



**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

Determinación de la resistencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*  
meticilina resistente aislado de quesos frescos de la localidad de Canta,  
Lima-Perú

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

**AUTORA**

Reyes Arquino, Milagros Melissa  
ORCID: 0000-0002-7616-252X

**ASESOR**

Ramos Gorbeña, Juan Carlos  
ORCID: 0000-0002-9713-2653

Lima, Perú  
2023

## **Metadatos Complementarios**

### **Datos de autor**

Reyes Arquinigo, Milagros Melissa

Tipo de documento de identidad de la AUTORA: DNI

Número de documento de identidad de la AUTORA: 45422499

### **Datos de asesor**

Ramos Gorbeña, Juan Carlos

Tipo de documento de identidad del ASESOR: DNI

Número de documento de identidad del ASESOR: 10243429

### **Datos del jurado**

PRESIDENTE: Agurto Saenz, Tomás Rene

Número del documento de identidad: 07207884

ORCID: 0000-0001-5186-9265

MIEMBRO: Guerra Santa Cruz, Alcides

Número del documento de identidad: 28260663

ORCID: 0000-0002-5130-8190

MIEMBRO: Porras López, Graciela Marbetty

Número del documento de identidad: 43354966

ORCID: 0000-0003-2720-0750

### **Datos de investigación:**

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.01

Código del programa: 511206

## DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Milagros Melissa Reyes Arquinigo, con código de estudiante N°201320835, con DNI N° 45422499, con domicilio en Pasaje Las Fresas Mz c2 Lt 8 La flor, distrito Carabaylo, provincia y departamento de Lima.

En mi condición de bachiller en Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, declaro bajo juramento que:

La presente tesis titulado: **"Determinación de la resistencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente aislado de quesos frescos de la localidad de Canta, Lima-Perú"** es de mi única autoría, bajo el asesoramiento del docente Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña, y no existe plagio y/o copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica o de investigación, universidad, etc; el cual ha sido sometido al antiplagio Turnitin y tiene el 25% de similitud final.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en la tesis, el contenido de estas corresponde a las opiniones de ellos, y por las cuales no asumo responsabilidad, ya sean de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de internet.

Asimismo, ratifico plenamente que el contenido íntegro de la tesis es de mi conocimiento y autoría. Por tal motivo, asumo toda la responsabilidad de cualquier error u omisión en la tesis y soy consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de falsa declaración, me someto a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y a los dispositivos legales nacionales vigentes.

Surco, 09 de noviembre de 2023



Milagros Melissa Reyes Arquinigo  
DNI: 45422499



Mg. Mario Martín Palta Gálvez  
Jefe Unidad Grados y Títulos  
FCB

# Determinación de la resistencia de Escherichia coli y Staphylococcus aureus meticilina resistente aislado de quesos frescos de la localidad de Canta, Lima-Perú

## INFORME DE ORIGINALIDAD

25%

INDICE DE SIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

14%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://cybertesis.unmsm.edu.pe">cybertesis.unmsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	12%
2	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	5%
3	<a href="http://repositorio.unprg.edu.pe">repositorio.unprg.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	Lucio GONZÁLEZ-MONTIEL, Melitón Jesús FRANCO-FERNÁNDEZ. "Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña", Brazilian Journal of Food Technology, 2015 Publicación	1%
5	<a href="http://www.scielo.org.co">www.scielo.org.co</a> Fuente de Internet	1%
6	Submitted to United World College of the Adriatic Trabajo del estudiante	1%

7	<a href="http://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://repositorio.uigv.edu.pe">repositorio.uigv.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
9	<a href="http://view.genial.ly">view.genial.ly</a> Fuente de Internet	1%
10	Rhede, D.. "A three-dimensional method for calculating independent chemical U/Pb- and Th/Pb-ages of accessory minerals", <i>Chemical Geology</i> , 19960827 Publicación	1%
11	<a href="http://www.efsa.europa.eu">www.efsa.europa.eu</a> Fuente de Internet	<1%
12	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1%
13	<a href="http://repositorio.ucundinamarca.edu.co">repositorio.ucundinamarca.edu.co</a> Fuente de Internet	<1%
14	<a href="http://repositorio.urp.edu.pe">repositorio.urp.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
15	<a href="http://repositorio.upagu.edu.pe">repositorio.upagu.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
16	Submitted to University of Sydney Trabajo del estudiante	<1%

Excluir citas Activo

Excluir bibliografía Activo

## ***DEDICATORIA***

*A MIS PADRES, porque sin ellos no podría haber cumplido mis sueños, porque siempre me guían y me enseñan a ser perseverante en todo.*

*A MI HIJO, mi mejor regalo de vida, por brindarme la fuerza necesaria para seguir adelante.*

*A MI MADRINA, quien desde el inicio siempre me apoyo y estuvo todo el tiempo posible brindándome su sincero cariño.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Un agradecimiento especial al docente Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña, por su orientación, recomendaciones y su amplia experiencia profesional transmitida en la asesoría de esta tesis.

A los docentes Dra. Frida Náquira Velarde y el Dr. Menandro Ortiz Pretel, profesores del Laboratorio de Parasitología- Facultad de Medicina Humana (URP), por sus recomendaciones y apoyo brindado en todo momento de mi carrera.

## RESUMEN

La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos genera mucha preocupación porque podría convertirse en un problema de salud pública. Se evaluaron bacterias patógenas significativas en humanos aislados de quesos frescos distribuida en puestos de mercados provenientes de Canta. Se analizaron 50 cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* provenientes de la elaboración de productos lácteos artesanales (queso fresco). La susceptibilidad antimicrobiana se determinó utilizando 7 antibióticos a través del método de disco difusión, de las cepas de *E. coli* aisladas se encontró que el 42% (21/50) eran resistentes a Oxacilina (1ug) y a clindamicina con el 40% (20/50). El 34% (17/50) se encontró para las cepas aisladas de *S. aureus* con un aumento en la resistencia a vancomicina (30 ug). De los resultados obtenidos de la resistencia bacteriana de estas cepas se demostró que es importante el estudio de la sensibilidad antimicrobiana a lo largo del tiempo, debido a que los datos señalan multiresistencia y que este alimento necesita cobrar más relevancia en nuestro país.

Palabras clave: Resistencia, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

## ABSTRACT

The presence of antibiotic resistant bacteria is of great concern because it could become a public health problem. Significant pathogenic bacteria were evaluated in humans isolated from fresh cheeses distributed in market stalls from Canta. Fifty strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from the production of artisan dairy products (fresh cheese) were analyzed. The antimicrobial susceptibility was determined using 7 antibiotics through the diffusion disk method, of the isolated *E. coli* strains it was found that 42% (21/50) were resistant to Oxacillin (1ug) and clindamycin with 40% (20/50). 34% (17/50) were found for *S. aureus* isolates with increased resistance to vancomycin (30 ug). From the results obtained from the bacterial resistance of these strains, it was shown that the study of antimicrobial sensitivity over time is important, since the data indicates multi-resistance and that this food needs to become more relevant in our country.

Key words: Resistance, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
1.1. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	12
1.2. OBJETIVO GENERAL.....	14
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2. MARCO TEÓRICO .....	15
3. ANTECEDENTES.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
4.1. Lugar de ejecución.....	23
4.2. Obtención del material biológico.....	23
4.3. Preparación y dilución de las muestras .....	23
4.4. Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
4.5. Pruebas de la susceptibilidad antimicrobiana .....	26
4.5.1. Preparación del inóculo .....	26
4.5.2. Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland).....	26
4.5.3. Inoculación de las Placas .....	26
4.6. Aplicación de los discos.....	27
4.7. Incubación.....	27
4.8. Lectura de las placas e interpretación de los resultados.....	27
5. RESULTADOS .....	29
5.1. Identificación y aislamiento de <i>Escherichia coli</i> . .....	29
5.2. Identificación y aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	30
5.3. Evaluación de resistencia bacteriana frente a antibióticos.....	32
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1: ANTIBIÓTICOS Y DIÁMETROS CRÍTICOS PARA BACTERIAS ADAPTADOS DEL CFA-SFM, SEGÚN EL INCCLS 2001.....</b>	<b>21</b>
<b>TABLA N°2: PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE <i>E. coli</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>TABLA N°3: PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE <i>S. aéreos</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>TABLA N°4: SE MUESTRA LA SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE <i>E. COLI</i> A LOS ANTIBIÓTICOS SELECCIONADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>TABLA N°5: SE MUESTRA LA SUSCEPTIBILIDAD EN CEPAS DE <i>S. aureus</i> DNasa POSITIVA A LOS ANTIBIÓTICOS SELECCIONADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>TABLA N°6: PORCENTAJE DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LAS CEPAS de <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>TABLA 7. PORCENTAJE DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>31</b>

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, es una de las principales causas que afecta a la salud pública. El evento que afecta principalmente a las bacterias está directamente relacionado con el uso de los antimicrobianos en los animales como el ganado y posteriormente la propagación de las bacterias a través de los alimentos. Es así, que algunas cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente y *Escherichia coli* tienen la capacidad de encontrarse a través del aislamiento en productos lácteos como el queso fresco (producto final) obtenido de la materia prima (leche no pasteurizada), contaminada a lo largo de su producción, afectando la cadena alimentaria. Asimismo, la presencia de *S. aureus* puede producir enterotoxinas estafilocócicas, que están asociadas a intoxicación alimentaria en humanos y mastitis en animales, ocasionando serias pérdidas económicas desde la obtención de la materia prima (la leche no pasteurizada). A menudo, este problema puede evitarse con el cumplimiento y conocimiento de normas a las que se enfrenta el productor de queso artesanal.

