a 35°C, transcurrido ese tiempo se observaron colonias de diferente forma, tamaño y color, las cuales se procedió a realizar el correspondiente aislamiento e identificación.

### **2.3 Aislamiento y Purificación**

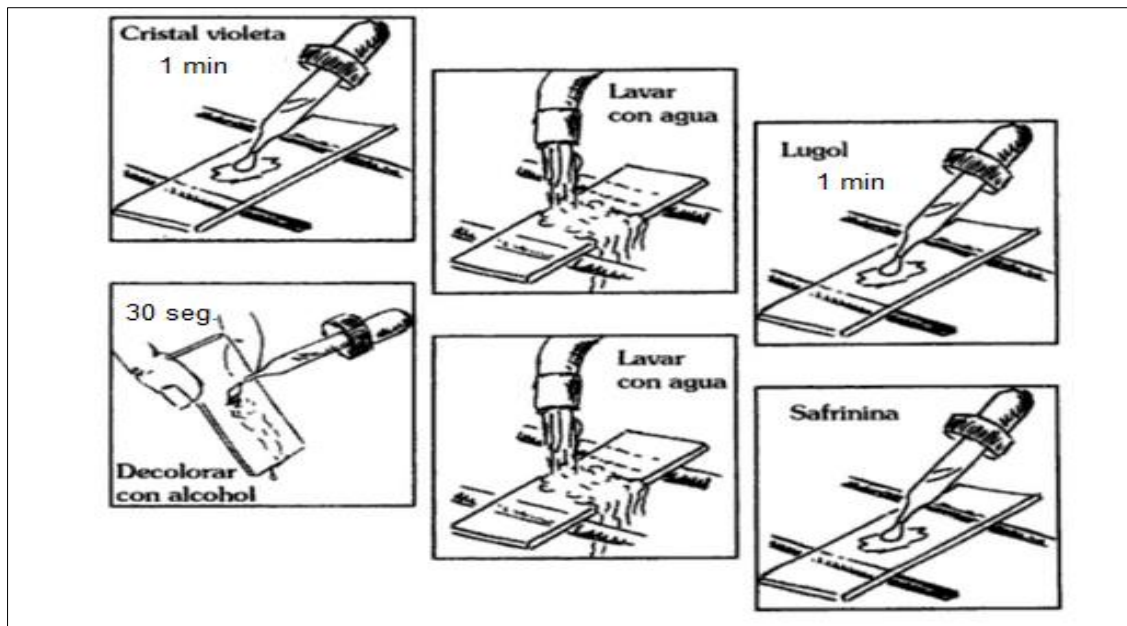
Se utilizó el método de siembra por estría en medios de cultivo selectivos-diferenciales: agar MacConkey, agar EMB con un asa calibrada de 0.5µl, se incubo a 35°C por 24 horas.

- Agar MacConkey: colonias rosadas (fermentan lactosa) y colonias transparentes (no fermentan lactosa)
- Agar EMB: colonias azules (fermentan lactosa) y colonias transparentes (no fermentan lactosa)
- En Agar Eosina Azul de Metileno: Colonias de *Escherichia coli*, presentaron brillo metálico, color característico de *E. coli*

### **2.4 Puebas de preliminares**

#### **2.5.1 Tinción Gram**

- En un portaobjeto se emulsionó una pequeña cantidad de colonias con solución salina estéril, se realizó un extendido con un palillo de madera, fijamos la muestra con la ayuda de un mechero, una vez fijada la muestra se procedió a realizar la tención Gram.
- Agregamos cristal violeta por un minuto, transcurrido este tiempo se enjuaga con agua no directamente sobre la muestra como lo indica en el (Figura 1-2).
- Seguidamente se adicionó lugol por 1 minuto, se enjuago con agua no directamente sobre la muestra, para evitar que esta se arrastra por el agua.
- Se colocó acetona y se dejó actuar por 30 segundos, se enjuago con agua no directamente sobre la muestra.
- Como paso final se coló safranina y se dejó actuar por 1 minuto, se enjuagó con agua y se dejó secar al ambiente.
- Se procedió a observar en el microscopio con un lente de 100x. se pudo observar bacilos Gram negativos.



**Figura 1-2:** Tinción Gram

Fuente: (Cavallini et al., 2005: p. 69)

#### 2.4.1 Producción de catalasa

En un portaobjetos colocamos una gota de peróxido de hidrógeno, con la ayuda de un palillo de madera estéril tomamos una colonia y le colocamos en el portaobjetos, se pudo observar el burbujeo que se produce y se toma como positivo. (Fernández., et al. 2010: p. 6)

#### 2.4.2 Producción de oxidasa

Se tomó una colonia con un palillo de madera estéril y se colocó en la tira reactiva de oxidasa marca Merck, se observó una coloración rosada intensa lo que quiere decir que es oxidasa negativa. (MacFaddin, 2003, p. 344)

### 2.5 Pruebas bioquímicas

Se prepararon pruebas bioquímicas como TSI, citrato, SIM, LIA y urea. Siguiendo las especificaciones indicadas en el envase.

#### 2.5.1 Prueba de TSI (Triple Azúcar Hierro)

- El medio de cultivo Kligler se preparó siguiendo las indicaciones, escritas en el envase, (54.8g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad tubos que se necesitaba, realizó los cálculos correspondientes para evitar desperdiciar medios de cultivo.



- Teniendo en cuenta la cantidad de agua y los gramos necesarios de agar, colocamos una pequeña cantidad de agua destilada en un erlenmeyer, para evitar que el polvo del agar se pegue en la superficie del erlenmeyer colocamos los gramos de agar y finalmente añadimos el agua para la cual se calculó los gramos de agar.
- Con la ayuda de un reverbero se procedió a hervir el medio de cultivo para este que se disuelva totalmente.
- Esterilizamos los medios de cultivo, 121°C durante 15 psi, en la autoclave.
- Transcurrido este tiempo esperamos que el medio de cultivo este a una temperatura de 45°C, y distribuimos en tubos 3mL de agar, antes que este se solidifique lo colocamos en una parte inclinada para que el agar tome forma de pico de flauta.

Una vez solidificados el medio de cultivo se procedió a sembrar. Con la ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada se tomó una colonia aislada por picadura y se sembró en el tubo, deje incubar durante 24 horas a 35°C.

#### **Interpretación de Resultados:**

Fondo amarillo: producción de glucosa

Rompimiento del medio o burbujas: producción gas

Pico de flauta amarillo: producción de lactosa

Ennegrecimiento del medio: Producción de H<sub>2</sub>S (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 140)

#### **2.5.2 Prueba de citrato**

- El medio de cultivo citrato se preparó siguiendo las indicaciones, escritas en el envase, (22.5g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad tubos que se necesitaba, se realizó los cálculos correspondientes para evitar desperdiciar medios de cultivo.
- Teniendo en cuenta la cantidad de agua y los gramos necesarios de agar, colocamos una pequeña cantidad de agua destilada en un erlenmeyer, colocamos los gramos de agar y finalmente añadimos el agua para la cual se calculó los gramos de agar.
- Con la ayuda de un reverbero se procedió a hervir el medio de cultivo para este que se disuelva por su totalidad.
- Esterilizamos los medios de cultivo, 121°C durante 15 psi, en la autoclave.
- Transcurrido este tiempo esperamos que el medio de cultivo este a una temperatura de 45°C, y distribuimos en tubos 3mL de agar, antes que este se solidifique lo colocamos en una parte inclinada para que el agar tome forma de pico de flauta.

- Una vez solidificados el medio de cultivo se procedió a sembrar. Con la ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada se tomó una colonia aislada por picadura y se procedió a sembrar en el tubo, deje incubar 24 horas a 35°C durante.

#### **Interpretación de resultados:**

- **Positivo:** crecimiento y color azul en el pico, alcalinidad.
- **Negativo:** el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 142)

#### **2.5.3 Prueba SIM (Sulfuro- Indol- Movilidad)**

- El medio de cultivo SIM se preparará siguiendo las indicaciones, escritas en el envase, (30g de agar en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad tubos que se necesitaba, se realizó los cálculos correspondientes para evitar desperdiciar medios de cultivo.
- Teniendo en cuenta la cantidad de agua y los gramos necesarios de agar, colocamos una pequeña cantidad de agua destilada en un erlenmeyer, colocamos los gramos de agar y finalmente añadimos el agua para la cual se calculó los gramos de agar
- Con la ayuda de un reverbero se procedió a hervir el medio de cultivo para este que se disuelva por su totalidad.
- Esterilizamos los medios de cultivo, 121°C durante 15 psi, en la autoclave.
- Transcurrido este tiempo esperamos que el medio de cultivo este a una temperatura de 45°C, y distribuimos en tubos 3mL de agar, lo coloque en una superficie plana.

Una vez solidificados el medio de cultivo se procedí a sembrar, con la ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada se tomó una colonia aislada por picadura y se procedí a sembrarla en el tubo, se dejó a incubar durante 24 horas a 35°C.

#### **2.5.4 Prueba LIA (Lisina Hierro Agar)**

- El medio de cultivo Lisina se preparó siguiendo las indicaciones, escritas en el envase, (35.56 g de agar en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad tubos que se necesitaba, realizó los cálculos correspondientes para evitar desperdiciar medios de cultivo.
- Teniendo en cuenta la cantidad de agua y los gramos necesarios de agar, colocamos una pequeña cantidad de agua destilada en un erlenmeyer, colocamos los gramos de agar y finalmente añadimos el agua para la cual se calculó los gramos de agar.
- Con la ayuda de un reverbero se procedió a hervir el medio de cultivo para este que se disuelva por su totalidad.
- Esterilizamos los medios de cultivo, 121°C durante 15 psi, en la autoclave.

- Transcurrido este tiempo esperamos que el medio de cultivo este a una temperatura de 45°C, y distribuimos en tubos 3mL de agar, antes que este se solidifique lo coloque en una parte inclinada para que el agar tome forma de pico de flauta.
- Una vez solidificados el medio de cultivo se procedió a sembrar. Con la ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada se tomó una colonia aislada por picadura y se procedió a sembró en el tubo, dejo incubar durante 24 horas a 35°C.

### **Interpretación de Resultados:**

#### **1. Decarboxilación de la lisina:**

- Prueba Positiva: Pico violeta/fondo violeta.
- Prueba Negativa: Pico violeta/fondo amarillo.

#### **2. Producción de ácido sulfhídrico:**

- Prueba positiva: Ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del pico y fondo)  
(ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 142)

### **2.5.5 Prueba Urea**

- El medio de cultivo agar base urea se preparó siguiendo las indicaciones, escritas en el envase, (21g de agar base urea en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad tubos que se necesitaba, se realizó los cálculos correspondientes para evitar desperdiciar medios de cultivo.
- Teniendo en cuenta la cantidad de agua y los gramos necesarios de agar, colocamos una pequeña cantidad de agua destilada en un erlenmeyer, colocamos los gramos de agar y finalmente añadimos el agua para la cual se calculó los gramos de agar.
- Con la ayuda de un reverbero se procedió a hervir el medio de cultivo para este que se disuelva por su totalidad.
- Esterilizamos los medios de cultivo, 121°C durante 15 psi, en la autoclave.
- Transcurrido este tiempo esperamos que el medio de cultivo este a una temperatura de 45°C, y añadimos la solución de urea al 4%, distribuí en tubos 3mL de agar, antes que este se solidifique lo coloque en una parte inclinada para que el agar tome forma de pico de flauta.
- Una vez solidificados el medio de cultivo se procedió a sembrar. Con la ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada se tomó una colonia aislada por picadura y se procedió a sembró en el tubo, se dejó incubar durante 24 horas a 35°C.