La problemática no solo afecta la salud de las personas y animales, por tanto, es importante la prevención y vigilancia de las enfermedades bacterianas transmitidas por animales con el fin de disminuir la resistencia antimicrobiana a lo largo de toda la cadena productiva del queso.

Por consiguiente, es importante cumplir los criterios microbiológicos de la ICMSF en el establecimiento de las técnicas de análisis de riesgo para los alimentos en el Libro 2 (ICMSF, 2018), que se basan en el riesgo y difieren dependiendo de si el queso se ha elaborado con leche cruda, para cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Además, según la Resolución Ministerial Nacional N° 591-2008/MINSA; Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, establece que estas

especificaciones técnicas deberán ser cumplidas para alimentos elaborados y ser considerado apto para el consumo.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la resistencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente aislado de quesos frescos de la localidad de Canta.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de *S. aureus* en el queso ocasiona serias pérdidas económicas, el cual impacta en el ganado rumiante ocasionando infecciones graves intramamarias y en donde estas cepas son capaces de causar intoxicaciones alimentarias a partir de alimentos contaminados, incluidos la leche y los productos lácteos (Kümmel *et al.*, 2016). Por esta razón, es muy importante vigilar la cadena de almacenamiento y transporte de la materia prima, porque permite la multiplicación de los microorganismos mesófilos (Das *et al.*, 2015). Asimismo, en la elaboración de productos lácteos locales, las granjas lecheras comúnmente usan leche cruda para la producción de queso, dependen de pozos para el suministro de agua y tienen animales productores de leche cerca de las instalaciones. Estos factores pueden aumentar el riesgo de contaminación de los productos lácteos con bacterias patógenas (Bellio *et al.*, 2018).

Habitualmente este problema puede ser atendido siguiendo las recomendaciones de las normas de buenas prácticas o tener información acerca del tema. Sin embargo la leche cruda y productos lácteos contaminados son una fuente potencial de brotes causados por *Escherichia coli* O157: H7 (Honish *et al.*, 2005; Baylis, 2009; Ravel *et al.*, 2009). Asimismo, la presencia de *Staphylococcus aureus* en productos derivados de la leche es un problema que aqueja, debido a su capacidad de colonizar e infectar a humanos y animales, el cual no debe ser aceptado, además el uso excesivo de antibióticos a menudo exhibe resistencia a diferentes clases de antimicrobianos en la ganadería de manera preocupante.

Por estas razones, la contaminación microbiana de los quesos tiene consecuencias muy importantes, tanto para la industria láctea, dadas las posibles pérdidas económicas, como para

la salud pública, por el riesgo de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (De Oliveira *et al.*, 2017).

## 1.1. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente la leche es uno de los alimentos más importantes en la dieta, no solamente durante la infancia, sino también en mujeres embarazadas o lactantes, y para las personas mayores. El consumo de derivados lácteos como el queso fresco es muy elevado en nuestro país. Por ello, es importante la detección y cuantificación de patógenos presentes en un producto lácteo el cual constituye uno de los parámetros más importantes para evaluar la calidad sanitaria de este alimento. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud recomienda monitorizar la resistencia antimicrobiana en una «bacteria indicadora» como *E. coli* para analizar los mecanismos de resistencia que pudieran diseminarse a través de alimentos de origen animal y sus derivados, en diferentes áreas geográficas (OMS, 2015).

Muy pocos estudios pueden ayudar a identificar si los aislamientos presentes en el animal vivo terminarán en los productos lácteos o si los aislamientos que se encuentran en los productos finales se originan a partir de contaminaciones a lo largo de la cadena alimentaria (Wendlandt *et al.*, 2013). Por lo tanto, estudiar y comprender la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en particular es de gran interés tanto desde el punto de vista de la salud pública así como también según la OIT establece el principio sobre salud y seguridad de los trabajadores los cuales deben estar protegidos contra enfermedades o accidentes que resulten de su trabajo es por ello, que cada año se producen 2,78 millones de muertes relacionadas con el trabajo. Además del inmenso sufrimiento que esto causa a los trabajadores y sus familias, los costes económicos que ello conlleva, las interrupciones de producción y los costes de la atención sanitaria representan pérdidas económicas (Organización Internacional del Trabajo-C187, 2006).

Por consiguiente, las enfermedades transmitidas por los alimentos relacionados con el consumo de queso generalmente involucran productos elaborados con leche cruda (Choi *et al.*, 2016). Asimismo, en los últimos años se observa un aumento de la resistencia de estos microorganismos a los principales antibióticos de uso clínico y veterinario principalmente como la ampicilina, tetraciclina, cefotaxima, oxacilina, gentamicina, clindamicina y vancomicina.

## **1.2. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la resistencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* metilina resistente aislado de quesos frescos de la localidad de Canta.

## **1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Aislar en medios de cultivos selectivos y diferenciales e identificar mediante pruebas bioquímicas a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* metilina resistente en muestras de queso fresco.

Determinar la sensibilidad por el método Kirby-bauer de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* frente a los antibióticos ampicilina, tetraciclina, cefotaxima, oxacilina, gentamicina, clindamicina y vancomicina.

Analizar comparativamente los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* metilina resistente aislados de la muestra de queso.

## 2. MARCO TEÓRICO

### Queso fresco

El queso fresco es un producto lácteo elaborado artesanalmente, el cual resulta de la acidificación y coagulación de la leche fresca cruda no pasteurizada, además contiene enzimas y una serie de agentes bacterianos que forman parte de la microbiota.

Las características fisicoquímicas como pH, calidad del agua, temperatura de almacenamiento y contenido de sal, favorecen el crecimiento de bacterias específicas en el queso (Silva *et al*, 2021).

La microbiota que se encuentra en el queso fresco varía debido a una serie de factores, principalmente la calidad microbiológica de la leche, la intensidad del tratamiento térmico, el tipo de cultivo bacteriano empleado y las condiciones de higiene durante el procesamiento. La leche cruda tiene una microbiota normal que es predominantemente grampositiva, pero también se pueden encontrar mohos, levaduras y bacterias gram negativas. Asimismo, el sabor se debe principalmente a la presencia de las bacterias ácido lácticas (*Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, y *Enterococcus spp.*), las cuales contribuyen también a la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (De Oliveira et al., 2017).

### Principales microorganismos patógenos

Las principales especies bacterianas involucradas en enfermedades transmitidas por alimentos asociadas al consumo de queso incluyen *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (PEC), *Enterobacter*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium avium*

*ssp. Paratuberculosis (MAP), Arcobacter skirrowii, y Salmonella entérica* (Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos, 2001).

Géneros como *Serratia, Hafnia, Rahnella, Buttiauxella y Leclercia* representan coliformes ambientales y recientemente se demostró que incluyen al menos algunas cepas capaces de crecer en la leche a temperaturas de refrigeración (Masiello *et al.*, 2016).

#### Características de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

*Escherichia coli* según la clasificación taxonómica se describe que, es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, en forma de bacilo y que es capaz de fermentar ácido y gas que produce glucosa, con un crecimiento óptimo a 37 °C. Las cepas patógenas generalmente sobreviven a temperaturas de refrigeración, pero los recuentos se reducen después de 1 a 5 semanas de almacenamiento. *E. coli* no es termorresistente, muriendo a 60°C en pocos segundos. Sin embargo, es capaz de resistir por largos periodos a temperaturas de refrigeración (De Oliveira *et al.*, 2017).

*E. coli* O157:H7 es el serotipo que presenta mayor riesgo para la salud pública, las principales condiciones favorables para su desarrollo en productos lácteos incluyen temperatura óptima (37°C), pH óptimo (7,5), desarrollo en caldo NaCl al 6,5% y supervivencia por largos periodos en productos ácidos o fermentados *E. coli*. El serotipo O157:H7 se encuentra ampliamente en la leche cruda y tiene un potencial muy amenazador de causar infecciones y muertes relacionadas con los alimentos relacionados con el queso. A diferencia de los otros serotipos, O157:H7 es relativamente tolerante a los ácidos, hecho que ha sido confirmado durante el proceso de producción del queso (Reitsma y Henning, 1996).

*Staphylococcus aureus* es un coco grampositivo, no formador de esporas y no móvil. Este anaerobio facultativo, catalasa positivo pertenece a la microbiota comensal de humanos y varias especies de animales, puede ser una amenaza para la salud humana y animal y puede causar intoxicación alimentaria estafilocócica (SFP) en humanos. Además, crece en temperaturas entre 7,0 y 47,8°C, siendo 37°C la temperatura óptima (Jay *et al.*, 2005). Tolera concentraciones de sal de 0% a 20%, conservando la capacidad de multiplicarse.

### Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia bacteriana de ciertos microorganismos patógenos se debe a la falta de control y prevención en el uso de fármacos de uso veterinario e incorrecta manipulación en donde la transmisión es por zoonosis. *Staphylococcus aureus* es causante de la mastitis el cual es frecuentemente aislado de la leche bovina, es una enfermedad de presentación endémica y es considerada una de las más costosas en la industria láctea (Ribeiro *et al*, 2019). Ciertas cepas de *S. aureus* pueden desarrollar resistencia a los antibióticos betalactámicos como la penicilina, que se utilizan de manera generalizada para tratar las infecciones. Estas cepas se conocen como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), cuya resistencia se debe a la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas. Es decir, emergen nuevas especies de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y poseen diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana como: alteración/reemplazo del sitio blanco, impedimento para acceder al blanco, inactivación enzimática del antibiótico, activación de bombas de eflujo transmembrana para bloquear la acción del antimicrobiano (Wendlant *et al*, 2013).

*Escherichia coli* contiene cepas potencialmente patógenas que producen la toxina Shiga (STEC) O157: H7 y O103: H2 que se pueden encontrar en el ambiente y productos derivados de la leche cruda (Limoges y Donnelly. 2019).

Los animales empleados para la producción de leche son un importante reservorio conocido de *Escherichia coli* (VTEC) y suelen ser portadores asintomáticos (Caprioli *et al.*, 2005). La leche cruda contaminada y los productos lácteos preparados con leche cruda contaminada son una fuente potencial de brotes causados por *Escherichia coli* O157: H7 (Baylis *et al.*, 2009).

La resistencia a los antimicrobianos por parte de los microorganismos aparece y se propaga a través de animales, personas, alimentos y el ambiente, debido al abuso y al mal uso de antimicrobianos en la producción agropecuaria.

#### Contaminación de alimentos por malas prácticas

El ganado vacuno es uno de los reservorios más importante de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, las posibles fuentes de contaminación en un derivado lácteo podrían estar relacionadas por las malas prácticas de crianza, el agua, el equipo de ordeño y el ambiente (Bergonier *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2005c). Siendo un problema de salud pública también la presencia de *Escherichia coli* patógeno en un producto lácteo como el queso, el cual proviene de condiciones de producción insalubres relacionadas con la contaminación fecal, prácticas deficientes de higiene personal, utensilios y equipos mal desinfectados o materia prima contaminada (CFSSAN de la FDA de EE. UU., 2009).

Por otro lado, las granjas lecheras comúnmente usan leche cruda para la producción de queso, dependen de pozos privados para el suministro de agua y tienen animales productores de leche cerca de las instalaciones lecheras. Estos factores pueden aumentar el riesgo de contaminación de los productos lácteos con bacterias patógenas (Oliver *et al.*, 2009).

Según la NTS N°118-MINSA/DIGESA-V.01, Perú 2015, el queso “fresco” pertenece al Grupo 2 de Alimentos de Alto Riesgo (AAR), alimento de origen animal con algún tratamiento

tecnológico que requieren cadena de frío (refrigeración/congelación), que de no observarse estas condiciones podría causar una ETA (Ministerio de Salud del Perú-2015).

La elaboración de quesos generalmente es muy variable y se encuentra marcada principalmente por aspectos como; las deficientes prácticas de higiene, la poca o nula verificación de la calidad de la materia prima (leche), proceso de fabricación no tecnificado, transporte inadecuado, así como deficiencias al momento de su expendio. Además, muchos de los quesos que se producen a nivel artesanal pueden contener una gran diversidad de microorganismos de interés sanitario (Gonzales *et al.*, 2015).

### 3. ANTECEDENTES

En la última década, es oportuno mencionar que varios de los estudios consideran que el uso excesivo de antibióticos en la medicina y la ganadería han contribuido a la aparición de resistencias a los antibióticos entre las que se encuentran *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

**Trmcic et al. 2016.** Evaluaron la presencia de coliformes en el queso y su asociación con características específicas en presencia de patógenos elaborados en condiciones insalubres. Analizaron 273 muestras de queso para detectar la presencia de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga y *Listeria monocytogenes*. Además, consideraron que el pH, la actividad del agua, el tipo de leche y el tipo de corteza fueron factores significativamente asociados con la detección de coliformes en el queso. También detectaron que el queso elaborado de leche no pasteurizada, dio positivo para coliformes en concentraciones (42% con >10 UFC/g), en comparación con el queso de leche pasteurizada (21%).

**Bellio et al. 2018.** Estudiaron el comportamiento de *E. coli* O157:H7, en la elaboración y maduración del queso con Denominación de Origen Protegida (DOP). Para ello, realizaron el seguimiento de la producción de queso Fontina DOP en 3 queserías, evaluaron el uso de los bacilos de ácido láctico (LAB), el pH y la actividad del agua. Luego realizaron la producción de queso con leche no pasteurizada, seguido para la producción experimental, la leche fue inoculada con *E. coli* O157: H7 a una concentración de 5 log<sub>10</sub> ufc/mL y cultivos iniciadores comerciales de acuerdo a la normativa Fontina DOP, el aumento del recuento de LAB y la

disminución del pH en las primeras horas no parecieron afectar el crecimiento de *E. coli* O157. Sin embargo, encontraron que la maduración inhibe la supervivencia del patógeno.

**Papadopoulos et al. 2018.** Evaluaron la prevalencia de metilina resistente a *Staphylococcus aureus* (MRSA) en la cadena de producción de productos lácteos. Obtuvieron los siguientes resultados el 99,6% fueron resistentes al menos un antimicrobiano y el 13,3% fueron resistentes a múltiples fármacos (MDR), exhibiendo resistencia a tres o más clases de antibióticos. El 3% de las muestras fueron encontradas contaminadas por MRSA. Los autores concluyen que la presencia de MDRS especialmente MRSA, en animales y productos lácteos representa una amenaza potencial para la propagación de este patógeno en la comunidad, así como la contaminación de los productos lácteos a lo largo de su cadena de producción.

**Limoges & Donnelly. 2019.** Analizaron el impacto retrospectivo del queso de acuerdo a las pautas del Programa de Cumplimiento de Queso y Productos de Queso de la FDA. Para ello encontraron que el 76% (2,300) muestras de (3,007) contenían niveles de *E. coli* no toxigénica que excedían 10 (MPN/g). Así mismo de estas muestras, el 68% (2,047) excedieron las pautas regulatorias de 2009 de 100/g. Por lo que concluyeron que los quesos maduros blandos y semiblandos fueron los tipos de queso más afectados por la aplicación de los estándares de *E. coli* no toxigénicos. Sin embargo, las asociaciones entre niveles de *S. aureus* de 10 000 UFC/g y la presencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* fueron estadísticamente significativos, lo que indica que las regulaciones de la UE en cuanto a *S. aureus* como el patógeno de interés pueden ser más apropiados para la evaluación de la seguridad del queso.

**Alghizzi & Shami. 2021.** Evaluaron la prevalencia de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a la meticilina en leche y productos lácteos. Para ello, primero analizaron la susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y sus enterotoxinas estafilocócicas en muestras de leche sin pasteurizar. Como resultado el 70% de las 100 muestras de productos lácteos recolectadas estaban contaminadas por bacterias de *S. aureus* y el 72,9% de ellas se definieron como MRSA. Además, un gran número de aislamientos de MRSA se identificaron como resistentes a múltiples fármacos.

**Ávila et al. 2021.** Evaluaron la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en los productos lácteos. De 141 muestras de productos lácteos recolectadas, el 26% fueron positivas para *S. aureus* y el 14% de *S. aureus* los aislamientos fueron MRSA. Para ello, primero, determinaron los patrones de resistencia y/o susceptibilidad mediante el método de difusión en agar, posteriormente evaluaron la susceptibilidad antimicrobiana con los siguientes antibióticos: penicilina, cefalotina, ampicilina, cefotaxima, sulfametoxazol mitrimetoprima, gentamicina, eritromicina, dicloxacilina, tetraciclina, ciprofloxacino, clindamicina y vancomicina.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Lugar de ejecución**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología (LA 79) de la Facultad de Biología - Universidad Ricardo Palma (Av. Benavides 5440 Urb. Las Gardenias, Santiago de Surco). Las muestras fueron colectadas en la Localidad de Canta.

### **4.2. Obtención del material biológico**

Se recolectaron 40 muestras, las cuales corresponden a queso fresco, para las pruebas en laboratorio, se obtuvieron de mercados ubicados en la localidad de Canta. La unidad de muestra representativa fue de 200 g de queso. La recolección se llevó a cabo en las mismas condiciones en que fue adquirido desde el punto de venta, el cual fueron colocados en bolsas de polietileno de primer uso y transportadas al laboratorio en una caja de poliestireno con hielo a una temperatura de 4°C para ser analizadas.

La cepa de *Staphylococcus aureus* meticilina ATCC 43300 resistente se obtuvo del laboratorio de Parasitología de la Universidad Ricardo Palma a cargo del Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña.

### **4.3. Preparación y dilución de las muestras**

Se pesó 25 g representativos de la muestra a analizar. En condiciones de asepsia se añadió la muestra a un frasco conteniendo 225 mL de agua peptonada al 0,1% y se homogenizó (dilución  $10^{-1}$ ).

#### **4.4. Aislamiento e Identificación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus***

El aislamiento y la identificación de las bacterias fueron realizadas de acuerdo al protocolo establecido.

##### **Método para el recuento en superficie de agar los microorganismos indicadores de Inocuidad, *Staphylococcus aureus* y Coliformes Totales, según la Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF)**

###### **a. Técnica de recuento en superficie de agar para *Staphylococcus aureus***

Se preparó el medio de cultivo Agar Baird Parker en un frasco para luego autoclavar, después se retiró del equipo autoclave el frasco preparado, luego se enfrió hasta los 44°C y después se añadió la emulsión de yema de huevo con Telurito de potasio al 1% y se homogenizo mediante agitación con movimientos circulares. Luego, se plaqueo 15 mL de este medio por cada una de las placas dejándola solidificar. Después, se preparó las muestras de queso, para luego añadir 100 uL del homogenizado del alimento y de sus diluciones en la superficie del medio conteniendo en placas independientes y se extendió cada inóculo con el asa de siembra hasta que aparezca de nuevo la superficie seca.