### **Interpretación de resultados:**

La prueba se considera positiva si el medio se torna de un tono rosado, y negativa si mantiene su color original. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 142).

**Cuadro 1-2:** Características para la diferenciación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

	K L I G L E R				Citrato	Fenilalanina desaminasa	Indol	Lisina decarboxilasa	Manitol	Movilidad	Ureasa
	Glucosa	Gas/glucosa	Lactosa	SH <sub>2</sub>							
<i>Escherichia coli</i> .....	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V <sup>+</sup>	-
<i>Escherichia coli</i> inactivo ....	+	-	V <sup>-</sup>	-	-	-	+	V	+	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> .....	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> .....	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i> .....	+	-	-	-	-	-	V <sup>-</sup>	-	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i> .....	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i> .....	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Klebsiella ozaenae</i> (1).....	+	V	V <sup>-</sup>	-	V <sup>-</sup>	-	-	V	+	-	V <sup>-</sup>
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> (1).....	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> .....	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i> .....	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	V <sup>+</sup>
<i>Enterobacter aerogenes</i> .....	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> .....	+	V <sup>-</sup>	V	-	V	V <sup>-</sup>	V <sup>-</sup>	-	+	V <sup>+</sup>	V <sup>-</sup>
<i>Enterobacter gergoviae</i> .....	+	+	V	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Enterobacter sakazakii</i> .....	+	+	+	-	+	V	V <sup>-</sup>	-	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i> .....	+	V	-	-	+	-	-	+	+	+	V <sup>-</sup>
<i>Serratia liquefaciens</i> .....	+	V	V <sup>-</sup>	-	+	-	-	V <sup>+</sup>	+	+	-
<i>Serratia rubidaea</i> .....	+	V	+	-	+	-	-	V	+	V <sup>+</sup>	-
<i>Morganella morganii</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	+	V <sup>+</sup>	+	-	-	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	+	V <sup>-</sup>	+	+	-	-	+	+
<i>Providencia alcalifaciens</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Providencia rettgeri</i> .....	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Providencia stuartii</i> .....	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	V <sup>-</sup>

Fuente: ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 74

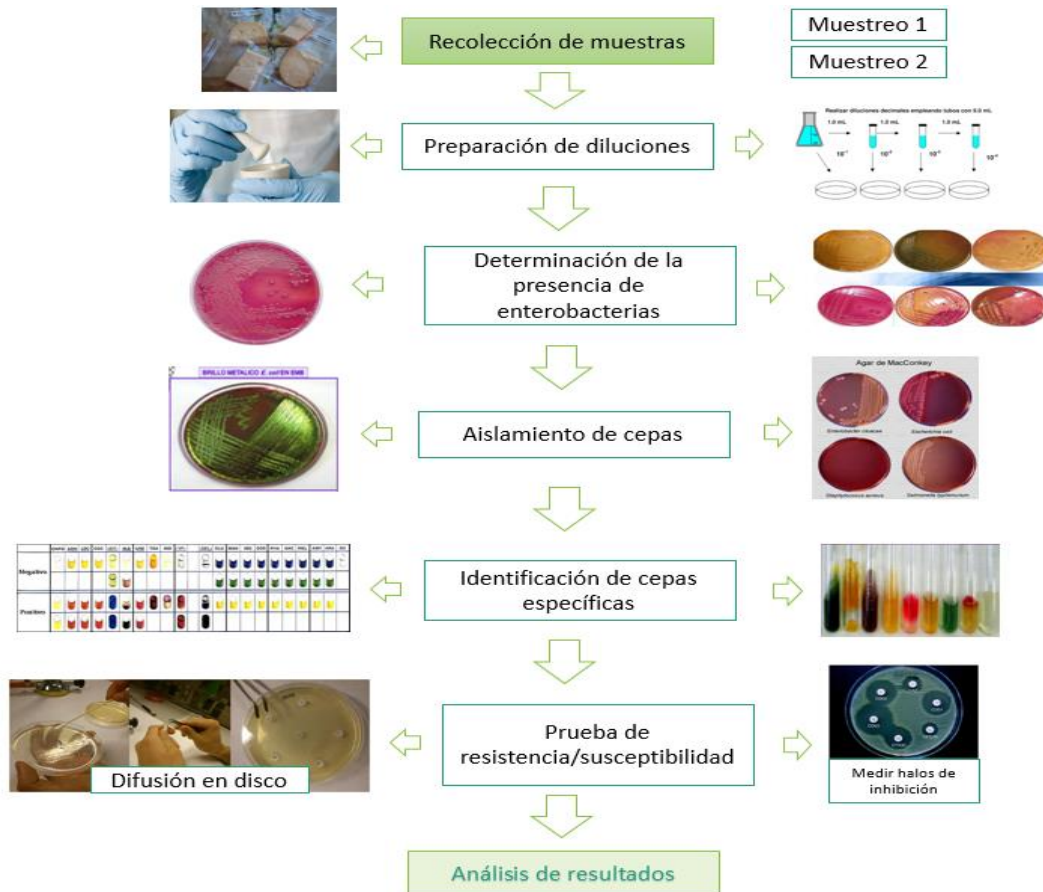
## 2.4 Resistencia/ susceptibilidad a antimicrobianos

Los antimicrobianos empleados en la determinación de resistencia/susceptibilidad, fueron escogidos según nos indica la Clínica and Laboratory Standart Institute 2015, específicos para enterobacterias, se utilizó el método de difusión en disco de Kirby Bauer. Para llevar a cabo este método, previamente se preparó el patrón de turbidez llamado Mac Farland. El estándar de Mac Farland de 0,5 tiene una turbidez comparable a una suspensión bacteriana que contiene 1,5X10<sup>8</sup> UFC/mL.

Este estándar se obtuvo agregando 0,5 mL de BaCl<sub>2</sub> 0,048 M a 99,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Luego se distribuyó de 4 a 6 mL de esta solución dentro de tubos similares a los que fueron utilizados para la preparación del inóculo, inmediatamente se sellaron con parafilm y se guardó a temperatura ambiente.

Para la preparación del inóculo se tomaron 4 a 5 colonias bien aisladas y de igual morfología, seguidamente se realizó la suspensión en agua estéril, esta se incubó hasta que alcanzó la turbidez de 0.5 de la escala de Mac Farland estándar. Una vez obtenido el inóculo estándar de cada una de las cepas identificadas, se sembró por hisopado completo en cajas petri con agar Müller-Hilton

Se colocó disco de antimicrobianos según los señalados por la Norma del Instituto Estándar Clínica y Laboratorio 2015, específicos para Enterobacterias. (Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, ceftriaxona, cefoxitin, ceftazidima, imipinem y ciprofloxacina) Se incubo a 35°C por 24 horas, luego del periodo de incubación se midieron los halos con una regla de medición común. Los resultados se interpretaron como sensible, sensibilidad media o resistente de acuerdo al diámetro del halo de inhibición tomado en mm y usando referencia la tabla del NCCLS tabla (SSS). (VER ANEXO A y B)



**Figura 2-2:** Esquema metodológico resistencia/ susceptibilidad en cepas de enterobacterias.

Realizado por: Barrionuevo, Ana 2015

- **Análisis estadístico**

Como herramienta de análisis se utilizó el programa estadístico infostat, los datos se sometió a un análisis de varianzas de un factor (ANOVA) con una significancia del 5% y observando que existe una diferencia estadística se utilizó el test de comparación de medias o test de Tukey al 95% de confianza.

### CAPITULO III

## 3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 3.1 Recuento de enterobacterias presentes en queso fresco de tipo artesanal

Tabla 1-3: Cuantificación de enterobacterias

Procedencia	Cód.	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC /mL)		
		Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
San Juan	QA	2.20X10 <sup>4</sup>	2.03X10 <sup>4</sup>	2.30X10 <sup>4</sup>
	QB	2.13X10 <sup>4</sup>	1.61X10 <sup>4</sup>	1.67X10 <sup>4</sup>
Quimiag	QC	< 1.0X10 <sup>0</sup>	8.86X10 <sup>3</sup>	4.05X10 <sup>4</sup>
	QD	1.16X10 <sup>4</sup>	9.86X10 <sup>3</sup>	9.86X10 <sup>4</sup>
Pungalá	QF	2.93X10 <sup>4</sup>	2.09X10 <sup>4</sup>	2.16X10 <sup>4</sup>
	QE	2.89X10 <sup>4</sup>	2.12X10 <sup>4</sup>	2.14X10 <sup>4</sup>

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

En la (tabla 1-3), resultados de la cuantificación de enterobacterias, los datos analizados están entre  $8.86 \times 10^3$  UFC/g y  $9.86 \times 10^4$  UFC/g, encontrándose fuera de los límites establecidos por la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528 norma general para quesos frescos no madurados, en la cual el valor permitido es  $2 \times 10^2$  UFC/g.

El (ANEXO H) ANOVA de un factor nos muestra al análisis de datos entre queseras, muestreo y procedencia, dando como resultado un valor no significativo entre el análisis de queseras y muestreos, el análisis de ANOVA entre procedencia arrojó un valor de  $p < 0.001$ , considerándose estadísticamente significativo, para la cual se realizó en test de tukey, que indica que la carga bacteriana de los quesos procedentes de San Juan y Pungalá son estadísticamente iguales.

Los datos obtenidos en esta investigación concuerdan con los datos expresados Giovanna Estrella (2013), la cual realizó el monitoreo de la calidad e inocuidad durante el almacenamiento de queso fresco elaborado artesanalmente en las parroquias rurales del cantón Riobamba, donde se encontró recuentos de enterobacterias desde  $3,66 \log$  UFC/g hasta de  $8.13 \log$  UFC/g.

Datos similares también son obtenidos de la investigación realizada por Fuentes Lorena (2003 en Valdivia Chile), el recuento de enterobacterias en queso tipo Gouda se encuentra fueron el rango permitid en la norma. Lo cual hace sospechar que los dueños de las queseras artesanales, no están implementando cambios para mejorar la calidad higiénica de los quesos.

### 3.2 Cepas Identificadas

**Cuadro 1-3:** Características bioquímicas de cepas de Enterobacterias aisladas de queso fresco artesanal elaborados en zonas rurales del cantón Riobamba

MUESTREO 1												
Código	PRUEBAS PRELIMINARES		PRUEBAS BIOQUIMICAS									MICROORGANISMO IDENTIFICADO
	CATALASA	OXIDASA	KLIGLER				CITRATO	SIM		LISINA DECARBOXILASA	Urea	
			Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	SH <sub>2</sub>		Indol	Movilidad			
QA	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
QB	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
QD	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Shigella sonnei</i>
QE	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
QF	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	V	-	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter gergoviae</i>
MUESTREO 2												
QA	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
QB	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>

QC	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Shigella sonnei</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
QD	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
QE	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
QF	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	v	-	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter gergoviae</i>
<b>MUESTREO 3</b>												
QA	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
QB	+	-	+	+	v	-	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter gergoviae</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
QC	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Shigella sonnei</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
QD	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
QE	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Shigella sonnei</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
QF	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>E. coli</i>
	+	-	+	+	v	-	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter gergoviae</i>

Fuente: Ana Barrionuevo, 2015

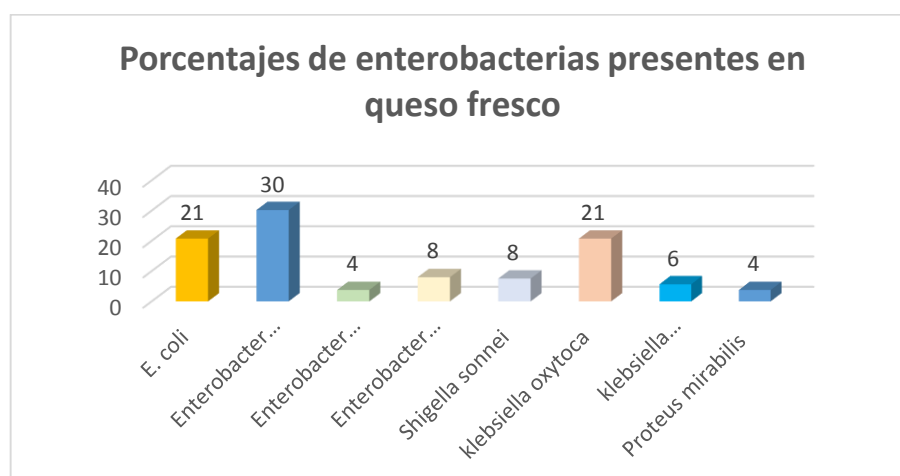


A partir de las 16 muestras de queso analizadas, luego de haber realizado las pruebas preliminares como oxidasa y catalasa para determinar si se trata de bacilos Gram positivos o Gram negativos, se realizaron las pruebas bioquímicas a correspondientes: Kligler, citrato, SIM, LIA y urea, de las cuales se identificaron a: *klebsiella oxytoca*, *Enterobacter*, *cloacae*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter gergoviae*.

De esta manera logrando aislar 53 cepas de enterobacterias como nos indica en la (tabla 2-3), *klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *E. coli* se aislaron de las queseras A, B, C, D, E y F, cepas de *Shigella sonnei* se aislaron en los quesos provenientes de las queseras de las queseras C, D y E en los diferentes muestreos; cepas de *klebsiella pneumoniae* fueron aisladas en las queseras C y D; cepas de *Proteus mirabilis* aisladas únicamente en la quesera D; *Enterobacter aerogenes* en la quesera A; *Enterobacter gergoviae* fueron encontradas en los quesos de las queseras F y B, en la quesera F fueron encontradas dichas cepas en los tres muestreos, mientras que en los quesos de la quesera B se encontró únicamente en el muestreo 3.

**Tabla 2-3:** Enterobacterias y su porcentaje en queso fresco

Enterobacterias	Número aisladas en los tres muestreos	Porcentaje
<i>Enterobacter cloacae</i>	16	30 %
<i>E. coli</i>	11	21 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	11	21 %
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4	8 %
<i>Shigella sonnei</i>	4	8 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	5%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	4%
<i>Proteus mirabilis</i>	2	4 %



**Figura 1-3:** Porcentaje de cepas de enterobacterias aisladas en queso fresco artesanal elaborados en zonas rurales del cantón Riobamba.

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

*Enterobacter cloacae* se aisló en un 30%, *klebsiella oxytoca* y *E. coli* en un 21%, *Shigella sonnei* y *Enterobacter gergoviae* 8%, *Klebsiella pneumoniae* 5%, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes* 4%.

Los datos obtenidos en nuestra investigación concuerdan con la investigación realizadas por Ruth Cristóbal y Dora Maurtua en el 2003, quienes realizaron la evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, en su investigación menciona que el mayor porcentaje de cepas aisladas corresponde a *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp y en menor cantidad se aisló cepas de *Shigella* spp.

Cepas de *Enterobacter* se suelen encontrar con mayor cantidad en muestras de queso, porque el equipo no se limpia adecuadamente, está relacionado también con la mala práctica de ordeños, mala higiene del lugar donde se elabora el queso, es posible también que unos de los manipuladores se encontraba enfermo.

Guillén Leidy y Araque (2014) indica que *E. coli* es uno de los agentes biológicos que con mayor frecuencia se encuentran involucrados en la contaminación de alimentos. Particularmente la leche y sus productos derivados no pasteurizados son potencialmente peligroso por su alto riesgo de contaminación en todas las etapas de producción.

Cortecero y Benítez en un estudio realizado en el año 2012, evaluó la resistencia bacteriana en quesos frescos costeños en los municipios de Arjona y Villanueva, Cartagena de Indias, en el que indica que las cepas aisladas de *klebsiella pneumoniae* pueden provenir de una o varias vacas con mastitis coliforme, que se encontraban enfermas al momento del ordeño, otra causa pudo ser que el personal manipulador de alimentos en ese momento se encontraba enfermo.

Los resultados obtenidos indican deficiencia higiénica, por lo tanto no es apto para en consumo humano, alimentos contaminados con cepas resistente a los antibiótico pueden provocar graves daños a la salud del consumidor, como también puede generar grandes pérdidas económicas para el estado y para la familia, un paciente que presenta multiresistencia antimicrobiana, prolonga la estancia en el hospital, incrementa gasto médicos y aumenta el riesgo de morbilidad.

### **3.2 Perfil de resistencia/susceptibilidad**

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad realizados en las 53 cepas de enterobacterias serán analizadas de manera individual por género y especie, utilizando antimicrobianos indicados por la Clínica and Laboratory Estándar Intitute (ANEXO A y B), específicos para

enterobacterias, los grupos de antimicrobianos son: betalactámicos, cefalosporinas de tercera generación, inhibidores de betalactamasa, carbapenem y quinolonas.

**Tabla 3-3:** Resultado del Antibiograma

MUESTREO 1									
Cód.	Cepa aislada	ANTIMICROBIANO							
		AM	AMC	CTX	CRO	FOX	CAZ	IMP	CIP
QA	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	R	S	S	R
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
QB	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
QC	<i>no existió crecimiento bacteriano</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
QD	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	I	S
	<i>Shigella sonnei</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
QE	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	R	S	S	S
	<i>E. coli</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
QF	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	S	S	R	S	S	S
MUESTREO 2									
QA	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	R	S	S	S
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	S	I	S	I	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	I	S
QB	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. coli</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
QC	<i>Shigella sonnei</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
	<i>E. coli</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
QD	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	I	R	S	S	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	I	S
QE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
	<i>E. coli</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
QF	<i>Enterobacter cloacae</i>	I	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. coli</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	S	S	R	S	S	S
MUESTREO 3									
QA	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	R	S	S	S
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	S	I	S	I	S	S

	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	I	S
<b>QB</b>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	S	S	R	S	S	S
	<i>E. coli</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>QC</b>	<i>Shigella sonnei</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>QD</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>QE</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
	<i>Shigella sonnei</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>SQF</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	S	S	R	S	S	S
<b>TOTAL 53 CEPAS AISLADAS</b>	<b>S%</b>	10	53	100	83	85	96	92	100
	<b>I%</b>	15	0	0	4	0	4	8	0
	<b>R%</b>	75	47	0	13	15	0	0	0

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

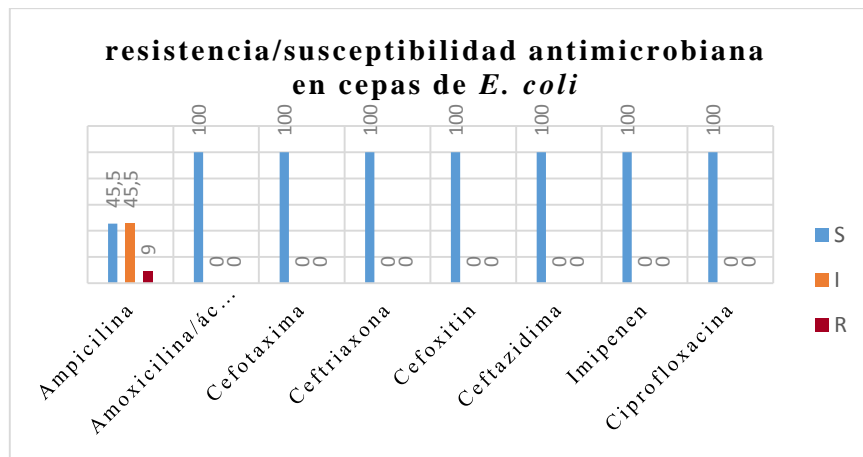
Las 53 cepas de enterobacterias mostraron sensibilidad 100% a cefotaxima y ciprofloxacina, 96% a ceftazidima, 92% a imipenem, 85% a ceftaxina, 83% a ceftriaxona, 53% a amoxicilina/ácido clavulánico y 10% a ampicilina.

El 90% de cepas aisladas son resistentes a ampicilina, datos concordantes con bibliografía de Bertram G. en cual indica que todas las enterobacterias son resistentes a la ampicilina, porque son productoras de enzimas betalactamasa las cuales hidrolizan el anillo betalactámico de los antimicrobianos evitando que este ingrese las bacterias y las elimine.

**Tabla 4-3:** Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *E. coli*

<i>E. coli</i> (n=11)			
Antimicrobiano	S %	I %	R %
Ampicilina	45.5	45.5	9.0
Amoxicilina/ác. Clavulánico	45.5	0	0
Cefotaxima	100	0	0
Ceftriaxona	100	0	0
Cefoxitin	100	0	0
Ceftazidima	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015



**Figura 2-3:** Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de *E. coli* aisladas en queso fresco (n=11)

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad realizadas en las 11 cepas de *E. coli* se muestra en la (tabla 4-3). El 45.5 % (5/11) de las cepas fueron sensibles a los antibacterianos betalactámicos, penicilina (Ampicilina), los betalactámicos de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, cefoxitin, ceftazidima), los carbapenem (Imipenem), las quinolonas antibacterianas (ciprofloxacina) y la combinación de penicilina con inhibidores de betalactamasa (Amoxicilina/ácido clavulánico) fueron los antibióticos con mayor actividad sobre las cepas estudiadas (100%)

La resistencia a la ampicilina se observó en el 9 % de las (cepas 1/11).

La susceptibilidad intermedia solo evidencio con Ampicilina en 45.5% (5/11).