Por cada dilución se preparó dos placas. Luego, se incubaron las placas Petri invertidas durante 24 horas a 35-37°C y se examinaron. Después, se eligió las placas Petri que contengan entre 20 y 200 colonias y se contaron todas las colonias de color azabache rodeadas de las características reacciones en yema de huevo. Luego, se llevó a cabo la prueba de coagulasa con un número

significativo de colonias (no menos de cinco). Para finalizar, se calculó en número de *S. aureus* por gramo de la muestra del alimento utilizando la proporción de las colonias seleccionadas productoras de DNAsa y la dilución correspondiente. Para la identificación de *Staphylococcus aureus* se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes como DNAsa.

**b. Técnica de recuento en superficie de agar para *Coliformes Totales***

Se preparó el medio de cultivo Agar Mac Conkey en un frasco para luego autoclavar, después se retiró del equipo autoclave el frasco preparado, para luego enfriarlo hasta los 44°C.

Luego, se plaqueo 15mL de este medio por cada una de las placas Petri dejándola solidificar. Después, se preparó las muestras de queso fresco, para luego añadir 100 uL del homogenizado del alimento y de sus diluciones en la superficie del medio conteniendo en placas independientes y se extendió cada inóculo con el asa de siembra hasta que aparezca de nuevo la superficie seca.

Por cada dilución se preparó dos placas. Luego, se incubaron las placas invertidas durante 24 horas a 35-37°C y se examinaron. Después, se eligieron las placas Petri que contengan entre 20 y 200 colonias y se contaron todas las colonias de color rojo a púrpura, de 0,5 mm de diámetro rodeado por un halo con precipitado. Para finalizar, se calculó el número de *Coliformes totales* por gramo de la muestra del alimento y la dilución correspondiente.

Para la identificación de *Escherichia coli* se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes como TSI, LIA, INDOL y CITRATO.

## **4.5. Pruebas de la susceptibilidad antimicrobiana**

La susceptibilidad antibiótica se determinó mediante el método de disco difusión (Kirby-Bauer).

### **4.5.1. Preparación del inóculo**

Se preparó la suspensión directa de la colonia en solución salina al 0.9% a partir de un cultivo en agar Muller Hinton de 18-24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala Mc. Farland.

### **4.5.2. Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland).**

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó como estándar o patrón de comparación una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mc. Farland), se preparó de la siguiente manera: Se agregó 0,5 mL de una solución de BaCl<sub>2</sub> 1% p/v a 99,5 mL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% v/v en constante movimiento para mantener la suspensión.

### **4.5.3. Inoculación de las Placas**

1. Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se romo el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo para remover el exceso del inóculo.
2. Seguido se inoculo en la superficie seca de la placa de Muller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes

de haber colocado los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

#### **4.6. Aplicación de los discos**

Los discos de sensibilidad empleados fueron: amoxicilina, tetraciclina, cefotaxima, oxacilina, gentamicina, clindamicina y vancomicina.

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

#### **4.7. Incubación**

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

#### **4.8. Lectura de las placas e interpretación de los resultados.**

- a. Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando un vernier. Se mantuvieron iluminados la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.

b. El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

Los diámetros de inhibición fueron interpretados basándose en tabla N°1 en anexo N° 1. La sensibilidad de la cepa bacteriana fue reportada como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R).

**Tabla 1:** Antibióticos y Diámetros críticos para bacterias adaptados del CFA-SFM, según el INCCLS 2001

Antimicrobiano seleccionado para <i>E. coli</i>	Contenido del disco	Diámetro en mm		
		R	I	S
CEFOTAXIMA	30 ug	≤14	15-22	≥23
AMOXICILINA	25 ug	≤12	13-14	≥15
VANCOMICINA	30 ug	≤14	15-16	≥17
GENTAMICINA	10 ug	≤12	13-14	≥15
OXACILINA	1 ug	≤10	11-12	≥13
TETRACICLINA	30 ug	≤14	15-18	≥19
CLINDAMICINA	2 ug	≤15	16-18	≥19

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificación y aislamiento de *Escherichia coli*.

Se seleccionaron 50 cepas sospechosas, confirmándose 08 cepas de *E. coli* positiva mediante las pruebas bioquímicas IMVIC (ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Pruebas de Identificación de cepas de *E. coli*

CEPA (OBTENIDA DE CADA MUESTRA)	TSI	LIA	CITRATO	SIM	PRESENCIA DE <i>E. COLI</i>
M1-1	K/K	A/A	+	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M1-2	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M1-3	A/A	K/K	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M2-1	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M2-2	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M2-3	A/K	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M2-4	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M2-5	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M2-6	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M3-1	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M3-2	K/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M3-3	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M3-4	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M4-1	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M4-2	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M5-1	A/A	K/A	+	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M5-2	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M5-3	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M6-1	A/A	K/A	+	+	<i>Enterobacteria spp.</i>
M7-1	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M8-1	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M8-2	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M8-3	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M8-4	A/K	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M9-1	A/A	K/K	+	+	<i>Enterobacteria spp.</i>
M9-2	A/A	K/K	+	+	<i>Enterobacteria spp.</i>
M10-1	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M11-1	A/A	K/K	-	+	<i>Escherichia coli.</i>
M11-2	A/K	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M11-3	A/A	A/A	-	+	<i>Escherichia coli</i>
M11-4	A/A	K/K	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M11-5	A/A	K/K	+	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M11-6	K/K	A/A	-	+	<i>Escherichia coli</i>

M11-7	K/K	K/K	-	+	<i>Escherichia coli</i>
M12-1	K/K	K/K	-	+	<i>Escherichia coli.</i>
M12-2	K/K	K/K	-	+	<i>Escherichia coli.</i>
M13-1	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M13-2	K/K	K/K	-	+	<i>Escherichia coli.</i>
M13-3	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M14-1	A/A	K/K	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M14-2	A/A	K/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M14-3	A/K	K/K	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M14-4	A/A	K/K	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M14-5	A/K	K/K	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M15-1	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M15-2	A/A	K/A	+	+	<i>Enterobacteria spp.</i>
M15-3	A/A	A/A	+	+	<i>Enterobacteria spp.</i>
M16-1	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M16-2	A/A	A/A	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>
M17-1	K/K	K/K	-	+	<i>Escherichia coli</i>
M17-2	A/A	K/K	-	-	<i>Enterobacteria spp.</i>

### Leyenda:

TSI Resultado (+): A/A

LIA Resultado (+): K/K

CITRATO: Resultado (-)

SIM-INDOL: Resultado (+)

Resultados para *Escherichia coli*

### 5.2. Identificación y aislamiento de *Staphylococcus aureus*.

Se logró aislar 50 cepas sospechosas, confirmándose 16 cepas de *S. aureus* positivas mediante la prueba de DNAsa positiva resultado de la coagulasa positiva (ver Tabla 3).

**Tabla 3. Prueba de Identificación de cepas de *S. aureus***

Cepa (obtenida de cada muestra)	DNAsa	Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>
M1-1	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M1-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M1-3	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M2-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M2-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M2-3	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M2-4	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M2-5	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M2-6	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M3-1	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M3-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i>

M3-3	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M3-4	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M4-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M4-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M5-1	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M5-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M5-3	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M6-1	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M7-1	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M8-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M8-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M8-3	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M8-4	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M9-1	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M9-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M10-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M11-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M11-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M11-3	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M11-4	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M11-5	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M11-6	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M11-7	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M12-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M12-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M13-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M13-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M14-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M14-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M14-3	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M14-4	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M14-5	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M15-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M15-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M15-3	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
M16-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M16-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M17-1	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
M17-2	-	<i>Staphylococcus sp.</i>

**Leyenda:**

DNAsa: Resultado (+) para *S. aureus*

De las 50 cepas sospechosas y que fueron sometidas a pruebas de identificación bioquímica, y de acuerdo a los resultados obtenidos, por lo que se confirmaron 16 cepas de *S. aureus* DNAsa positiva.

### 5.3. Evaluación de resistencia bacteriana frente a antibióticos.

Cada una de las cepas seleccionadas fueron sometidas al método de Kirby-Bauer frente a seis antibióticos clasificados en Betalactámicos (Amoxicilina y Oxacilina), Cefalosporinas (Cefotaxima) Aminoglucósidos (Gentamicina), Lincosamidas (clindamicina), Glucopéptidos (vancomicina) y Tetraciclinas (Tetraciclina), Obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 4:** Se muestra la susceptibilidad de cepas de *E. coli* a los antibióticos seleccionados, mediante la medición del diámetro del halo de inhibición, siendo clasificadas como resistente, sensible e intermedio de acuerdo al manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión del INS.