Estos resultados son similares a los descritos por Guillén Leidy y Araque (2014), quien reporta la presencia de *E. coli* resistente a betalactámicos en un 24,4% en muestras de crema de leche, cuajada y requesón, los cuales fueron adquiridos en diferentes establecimientos comerciales de la ciudad de Mérida. Sin embargo Guillén et al, menciona que porcentajes superiores a los obtenidos en este estudio fueron registrados en la región de Jammu (India) donde la prevalencia de cepas de *E. coli* resistente a ampicilina, a cefalotina y a los aminoglucósidos mayor del 30% en productos lácteos fermentados con procesamiento artesanal.

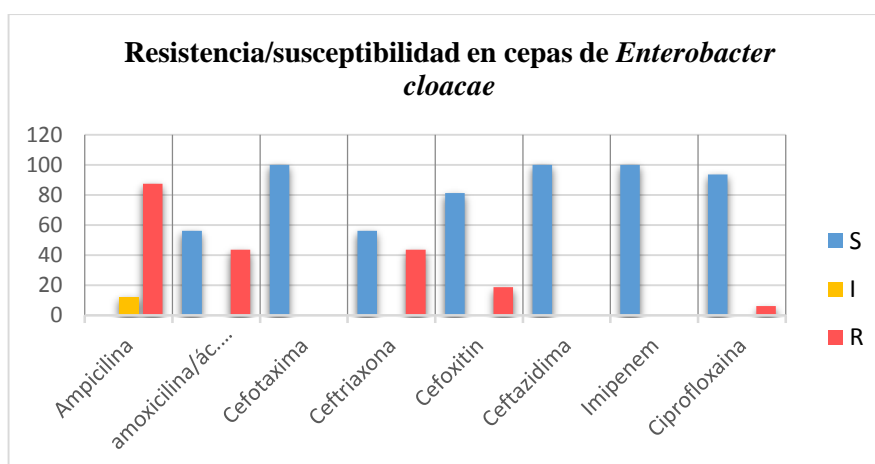
Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con bibliografía de Bertram G. el cual indica que cepas de *E. coli* que antiguamente fueron susceptibles a ampicilina, actualmente producen enzimas betalactamasas las cuales hidrolizan al antibiótico betalactámico impidiendo que este actúe contra la bacteria, lo que evita el uso de este antibiótico para la terapéutica empírica en infecciones del tracto urinario.

Al respecto Guillén Leidy y Araque (2014), ha descrito que el uso de los antibióticos como terapéuticos, profilácticos y promotores del crecimiento en animales destinados al consumo humano han contribuido con la aparición de cepas bacterianas resistente.

**Tabla 5-3:** Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Enterobacter cloacae*

<i>Enterobacter cloacae</i> (16)			
Antimicrobiano	S %	I %	R %
Ampicilina	0	12,5	87,5
Amoxicilina/ác. Clavulánico	56,3	0	43,8
Cefotaxima	100	0	0
Ceftriaxona	56,25	0	43,75
Cefoxitin	81,25	0	18,75
Ceftazidima	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Ciprofloxacina	93,75	0	6,25

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015



**Figura 3-3:** Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de *Enterobacter cloacae* aisladas en queso fresco (n= 16)

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

El 100% (16/16) de cepas de *Enterobacter cloacae* es susceptible en cefotaxima, Ceftazidima y imipenem, 93.7 % para ciprofloxacina, 81% para cefoxitin 56.3 % para amoxicilina/ ácido clavulánico y ceftriaxona, susceptibilidad 0% para Ampicilina.

Famiglietti et al, realizó un consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, en el cual nos indica que *Enterobacter cloacae* presenta mecanismo de resistencia natural para ampicilina, coincidiendo con los datos bibliográficos por el autor Bertram G. el cual indica que las ampicilinas no son activas contra *Enterobacter cloacae*. Los resultados de mi investigación coinciden con los datos antes mencionados.

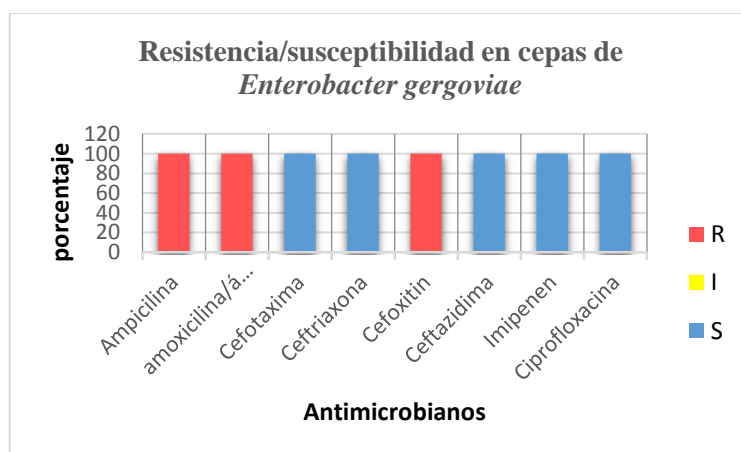
*Enterobacter cloacae* es productor de una betalactamasa tipo AmpC inducible clases 1, el cual le confiere resistencia a amoxicilina con o sin la presencia de un inhibidor de betalactamasa, como podemos observar en la (figura 4-3) el 48,3% de cepas son resistente a ampicilina acido/clavulánico.

Patricio et al, (1998) las cepas de *Enterobacter cloacae* aisladas en Chile en un hospital de alta complejidad, no encontró resistencia a imipenem entre las cepas de *Enterobacter cloacae* y la sensibilidad de este agente antibacteriano. Pues los agentes carbapenémicos son activos contra *Enterobacter cloacae*, que sean aislados en muestras clínicas como aquellos aislados en alimentos. Valores inferiores son indicados para Cefotaxima (38%) ya que en mi investigación muestra una sensibilidad del 100%, esta variación puede deberse en el hospital se está utilizando en mayor cantidad Cefotaxima y las cepas se vuelven resistentes.

**Tabla 6-3:** Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Enterobacter gergoviae*

<i>Enterobacter gergoviae</i> (n= 4)			
Antimicrobiano	S %	I %	R %
Ampicilina	0	0	100
Amoxicilina/ác. Clavulánico	0	0	100
Cefotaxima	100	0	0
Ceftriaxona	100	0	0
Cefoxitin	0	0	100
Ceftazidima	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015



**Figura 4-3:** Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de *Enterobacter gergoviae* en queso fresco (n= 3)

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

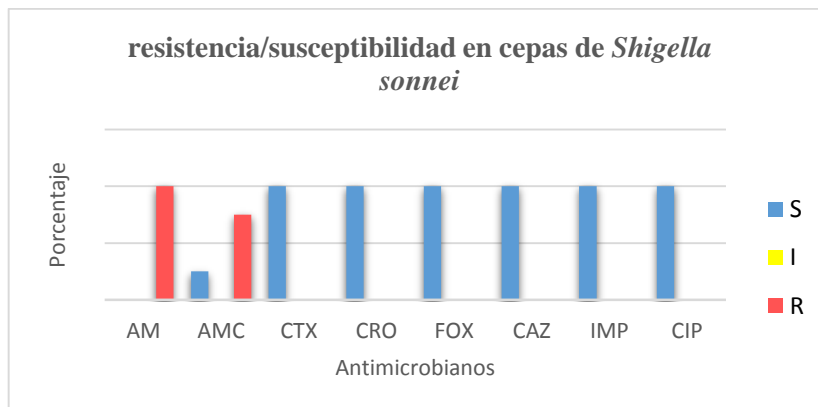
En la figura (5-3), *Enterobacter gergoviae*, presenta multiresistencia a los antimicrobianos utilizados (más de dos fármacos resistentes en dicha cepa), el 100% de cepas fueron resistentes a ampicilina, amoxicilina ácido clavulánico y cefoxitin.

Estudios realizados por la revista Colombia Médica en el año 2002, por María del Pilar, corrobora los resultados obtenidos en esta investigación, ya que el 100% de cepas de *Enterobacter aerogenes* son resistentes a ampicilina, amoxicilina y cefoxitin, mientras que presenta sensibilidad de 100% para cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, Imipenem y ciprofloxacina. *Enterobacter aerogenes* ha combinado dos mecanismos de resistencia, 1) producción de enzimas inactivadoras de antibiótico (betalactamasa) generando una mayor concentración de AmpC, y 2) cambio la permeabilidad, o mecanismo de bombeo hacia el exterior, evitando que el fármaco ingrese a la célula bacteria para cumplir con su función.

**Tabla 7-3:** Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Shigella sonnei*

..... <i>Shigella sonnei</i> (n= 4)			
Antimicrobiano	S %	I %	R %
Ampicilina	0	0	100
Amoxicilina/ác. Clavulánico	25	0	75
Cefotaxima	100	0	0
Ceftriaxona	100	0	0
Cefoxitin	100	0	0
Ceftazidima	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015



**Figura 5-3:** Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de *Shigella sonnei* aisladas en queso fresco (n= 3)

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015



En la (tabla 7-3) y (figura 6-3) *Shigella sonnei* presenta resistencia a Ampicilina en un 100% (3/3) cepas aisladas, 75% (2/3) a amoxicilina/ácido clavulánico. Resistencia al 100% (3/3) a cefotaxima, ceftriaxona, cefoxitin, ceftazidima, Imipenem y ciprofloxacina.

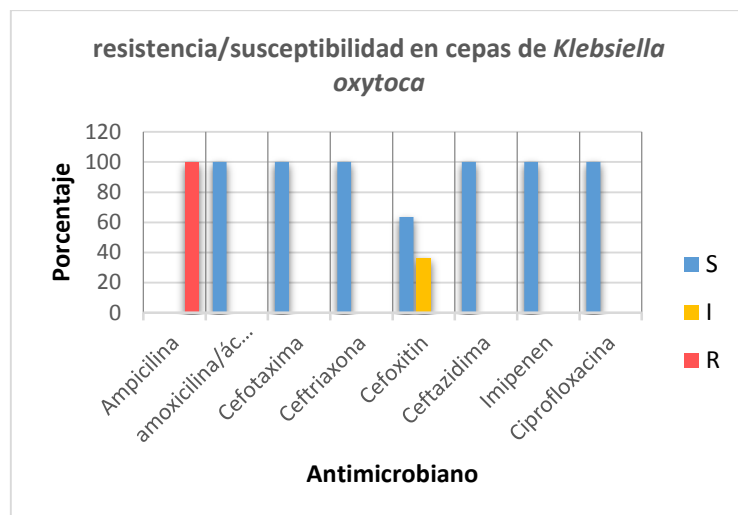
Un grupo de Microbiología, en el Instituto Nacional de salud de Colombia, realizaron un estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* spp., en los datos obtenidos en un programa de vigilancia desde 1998 a 2010. La resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico está en 62% presentando valores bajos en cuanto a esta investigación, teniendo en cuenta que no solamente se trata de *Shigella sonnei*, pues el estudio abarca todas las especies de *Shigella*, por tal razón los valores puede cambiar de especie a otra. Para antimicrobianos ceftazidima, Cefotaxima y Ciprofloxacina tienen un perfil de sensibilidad del 100%.

La investigación realizada por Alicia et al, muestra datos de sensibilidad (17,3%) de cepas sensibles a todos los antimicrobianos estudiados, nuestros datos revelan cepas de *Shigella sonnei* sensibles al 75% de los fármacos utilizados. Esta variación puede deberse a la cantidad de cepas utilizadas, pues Alicia et al, utiliza 277 cepas de *Shigella sonnei*, en esta investigación solo utilizó tres cepas de *Shigella sonnei*, otra variante de este resultado son los antimicrobianos utilizados, los valores de resistencia a ampicilina y amoxicilina ácido clavulánico concuerda, presentando una resistencia superior al 75% de cepas.

**Tabla 8-3:** Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Klebsiella oxytoca*

<i>Shigella Klebsiella oxytoca</i> (n= 11)			
Antimicrobiano	S %	I %	R %
Ampicilina	0	0	100
Amoxicilina/ác. Clavulánico	100	0	0
Cefotaxima	100	0	0
Ceftriaxona	100	0	0
Cefoxitin	64	0	36
Ceftazidima	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0

Reanalizado por: Ana Barrionuevo, 2015



**Figura 6-3:** Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de *Klebsiella oxytoca* aisladas en queso fresco (n= 11)  
**Realizado por:** Ana Barrionuevo

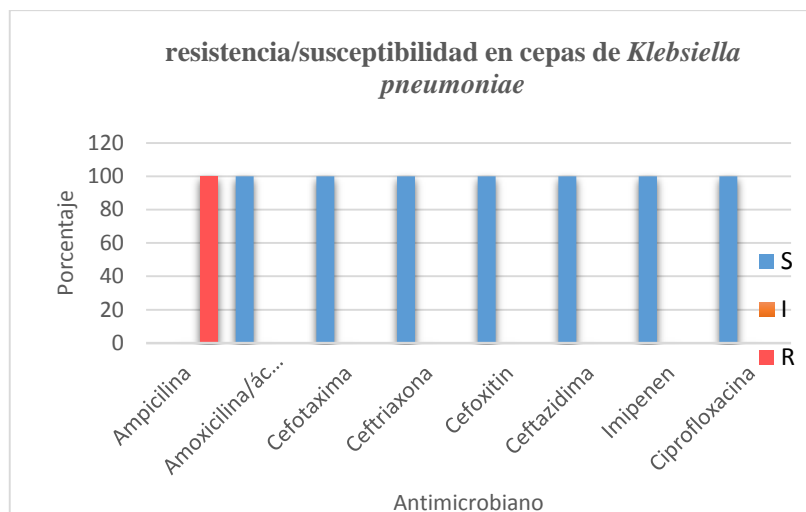
En la (tabla 8-3) y (figura 7-3), nos muestra que el 100% (11/11) de cepas de *Klebsiella oxytoca*, presenta resistencia únicamente a ampicilina, de manera satisfactoria *Enterobacter oxytoca* es activa frente a antimicrobianos tales como amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, Imipenem y ciprofloxacina, y una sensibilidad intermedia a cefoxitin.

Además presenta una sensibilidad intermedia a Cefoxitin perteneciente al grupo de cefalosporinas de segunda generación, algunas betalactamasas tiene la capacidad de hidrolizar a cefalosporinas de segunda generación. Bertram G, indica que este antibacteriano es habitualmente susceptible. El cual corrobora a los resultados obtenidos en esta investigación ya que presenta 36% de sensibilidad intermedia.

**Tabla 9-3:** Resistencia/susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Klebsiella pneumoniae*

<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n= 3)			
Antimicrobiano	S %	I %	R %
Ampicilina	0	100	0
Amoxicilina/ác. clavulánico	100	0	0
Cefotaxima	100	0	0
Ceftriaxona	100	0	0
Cefoxitin	100	0	0
Ceftazidima	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0

**Realizado por:** Ana Barrionuevo, 2015



**Figura 7-3:** Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en queso fresco (n= 3)

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015

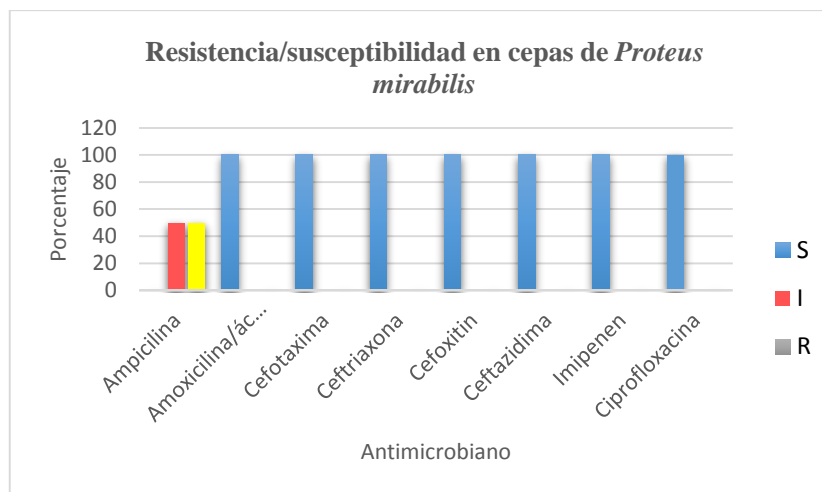
En la (tabla 9-3) y (figura 8-3) se analizan resultados que concuerdan con investigaciones realizadas por la Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, la resistencia a ampicilina se ha mantenido a lo largo de la década en cifras superiores al 90%, estos resultados demuestran la ineficiencia de estos antibióticos para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae*, y consideran que deberían ser eliminados del antibiograma para este patógeno. Conclusiones similares fueron descritas en publicaciones anteriores del Grupo Venezolano de Vigilancia de la resistencia bacteriana, cuando ya fue evidente que el 90% de los aislados de *K. pneumoniae* eran resistentes a ampicilina.

La resistencia natural a ampicilina esta medida por la producción betalactamasa, la cual hidroliza el anillo betalactámico de los antimicrobianos impidiendo que este actué sobre la bacteria.

**Tabla 10-3:** porcentaje resistencia/susceptibilidad en cepas de *Proteus mirabilis*

<i>Proteus mirabilis</i> (n= 2)			
Antimicrobiano	S %	I %	R %
Ampicilina	0	50	50
Amoxicilina/ác. Clavulánico	100	0	0
Cefotaxima	100	0	0
Ceftriaxona	100	0	0
Cefoxitin	100	0	0
Ceftazidima	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0

Realizado por: Ana Barrionuevo, 2015



**Figura 8-3:** Perfil de resistencia/susceptibilidad en cepas de *Proteus mirabilis* aisladas en queso fresco (n= 2)

**Realizado por:** Ana Barrionuevo, 2015

En la (tabla 10-3) y (figura 9-3) *Proteus mirabilis* muestra sensibilidad del 100% (2/2) en cepas aisladas frente a inhibidores de betalactamasa (amoxicilina /ácido clavulánico), cefalosporinas de segunda generación (cefoxitin), cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), carbapenemico (imipenem) y quinolonas (ciprofloxacina), y 50% de resistencia a Ampicilina.

Rodríguez et al, (2005) menciona en su investigación que *Proteus mirabilis* es uno de los miembros de la familia Enterobacteriaceae más sensible, debido entre otras causas a la ausencia de betalactamasas cromosómicas. La resistencia en esta especie se debe fundamentalmente a la adquisición de betalactamasa plasmídicas, siendo TEM-1 la más frecuentemente detectada, por esta es la causa de la resistencia a la ampicilina. Los resultados obtenidos por Rodríguez et al, son totalmente diferentes a los obtenidos en esta investigación, el 54% fueron susceptibles a todos los antibióticos betalactámicos ensayados, 28% resistentes a aminopenicilinas y cefalosporinas de segunda generación, y el 18% resistentes a cefalosporinas de tercera generación.

La gran diferencia que existe entre los resultados analizados por Rodríguez y los de esta investigación, puede ser porque las cepas aisladas fueron de pacientes atendidos en un hospital, y las de este estudio fueron obtenidas de muestras de queso proveniente de queseras artesanales, la otra razón puede ser porque Rodríguez analiza 87 cepas mientras que en esta se únicamente se utilizan 2 cepas, mientras que mayor cantidad de datos se tiene los resultados obtenidos son confiables.

Rodríguez et al, concuerdan que las cepas de *Proteus* son más sensibles que todas las enterobacterias, por la ausencia de betalactamasa cromosómica.

## CONCLUSIONES

- 1) Las muestras de queso fueron recolectadas siguiendo los pasos indicados por la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-2:2013, realizando de manera adecuada la toma, transportar y preparación de las muestras para el análisis microbiológicos.
- 2) Los quesos elaborados de manera artesanal en zonas rurales de Riobamba no cumplen con la Norma Técnica Ecuatoriana 1528:2012, para el recuento de enterobacteria la cual estable un valor aceptable de  $2 \times 10^2$  UFC/g, los valores obtenidos en esta investigación se encuentran entre  $8.86 \times 10^3$  UFC/g y  $9.86 \times 10^4$  UFC/g, sobre pasando, los limes aceptables establecidos por la norma, convirtiendo este producto en un riesgo para la salud del consumidor.
- 3) En los quesos elaborados en las queseras provenientes de San Juan, Química y Pungalá se aisló 53 cepas de enterobacterias, correspondientes a 30% *Enterobacter cloacae*, 21% *E. coli* y *klebsiella oxytoca*, 8% *Enterobacter gergoviae* y *Shigella sonnei*, 5% *klebsiella pneumoniae*, 4% *Enterobacter aerogenes* y *Proteus mirabilis*.
- 4) Todas las cepas aisladas son 100% susceptibles a cefotaxima y ciprofloxacina, 96% ceftazidima, %92 imipenen, 85% ceftaxitin, 83% ceftriaxona, 53% amoxicilina/ácido clavulánico y un 10% para ampicilina, este 10% enterobacterias sensibles a ampicilina corresponde a cepas de *E. coli*.
- 5) Las cepas aisladas presentan 75% de resistencia a ampicilina, 47% a amoxicilina ácido clavulánico, 13% a ceftriaxona, 15% a ceftaxitin.

## **RECOMENDACIONES**

Implementación de un manual de calidad en las queseras artesanales que incluya capacitación del personal que está a cargo de la manipulación de la materia prima y del personal encargado de elaboración de quesos.

Se recomienda hacer un monitores de quesos desde la obtención de la materia primas hasta el producto final, en cada una de sus etapas, para saber con exactitud en qué etapa de elaboración se está contaminando con enterobacterias, y tomar medidas de precaución.

Para el estudio de resistencia susceptibilidad se recomienda hacer más muestreos como tiempo mínimo de 1 una año, para obtener datos confiables y estadísticamente significativos.

Realizar un estudio resistencia susceptibilidad en enterobacterias presentes en alimentos y compararlas con las enterobacterias aisladas en pacientes hospitalizados.