CEPA (SELECCIO NADA)	PRUEBA DE SENSIBILIDAD – DIÁMETRO MM													
	CTX	CTX	AMX	AMX	VA	VA	GM	GM	TE	TE	CC2	CC2	OX1	OX 1
M1-1	2	I	17	I	12	R	1.6	S	9	R	15	R	14	S
M1-2	23	S	13	R	13	R	2.3	S	18	I	15	R	19	S
M1-3	32	S	22	S	12	R	2.8	S	17	I	15	R	16	S
M2-1	22	I	22	S	16	I	2.3	S	17	I	12	R	14	S
M2-2	23	S	12	R	12	R	2	S	17	I	15	R	15	S
M2-3	29	S	12	R	2	S	2.2	S	19	S	21	S	21	S
M2-4	34	S	16	I	22	S	2.5	S	23	S	17	I	15	S
M2-5	33	S	22	S	19	S	2.2	S	24	S	17	I	17	S
M2-6	29	S	15	I	16	I	2.3	S	15	I	14	R	12	I
M3-1	32	S	17	I	16	I	2.5	S	11	R	2	S	0	R
M3-2	32	S	13	I	15	I	2.1	S	23	S	18	I	13	S
M3-3	34	S	2	S	0	R	2.3	S	2	S	2	S	1	R
M3-4	33	S	14	I	2	S	1.7	S	22	S	14	R	15	S
M4-1	34	S	2	S	1.5	I	2.5	S	2	S	18	I	21	S
M4-2	29	S	22	S	1.5	I	2.3	S	12	R	15	R	2	S
M5-1	32	S	16	I	1.5	I	2.5	S	16	I	16	I	17	S
M5-2	29	S	13	R	1.8	S	2.5	S	2	S	18	I	17	S
M5-3	29	S	15	I	1.6	I	2.6	S	18	I	17	I	21	S
M6-1	29	S	17	I	1.8	S	2.4	S	15	I	13	R	2	S
M7-1	28	S	1	R	1	R	1.9	S	22	S	0	R	0	R
M8-1	26	S	12	R	1.1	R	1.6	S	13	R	1	R	1	R
M8-2	32	S	15	I	2.2	S	1.9	S	19	S	16	I	18	S
M8-3	32	S	23	S	1.9	S	2	S	22	S	16	I	1	R
M8-4	24	S	11	R	1	R	1.5	S	17	I	0	R	0	R

M9-1	34	S	32	S	1.4	R	1.8	S	21	S	21	S	3	S
M9-2	33	S	17	I	1.9	S	3.4	S	21	S	19	S	23	S
M10-1	31	S	13	R	1.5	I	2.2	S	15	I	18	I	19	S
M11-1	26	S	1	R	1.6	I	1.9	S	12	R	0	R	1	R
M11-2	3	S	15	I	19	S	25	S	22	S	18	I	21	S
M11-3	3	S	24	S	1	R	22	S	14	R	19	S	21	S
M11-4	3	S	2	S	15	I	22	S	2	S	19	S	18	S
M11-5	3	S	17	I	12	R	17	S	18	I	14	R	14	S
M11-6	26	S	16	I	15	I	18	S	15	I	17	I	1	R
M11-7	26	S	16	I	15	I	18	S	15	I	17	I	1	R
M12-1	26	S	16	I	15	I	18	S	15	I	17	I	1	R
M12-2	26	S	16	I	15	I	18	S	15	I	17	I	1	R
M13-1	31	S	15	I	14	R	21	S	0	0	18	I	0	R
M13-2	23	S	16	I	18	S	2	S	0	0	14	R	0	R
M13-3	25	S	22	S	18	S	23	S	15	I	21	S	1	R
M14-1	29	S	23	S	17	S	16	S	18	I	15	R	17	S
M14-2	33	S	25	S	21	S	23	S	22	S	21	S	1	R
M14-3	3	S	1	R	16	I	17	S	18	I	18	I	1	R
M14-4	33	S	23	S	18	S	2	S	21	S	19	S	14	S
M14-5	33	S	13	R	19	S	21	S	0	0	12	R	0	R
M15-1	33	S	1	R	13	R	23	S	2	S	19	S	1	R
M15-2	0	R	0	0	0	R	0	0	0	0	0	R	0	R
M15-3	36	S	19	S	1	R	25	S	22	S	15	R	14	S
M16-1	36	S	25	S	18	S	25	S	24	S	27	S	1	R
M16-2	25	S	13	R	16	I	2	S	19	S	14	R	0	R
M17-1	32	S	12	R	19	S	21	S	22	S	16	I	12	I
M17-2	23	S	12	R	12	R	8	R	19	S	15	R	20	S

□

Leyenda:

• R = Resistente, S = Sensible, I = Intermedio

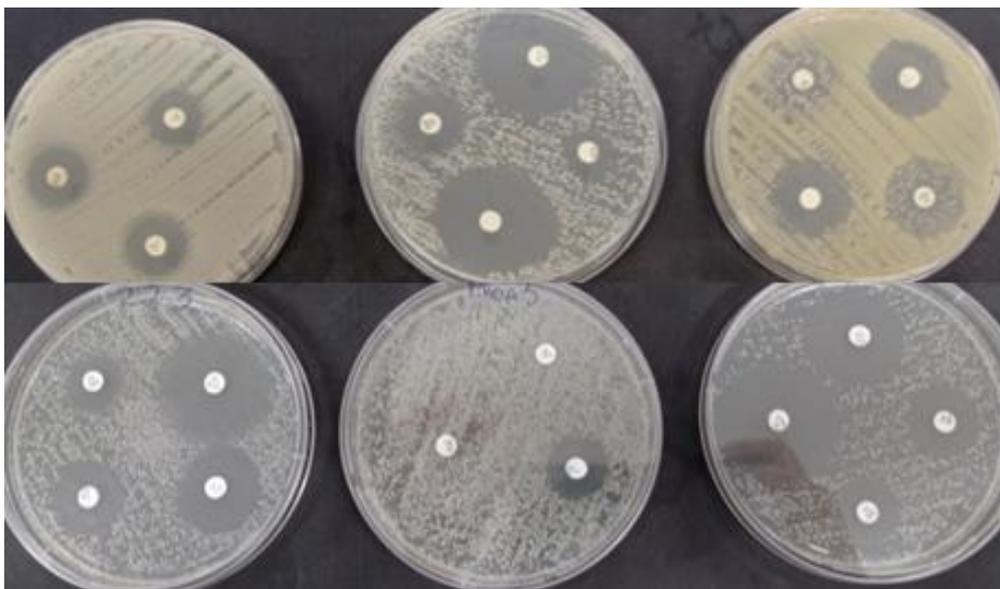
• Antibióticos:

CTX= Cefotaxima, AMX= Amoxicilina, VA= Vancomicina, GM= Gentamicina, TE= Tetraciclina, CC2= Clindamicina y OX1= Oxacilina

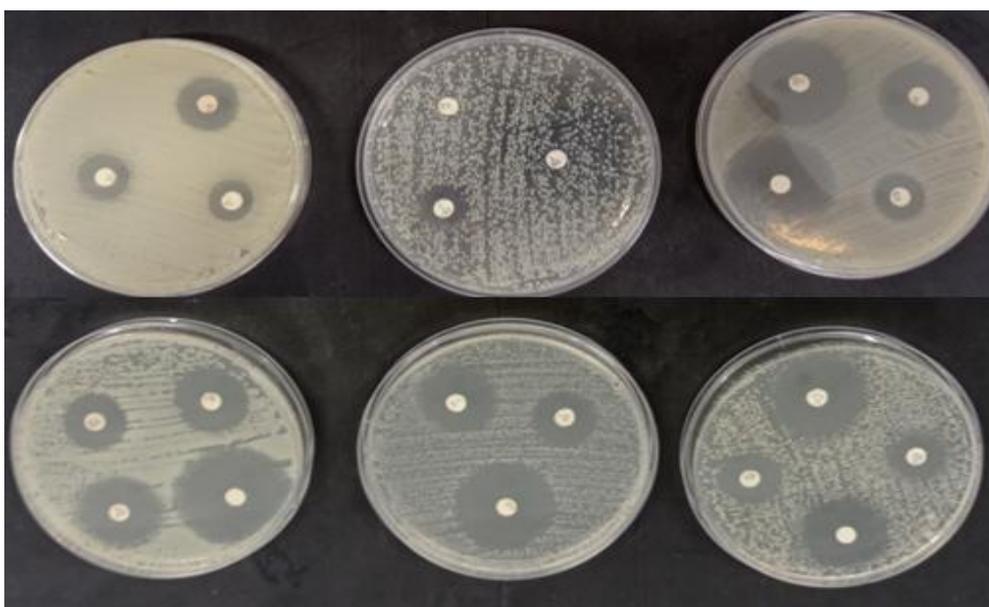
Las muestras sometidas presentaron diferentes diámetros de zona de inhibición entre ellas, así como entre las familias de antibióticos.

De las 50 cepas de *E. coli* aisladas e identificadas resultaron resistentes a Cefotaxima (n=1, 2%), Amoxicilina (n=15, 30%), Vancomicina (n=15, 30%), Gentamicina (n=1, 2%), Tetraciclina (n=8, 16%), Oxacilina (n=21, 42%) y Clindamicina (n=20, 40%) (Ver Tablas 5 y 7).

Asimismo 15, 21 y 20 cepas fueron resistentes a uno, dos y tres antibióticos, respectivamente (ver Tabla 5). La resistencia de cepas de *E. coli* a dos o más antibióticos representó el 42% (21/50).



**Fotografía N° 1:** Susceptibilidad de las cepas frente a los antibióticos en las muestras analizadas de *Escherichia coli*.



**Fotografía N° 2:** Susceptibilidad de las cepas frente a los antibióticos en las muestras analizadas de *Staphylococcus aureus*.

## Perfil de Sensibilidad Antimicrobiana en cepas de *S. aureus*

**Tabla 5:** Se muestra la susceptibilidad en cepas de *S. aureus* DNasa positiva a los antibióticos seleccionados, mediante la medición del diámetro del halo de inhibición, siendo clasificadas como resistente, sensible e intermedio de acuerdo al manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión del INS

CEPA (OBTENIDA DE LA MUESTRA)	PRUEBA DE SENSIBILIDAD													
	CTX	CTX	AMX	AMX	VA	VA	GM	GM	TE	TE	CC2	CC2	OX1	OX1
M1-1	s	33	s	32	s	22	s	35	s	35	s	22	s	23
M1-2	s	32	s	33	s	2	s	32	s	34		21	s	23
M1-3	s	33	s	36	R	13	s	35	s	35	s	24	s	2
M2-1	s	23	s	32	s	15	R	12	s	31	s	26	s	24
M2-2	s	35	s	38	s	19	s	32	s	35	s	25	s	2
M2-3	s	25	s	33	s	15	s	32	s	31	s	19	s	24
M2-4	r	15	R	11	R	13	I	13	s	23	I	22	R	1
M2-5	s	32	s	36	s	22	s	32	s	35	s	23	s	23
M2-6	s	29	s	36	s	22	s	34	s	32	s	24	s	26
M3-1	s	35	s	39	s	24	s	34	s	34	s	25	s	16
M3-2	s	25	s	37	s	23	s	24	s	32	s	29	s	29
M3-3	R	0	s	31	s	16	s	29	s	35	s	26	s	23
M3-4	s	28	s	34	s	17	s	24	s	28	s	24	s	22
M4-1	I	18	s	37	s	2	s	3	s	32	s	25	s	27
M4-2	s	2	s	31	s	19	s	3	s	34	s	2	s	24
M5-1	s	24	s	28	s	16	s	3	s	29	s	22	s	18
M5-2	s	33	s	37	s	22	s	34	s	29	s	29	s	19
M5-3	s	21	s	24	s	19	s	32	s	26	s	3	s	2
M6-1	R	0	R	0	R	0	s	29	s	32	s	28	s	18
M7-1	s	31	s	33	s	2	s	34	s	29	s	25	s	14
M8-1	s	36	s	31	s	19	s	34	s	31	s	21	s	2
M8-2	s	31	s	36	s	2	s	31	s	3	s	24	s	2
M8-3	s	3	s	4	s	2.1	R	0	R	0	R	0	R	0
M8-4	s	31	s	36	s	2	s	31	s	3	s	24	s	2
M9-1	s	26	s	35	s	18	R	0	R	0	R	0	R	0
M9-2	s	21	I	16	s	16	s	32	s	31	s	24	s	18
M10-1	s	21	s	24	s	19	s	32	s	26	s	3	s	2
M11-1	s	31	I	14	R	14	s	15	s	2	I	18	s	21
M11-2	s	32	s	31	R	13	s	21	s	28	s	23	s	23
M11-3	s	29	s	27	R	14	s	2	s	19	s	2	s	24
M11-4	s	3	s	31	s	15	s	18	s	21	s	2	s	29
M11-5	s	23	I	14	R	14	s	18	R	1	I	16	s	23
M11-6	s	25	s	31	R	1	s	23	s	2	s	22	s	27
M11-7	s	31	s	33	R	14	s	23	s	24	s	22	s	26
M12-1	s	35	s	35	R	14	s	23	s	24	s	25	s	32
M12-2	s	3	I	14	R	14	s	19	s	26	I	19	s	24
M13-1	s	29	s	3	s	15	s	22	s	25	I	18	s	31
M13-2	s	3	s	32	s	15	s	18	s	25	s	22	s	31
M13-3	s	34	s	34	s	18	s	22	s	24	s	21	s	3
M14-1	s	34	I	16	s	15	s	21	s	22	I	18	s	25
M14-2	s	3	I	14	R	13	s	15	R	1	s	2	s	24
M14-3	s	31	s	17	R	13	s	17	R	1	I	17	s	2
M14-4	s	31	s	3	R	14	s	21	s	2	s	23	s	27
M14-5	s	29	s	34	s	18	R	12	s	31	I	19	s	27
M15-1	s	29	s	3	s	15	I	14	R	0	s	25	s	26
M15-2	s	29	s	3	s	15	I	14	R	0	s	25	s	26
M15-3	s	23	I	15	R	14	R	1	s	2	s	2	s	2
M16-1	s	35	s	33	R	13	s	19	s	22	s	22	s	26
M16-2	s	32	I	15	R	13	s	16	s	19	I	17	s	27
M17-1	s	32	s	34	R	13	s	19	s	2	I	19	s	26
M17-2	s	33	s	32	s	22	s	35	s	35	s	22	s	23

Leyenda:

- R = Resistente, S = Sensible, I = Intermedio
- Antibióticos:

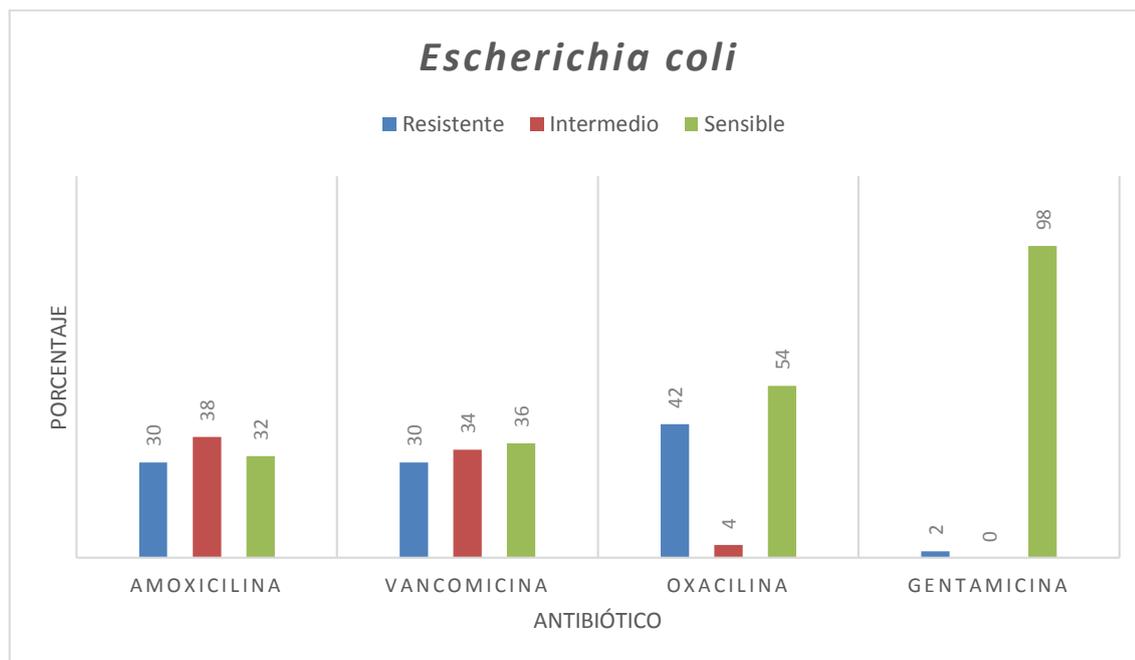
CTX= Cefotaxima, AMX= Amoxicilina, VA= Vancomicina, GM= Gentamicina, TE= Tetraciclina, CC2= Clindamicina y OX1= Oxacilina

De las 50 cepas de *S. aureus* aisladas e identificadas resultaron resistentes a Cefotaxima (n=3, 6%), Amoxicilina (n=2, 4%), Vancomicina (n=17, 34%), Gentamicina (n=4, 8%), Tetraciclina (n=7, 14%), Oxacilina (n=3, 6%) y Clindamicina (n=2, 4%) (Ver Tabla 7).

Asimismo 7 y 17 cepas fueron resistentes a uno y dos antibióticos, respectivamente (ver Tabla 8). La resistencia de cepas de *S. aureus* a dos antibióticos representó el 34% (17/50).

**Tabla 6.** Porcentaje de la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Escherichia coli*

Antibiótico	N° DE CEPA	Resistente		Sensible		Intermedio	
		N	%	N	%	N	%
<b>Cefotaxima</b>	50	1	2	47	94	2	4
<b>Amoxicilina</b>	50	15	30	16	32	19	38
<b>Vancomicina</b>	50	15	30	18	36	17	34
<b>Gentamicina</b>	50	1	2	49	98	0	0
<b>Tetraciclina</b>	50	8	16	24	48	18	36
<b>Clindamicina</b>	50	20	40	12	24	18	36
<b>Oxacilina</b>	50	21	42	27	54	2	4

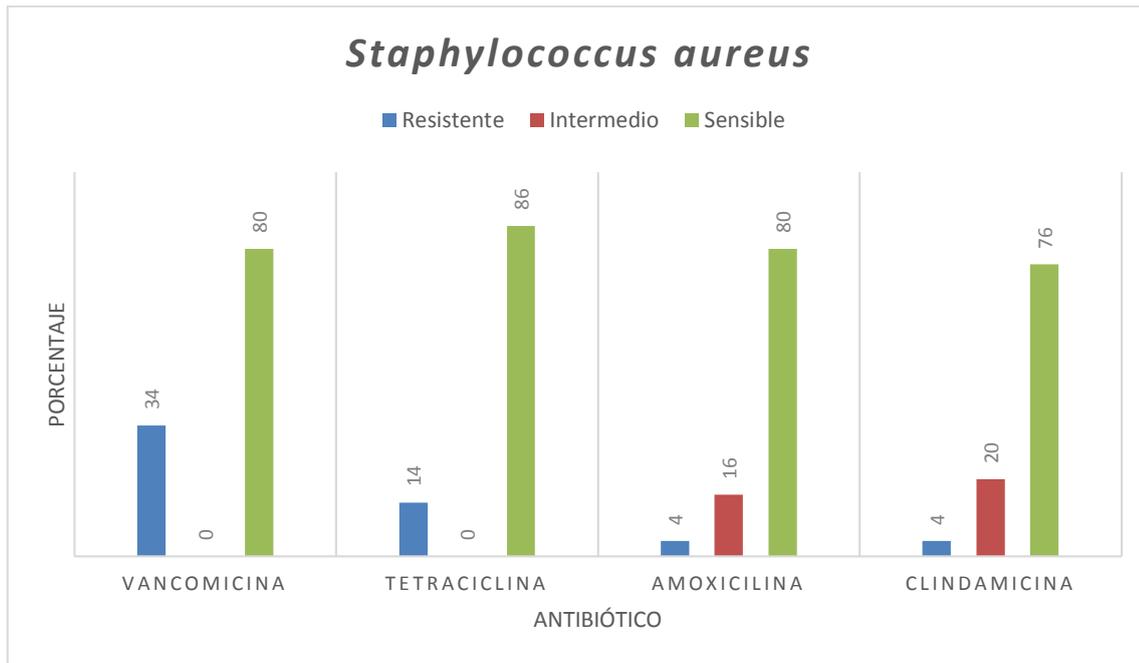


**Figura 1:** Porcentaje de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de *E. coli*.

Se muestra los porcentajes de resistencia de cepas de *E. coli*, mayor para oxacilina (42%), Amoxicilina y vancomicina (30%) y menor para gentamicina (2%). También los porcentajes de sensibilidad a Gentamicina (98%), Oxacilina (54%) y Vancomicina (36%) además la sensibilidad intermedia a oxacilina (4%).

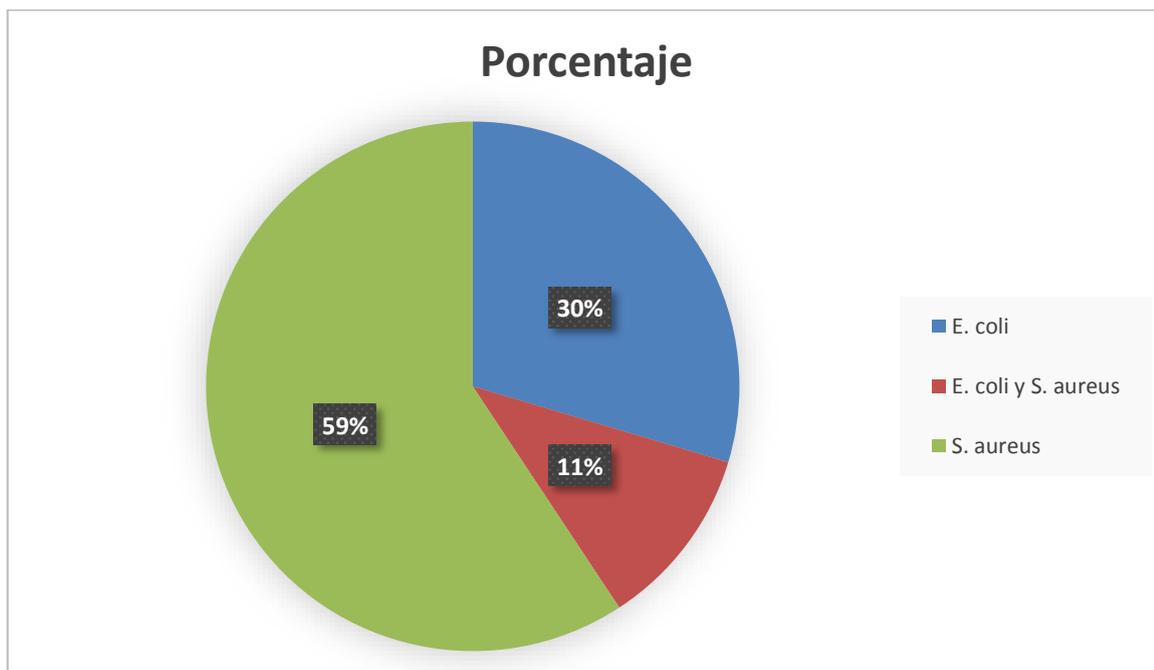
**Tabla 7.** Porcentaje de la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *S. aureus*

Antibiótico	N° DE CEPA	Resistente		Sensible		Intermedio	
		N	%	N	%	N	%
<b>Cefotaxima</b>	50	3	6	46	92	1	2
<b>Amoxicilina</b>	50	2	4	40	80	8	16
<b>Vancomicina</b>	50	17	34	33	66	0	0
<b>Gentamicina</b>	50	4	8	43	86	3	6
<b>Tetraciclina</b>	50	7	14	43	86	0	0
<b>Clindamicina</b>	50	2	4	38	76	10	20
<b>Oxacilina</b>	50	3	6	47	94	0	0



**Figura 2:** Porcentaje de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Se muestra los porcentajes de resistencia de cepas de *S. aureus*, mayor para Vancomicina (34%), Tetraciclina (14%) y menor para Amoxicilina y Clindamicina (4%). También los porcentajes de sensibilidad a Tetraciclina (86%), Amoxicilina (80%) y Vancomicina (66%) además la sensibilidad intermedia a Clindamicina (20%).



**Figura 3:** Porcentaje de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que presentan resistencia a antibióticos en una misma muestra de queso.

## DISCUSIÓN

La detección de *E. coli* constituye un importante parámetro capaz de evaluar la calidad sanitaria de un alimento. La contaminación del queso puede estar asociado a diversos factores pero principalmente puede estar presente en la leche sin pasteurizar.

De este producto alimenticio se aislaron dos bacterias de importancia en la salud pública con mayor frecuencia de las cuales son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, ambos son muy versátiles al momento de adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos y generar resistencia. En los últimos años el poco estudio en nuestro país sobre la presencia de *Escherichia coli* en productos derivados de lácteos, ha ocasionado según Masiello et al. que se interprete al uso de coliformes como indicadores, que contribuyen a posibles interpretaciones erróneas de la detección de coliformes en el queso. La primera es que los coliformes representan exclusivamente bacterias provenientes de un ambiente fecal. Separaron los coliformes en 3 grupos, incluidos (1) coliformes ambientales, (2) coliformes fecales termotolerantes y (3) coliformes ubicuos.

La presencia de ciertos microorganismos en la elaboración del queso se debe a la falta de pasteurización en la elaboración del producto, en donde el producto final tenía 4,6 veces más probabilidad de contener enterobacteria patógena (Trmčić. A., et al. 2016).

En este trabajo se analizaron las muestras de queso fresco la cual está a la venta en los mercados, y la importancia de la presencia de *E. coli* y *S. aureus* y su multiresistencia antimicrobiana a ciertos fármacos. Un estudio realizado por Jiménez et al. señala que la dinámica epidemiológica de microorganismos patógenos en leche depende del sistema de producción, la región geográfica y los factores relacionados con el manejo de los animales, lo que podría explicar la discrepancia de resultados al comparar diversos estudios.

Los resultados obtenidos para la cepa de *S. aureus* demuestran que la relación con la sensibilidad a diferentes grupos de antimicrobianos difieren a los resultados reportados por Ávila et al. el 92% (58/63) fueron resistentes a cefotaxima, y el 65% (41/63) a clindamicina. Sin embargo en el presente proyecto el 6% (3/50) fueron resistentes a cefotaxima y el 4% (2/50) a clindamicina.

Los resultados obtenidos de las 40 muestras de queso, 8 de ellas (20%) presentaron contaminación con *Escherichia coli* porcentaje nada similar a lo reportado por Limoges y Donnelly, de 3007 muestras de queso analizadas, el 76 % (2300/3007) de los quesos contenían *E. coli* niveles que superan los 10 ufc/gramo.

En cuanto a la resistencia, se evidencio que hay mayor porcentaje (42%) en *Escherichia coli* con el antibiótico de oxacilina que en *S. aureus*. Estos resultados son superiores a los encontrados por Jiménez et al., donde obtuvo 7.7% que reporta como respuesta a oxacilina encontraron menor resistencia frente a *S. aureus*.

Las pruebas demostraron susceptibilidad de *S. aureus* y fueron sensibles a 7 antimicrobianos de los cuales fueron resistentes a vancomicina (34%) y tetraciclina (14%), respectivamente. Se observó sensibilidad de (86%) para tetraciclina, un (80%) para amoxicilina y (66%) para vancomicina. Sin embargo, estos resultados fueron diferentes reportados por Lee *et al.*, donde reporto que la resistencia a la tetraciclina observada en este estudio (10,3 %) también fue encontrada en Italia por Spanu *et al.* (2014) en cepas aisladas de queso (10,6%). La tetraciclina se utiliza en la producción ganadera intensiva, lo que puede explicar la resistencia observada en la literatura en bacterias obtenidas de productos animales.

Finalmente, la importancia de la resistencia en el presente trabajo cobra relevancia debido a que ocasiona enfermedades alimentarias en humanos, vinculados a la falta de calidad e inocuidad de la leche en su producción, manipulación y distribución del producto final, además las enfermedades que presenta el productor de la leche (el ganado) siendo un potencial riesgo para la salud del animal y del ser humano debido a la resistencia a diversos antimicrobianos por el uso indiscriminado de fármacos, ocasionando enormes pérdidas económicas.

## CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo muestra que el queso es un producto altamente comercializado y expendido sin ningún control sanitario a nivel local y regional de Lima, la contaminación con *E. coli* y *S. aureus* dependerá en el cuidado y prevención al momento de la elaboración, producción, almacenamiento y distribución del producto.
- Las cepas de *E. coli* en quesos frescos aisladas, presentaron una mayor resistencia para oxacilina (42%), Amoxicilina y vancomicina (30%) y menor para gentamicina (2%). También los porcentajes de sensibilidad a Gentamicina (98%), Oxacilina (54%) y Vancomicina (36%).
- Las cepas de *S. aureus* en quesos frescos aisladas presentaron una mayor resistencia para Vancomicina (34%), Tetraciclina (14%) y menor para Amoxicilina y Clindamicina (4%). También los porcentajes de sensibilidad a Tetraciclina (86%), Amoxicilina (80%) y Vancomicina (66%).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avila-Novoa, M. G., González-Gómez, J.-P., Guerrero-Medina, P. J., Cardona-López, M. A., Ibarra-Velazquez, L. M., Velazquez-Suarez, N. Y., Gutiérrez-Lomelí, M.(2021). Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) strains isolated from dairy products: Relationship of ica-dependent/independent and components of biofilms produced in vitro. *International Dairy Journal*, 119, 105066.
- Alghizzi, M., & Shami, A. (2021). The prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin resistant Staphylococcus aureus in milk and dairy products in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Azzi, O., Lai, F., Tennah, S., Menoueri, M. N., Achek, R., Azara, E., & Tola, S. (2020). Spatyping and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from clinical sheep mastitis in Medea province, Algeria. *Small Ruminant Research*. University of Blida, Algeria.
- Baylis, C. 2009. La leche cruda y los quesos de leche cruda como vehículos para infección por verocitotoxina productora Escherichia coli. *Int. J. Dairy Technol.* 62: 293–307.
- Bellio, A., Bianchi, D. M., Vitale, N., Verneti, L., Gallina, S., & Decastelli, L. (2018). Behavior of Escherichia coli O157:H7 during the manufacture and ripening of Fontina Protected Designation of Origin cheese. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4962–4970.
- Bergonier, D., de Cremoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X., (2003). Mastitis de pequeños rumiantes lecheros. *Veterinario. Res.* 34, 689–716.
- Caprioli, A., S. Morabito, H. Brugère y E. Oswald. (2005). Enterohemorrágico Escherichia coli: Temas emergentes sobre virulencia y modos de transmisión. *Veterinario. Res.* 36: 289-311
- Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos, (2001). *Microorganisms in Foods 6-Microbial Ecology of Food Commodities*, Acibia, Zaragoza, España

- Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF). (2018). *Microorganismos en los alimentos 7<sup>o</sup> edición. Pruebas microbiológicas en la gestión de la seguridad alimentaria.*
- Choi, KH, Lee, H., Lee, S., Kim, S., Yoon, Y., (2016). Evaluaciones de riesgo microbiano del queso: Una revisión. *Australas Asiáticas. J. Anim. Ciencia* 29, 307–314.
- CLSI (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio). 2015. *Realizar Normas de Mance para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. 23 Suplemento Informativo. M100–S25.* CLSI, Wayne, Pensilvania
- Das, B., Roy, A. P., Bhattacharjee, S., Chakraborty, S., & Bhattacharjee, C. (2015). Lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 121, 244–252.
- De Oliveira, C. A. F., Corassin, C. H., Lee, S. H. I., Gonçalves, B. L., & Barancelli, G. V. (2017). *Pathogenic Bacteria in Cheese, Their Implications for Human Health and Prevention Strategies. Nutrients in Dairy and Their Implications on Health and Disease.* Universidad de Sao Paulo.
- Diniz-Silva, H. T., Brandão, L. R., de Sousa Galvão, M., Madruga, M. S., Maciel, J. F., Leite de Souza, E., & Magnani, M. (2019). Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Escherichia coli* O157:H7 in Minas frescal cheese made with oregano and rosemary essential oils. *Food Microbiology*. University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
- FDA. (2016). *Manual analítico bacteriológico.* Rockville, MD, EE. UU.: AOAC Internacional.
- FDA (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos). 2009. *Bacteriological Analytical Manual (BAM).* Servicio de Salud Pública del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos.
- González, L., Fernández Cuadrillero, A., Castro, J. M., Bernardo, A., & Tornadijo, M. E. (2015). Selection of lactic acid bacteria isolated from San Simón da Costa cheese (PDO) in order to develop an autochthonous starter culture. *Advances in Microbiology*, 5, 748–759.

Honish, L., Predy, G., Hislop, N., Chui, L., Kowalewska-Grochowska, K., Trottier, L., Kreplin, C., Zazulak, I., 2005. Un brote de *E. coli* O157:H7 colitis hemorrágica asociada con queso Gouda no pasteurizado. *Pueden. J. Salud Pública* 96, 182–184.

Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), 2020. Estándares de Desempeño para Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, 30ª edición Suplemento CLSI M100. Wayne, Pensilvania.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). 2013a. M02–A11 Y M100–S23. Estándares de rendimiento para pruebas de susceptibilidad de disco antimicrobiano; Estándar aprobado - Undécima edición y Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos; Vigésimo Tercer Suplemento Informativo. CLSI, Wayne, Pensilvania. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). 2013b. VET01–A4

Jay, JM, Loessner, MJ, Golden, DA, (2005). *Microbiología alimentaria moderna*. Springer, Nueva York.

Jorgensen, HJ, Mork, T., Rorvik, LM, (2005c). La ocurrencia de estafilococo aureus en una finca con pequeña producción de queso de leche cruda. *J. Ciencias de la leche*. 88, 3810– 3817.

Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., Grunert, T., Wagner, M., Ehling-Schulz, M., (2016). *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Front. Microbiol.* 7.

Limoges, M., & Donnelly, C. (2019). FDA’s cheese and Cheese Products Compliance Program guideline criteria for non-toxigenic *Escherichia coli*: A retrospective analysis of impacts on domestic and imported cheeses. *Food Control*, 106730.

Masiello, SN, NH Martin, A. Trm i, M. Wiedmann y KJ Patán. (2016). Identificación y caracterización de bacterias coliformes psicotolerantes aisladas de leche líquida pasteurizada. *J. Ciencias de la leche*. 99:130–140.

Ministerio de Salud. DIGESA. R.M. N° 624-2015/MINSA. “Norma Sanitaria que Establece la Lista de Alimentos de Alto Riesgo (AAR)” NTS N° 118-MINSA/ DIGESA-V.01.Perú.

- Ministerio de Salud de Perú, Dirección General de Salud Ambiental. NTS N°114-MINSA/DIGESA-V.01 “Norma Sanitaria para el almacenamiento de alimentos terminados destinados al consumo humano. Perú. 2015. pp. 1-15.
- Normas Alimentarias Australia Nueva Zelanda. (2015). Riesgo de alimentos importados declaración. Queso de leche cruda y productor de toxina Shiga Escherichia coli.
- Nobili, G., I. Franconieri, MG Basanisi, G. La Bella, R. Tozzoli, A. Caprioli y G. La Salandra. 2016. Aislamiento de toxina Shiga Escherichia coli en leche cruda y queso mozzarella en el sur de Italia. *J. Dairy Sci.* 99: 7877–7880
- Oliver, SP, KJ Boor, SC Murphy y SE Murinda. 2009. Alimentos riesgos de seguridad asociados con el consumo de leche cruda. *Patógeno transmitido por alimentos. Dis.* 6:793–806
- Organización Internacional del Trabajo. (2006). Convenio sobre el marco promocional para la seguridad y salud en el trabajo. C187
- Organización Mundial de la Salud, OMS. (2015). Resistencia a los antibióticos: infografías.
- Papadopoulos, P., Papadopoulos, T., Angelidis, A. S., Boukouvala, E., Zdragas, A., Papa, A., Sergelidis, D. (2018). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiology*, 69, 43–50.
- Papadopoulos, P., Angelidis, A. S., Papadopoulos, T., Kotzamanidis, C., Zdragas, A., Papa, A., Sergelidis, D. (2019). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness. *Food Microbiology*. (84), 103249.
- Ravel, A., J. Greig, C. Tinga, E. Todd, G. Campbell, M. Cassidy, B. Marshall y F. Pollari. 2009. Exploración de conjuntos de datos históricos de brotes transmitidos por alimentos en Canadá para la atribución de enfermedades humanas. *J. Food Prot.* 72: 1963–1976.

- Reitsma, CJ, Henning, DR, 1996. Supervivencia de enterohemorrágico *Escherichia coli* O157:H7 durante la fabricación y curado del queso Cheddar. *J. Alimentos Prot.* 59, 460–464
- Resolución Ministerial N°591. (2008). MINSA. “Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”.
- Ribeiro Júnior, J. C., Silva, F. F., Lima, J. B. A., Ossugui, E. H., Teider Junior, P. I., Campos, A. C. L. P., Beloti, V. (2019). Short communication: Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil. *Journal of Dairy Science*.
- Rhoades, J., Anastasiou, I., Michailidou, S., Koinidis, A., Doulgerakis, C., Alexa, E. A., Likotrafiti, E. (2021). Microbiological analysis of Greek Protected Designation of Origin cheeses and characterisation of the isolated lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 123(105183)
- Silva, ER, TRM Silva, AMG Pereira, AC Machado, and KR Santoro. (2012). Producción de hemolisinas por *Estafilococo aureus* aislados de casos de mastitis bovina subclínica. *Acta Vet. Brasilica* 6:118–123
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Tolinački, M., Živković, M., Lukić, J., Lozo, J., Golić, N. (2020). Diversity of non-starter lactic acid bacteria in autochthonous dairy products from Western Balkan Countries - technological and probiotic properties. *Food Research International, Journal Pre- proofs*, 136 (109494)
- Trmčić, A., Chauhan, K., Kent, D. J., Ralyea, R. D., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6105–6120.
- Wendlandt, S., Feßler, A. T., Monecke, S., Ehricht, R., Schwarz, S., & Kadlec, K. (2013). The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 338–349