## GLOSARIO

<b>RBA</b>	Resistencia Bacteriana a los Antibióticos
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>Cm</b>	Centímetros
<b>ETAs</b>	Enfermedades transmitidas por los Alimentos
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos)
<b>g</b>	Gramos
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligramos
<b>NTE</b>	Norma Técnica Ecuatoriana
<b>%</b>	Porcentaje
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PABA</b>	Ácido- <i>p</i> -aminobenzoico
<b>REDNARBE</b>	Red Nacional de Resistencia Bacteriana de Ecuador
<b>t</b>	Tiempo
<b>T°</b>	Temperatura
<b>μL</b>	Microlitro
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>VRBG</b>	Bilis rojo-violeta con Glucosa
<b>LIA</b>	Lisina Hierro Agar

## BIBLIOGRAFIA

1. **ALICIA et al**, *Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de Shigella Sonnei aisladas durante tres periodos diferentes en la Región Metropolitana, Chile*. [en línea] Chile, [consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v30n6/art07.pdf>
2. **ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto**. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. 2ª Edición. Madrid-España. Garsi S.A. 1990. pp. 29-39, 111-144
3. **ALVARADO, V; et al. Chávez:** “Resistencia antimicrobiana de cepas de Staphylococcus aureus, costa Rica”. “*Revista Costarricense de Salud Pública*”*SCIELO*. [en línea], 2011, (Costa Rica) 20(2). [Consultado: 30 octubre 2015]. ISSN 1409-1429. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292011000200006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292011000200006&script=sci_arttext)
4. **ARTURO, Q. M et al**. *Recuperar la salud integral y la armonía de los ecosistemas, para contener la resistencia bacteriana a los antibióticos*. [en línea]. Ecuador: ReACT Globla, 2011 [Consultado: 18 enero 2016]. Disponible en: <http://www.reactgroup.org/uploads/who-we-are/rla/RLA-recuperar-la-salud.pdf>
5. **AUSINA RUIZ, Vicente., & MORENO GUILLÉN, Santiago**. *Tratado de SEIMAC de las enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Buenos Aires – Madrid: Médica Panamericana, 2005, p. 338.
6. **BAILEY & SCOTT**. *Diagóstico Microbiológico*. 12ª ed. Buenos Aires – Argentina: Médica Panamericana, 2007, pp. 185, 323-327.
7. **BERTRAM, K. M**. *Farmacología básica y clínica*. 8ª ed. México-Santafé de Bogotá: El manual moderno, 2002, pp. 848-850
8. **CASTILLO SEGOVIA, Glenda Elizabeth**. *Prevalencia de bacterias patógenas listeria monocytogenes y Staphylococcus aureus en quesos frescos elaborados artesanalmente en las parroquias rurales del cantón Riobamba*. (Tesis Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencia, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba- Ecuador. 2013. pp 113-193



9. **CASTILLO SHELLY, Roser; & LAGARRIGA, Jasep.** *Productos lácteos Tecnología.* Barcelona – España: Politext, 2004, p. 19
10. **CASTILLO C y HUALPA D.** *Consumo de lácteos sin procesar un riesgo latente* [en línea]. Loja. Universidad Técnica Particular de Loja. [Consultado: 20 octubre 2015]. Disponible en [http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036\\_Inocuidad%20de%20los%20alimentos.pdf](http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036_Inocuidad%20de%20los%20alimentos.pdf)
11. **CASTRO, M.** *BACTERIOLOGÍA MÉDICA basada en problemas.* 2<sup>da</sup> ed. México: Manual Moderno S.A de c.v. 2014
12. **CORTECERO MORÉ, Luz Karime, & BENÍTEZ BELLIDO, Jamenso Luis.** *Evaluación de resistencia bacteriana a antibióticos oxitetraciclina y eritromicina en quesos frescos costeños del departamnete de Bolívar provenientes de los municipios de Arjona y Villanueva* (tesis pregrado) Universidad de Cartagena, Facultada de Ingeniera, Programa de Ingeniería de alimentos. 2011. pp. 35-56
13. **CAVALLINI, R. et al:** *Bacteriología General principios y prácticas de laboratorio.* Costa Rica; Universidad de Costa Rica, 2005, p 69
14. **FAMIGLIETTI, A; et al. Soloaga:** “Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacterias”. “*Revista Argentina de Microbiología SCIELO*” [en línea], 2005, (United State of Ameriaca) 1851-7617(37). [Consultado: 18 enero 2016]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=s0325-75412005000100008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=s0325-75412005000100008&script=sci_arttext)
15. **FARIA, J; et al.,** “Resistencia a los antimicrobianos de Enterococos aislados de leche cruda”. *Revista Científica Venezolana* [en línea]. Venezuela, 2002 (United State of America) 29-35(12), pp. 29-31 [Consultado: 20 octubre 2015]. Disponible: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27593/2/articulo6.pdf>
16. **FARIA, J; et al;** “Sensibilidad a los agentes antimicrobianos en algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito”. *Revista científica Venezolana* [en línea]. Venezuela, 2005 (United State of America) 227-235 (3), p. 1. [Consultado: 20 octubre 2015]. Disponible: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28313/2/art5.pdf>

17. **FLORENTÍN, A.** “Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción”. *SCILEO* [en línea], 2007, (Paraguay) 5(1), p. 19 [Consulta: 18 Octubre 2015]. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v5n1/v5n1a05.pdf>
18. **FLÓREZ, A.** *Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia.*(tesis Doctoral) Universidad de Oviedo. Departamento de Biología Microbiología. 2007. pp. 136 [Consulta: 2015-10-25]. Disponible en : [digital.csic.es/.../1/TESIS%20Ana%20Belén%20Flórez%20rotada.pdf](http://digital.csic.es/.../1/TESIS%20Ana%20Belén%20Flórez%20rotada.pdf)
19. **FLORES, A; et al.** *Utilización de la DGGE para la identificar la microbiota resistente a antibióticos en queso y estudiar su evolución a lo largo del tiempo.* [En línea]. Asturias: IPLA-CSIC, 2004. Disponible en: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/108482/4/DGGE\\_microbiota\\_Florez.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/108482/4/DGGE_microbiota_Florez.pdf)
20. **KOOLMAN, Jan; & HEINRICH ROHM, Klaus.** *BIOQUÍMICA Texto y Atlas*, 3<sup>ra</sup> ed. Madrid: Médica panamericana, 2004, p 256
21. **GALÍ, Z.** *Enterobacterias. Antibioticoterapia.* [en línea]. UPUA. 2012 [Consultado: 10 agosto 2015]
22. **GIL, A.** *Tratado de nutrición. Tomo II composición y calidad Nutritiva e los Alimentos.* 2<sup>a</sup> ed. Madrid. Medica panamericana, 2010, pp. 21-22
23. **HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Manuel & SASTRE GALLEGO, Ana.** *Tratados de nutrición.* Madrid-España: Díaz de Santos, 1999. pp. 516-519
24. **FERRAN, Risueño; et al. Otero:** *lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias* [en línea] Servicio de microbiología. Barcelona. España [Consulta: 18 enero 2016]. Disponible en [http://www.sld.cu/tios/apua-cuba/lectura\\_interpretada\\_del\\_antibiograma\\_de\\_enterobacterias.pdf](http://www.sld.cu/tios/apua-cuba/lectura_interpretada_del_antibiograma_de_enterobacterias.pdf)
25. **GARCÍA, J; et al. Guzmán:** “Susceptibilidad Antimicrobiana *in vitro* de enterobacterias nosocomiales productoras de betalactamasas de espectro expandido, Cumaná, estado Sucre”. “*Kasmera*”*SCIELO.* [en línea], 2009, (United State of America) 0075-5222(37). [Consultado: 21 enero 2016]. Disponible en:

[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt&pid=S0075-52222009000100005](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt&pid=S0075-52222009000100005)

26. **GARCIA DEL VALLE, Araceli; & ZAMUDIO DURÁN, Mercedes.** *Manual de prácticas de Microbiología médica.* Juárez: Universidad Autónoma de la Ciudad de Juárez. 1998, pp. 71-72.
27. **GUILLÉN et al,** *caracterización molecular de cepas de Escherichia coli aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela.* [en línea]. 2014, (Mérida) 18(3), [Consulta: 20 enero 2016]. ISSN 0123-9392. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-93922014000300005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-93922014000300005&script=sci_arttext)
28. **GONZÁLEZ, M.** *Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt.* [en línea]. Panamá, 2002. [Consultado 20 agosto 2015]. Disponible en: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/399.pdf>
29. **GONZÁLEZ, R.** *Características de la composición físico química del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehuilaca.* (tesis pregrado). Universidad Veracruzana, Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz 2010. p 18 [consultado: 25 octubre 2015]. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/29722/1/Gonzalez%20Ramirez.pdf>
30. **GRUNER H, et al.** *Procesos de cocina.* Gruitzen – Alemania: Akal, S. A., 2005, p. 110
31. **INFORMACIÓN TERAPÉUTICA DEL SISTEMA NACIONAL DE SALUD,** [en línea] *resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria.* 2011 [consulta: 24 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
32. **MACFADDIN J.** *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* 3<sup>ra</sup> ed. Montevideo-Uruguay Editorial Médica Panamericana S.A, 2003, pp. 73-436
33. **MOSQUITO et al.** “Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea”. *Rev Peru Exp Salud Pública* [en línea], 2011. (United State of America) 28(4), pp. 148-151 [Consultada: 27 enero 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>

34. NIETO, M. A. *Análisis de Competitividad de la Cadena Agroalimentaria de la leche y sus derivados en el Ecuador, en el Circuito de Queserías Rurales*. (Tesis) (Pregardo). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Economía. Quito. 2002. pp 54-69.
35. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 1528:2012**. *Norma General para Queso Fresco No madurado Requisitos*. [en línea]. 2012. p. 4. [Consulta: 15 octubre 2015]. Obtenido de: <http://www.normalizacion.gob.ec/>.
36. **NORMAS CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100-S25**. [en línea]. 2015 [Consulta: 20 noviembre 2015]. Disponible en: [http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample\\_pdf/M100S25\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf)
37. OLIVAS, E. *Manula de practicas de Microbiologia I,II y paracitologia. Programa de Medicina*. Ciudad de Juárez.Universidad autonoma de la ciudad de Juárez, 2004, p. 29.
38. **OPS & OMS**. *Resistencia a los antimicrobianos*. [en línea] Centro de prensa, 2015. [consulta: 20 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
39. **OPS & OMS**. *Resistencia a los antimicrobianos*. [en línea] Centro de prensa, 2013. [consulta: 20 octubre 2015]. Disponible en: [http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com\\_content&view=article&id=907:-el-primer-informe-mundial-de-la-oms-sobre-la-resistencia-a-los-antibioticos-pone-de-manifiesto-una-grave-amenaza-para-la-salud-publica-en-todo-el-mundo&catid=827:aft-02noticias-2013](http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=907:-el-primer-informe-mundial-de-la-oms-sobre-la-resistencia-a-los-antibioticos-pone-de-manifiesto-una-grave-amenaza-para-la-salud-publica-en-todo-el-mundo&catid=827:aft-02noticias-2013)
40. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA** .*Prevención de la E. coli en los alimentos*. [en línea] [Consultado: 15 octubre 2015]. Disponible en: [www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf)
41. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**, 2011 [en línea]. Resistencia antimicrobiana. [Consulta: 23 enero 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194>
42. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**, 2014 [en línea]. “El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave

amenaza para la salud pública en todo el mundo”. [Consulta: 23 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>

43. **OTTO, Sussmann.** *Resistencia bacteriana*. [en línea]. Javerina. [Consulta: 21 octubre 2015]. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/sl/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
44. **PEÑA, Yamila P.; HERNÁNDEZ, María E.; CASTILLO, Virginia L.** Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos. *Panorama Cuba y Salud*, n° 6 (2011). p. 30
45. **PÉREZ, C.** *Obtenido de Propiedades de la leche de cabra*. [en línea]. [Consultado: 24 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.natursan.net/leche-de-cabra-beneficios-y-propiedades/>
46. **PÉREZ, M; et al. Carmona:** “Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela análisis de una década”. “*Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*” *Scielo*. [en línea], 2001, (United State of America) 1351-2556(21). [Consultado: 21 enero 2016]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
47. **PRIETO, J; et al. Centelles:** Género *Staphylococcus* Madrid: UNIVERSIDAD COPLUTENSE MADRID. sf; p. 224
48. **QUESOS.** *Historia Del Queso*. [En línea]. Producción y consumo en el mundo. [Consultado 28 octubre 2015]. Disponible en: <http://quesos.es/historia-del-queso/produccion-y-consumo-en-el-mundo>
49. **QUEZADA, M.** *Enterobacteriaceae*. [en línea]. Facultad de Ciencias Químicas. [Consulta: 28- diciembre 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/MichelleQuezada/enterobacter-16991162>
50. **QUIJANO, J.** *Quimosinas*: Cali – Colombia: ReCiTeIA, 2010, p. 6
51. **RODRIGUEZ et al.** *resistencia enzimática a beta lactamicos en el género proteus y evaluación de los fenotipos y genotipos de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en proteus mirabilis*. 2005[en línea].El sevier. [consulta: 20 diciembre 2015]. Disponible en: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X05749247](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X05749247)

- 52. ROMERO, R.** *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias.* 3<sup>ra</sup> ed. Buenos Aires – Argentina: Médica Panamericana, 2007, pp. 743-746.
- 53. VÁZQUES, C.** *Alimentación y Nutrición-MANUAL TEÓRICO-PRÁCTICO.* 2<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Díaz de Santos, 2005 pp. 5-10
- 54. VILLALOBOS, L & MARTÍNEZ, R.** “Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004.” *revista de la sociedad Venezolana de Microbiología Scielo.* [en línea], 2006 (Venezuela) 26(1) [consulta: 20 noviembre 2015]. ISSN 1315-2556. Disponible: [www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562006000100007&script](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562006000100007&script)
- 55. VITERI, A.** *Sistema de control de calidad de queso fresco.* (en línea). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ingeniería de alimentos. [Publicado 12 agosto 2011]. [Consultado: 24 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/dicoeo/sistema-calidad-en-queso-fresco>
- 56. ZURITA, J.** “Epidemiología de la Resistencia bacteriana”. Facultad de Medicina PUCE Quito. 2010, Quito, p. 42

**ANEXOS**

**Anexo A:** Agrupaciones sugeridos de Agentes Antimicrobianos

Table 1C. Suggested Groupings of Antimicrobial Agents With US Food and Drug Administration Clinical Indications That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Anaerobic Organisms by Clinical Microbiology Laboratories in the United States

	<i>Bacteroides fragilis</i> Group and Other Gram-Negative Anaerobes	Gram-Positive Anaerobes <sup>b</sup>
<b>Group A Primary Test and Report</b>	Amoxicillin-clavulanate Ampicillin-sulbactam Piperacillin-tazobactam Ticarcillin-clavulanate	Ampicillin <sup>a</sup> Penicillin <sup>a</sup> Amoxicillin-clavulanate Ampicillin-sulbactam Piperacillin-tazobactam Ticarcillin-clavulanate
	Clindamycin	Clindamycin
	Doripenem Ertapenem Imipenem Meropenem	Doripenem Ertapenem Imipenem Meropenem
	Metronidazole	Metronidazole
<b>Group C Supplemental Report Selectively</b>	Penicillin <sup>a</sup> Ampicillin <sup>a</sup>	
	Cefotetan Cefoxitin	Cefotetan Cefoxitin
	Ceftizoxime Ceftriaxone	Ceftizoxime Ceftriaxone
	Chloramphenicol	
	Moxifloxacin	Moxifloxacin
	Piperacillin	Piperacillin  Tetracycline

**Fuente:** (NORMAS CLSI M100-S25, 2015, p. 48)

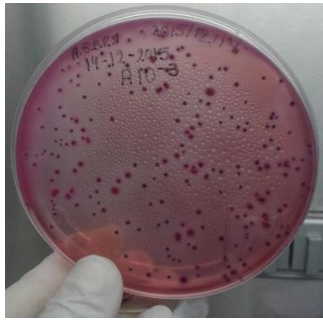
**Anexo B:** Tabla Patrones estándar del halo de inhibición para Enterobacterias

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
			Resistente	Intermedia	Sensible
<b>A</b>	Ampicilina <sup>a,c</sup>	10	≤13	14-16	≥17
	Cefalotina <sup>c,d</sup>	30	≤14	15-17	≥18
	Cefazolina <sup>c,d</sup>	30	≤14	15-17	≥18
	Gentamicina <sup>c</sup>	10	≤12	13-14	≥15
<b>B</b>	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	≤13	14-17	≥18
	Ampicilina/sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15
	Piperacilina/tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	≤14	15-19	≥20
	Mezlocilina	75	≤17	18-20	≥21
	Ticarcilina	75	≤14	15-19	≥20
	Piperacilina	100	≤17	18-20	≥21
	Cefamandol	30	≤14	15-17	≥18
	Cefonicid	30	≤14	15-17	≥18
	Cefuroxima (oral)	30	≤14	15-22	≥23
	Cefpodoxima	10	≤17	18-20	≥21
	Cefixima	5	≤15	16-18	≥19
	Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18
	Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16
	Cefmetazol	30	≤12	13-15	≥16
	Cefoperazona <sup>a</sup>	75	≤15	16-20	≥21
	Cefotaxima <sup>a,d</sup>	30	≤14	15-22	≥23
	Ceftizoxima <sup>a</sup>	30	≤14	15-19	≥20
	Ceftriaxona <sup>a,d</sup>	30	≤13	14-20	≥21
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17
Ciprofloxacino <sup>a,c</sup>	5	≤15	16-20	≥21	
Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	
Trimetoprim/sulfametoxazol <sup>a,c</sup>	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	
<b>C</b>	Ceftazidima <sup>e</sup>	30	≤14	15-17	≥18
	Aztreonam <sup>e</sup>	30	≤15	16-21	≥22
	Kanamicina	30	≤13	14-17	≥18
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15
	Tetraciclina <sup>c</sup>	30	≤14	15-18	≥19
	Cloranfenicol <sup>a</sup>	30	≤12	13-17	≥18
<b>D</b>	Carbenicilina	100	≤19	20-22	≥23
	Cinoxacino	100	≤14	15-18	≥19
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16
	Loracarbef <sup>f</sup>	30	≤14	15-17	≥18
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16
	Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16

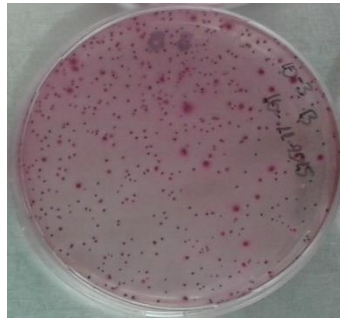
Fuente: Normas CLSI-NCCL, 2015



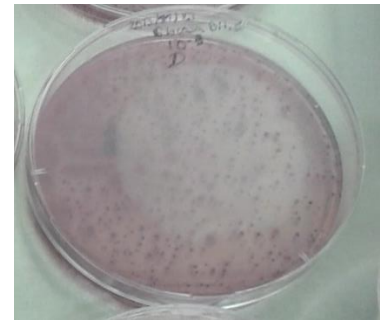
**Anexo C: Fotografías Enterobacterias en Agar glucosa Bilis Rojo Violeta**



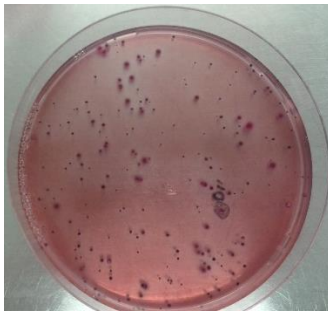
**Quesera A**



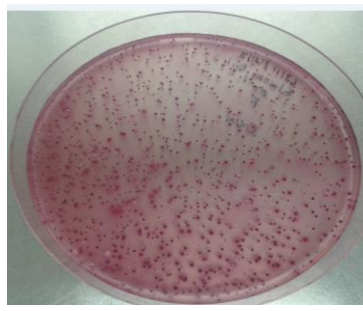
**Quesera B**



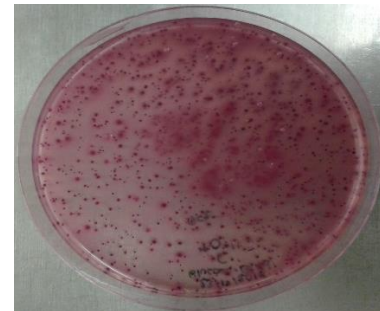
**Quesera C**



**Quesera D**

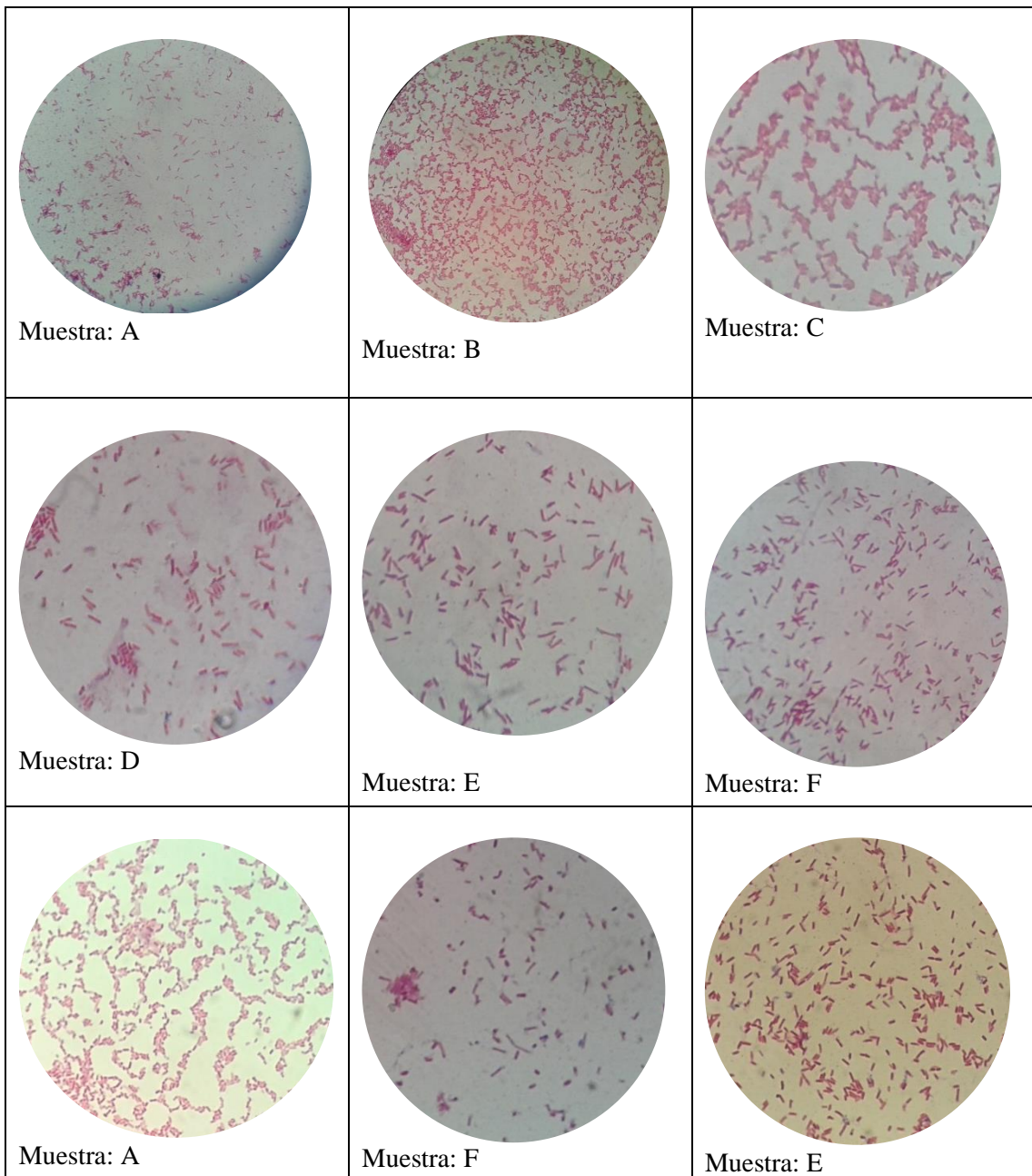


**Quesera F**



**Quesera E**

**Anexo D:** Fotografías de bacilos Gram negativos observados en el lente de 100X



**Anexo E:** Resultado de las pruebas Bioquímicas



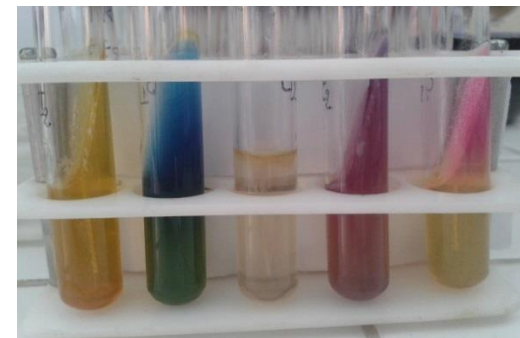
*E. coli* aislada de la quesera A



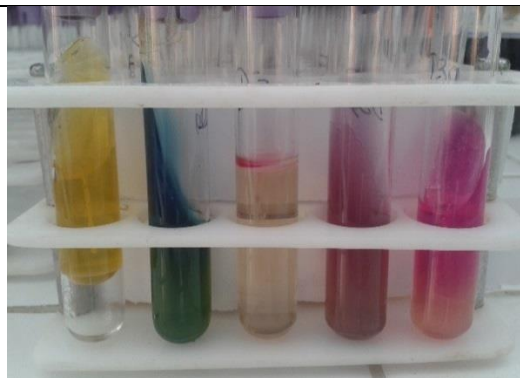
*Enterobacter cloacae* aislada en quesera A



*Enterobacter gergoviae* aislada de la quesera F



*Klebsiella pneumoniae* aislada de la quesera C



*Klebsiella oxytoca* aislada de la quesera D



*Proteus mirabilis* aislada de la quesera D

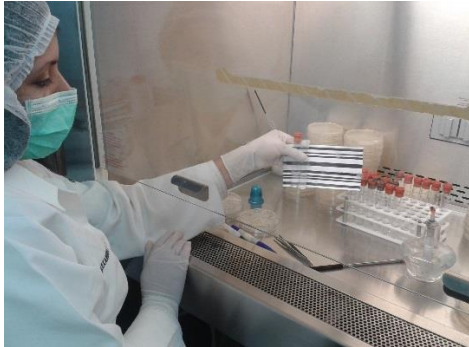


*Shigella sonnei* aisladas de la quesera E



*Enterobacter aerogenes* aislada de la quesera

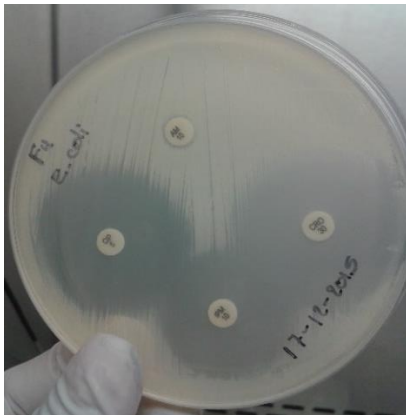
**Anexo F:** Resistencia/susceptibilidad en cepas de Enterobacterias



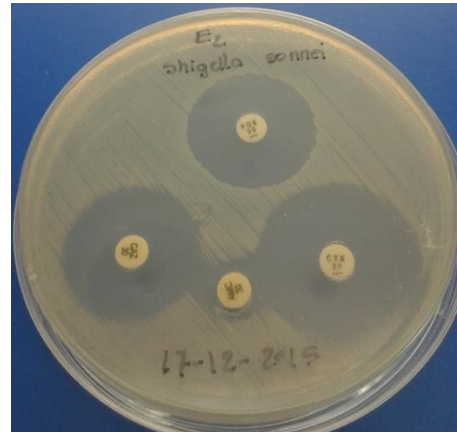
Comparación con el McFarland



Hisopado en las tres direcciones.



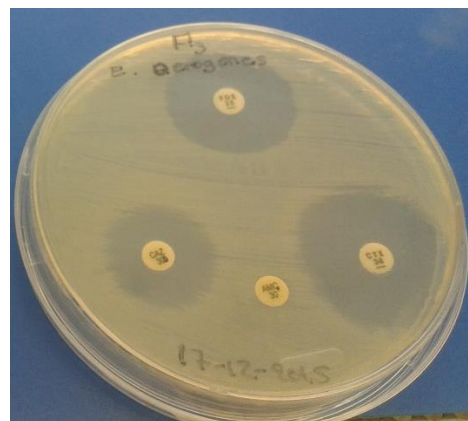
*E. coli* resistente a AM



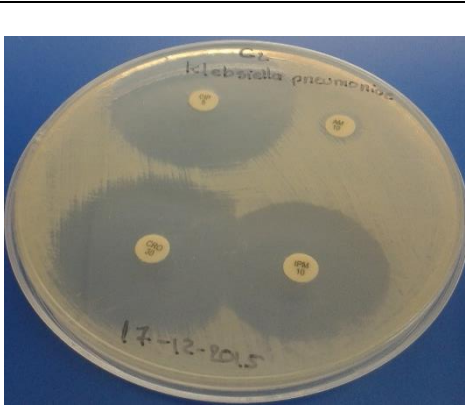
*Shigella sonnei* aislada de la quesera E



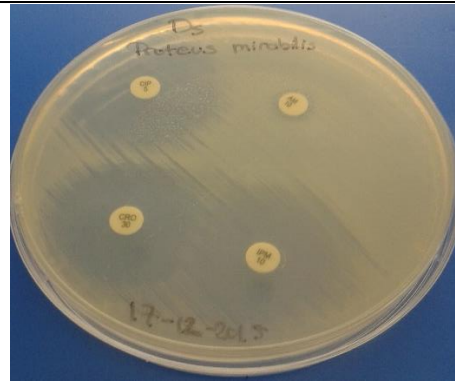
*E. aerogenes* resistente a AM



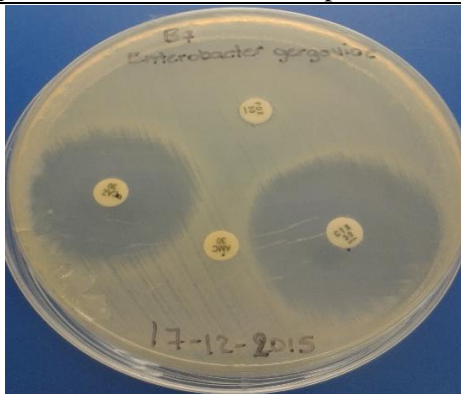
*E. aerogenes* resistente a AMC



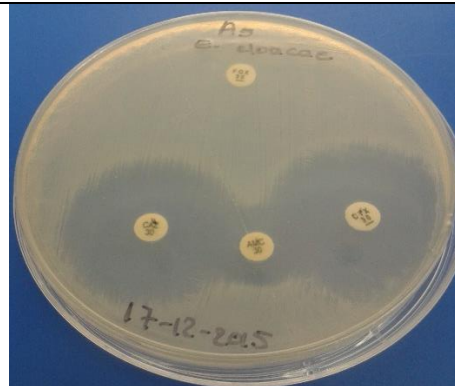
*K. pneumoniae* resistente a ampicilina



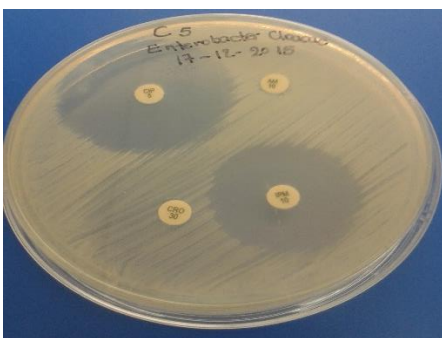
*Proteus mirabilis* resistente a AMP



*E. gergoviae* resistente a AMP y FOX



*E. cloacae* resistente al FOX



*E. cloacae* resistente al AM y CRO



*K. pneumoniae* sensible al FOX, CAZ, AMC y CTX

**Anexo H:** Queseras artesanales donde se tomó la muestra.



Quesera San Juan



Quesera Pungalá

## Anexo H: test de ANOVA

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Enterobacterias	18	0,84	0,77	24,12

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	101883,21	5	20376,64	12,24	0,0002
Procedencia	94197,04	2	47098,52	28,29	<0,0001
Quesera	819,45	1	819,45	0,49	0,4963
E. Evaluación	6866,73	2	3433,36	2,06	0,1699
Error	19976,59	12	1664,72		
Total	121859,80	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=62,84533

Error: 1664,7155 gl: 12

Procedencia Medias n E.E.

Pungala	238,88	6	16,66	A
San Juan	199,16	6	16,66	A
Quimiag	69,47	6	16,66	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=41,90672

Error: 1664,7155 gl: 12

Quesera Medias n E.E.

2,00	175,91	9	13,60	A
1,00	162,42	9	13,60	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=62,84533

Error: 1664,7155 gl: 12

E. Evaluación Medias n E.E.

1,00	196,07	6	16,66	A
30,00	161,13	6	16,66	A
15,00	150,30	6	16,66	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )