

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

PREVALENCIA DEL GEN DE RESISTENCIA A METICILINA (*mecA*) EN
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE PRODUCTOS LACTEOS
ARTESANALES

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE:
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

PRESENTADO POR:

ING. JAIME RODRIGO ESCOBAR RIVAS

INGA. RUTH ADELINA SARAVIA HERNÁNDEZ

JULIO 2025

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LIC. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MSc. NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

PREVALENCIA DEL GEN DE RESISTENCIA A METICILINA (*mecA*) EN
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE PRODUCTOS LACTEOS
ARTESANALES.

COMITÉ DE TESIS

M.Sc. Blanca Eugenia Torres de Ortiz
DOCENTE ASESORA INTERNA

M.Sc. Claudia Lissette Alberti de Rivas
DOCENTE ASESORA EXTERNA

M.Sc. Evelyn Patricia Vásquez Rodríguez
MIEMBRO DE TRIBUNAL EVALUADOR

M.Sc. Guillermo Emilio Alvarenga Marroquín
MIEMBRO DE TRIBUNAL EVALUADOR

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE POSTGRADO

M.Sc. Jessica Tatiana Burgos Sierra
COORDINADORA MAESTRIA

M.Sc. Edith Alicia Torres de Cantón
COORDINADORA POSGRADO

TESISTAS

Ing. Ruth Adelina Saravia Hernández
Ing. Jaime Rodrigo Escobar Rivas

Fecha de entrega: _____

Fecha de aprobación: _____

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer primordialmente a Dios por estar siempre en mi vida y la de mis seres queridos, a mi familia, especialmente a mis padres, les agradezco profundamente su apoyo constante, su fe en mí ha sido el motor que me permitió completar este camino, a mis hermanos y amigos, por sus palabras de aliento, sin ustedes, este logro no habría sido posible. Agradezco a la Universidad de El Salvador por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional.

Agradezco especialmente a La Cátedra de la Maestría, docentes asesores y evaluadores por su constante apoyo, su fe en mis habilidades y su disposición para ayudarme han sido fundamentales para finalizar la tesis.

Finalmente, agradezco a mi compañero de tesis Rodrigo, mis compañeros de labores y jefaturas que participaron en esta investigación. Su ayuda en la recopilación de datos, revisión de mi trabajo y valiosos comentarios enriquecieron este proyecto de maneras que jamás imaginé. Esta tesis es el resultado de un esfuerzo colectivo, y su colaboración fue crucial para su realización.

Ruth Saravia.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios todo poderoso, por darme la sabiduría, la entereza y los recursos económicos para poder culminar mis estudios de Maestría. Este trabajo se lo dedico a mi madre quien siempre fue y será un ángel guardián en mi vida, a mi abuela y mis hermanos por sus palabras de aliento, su cariño y sus consejos durante toda mi vida académica.

Quiero dedicar un especial agradecimiento a la Dra. María Dolores Rovira, por siempre motivarme a no rendirme con mis estudios de maestría y sobre todo, por darme la oportunidad de realizar la primera fase experimental de este trabajo de investigación en los laboratorios de Microbiología Aplicada de la UCA. Agradezco grandemente a la MVZ e Inga. Cecilia Vázquez Ávalos y al Laboratorista Clínico Nicolás González, por apoyarme con sus conocimientos y experiencia profesional en Bacteriología clínica, Microbiología de Alimentos y Biología Molecular.

Agradezco también a la jefatura de la Red de Laboratorios Veterinarios del MAG, puesto que nos permitieron la realización de la fase de identificación microbiana en el equipo VITEK 2Compact y la realización de las pruebas fenotípicas de susceptibilidad a los antimicrobianos, en las instalaciones y equipos de los laboratorios de la Red.

Agradezco a Ruth, mi compañera de fórmula, quien tomó el reto y nos aventuramos a este tema de investigación del cual no estábamos seguros de que podríamos terminar, pero Dios en su infinita misericordia nos puso todos los medios y a las personas indicadas en el camino, para que este trabajo de graduación sea una realidad. Agradezco infinitamente a nuestras Asesoras, La MSc. Blanca Torres, y a la MSc. Claudia Alberti, pues sin su colaboración y sin su dirección este trabajo habría sido imposible, gracias por todo su apoyo.

Rodrigo E. Rivas

ÍNDICE

	Pág
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN:.....	xiii
II. OBJETIVOS	
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
3.1 Definiciones generales de la leche y sus derivados.....	19
3.2 Productos lácteos en El Salvador	20
3.3 Panorama de los productos lácteos en Chalatenango.....	21
3.4 Panorama de los productos lácteos en Nueva Concepción.....	22
3.5 Composición de la leche y sus derivados	24
3.6 Criterios microbiológicos para la calidad microbiológica de productos lácteos.....	25
3.7 Generalidades del patógeno <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.8 Factores de patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.9 <i>Staphylococcus aureus</i> y su resistencia a los antibióticos.	40
3.10 Métodos de detección genotípica de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente al grupo de antibióticos betalactámicos.	54
IV. METODOLOGÍA.....	63
4.1 Tipo de investigación:	63
4.2 Descripción o información del sitio de estudio:	63
4.3 Tipo de Muestreo y cálculo del tamaño de la muestra:	64
4.4 Procedimiento de toma de muestra y recepción para el análisis de laboratorio.	66

	Pág
4.5 Metodología de Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de cremas artesanales.....	67
4.6 Conservación de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de muestras:.....	79
4.7 Identificación microbiana confirmatoria de cepas con equipo VITEK 2 Compact.....	79
4.8 Determinación fenotípica de la resistencia a antibióticos por la técnica de Kirby-Bauer. (CLSI, 2025).....	82
4.9 Presencia del gen <i>mecA</i> en cepas aisladas de <i>S. aureus</i>	84
4.10 Análisis estadístico de resultados esperados:.....	91
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
5.0 Recuentos microbianos de <i>S. aureus</i> en muestras de crema y quesos frescos artesanales.....	93
5.1 Identificación bioquímica de aislados de <i>S. aureus</i> :.....	106
5.2 Confirmación de cepas de <i>Staphylococcus coagulasa</i> positivas:	111
5.3 Susceptibilidad fenotípica a la Meticilina de cepas de <i>S. aureus</i>	115
5.4 Detección del gen de resistencia de <i>S. aureus</i> a la meticilina (<i>mecA</i>) por PCR punto final.....	119
VI. CONCLUSIONES:.....	129
VII. RECOMENDACIONES	132
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 2. Grupo funcional de los antibióticos Betalactámicos y sus diferencias estructurales.	42
Figura 3. Modo de acción de la enzima Betalactamasa al hidrolizar el anillo betalactámico.....	45
Figura 4. Estructura química de penicilina y meticilina.	46
Figura 5. Esquema comparativo las proteínas de PBP2 (nativas y mutante) ...	47
Figura 6. Estructura general del cassette cromosomal estafilocócico.....	49
Figura 7. Resultados de halos de inhibición por disco difusión para la evaluación de cepas susceptibles a antibióticos.....	51
Figura 8. Lectura de Concentración inhibitoria mínima inhibitoria (E-test).....	53
Figura 9. Esquema general de las etapas la PCR.	56
Figura 10. Preparación de muestras.	72
Figura 11. Inoculación de la dilución 1:10 de muestra.....	73
Figura 12. Inoculación de la dilución 1:100 de muestra.	74
Figura 13. Inoculación de la dilución 1:1000 de muestra.	74
Figura 14. bioquímica de la coagulasa.	77
Figura 15. Tarjetas de Identificación VITEK 2.....	80
Figura 16. InvitrogenTM, PureLinkTM Genomic DNA Mini Kit.	86
Figura 17. Termociclador Eppendorf® Mastercycler®.....	89
Figura 18. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen <i>mecA</i>	90
Figura 19. Lectura concentración y pureza del ADN <i>S. aureus</i> ATCC 43300..	120
Figura 20. Lectura concentración y pureza del ADN <i>S. aureus</i> ATCC 25923..	120
Figura 21. Visualización de la gel en Fotodocumentador AXYGEN Corning...	121
Figura 22. Gráfica de distribución normal prueba de hipótesis	125

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Distribución del hato bovino nacional por departamento para los años 2017-2021.....	22
Tabla 2. Composición nutricional de los diferentes tipos de leche de vaca	25
Tabla 3. Requisitos microbiológicos clasificación leche cruda de vaca	27
Tabla 4. Requisitos microbiológicos para leche pasteurizada	28
Tabla 5. Requisitos microbiológicos para quesos frescos, no madurados.....	29
Tabla 6. Criterios microbiológicos para crema ácida (natilla), crema dulce, crema batida, y sus mezclas.....	30
Tabla 7. Características bioquímicas típicas sugeridas para la identificación de <i>S. aureus</i> FDA (2016).....	33
Tabla 8. Clasificación de los antibióticos betalactámicos.....	43
Tabla 9. Métodos fenotípicos para la detección de MRSA.	50
Tabla 10. Criterios de interpretación (en mm) para la prueba de difusión en disco de Cefoxitina en agar Müller-Hinton.....	52
Tabla 11. Criterios de interpretación para las pruebas de MIC de cefoxitina en agar Müller-Hinton.	53
Tabla 12. Matriz de riesgo de lácteos procesados producidos en la planta de estudio.....	64
Tabla 13. Tabla de composición de la Máster mix	89
Tabla 14. Resultados de recuentos microbianos para <i>S. aureus</i> y su comparación con criterios para vigilancia del RTCA 67.04.50:17.	94
Tabla 15. Pruebas bioquímicas de identificación preliminar (BAM-FDA).....	107
Tabla 16. Confirmación de las cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva, como <i>S. aureus</i> mediante equipo automatizado VITEK 2C.....	111
Tabla 17. Resultados de Ensayos de Susceptibilidad a la Cefoxitina.....	116
Tabla 18. Tabla de niveles de confianza.....	125

RESUMEN

El *Staphylococcus aureus* es un agente que con frecuencia ocasiona enfermedades alimentarias y está asociado con diversos alimentos. En Estados Unidos, sólo entre el 1 y el 5% de todos los casos de enfermedades transmitidas por alimentos causadas por este patógeno son reportados, siendo la tercera causa más común de infección bacteriana en el país (CDC, 2021). En Francia y Corea, es el segundo agente etiológico de enfermedades transmitidas por alimentos. Esto posiciona a *S. aureus* como uno de los principales microorganismos causantes de intoxicación alimentaria a nivel mundial (Salina *et al.*, 2018).

La resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus* representa un desafío significativo para la seguridad alimentaria, especialmente en productos lácteos artesanales. Estudios han demostrado que los alimentos de origen animal, como la leche y sus derivados, pueden actuar como vehículos de transmisión de cepas resistentes, aumentando el riesgo de infecciones en consumidores. Esto subraya la importancia de implementar estrategias de control microbiológico y mejorar las condiciones higiénicas en la producción artesanal. (Torres Segarra & Pacheco Cárdenas, 2021).

El estudio se centró en evaluar la inocuidad de 108 muestras de lácteos artesanales (54 muestras de queso fresco y 54 muestras de crema), de acuerdo con el RTCA 67.04.50:17 "Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos". Se identificaron los aislados bacterianos utilizando el sistema automatizado VITEK 2 Compact. Las pruebas fenotípicas de susceptibilidad a la meticilina se realizaron mediante los métodos de Kirby-Bauer y Epsilometría utilizando los puntos de corte establecido para *S. aureus* por la guía M100 del CLSI (2025).

De las 96 cepas aisladas e identificadas como *S. aureus*, ninguna presentó resistencia fenotípica a la meticilina utilizando los métodos de Kirby-Bauer y Epsilometría. Por lo tanto, se realizó el análisis molecular a las cepas control positivo del gen *mecA* (*S. aureus* ATCC 43300) y a la cepa control negativo del gen *mecA* (*S. aureus* ATCC 25923) por medio de PCR punto final. La prevalencia del estudio evidencio que las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), aisladas de lácteos procesados en la planta artesanal de estudio en Nueva Concepción Chalatenango, fue menor del 1%.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN:

Staphylococcus aureus es un patógeno capaz de causar diversas enfermedades tanto en humanos como en animales. Su presencia en productos alimenticios, especialmente en aquellos de origen animal como leche, quesos y cremas, representa una amenaza significativa para la salud pública. Diversos estudios internacionales han demostrado que este microorganismo puede desarrollar resistencia a antibióticos, en particular al grupo de los β -lactámicos, mediante la adquisición del gen *mecA*, el cual codifica la proteína PBP2a, con baja afinidad por la meticilina (Aguayo Reyes *et al.*, 2018; Pasachova Garzón *et al.*, 2019).

La detección de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) en alimentos de origen animal ha sido documentada en distintas regiones del mundo. En Europa, estudios en Italia y Bélgica reportaron prevalencias del 2.5% y 9.3% respectivamente en leche y derivados. En América Latina, investigaciones en México y Brasil identificaron el gen *mecA* en hasta un 18% de cepas aisladas de quesos artesanales elaborados con leche no pasteurizada (Herrera & Santos, 2015; Adame-Gómez *et al.*, 2018; de Aguiar *et al.*, 2022). Estos hallazgos evidencian la necesidad de fortalecer la vigilancia microbiológica, especialmente en sectores donde la producción artesanal carece de controles sanitarios sistemáticos.

Los agentes antimicrobianos se usan ampliamente en medicina y agricultura, y su uso excesivo ha generado cepas bacterianas resistentes (Titouche *et al.*, 2019). De acuerdo con Aguayo Reyes *et al.* (2018), la resistencia del género *Staphylococcus* al grupo β -lactámico, se debe a la presencia *gen mecA*, que produce una proteína transpeptidasa PBP2a de baja afinidad por la penicilina. Las cepas de *S. aureus* que poseen el gen *mecA* son llamadas *Staphylococcus* meticilino-resistentes (MRSA). El sitio del genoma bacteriano de

S. aureus donde se encuentra inserto el gen *mecA*, es la isla de patogenicidad SCCmec (*Staphylococcal cassette chromosome mec*), responsable de la resistencia a la meticilina (Pasachova Garzón *et al.*, 2019).

A nivel mundial, se ha detectado MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) en alimentos de origen animal. En carne de vacuno, la prevalencia es variable. En leche de vaca, MRSA se asocia a mastitis bovina: en Italia (2007), 4 de 160 cepas analizadas de *S. aureus* fueron MRSA; en Bélgica (2010), 9.3% de cepas analizadas fueron MRSA; en Minnesota (2012), 2 de 150 muestras de leche cruda contenían MRSA. En México (2015), se halló el gen *mecA* en 18.2% de aislados de *S. aureus*, con una prevalencia del 9.0% de MRSA en muestras de queso doble crema (Herrera A. & Santos B., 2015).

En Brasil de acuerdo con el estudio de Martins González *et al.* (2017), se logró identificar 7 cepas de *S. aureus* con el gen *mecA* (MRSA), de 78 muestras de queso fresco minas de leche de vaca sin pasteurizar que fueron analizadas. En México, (Adame-Gómez *et. al.*, 2018), se analizaron 78 muestras de diversos quesos (fresco, Oaxaca, Adobera y Cotija) y requesones producidos con leche de vaca no pasteurizadas, y se obtuvo una prevalencia del 10.26% de MRSA (8 cepas confirmadas). En Brasil, en 2022, se analizaron 112 muestras de queso Coalho de 56 granjas, con una prevalencia del gen *mecA* del 8.04% con un total de 9 cepas confirmadas (de Aguiar *et. al.*, 2022).

En El Salvador, a pesar de que los boletines epidemiológicos del MINSAL han reportado casos de intoxicación alimentaria aguda, no se identifican los agentes etiológicos responsables, lo que limita el análisis de riesgos sanitarios asociados a alimentos (VIGEPES, 2019). Además, no se dispone de estudios científicos que exploren la prevalencia de MRSA en productos lácteos artesanales, como los producidos en Nueva Concepción, Chalatenango, una región de reconocida actividad ganadera y producción de quesos y cremas sin procesos industriales.

Pese a la abundante literatura internacional que documenta la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. aureus* asociadas a alimentos, en El Salvador no se dispone de evidencia suficiente que caracterice este fenómeno en el contexto de la producción artesanal. Esta ausencia de datos representa una brecha crítica en la de la resistencia antimicrobiana, particularmente en entornos donde los procesos no industrializados carecen de monitoreo microbiológico sistemático. En respuesta a esta necesidad, el presente estudio tiene como objetivo identificar la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. aureus* aisladas de quesos frescos y crema procesados artesanalmente en Nueva Concepción, Chalatenango, mediante una combinación de métodos fenotípicos y moleculares.

Para abordar esta brecha de conocimiento, el estudio emplea un enfoque metodológico integral. La identificación bacteriana se realizó utilizando el sistema automatizado VITEK 2 Compact, que permite una clasificación rápida y precisa de cepas de *S. aureus*. La evaluación de la resistencia a meticilina se llevó a cabo mediante los métodos fenotípicos de Kirby-Bauer y Epsilometría, siguiendo las directrices del CLSI (2025).

Finalmente, la confirmación de la presencia del gen *mecA* se efectuó mediante PCR convencional, considerada el estándar de oro para la detección de resistencia genotípica. Esta combinación metodológica permite no solo caracterizar con precisión la resistencia a meticilina en productos lácteos artesanales, sino también generar evidencia técnica útil para el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia microbiológica y la protección del consumidor salvadoreño.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Determinar la prevalencia del gen de resistencia a la meticilina (*mecA*) en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de productos lácteos procesados en una planta artesanal de Nueva Concepción en Chalatenango, mediante métodos fenotípicos y moleculares.

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1 Verificar si las muestras de quesos frescos y crema procesados artesanalmente cumplen con los límites establecidos en el RTCA 67.04.50:17 para los criterios microbiológicos de inocuidad alimentaria.
- 2.2.2 Determinar la sensibilidad a meticilina mediante los métodos fenotípicos de Kirby-Bauer y Epsilometría, conforme a los lineamientos de la Guía M100 de CLSI (2025).
- 2.2.3 Comprobar la presencia del gen *mecA* en los aislados de *Staphylococcus aureus* estudiados por medio de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) punto final.

CAPÍTULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Definición de productos lácteos.

3.1.1 Producto lácteo:

Producto obtenido mediante cualquier elaboración de la leche que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para su elaboración (COMIECO, 2013).

3.1.2 Nata o crema:

Es el producto lácteo fluido comparativamente rico en grasa en forma de una emulsión de grasa en leche desnatada (descremada), que es obtenida por separación física de la leche (COMIECO, 2013).

3.1.3 Queso:

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente caseína) mediante la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas del producto (COMIECO, 2013).

3.1.4 Queso no madurado:

Se entiende por queso sin madurar el queso que está listo para el consumo inmediatamente o poco después de su fabricación, en esta definición se incluye el queso fresco (COMIECO, 2013).

3.1.5 Plantas artesanales de procesamiento de productos lácteos:

De acuerdo con el decreto número 955 del Código de Salud (1988) Quien procese menos de 2,000 botellas diarias de leche (equivalentes a 1,500 litros), se considerará procesador artesanal y estará exento de la pasteurización, pero deberá cumplir con las siguientes condiciones:

- i. Que se registren como procesadores artesanales en la Dirección General de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, quien supervisará la producción higiénica de la leche en los establecimientos de obtención, acopio, procesamiento y comercialización de la leche y sus derivados.
- ii. Que la leche utilizada provenga de hatos libres de Brucelosis y Tuberculosis, o que participen en los programas sanitarios que ejecuta el Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- iii. Que la leche provenga de hatos donde se practique un ordeño higiénico a las vacas, y que las personas involucradas en el ordeño mantengan sus boletos sanitarios actualizados.
- iv. Que para procesar la leche utilicen equipos y utensilios de fácil limpieza, y demás materiales que permita obtener productos de buena calidad higiénica.

3.2 Productos lácteos en El Salvador

La ganadería en El Salvador es una actividad muy importante en el aspecto económico y social del país, En la década de los 90's se reactivó la Comisión de Defensa de la Industria Láctea, se promulgó el Código de Salud, la Ley de Protección al Consumidor, la Ley de Fomento y Producción Higiénica de la Leche, Productos Lácteos y Regulación de su Expendio para controlar la producción nacional y la importación de productos lácteos. (Hércules & Joel, 2017).

El surgimiento del sector lácteo en el país data desde la época colonial, originándose principalmente por empresas artesanales, es decir empresas familiares poco convencionales cuya producción tenía por objetivo suplir sus propias necesidades, con el tiempo se convirtió en procesos más complejos, cuya meta ya no era satisfacer sus propias necesidades sino comercializar sus productos; convirtiéndose en empresas de mayor tamaño, las cuales fueron utilizando técnicas más adecuadas para la producción y transformación de lácteos (Benítez Cruz & Centi Lima, 2012).

Unos de los mayores problemas que existe actualmente es no contar con las condiciones higiénicas adecuadas para la extracción, producción y comercialización de lácteos; como por ejemplo el no cumplimiento de la Buenas Prácticas de Manufactura, ni programas de limpieza y desinfección adecuados y controlados por los establecimientos artesanales teniendo como consecuencia obtener productos lácteos de mala calidad higiénica, es decir, que los productos lácteos que serán consumidos por la población presenten microorganismos patógenos o dañinos causantes de enfermedades (Benítez Cruz & Centi Lima, 2012).

3.3 Panorama de los productos lácteos en Chalatenango

Según el IV Censo agropecuario realizado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería en los años 2007 y 2008 (MAG, 2009), el tercer Departamento con mayor producción de leche en el país es Chalatenango con 9.84 % de la producción nacional de lácteos. En la tabla 1, se puede observar que del total de cabezas de ganado a nivel nacional para 2021 es de 88,510 cabezas de ganado, el 11.19% corresponden al departamento de Chalatenango, solo por debajo de los departamentos de La Unión y Usulután según Estadísticas Agropecuarias (2022).

Tabla 1.

Distribución del hato bovino nacional por departamento para los años 2017-2021

Departamento	Año				
	2017	2018	2019	2020	2021
Ahuachapán	23,225	13,598	18,801	21,101	12,934
Santa Ana	46,681	77,128	63,426	55,934	52,232
Sonsonate	50,008	19,744	19,213	22,767	28,125
Chalatenango	103,505	60,411	66,116	85,075	88,510
La Libertad	40,109	19,253	50,552	57,593	22,737
San Salvador	12,384	17,491	12,585	6,634	8,671
Cuscatlán	16,705	11,517	17,424	23,904	12,829
La Paz	35,691	42,898	43,403	34,456	42,078
Cabañas	102,055	77,075	80,682	73,948	51,399
San Vicente	36,620	37,555	29,817	37,725	49,251
Usulután	156,625	112,062	97,787	96,076	120,719
San Miguel	85,945	72,234	57,694	90,687	56,096
Morazán	60,779	51,288	53,476	57,769	75,817
La Unión	115,231	128,032	88,111	90,502	169,585
Total por año	885,564	740,287	669,086	754,172	790,983

Nota. Datos tomados del Anuario de estadísticas agropecuarias (2021-2022).

3.4 Panorama de los productos lácteos en Nueva Concepción

La producción de productos lácteos en El Salvador constituye una actividad de relevancia económica y cultural, estrechamente vinculada con la ganadería bovina de doble propósito. Sin embargo, a pesar de su tradición, el sector enfrenta desafíos estructurales como la falta de autosuficiencia en la producción, el incumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura y la limitada modernización de los procesos artesanales (Benítez Cruz & Centi Lima, 2012; Hércules & Joel, 2017).

Uno de los principales problemas higiénico-sanitarios radica en la elaboración de productos lácteos sin condiciones óptimas de higiene, lo cual incrementa el riesgo de contaminación microbiológica. Esta situación se ve agravada por la limitada aplicación de programas de limpieza, desinfección y control de calidad en las plantas artesanales (Benítez Cruz & Centi Lima, 2012). Aun cuando algunos procesadores han invertido en mejorar sus técnicas tras la implementación del Código de Salud y el RTCA 67.04.50:17, muchos pequeños productores continúan operando sin condiciones estandarizadas de inocuidad.

Dentro del contexto nacional, el departamento de Chalatenango se posiciona como uno de los principales productores de leche bovina, con un 11.19% del hato nacional registrado en 2021 (88,510 cabezas) y una destacada producción de queso fresco y crema (MAG, 2009; Anuario Estadístico Agropecuario, 2022). En particular, el municipio de Nueva Concepción sobresale por su arraigada tradición en la elaboración de lácteos artesanales, reconocidos localmente como parte del patrimonio gastronómico de la región. Según el Plan de Competitividad Municipal (2012), esta actividad es desarrollada por familias que operan fuera del esquema industrial, comercializando sus productos de forma directa en la región y en otras ciudades del país.

Si bien existen organizaciones como APANC y Lácteos del Norte que disponen de cierta infraestructura, gran parte de los productores continúa procesando leche sin pasteurización, en condiciones de riesgo sanitario si no se cumplen criterios como los establecidos en el RTCA 67.04.50:17 o la NSO 67.01.01:06. Esto convierte a la producción artesanal en un punto crítico dentro de la cadena alimentaria, especialmente si se consideran microorganismos como *Staphylococcus aureus* y su potencial resistencia a antibióticos.

3.5 Composición de la leche y sus derivados

3.5.1 Características generales de calidad la leche cruda de vaca

La leche cruda de vaca debe presentar aspecto normal, estar limpia, libre de calostro, preservantes, antibióticos, colorantes, materias extrañas, sabores y olores objetables o extraños. La leche se obtendrá de vacas certificadas como sanas; es decir, libres de enfermedades infectocontagiosas, tales como tuberculosis, brucelosis y mastitis. Después del ordeño, la leche se someterá a filtración y preferentemente se enfriará a 4.5°C. En el momento de entrega a las plantas procesadoras o a los centros de distribución, puede estar a una temperatura no mayor de 10°C, debiendo cumplir, además, con las condiciones exigidas por la legislación nacional vigente (CONACYT, 2008).

3.5.2 Composición nutricional de la leche

La leche proporciona nutrientes esenciales y es una fuente importante de energía alimentaria, proteínas de alta calidad y grasas. Puede contribuir considerablemente a la ingestión necesaria de nutrientes como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B-12 y ácido pantoténico. En la leche de vaca las grasas constituyen alrededor del 3 al 4 por ciento del contenido sólido de la leche de vaca, las proteínas aproximadamente el 3.5 por ciento y la lactosa el 5 por ciento, pero la composición química bruta de la leche de vaca varía según la raza. Por ejemplo, el contenido de grasa suele ser mayor en el ganado *Bos indicus* que en el *B. taurus*. El contenido de materias grasas de la leche del ganado *B. indicus*, puede ser de hasta el 5.5 por ciento (FAO, 2019).

Tabla 2.*Composición nutricional de los diferentes tipos de leche de vaca.*

Nutriente	Para un tamaño de porción de 250 mL.			
	Leche entera	Leche semidescremada	Leche light	Leche deslactosada
Calorías	165	115	102	120
Proteínas (g)	7.8	7.8	7.8	7.8
Grasa (g)	9.0	4.0	2.5	4.5
Grasa saturada (g)	4.88	2.5	1.6	2.8
Grasa monoinsaturada (g)	2.33	1.6	0.09	1.7
Grasa poliinsaturada(g)	0.48	0.32	0.67	0.38
Hidratos de carbono	12.5	12.0	12.0	12.0
Azúcar (g)	12.5	12.0	12.0	12.0
Fibra (g)	0	0	0	0
Colesterol (mg)	35	20	12	3
Vitamina A (µg RE)	96.8	166	166	166
Calcio (mg)	303	290	290	290
Sodio (mg)	116	116	116	116
Potasio (mg)	375	387	366	380

Nota. Datos tomados Gasca, F. (2021).

3.6 Criterios microbiológicos para la calidad microbiológica de productos lácteos

La cantidad total de los microorganismos presentes en la leche o sus derivados por unidad de volumen o de peso es indicativo de las condiciones sanitarias de producción y conservación, así como de la vida comercial del producto. Los recuentos bacterianos muy altos en leche cruda son indicativos de fuerte contaminación durante las operaciones de ordeño, manipulación o

almacenamiento, o bien de conservación a temperatura de refrigeración insuficientes para retardar al crecimiento microbiano. En productos lácteos pasteurizados, altos recuentos bacterianos indican malas prácticas de procesamiento y/o mala conservación. según la guía práctica: Microbiología de la leche de la Universidad de Zulia (2005).

3.6.1 Calidad microbiológica de la leche.

Los métodos oficiales de análisis microbiológicos actualmente aplicados a los productos lácteos son los desarrollados por la Asociación Oficial Internacional de Químicos Analíticos (AOAC por sus siglas en inglés), por la Asociación Americana de Salud Pública (Métodos estándar para el análisis de productos lácteos) y La Federación Internacional de los Lácteos (IDF, por sus siglas en inglés).

En El Salvador existe una normativa que establece las especificaciones microbiológicas para leche cruda de vaca; es decir, la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.01:06 (Primera actualización). Para las especificaciones microbiológicas de la leche pasteurizada, se cuenta con el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:17 (Primera revisión), que establece los Criterios Microbiológicos Inocuidad de Alimentos para vigilancia sanitaria y para registro sanitario de producto.

i. Requisitos microbiológicos Leche Cruda de Vaca (CONACYT 2008).

De acuerdo con esta Norma Salvadoreña Obligatoria, la leche cruda se obtendrá de vaca certificadas como sanas; es decir, libres de enfermedades infectocontagiosas, tales como tuberculosis, brucelosis y mastitis.

La leche cruda de vaca según la NSO 67.01.01:06, se clasifica en grado A (mejor calidad), grado B (calidad intermedia) y grado C (menor calidad), de acuerdo a los requisitos microbiológicos siguientes:

Tabla 3.

Requisitos microbiológicos clasificación leche cruda de vaca.

Clasificación	Recuento total de microorganismos Aerobios Mesófilos
Clase A	< 300,000 UFC/mL
Clase B	300,000 UFC/mL - 600,000 UFC/mL
Clase C	< 600,000 UFC/mL

Nota. Datos tomados de CONACYT (2008).

- ii. Criterios microbiológicos para la vigilancia sanitaria de la Leche pasteurizada.

Según RTCA 67.04.50:17 en el apartado de criterios microbiológicos para la vigilancia sanitaria, la leche pasteurizada es clasificada como Alimento tipo A, pues es considerado como un alimento que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tiene una alta probabilidad de causar daño a la salud, de no cumplirse con la calidad microbiológica requerida (COMIECO, 2018).

Se realiza un plan de muestreo por atributos donde:

n: número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis

m: criterio microbiológico por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud

M: criterio microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.

c: número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre m y M para que el alimento sea aceptable.

Los requisitos microbiológicos exigidos por este reglamento son:

Tabla 4.

Requisitos microbiológicos para leche pasteurizada RTCA 67.04.50:17.

1.1 Subgrupo del alimento: leche pasteurizada con o sin saborizantes, con o sin aromatizantes, sus mezclas de productos lácteos con aceite o grasa comestible y similares

Parámetro (Vigilancia)	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de alimento	Clase	n	c	M	M
<i>Escherichia coli.</i>	A	2		0	<3NMP/mL o <10 UFC/mL	----
<i>Salmonella spp</i>		2	5	0	Ausencia/25 g	----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/mL	10 ² UFC/mL
<i>Listeria monocytogenes</i>		2		0	Ausencia/25 g	----

Nota. Datos tomados de COMIECO (2018).

3.6.2 Calidad microbiológica de queso fresco.

En El Salvador se dispone de criterios microbiológicos que se deben cumplir para el subgrupo de quesos frescos, denotando valores mínimos y máximos que garanticen la inocuidad del alimento, haciendo referencia a la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*.

- i. Criterios microbiológicos para la vigilancia sanitaria de quesos frescos, no madurados, requesón y sus mezclas de producto lácteo con aceite o grasa vegetal comestible y similares (RTCA 67.04.50:17).

Los requisitos microbiológicos exigidos por este reglamento son:

Tabla 5.

Requisitos microbiológicos para quesos frescos, no madurados.

1.9 Subgrupo del alimento: quesos frescos, no madurados, requesón, sus mezclas de productos lácteos con aceite o grasa vegetal comestible o similares.

Parámetro (Vigilancia)	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de alimento	Clase	n	c	M	M
<i>Escherichia coli.</i>	A	3		1	10 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>		3	5	1	10 ² UFC/g	10 ³ UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>		2		0	Ausencia/25 g	----
<i>Salmonella spp</i>		2		0	Ausencia/25 g	----

Nota. En el caso de Panamá, se aplica el siguiente criterio microbiológico para *Staphylococcus aureus* n=5; c=1; m=10 UFC/g y M=10² UFC/g. Datos tomados de COMIECO (2018).

3.6.3 Calidad microbiológica de la crema (nata)

Los procedimientos de manipulación y envasado posteriores a la elaboración de alimentos a base de leche, tanto pasteurizada como no pasteurizada, (productos artesanales), deben evitar cualquier tipo de contaminación, y las condiciones de su almacenamiento debe ser adecuadas.

En la reglamentación técnica vigente, se establecen criterios microbiológicos para la vigilancia sanitaria y para el registro sanitario para este

producto, haciendo referencia a la presencia *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, y *Salmonella spp.*

- i. Criterios microbiológicos para la vigilancia sanitaria de crema (nata), crema dulce, crema batida, y sus mezclas de producto lácteo con aceite o grasa vegetal comestible y similares del RTCA 67.04.50:17.

Los criterios microbiológicos establecidos por este reglamento son:

Tabla 6.

Criterios microbiológicos para crema ácida (natilla), crema dulce, crema batida, y sus mezclas.

1.6 Subgrupo del alimento: crema dulce crema acida (natilla) crema batida, sus mezclas de producto lácteo con aceite vegetal o grasa vegetal comestible y similares.						
Parámetro (Vigilancia)	Plan de muestreo				Limite	
	Tipo de alimento	Clase	n	c	M	M
<i>Salmonella spp.</i>		2		0	Ausencia/25g	----
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	3	5	1	10 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Escherichia coli</i>		2		0	<3 NMP/g o < 10 UFC/g	----
<i>Listeria monocytogenes</i>		2		0	Ausencia/25 g	----

Nota. Datos tomados de COMIECO (2018).

En el presente estudio se evaluó la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos y crema artesanal, parámetros que están regulados en el RTCA 67.04.50:17 bajo los subgrupos de alimentos 1.6 (cremas) y 1.9 (quesos frescos no madurados). Este reglamento establece límites microbiológicos

específicos para *S. aureus*, con valores de aceptación de hasta 10^2 UFC/g (m) para el queso fresco y 10 UFC/g (m) para la crema y valores de rechazo por encima de 10^3 UFC/g (M) para el queso fresco y 10^2 UFC/g (M) para la crema, bajo un plan de muestreo de tres clases ($n=5$, $c=1$).

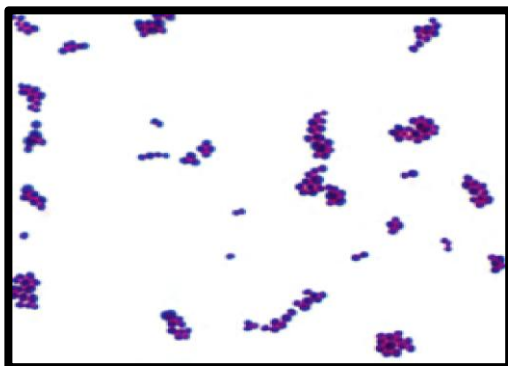
3.7 Generalidades del patógeno *Staphylococcus aureus*

3.7.1 Morfología microscópica del género *Staphylococcus*

Los miembros del género *Staphylococcus* son células esféricas (cocos) grampositivos que tienden a disponerse en racimos similares a uvas, su tamaño oscila entre 0.8 y 1.5 micrómetros (μm) de diámetro. Aunque los estafilococos tienen una marcada tendencia a formar racimos (del griego *Staphyle*, que significa racimo de uvas), también se pueden observar células solas, en pares o en cadenas cortas. Los estafilococos tienen una estructura grampositiva típica en cuanto a su pared celular. Son bacterias de forma esférica, no flageladas, no móviles y no forman esporas. Los estafilococos se desarrollan mejor en condiciones aeróbicas, pero son anaerobios facultativos, y poseen una temperatura de crecimiento óptima de 30-37°C (Ryan & Ray, 2014).

Figura 1.

Tinción de Gram de Staphylococcus aureus.



Nota. Muestra cocos grampositivos dispuestos en pares, tetradas y racimos. Obtenida de Carroll (2016).

Taxonomía de *S. aureus*

S. aureus pertenece al dominio Bacteria, Reino Eubacteria, Filo o División Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Bacillales, Familia Staphylococcaceae, al Género *Staphylococcus* y la especie *aureus*. El género *Staphylococcus* tiene por lo menos 45 especies diferentes (Carroll, 2016). Entre las especies de *Staphylococcus* clínicamente importantes se destacan *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, aunque no hay que descartar a las demás especies de estafilococos coagulasa negativos, que contribuyen a infecciones sobre todo a nivel intrahospitalaria, aunque en la actualidad también han sido relevantes en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Hamdan *et al.*, 2016).

3.7.2 Información bioquímica de *S. aureus*

Según MacFaddin (2003), *Staphylococcus aureus* es Hemolizina positiva (β -hemólisis), Catalasa positivo, Coagulasa positivo, Oxidasa negativo, Nucleasa Termoestable positivo, Voges Proskauer positivo, Ureasa Positivo, Sensible a la Novobiocina, Fosfatasa alcalina positivo, Reducción positiva de Nitratos a nitritos, Arginina dihidrolasa positivo, Lecitinasa positivo, Lipasa positivo y Hialuronidasa positivo.

Staphylococcus aureus también posee la capacidad de utilizar los siguientes carbohidratos produciendo reacción ácida en condiciones aeróbicas: D-Glucosa (también en anaerobiosis), D-Manitol (también en anaerobiosis), D-Fructosa, D-Manosa, D-Maltosa, D-Lactosa y Sacarosa.

Tabla 7.

Características bioquímicas típicas sugeridas para la identificación de S. aureus FDA (2016).

Prueba bioquímica	S. aureus
Actividad de la catalase	+
Producción de coagulase	+
Producción de termonucleasa	+
Sensibilidad a la lisostafina	+
Utilización anaeróbica de la glucosa	+
Utilización anaeróbica del manitol	+

Nota. Dónde el 90% o más: “+” son la mayoría de las cepas positivas y “-“:son la mayoría de las cepas negativas. Datos tomados de BAM capítulo 12 de FDA (2016).

3.7.3 Confirmación de identificación bacteriana por VITEK 2 Compact

VITEK 2 es un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Este sistema automatizado de identificación microbiana fue desarrollado por bioMérieux como una herramienta en la identificación microbiana, el tiempo de respuesta se reduce hasta 22 horas para la mayoría de las bacterias en comparación con los métodos bioquímicos tradicionales y cumple con las características de integridad de datos (bioMérieux, 2025).

Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras. Las tarjetas están selladas en ambos

lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiado. Cada tarjeta tiene un tubo de transferencia pre-insertado para la inoculación. Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema (Ramos Pérez, 2023).

Existen varios tipos de tarjetas reactivas disponibles para la identificación de diferentes clases de organismos (bioMérieux, 2025):

GN – Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores.

GP – Cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos

YST – Levaduras y organismos levaduriformes

BCL – Bacilos formadores de esporas Gram positivos.

NH – Neisseria y Haemophilus

AST – Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Para la lectura de las reacciones, cada tarjeta es removida del carrusel-incubador cada 15 min, transportada al sistema óptico de transmitancia el que usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar las reacciones de turbiedad o el color de los productos metabólicos, y devuelta a su sitio en el carrusel hasta el siguiente tiempo de lectura. Los datos son registrados a intervalos de 15 min durante el periodo de incubación total. Los cálculos se realizan con los datos “crudos” y se comparan en los umbrales para determinar las reacciones para cada prueba. Los resultados aparecen como “+”, “-“, o cuando las reacciones son débiles estas se indican como “?” (Ramos Pérez, 2023).

Las bases de datos de los productos de identificación están construidas con un gran número de cepas de microorganismos perfectamente caracterizados y probados bajo varias condiciones de cultivo. Estas cepas provienen de una variedad de fuentes clínicas e industriales, así como de colecciones de cultivo públicas (Ejem.: ATCC) y universitarias (Ramos Pérez, 2023).

3.8 Factores de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*

En el contexto de la inocuidad alimentaria, las toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*, en especial las enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED y SEE, representan una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Estas toxinas son termoestables, resistentes a las enzimas digestivas y pueden conservar su actividad biológica incluso tras procesos térmicos moderados, como los empleados en la producción artesanal de quesos frescos y crema (Argudín *et al.*, 2010; Johler *et al.*, 2016).

La ingestión de pequeñas cantidades puede provocar cuadros clínicos agudos, caracterizados por náuseas, vómitos, cólicos abdominales y diarrea en menos de 6 horas tras la exposición (Tang *et al.*, 2012). Su detección en alimentos listos para el consumo resalta la importancia del monitoreo microbiológico como herramienta clave para la vigilancia sanitaria y la protección de la salud pública.

En años recientes, de acuerdo con Mlynarczyk-Bonikowska *et al.* (2022). La incidencia de bacteriemias por *S. aureus* ha aumentado significativamente, y se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio (BSI) e intoxicaciones ocasionadas por alimentos.

S. aureus tiene un enorme potencial de patogenicidad, los factores de virulencia ocurren en diferentes frecuencias en diferentes clones bacterianos.

Algunos factores de patogenicidad tienen varias funciones y pueden incluirse en varios grupos simultáneamente. Con frecuencia, los genes de virulencia aparecen junto con genes de resistencia a fármacos en los mismos elementos genéticos. Sin embargo, la mera presencia de un gen del factor de patogenicidad no siempre equivale a su expresión, que está sujeta a uno o más sistemas reguladores presentes en la célula bacteriana (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

3.8.1 Componentes estructurales:

- i. Cápsula: Compuesta de polisacáridos que contribuyen a la resistencia de la bacteria contra la quimiotaxis y la fagocitosis; además inhibe la proliferación de células mononucleares (Pasachova Garzón *et al.*, 2019).
- ii. Peptidoglicano: Es el principal componente de la pared celular bacteriana de *S. aureus*. Permite la estabilidad osmótica y estimula la producción de pirógenos endógenos y es quimioatrayente leucocitario (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).
- iii. Ácido lipoteicoico (ALT): Es considerado como uno de los principales factores de virulencia de las bacterias Grampositivas. Una forma no acetilada del ALT es el ácido teicoico, que está unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular bacteriana. El ALT funciona como una molécula de adhesión que facilita la asociación de las bacterias a las células, la colonización y la invasión en tejidos. Posee capacidad de inducir respuestas inflamatorias y está relacionado con sepsis bacterianas (Gutiérrez-Venegas & Cardoso-Jiménez, 2006).
- iv. Proteína Estafilocócica A: Es una proteína presente en la pared celular de la mayoría de las cepas del *Staphylococcus aureus*. La proteína se une

selectivamente a la región Fc de inmunoglobulina G (igG) humana normal y es capaz de provocar actividad de anticuerpos y reacciones de hipersensibilidad. Altera la función ciliar, estimula la producción de pirógenos endógenos y es quimioatrayente leucitario (OPS, 2016).

3.8.2 Productos extracelulares

Staphylococcus aureus es un microorganismo capaz de producir componentes superficiales llamados toxinas y producir enzimas extracelulares. En general, estos componentes son capaces de provocar severas intoxicaciones alimentarias dependiendo de la cantidad ingerida de alimento (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).

i. Enzimas:

- Enzima coagulasa: La estafilocoagulasa (coagulasa), es la enzima producida por *S. aureus* que es relativamente estable al calor y resiste temperaturas hasta de 60°C por 30 minutos. Esta proteína es excretada al medio extracelular por las cepas de *S. aureus* y tiene la capacidad de convertir el fibrinógeno del plasma sanguíneo en coágulos (trombos) de fibrina (MacFaddin, 2003).
- Enzima Fibrolisina: Tiene la función de disolver los coágulos de fibrina (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).
- Enzima Catalasa: Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y liberación de oxígeno molecular en forma de burbujeo. Esta enzima está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias

facultativas (aerotolerantes), que contienen citocromos (MacFaddin, 2003).

- Enzima Hialuronidasa: Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).
- Enzima Lipasa: Posee la capacidad de Hidrolizar los triglicéridos y diglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol, esta enzima ayuda a la diseminación de *S. aureus* en los tejidos al hidrolizar los lípidos de las superficies epiteliales de los seres humanos (MacFaddin, 2003).
- Enzima Desoxirribonucleasa (DNasa): Endonucleasa extracelular que posee la capacidad de hidrolizar el ADN en fragmentos de mononucleótidos y dinucleótidos. (MacFaddin, 2003).
- Enzima β -lactamasa: Enzima con actividad de penicilinas, capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico y con esto inactivar el antimicrobiano penicilina (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

3.8.3 Factores de superficie:

- i. Biopelícula: Algunas cepas de *S. aureus* producen una capa polisacárida extracelular denominada biofilm. Ésta es una red extracelular que ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies y colonizar nuevos sitios; además, de protegerlas de la fagocitosis, así como de los antibióticos. (Cervantes-García *et al.*, 2014).
- ii. Proteínas superficiales:
 - Proteínas de unión a colágeno, Cna

- Proteínas de unión a fibronectina FnBPA y FnBpB: Las FnBPs cumplen una función importante en la invasión de las células del huésped debido a la capacidad de estas proteínas de adherirse a la fibronectina (Pasachova Garzón *et al.*, 2019).
- Proteínas de unión a fibrinógeno ClfA y ClfB: La importancia de estas proteínas está dada por ser el precursor de la fibrina la cual interviene en los procesos de coagulación y su posible participación en enfermedades aterotrombóticas (Pasachova Garzón *et al.*, 2019).

3.8.4 Resistencia a los antibióticos

Los antibióticos son medicamentos que combaten las infecciones bacterianas en personas y animales. Funcionan matando las bacterias o dificultando su crecimiento y multiplicación. Usados correctamente, pueden salvar vidas pero hay un creciente problema de resistencia a antibióticos. Esto ocurre cuando las bacterias cambian y resisten el efecto del antibiótico. Las bacterias resistentes pueden seguir creciendo y multiplicarse. Cada vez que toma antibióticos, existe un riesgo de que la bacteria se vuelva resistente. Las infecciones resistentes pueden ser complejas y, en ocasiones, imposibles de tratar. Se pueden propagar a otras personas. También pueden causar infecciones que ciertos antibióticos no pueden curar. Un ejemplo es el estafilococo resistente a la meticilina (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, o SARM) (*Resistencia a los antibióticos*, 2021).

3.9 *Staphylococcus aureus* y su resistencia a los antibióticos.

De acuerdo con Zendejas Manzo *et al* (2014), el *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema de salud, esto es, gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbilidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario. En los humanos, causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas y su principal impacto es ocasionado por las cepas de *S. aureus*, que son sumamente resistentes a los antibióticos que antes eran eficaces contra el tratamiento de las infecciones.

Desde el punto de vista genómico, la resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar; sin embargo, también se pueden inducir artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, como sería el abuso o la utilización de antibióticos; asimismo, *S. aureus* tiene características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por alimentos (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).

3.9.1 Resistencia de *S. aureus* a los Antibióticos Betalactámicos.

Desde el descubrimiento de *S. aureus* se han utilizado diferentes tratamientos. En 1940 la penicilina G era el antibiótico de elección para tratar estas infecciones; sin embargo, algunas cepas adquirieron resistencia no solo a este medicamento, sino a la metilina y al grupo de los β -lactámicos (Pasachova Garzón *et al.*, 2019).

Aproximadamente el 10% de las cepas de *S. aureus* en los Estados Unidos son susceptibles a la penicilina. Sin embargo, muchas cepas de *S. aureus*, aunque resistentes a la penicilina, siguen siendo susceptibles a las penicilinas estables a la penicilinas, como la oxacilina y la meticilina. Cepas que son resistentes a la oxacilina y la meticilina, históricamente denominadas *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), son resistentes a todos los agentes β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas y los carbapenémicos, aunque pueden ser susceptibles a la nueva clase de cefalosporinas activas de MRSA; por ejemplo, la ceftarolina (*Centers for Disease Control and Prevention, 2019*).

3.9.2 Clasificación y estructura química de los antibióticos betalactámicos.

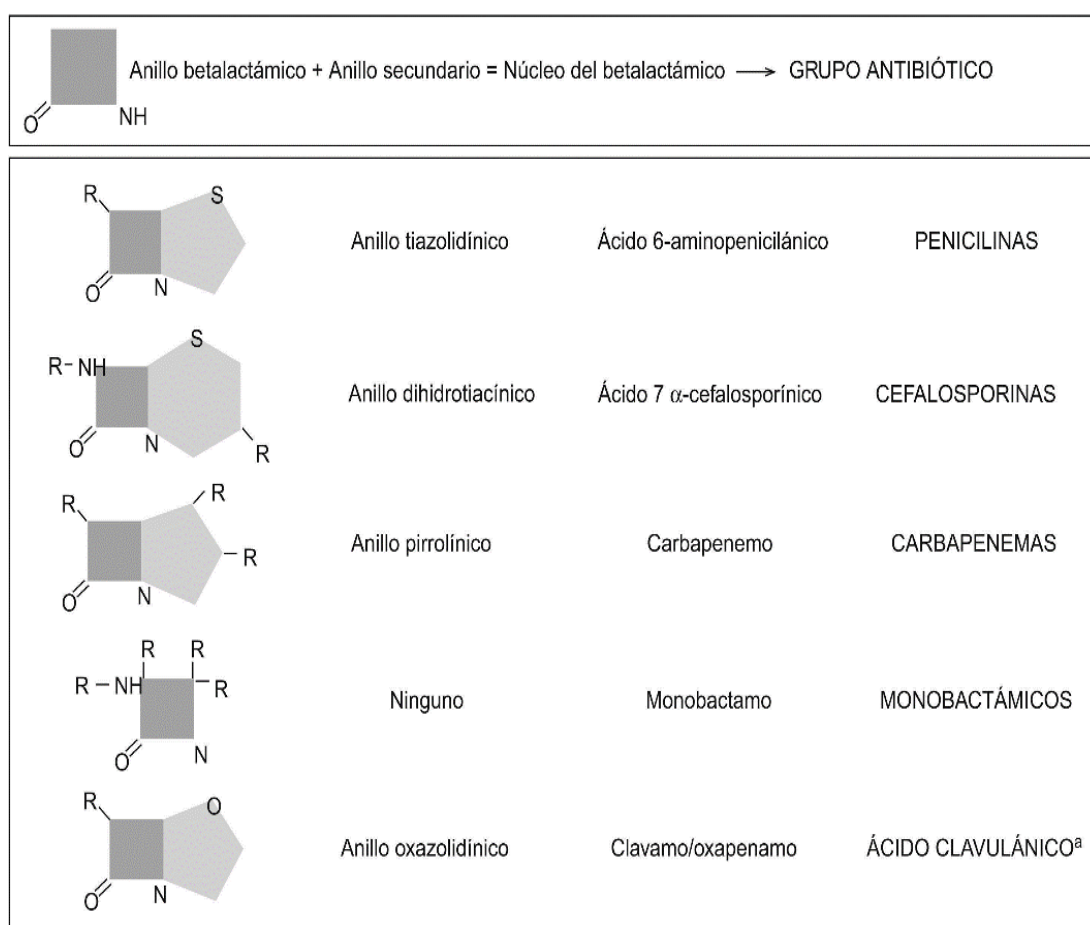
Según lo planteado por Suárez & Gudiol (2009), la presencia del anillo betalactámico define químicamente a la familia de estos antibióticos. Además, este determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa (actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal) y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) de esta gran familia de antibióticos. No obstante, para que el betalactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos).

La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas (tabla 11). Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico,

como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas (Suárez & Gudiol, 2009).

Figura 2.

Grupo funcional de los antibióticos Betalactámicos y sus diferencias estructurales.



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Nota. Obtenida de Suárez & Gudiol (2009)

Tabla 8*Clasificación de los antibióticos betalactámicos*

Grupo	Vía de administración	
	Parenteral	Oral
Penicilinas sensibles a las betalactamasas		
Espectro reducido	Bencilpenicilina (penicilina G)	Fenoxibencilpenicilina (penicilina V)
Activas frente a enterobacterias (aminopenicilinas)	Ampicilina	Amoxicilina, ampicilina
Activas frente a Enterobacterias y <i>Pseudomonas</i>	Ureidopenicilinas: <i>piperacilina, azlocilina, mezlocilina;</i> Carboxipenicilinas: <i>carbenicilina, ticarcilina</i>	<i>Indanil carbenicilina</i>
Penicilinas resistentes a las betalactamasas		
Antiestafilocócicas	Cloxacilina, <i>metcilina, nafcilina</i>	Cloxacilina, <i>dicloxacilina</i>
Combinadas con inhibidores de las betalactamasas	Amoxicilina con ácido clavulánico, piperacilina con tazobactam, <i>ampicilina con sulbactam, ticarcilina con ácido clavulánico</i>	Amoxicilina con ácido clavulánico
Cefalosporinas		
Primera generación	Cefazolina, cefalotina, cefradina	Cefalexina, cefadroxilo, cefradina
Segunda generación		
Activas frente a <i>Haemophilus</i>	Cefuroxima, cefonicida, <i>cefamandol, ceforanida</i>	Cefaclor, cefuroxima axetil, cefprozilo
Activas frente a <i>Bacteroides</i>	Cefoxitina, <i>cefotetán, cefmetazol, cefminox</i>	
Tercera generación		

Grupo	Vía de administración	
	Parenteral	Oral
Espectro ampliado	Ceftriaxona, cefotaxima, <i>ceftizoxima</i>	Cefditoren pivoxil, ceftibuteno, cefixima, cefepodoxima, <i>cefdinir</i>
Espectro ampliado y antipseudomonas	Ceftacidima, cefepima, <i>cefoperazona</i>	Ninguno
Carbapenémicos	Imipenem con cilastatina, meropenem, ertapenem	Ninguno
Monobactámicos	Aztreonam	Ninguno

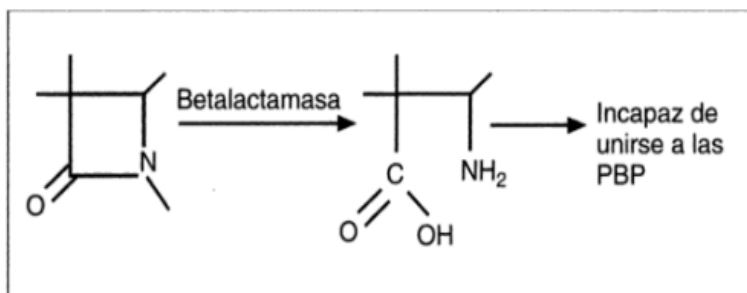
Nota. Imagen obtenida de Suárez & Gudiol (2009).

3.9.3 Resistencia de *S. aureus* a los antibióticos betalactámicos:

La resistencia a penicilina, mediada por un mecanismo enzimático, específicamente una β -lactamasa con actividad de penicilinasas codificada en el gen *blaZ* y ubicado en un plásmido, capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico y con esto inactivar este antimicrobiano (Ver figura 3). La actividad de penicilinasas está codificada en las cepas de *S. aureus*, la β -lactamasa está codificada por el gen *blaZ* y los genes reguladores estrechamente vinculados a su expresión, *blaI* y *blaR*. Además de la β -lactamasa codificada por plásmidos, los genes *bla* pueden estar ubicados en transposones o dentro del ADN cromosómico, capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico y con esto inactivar a la penicilina. (Malachowa & DeLeo, 2010).

Figura 3.

Modo de acción de la enzima Betalactamasa al hidrolizar el anillo betalactámico.



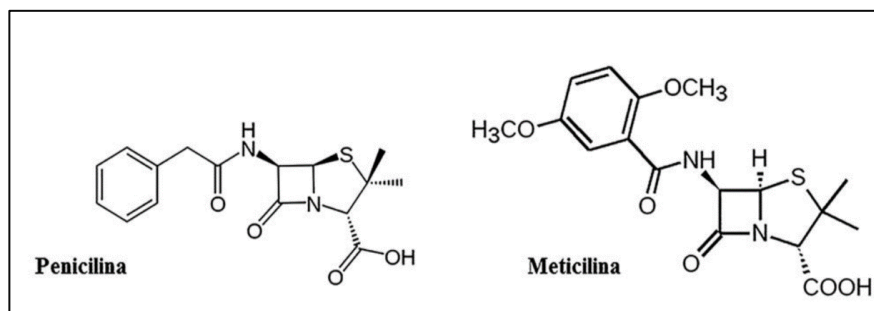
Nota. Obtenida de Forbes (2009)

La proteína blanco de acción de los β -lactámicos se conoce universalmente como PBP; es decir, Proteínas de unión a las penicilinas (del inglés penicillin-binding protein). Las PBPs corresponden a enzimas, principalmente con función transpeptidasa, que participan en el entrecruzamiento de las hebras de peptidoglicano (PG), específicamente entre las cadenas laterales de naturaleza aminoacídica que están unidas al ácido N-acetilmurámico. Con este entrecruzamiento de hebras de PG la bacteria logra resistencia frente a la lisis osmótica (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

En el año 1959 se crea la primera penicilina sintética resistente a la penicilinas producida por *S. aureus*; es decir, la meticilina. Esta molécula se convirtió en la precursora del conocido grupo de las penicilinas antiestafilocócicas, cuyas modificaciones químicas permitieron resistir la acción de esta β -lactamasa. Específicamente, meticilina posee un mayor tamaño molecular que penicilina, a expensas del grupo dimetoxibenzoil añadido al ácido 6-aminopenicilánico (como radical R₁), lo que confiere resistencia a la acción hidrolítica de la penicilinas por impedimento estérico (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

Figura 4.

Estructura química de penicilina y meticilina.



Nota. Obtenida de Aguayo-Reyes *et al.*, (2018).

Todas las cepas de *S. aureus* poseen cuatro tipos de PBPs: PBP1 (posee las funciones transpeptidasa y de dimerización), PBP2 (posee las funciones transpeptidasa, transglicosilasa y carboxipeptidasa), PBP3 (cuenta con las funciones de transpeptidasa y dimerización) y PBP4 (cuenta con la función D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa). Las primeras tres tienen alto peso molecular, PBP4 es la única de bajo peso molecular. Ninguna de estas PBPs nativas tiene regulación alostérica (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

Según lo descrito por Aguayo-Reyes *et al.* (2018), el mecanismo más importante y frecuente que determina la resistencia a meticilina es la adquisición de una nueva PBP, denominada PBP2a. La nueva transpeptidasa PBP2a posee una baja afinidad (no se une) a la meticilina y otros antibióticos betalactámicos. Lo anterior determina que con las concentraciones que alcanza el β -lactámico *in vivo* no se forma el intermediario acil-enzima entre el antimicrobiano y la PBP2a, por lo que la función de transpeptidación de la enzima se mantiene, permitiendo el entrecruzamiento de hebras de Peptidoglicán.

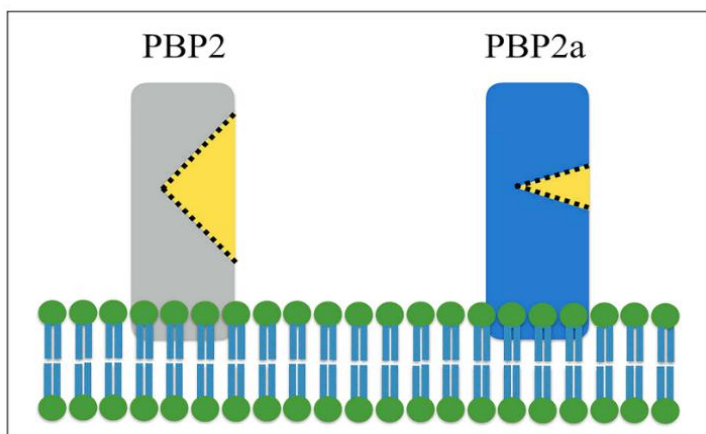
La nueva transpeptidasa PBP2a posee un sitio de regulación alostérico, al que podría unirse peptidoglicán en formación, lo que favorece la apertura del sitio activo para dejar mejor posicionado el residuo de serina nucleofílico que participa en la formación del enlace peptídico. Lo anterior tiene bastante lógica,

ya que el sitio activo de la PBP sería más accesible sólo en presencia de peptidoglicán naciente que debe ser transpeptidado (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

Los antibióticos betalactámicos inactivan el dominio transpeptidasa PBP2, mientras que el dominio transglicosilasa PBP2 permanece activo, en el caso de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), coopera con la transpeptidasa PBP2a. PBP2a, junto con otras 40 enzimas, participa en la formación de puentes de pentaglicano, entre L-lisina (posición 3 del pentapéptido) de una cadena y D-alanina (posición 4 del pentapéptido) de la otra cadena de peptidoglicano. Esto permite la síntesis de la pared celular bacteriana de *S. aureus*. La expresión de PBP2a puede ser inducible o constitutiva (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

Figura 5.

Esquema comparativo las proteínas de PBP2 (nativas) y PBP2a (mutante).



Nota. Tomado de Aguayo-Reyes *et al.*, (2018). Destaca la configuración más estrecha del sitio activo de la PBP2a, responsable de la menor afinidad por el antibiótico β -lactámico.

Staphylococcus aureus resistente a meticilina posee el gen *mecA*, que codifica la PBP2a, responsable de la resistencia a meticilina. A su vez, este gen se encuentra inserto en una isla genómica, denominada SCC*mec*, del inglés

Staphylococcal Cassette Chromosome mec (*cassette cromosomal estafilocócico mec*), que son fragmentos relativamente grandes de ADN que siempre se insertan en el gen *orfX* en el cromosoma de *S. aureus*. SCC puede codificar resistencia a antibióticos y/o determinantes de virulencia (Malachowa & DeLeo, 2010).

Existen varios tipos y subtipos de SCC *mec*, pero todos comparten algunas características. Estos *cassettes* se integran en el cromosoma junto al gen *orfX*, que codifica para una metiltransferasa ribosomal, y todos poseen un complejo de genes *mec*, compuesto por *mecA* (que codifica la PBP2a) y los genes *mecI* y *mecR* cuyos productos regulan la expresión de la resistencia a meticilina (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

Se ha propuesto que el gen *mecA* podría haber residido inicialmente en especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa, como *S. sciuri* o *S. fleuretti* (ambos relacionados con animales) y desde éstos haberse transferido a *S. aureus*. En resumidas cuentas, si una cepa de SARM es expuesta a meticilina o cloxacilina, el antimicrobiano es capaz de inhibir *in vivo* las PBPs nativas de la bacteria (PBP 1-4), pero no logra inhibir a la PBP2a, manteniendo el entrecruzamiento del PG en presencia de cualquier β -lactámico, exceptuando por supuesto, las cefalosporinas de 5ª generación (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

3.9.4 Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

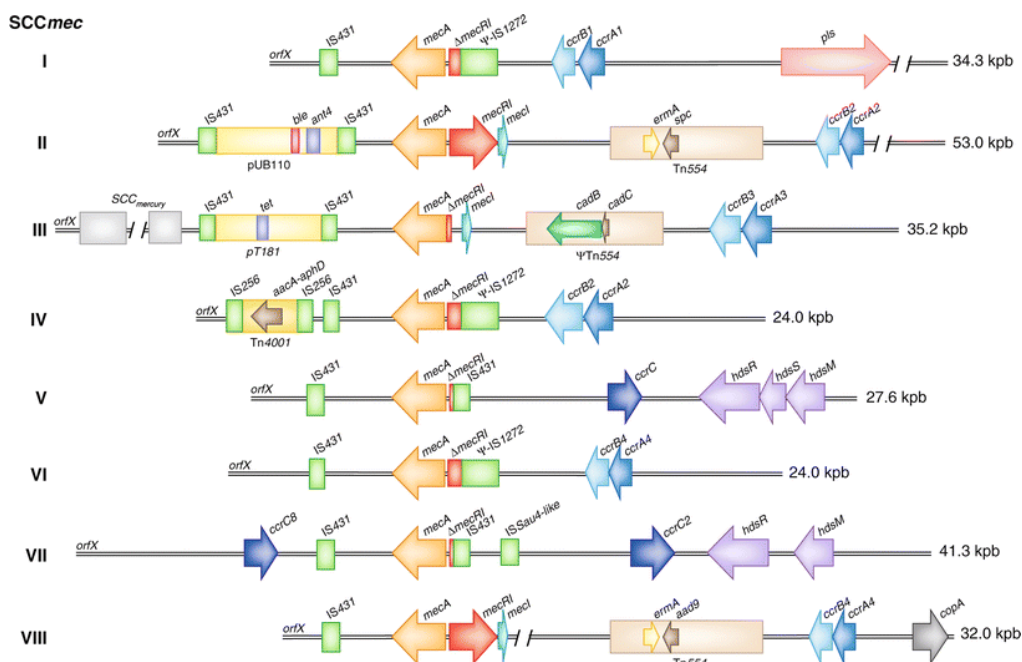
El CLSI en su estándar aprobado M100, recomienda la prueba de difusión en disco en agar Mueller-Hinton o por determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés), además puede utilizarse el Agar sal Oxacilina como parte de los métodos alternativos de prueba para MRSA. Los estafilococos resistentes a la oxacilina son resistentes a todos los agentes

antimicrobianos β -lactámicos actualmente disponibles, con la excepción de las cefalosporinas más nuevas con actividad anti-MRSA. De este modo, la susceptibilidad o la resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos β -lactámicos pueden deducirse analizando solo cefoxitina u oxacilina (CLSI, 2024).

La cefoxitina se prueba como sustituto de la oxacilina para algunas especies de *Staphylococcus*, como es el caso de *Staphylococcus aureus*, ya que la cefoxitina es un inductor aún mejor del gen *mecA*, y las pruebas dan resultados más reproducibles y precisos que las pruebas con oxacilina. Los aislamientos que resulten resistentes a cefoxitina u oxacilina, cuando se utilice el método de prueba apropiado para la especie, deben informarse como resistentes a meticilina (oxacilina). Si prueba solo cefoxitina, informe como susceptible o resistente a la meticilina (oxacilina) según el resultado de cefoxitina (CLSI, 2024).

Figura 6.

Estructura general del cassette cromosomal estafilocócico SCCmec.



Nota. Métodos de detección fenotípica de *Staphylococcus aureus* resistente al grupo de antibióticos betalactámicos (Malachowa & DeLeo, 2010).

Tabla 9.

Métodos fenotípicos para la detección de Staphylococcus aureus resistente a meticilina.

Organismo	Prueba con Cefoxitina CIM	Prueba con Cefoxitina por disco difusión	Prueba con Oxacilina CIM	Agar sal Oxacilina
<i>S. aureus</i>	Si (16–20 h)	Si (16–18 h)	Si (16–20 h)	Si (24 h)

Nota. Datos obtenidos de la Tabla 2C de la guía M100 del CLSI (2025). Donde MIC= Determinación de la Concentración mínima inhibitoria del microorganismo de prueba, con los antibióticos Oxacilina y Cefoxitina.

Los mecanismos de resistencia a la meticilina (oxacilina) distintos de *mecA* son raros e incluyen un nuevo homólogo del gen *mecA*, que es el gen *mecC*. Las MIC para las cepas con *mecC* suelen ser resistentes a la cefoxitina y sensibles a la oxacilina; la resistencia a *mecC* no se puede detectar mediante pruebas dirigidas a *mecA* o PBP2a. Los MRS, según lo definido por las pruebas de cefoxitina u oxacilina, según corresponda a la especie, se consideran resistentes a otros agentes betalactámicos, es decir, penicilinas, agentes combinados de betalactámicos, cefemas (con la excepción de ceftarolina) y carbapenémicos. Esto se debe a que la mayoría de los casos de infecciones por MRS documentadas han respondido mal a la terapia con β -lactámicos o porque no se han presentado datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de esos agentes (CLSI, 2025).

3.9.5 Ensayo para determinar la resistencia fenotípica por disco difusión en agar.

El antibiograma disco difusión en placa, está basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que sugiere el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio recomienda para la determinación de la

sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este método, recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), implica la colocación de discos impregnados con diferentes antibióticos sobre un agar inoculado con la bacteria bajo estudio. (Arreces Martínez, 2015).

El antibiograma por disco de difusión en placa consiste en depositar, en la superficie de Agar Müller-Hinton de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 - 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de las cepas (Arreces Martínez, 2015).

Figura 7.

Resultados de halos de inhibición por disco difusión para la evaluación de cepas susceptibles a antibióticos



Nota. Tomado de Sosa *et al.* (2022).

Tabla 10.

Criterios de interpretación (en mm) para la prueba de difusión en disco de cefoxitina en agar Müller-Hinton

Agente antimicrobiano de prueba	Contenido del disco	Categorías interpretativas y punto de corte de diámetro de zona (mm)	
		Sensible ¹	Resistente ²
Cefoxitina	disco de cefoxitina (30µg)	≥ 22 mm	≤ 21 mm

Nota. Datos obtenidos de la Tabla 2C Clinical & Laboratory Standards Institute (2025).

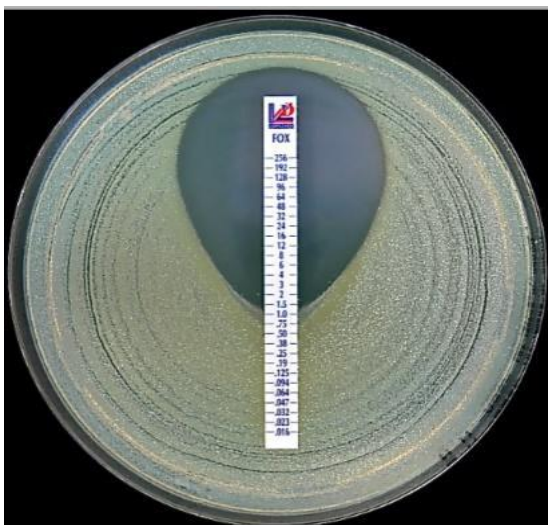
¹Indica que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado. ²Significa que el organismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismo de resistencia contra ese determinado antibiótico.

3.9.6 Ensayo para determinar la resistencia fenotípica en agar por Epsilometría (E-test).

La Epsilometría E-test es otro método estandarizado recomendado por el CLSI para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los agentes antimicrobianos frente a aislados bacterianos de prueba. Este método combina la simplicidad del método de difusión en disco con la capacidad de obtener resultados cuantitativos precisos de CMI, la facilidad para detectar los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Cuando se aplica la tira de prueba E-test sobre una superficie de agar inoculado, el gradiente exponencial preformado de agente antimicrobiano se transfiere a la matriz de agar. Después de 18 horas de incubación o más, se forma una elipse de inhibición simétrica centrada a lo largo de la tira. La MIC se lee directamente de la escala en términos de µg/mL en el punto donde el borde de la elipse de inhibición se cruza con la tira MIC Test Strip (*MIC Test Strip*, 2023).

Figura 8.

Lectura de Concentración inhibitoria mínima inhibitoria MIC Test Strip LIOFILCHEM



S. aureus ATCC® 29213
MIC Test Strip FOX 0.016 - 256 µg/mL
M.I.C. = 1.5 µg/mL

Nota. Tomado del Manual de fabricante LioFilChem (2023).

Tabla 11.

Criterios de interpretación (en µg/mL) para las pruebas de MIC de cefoxitina en agar Müller-Hinton.

Agente antimicrobiano de prueba	Categorías interpretativas y punto de corte MIC	
	Sensible ¹	Resistente ²
	≤ 4 µg	≥ 8 µg
Cefoxitina	(cefoxitina)	(cefoxitina)

Nota. Datos obtenidos de la Tabla 2C de la guía M100 del (2025).

¹Indica que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado.

²Significa que el organismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismo de resistencia contra ese determinado antibiótico.

3.10 Métodos de detección genotípica de *Staphylococcus aureus* resistente al grupo de antibióticos betalactámicos.

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se pueden utilizar para la detección directa de *mecA*, el gen más común que media la resistencia a la oxacilina en los estafilococos (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2019).

La expresión fenotípica de la resistencia a meticilina puede ser variable incluso cuando la uniformidad genética se ve afectada por las condiciones de cultivo, temperatura y osmolalidad del medio. La resistencia fenotípica, mediante pruebas de sensibilidad de disco de difusión con el antibiótico betalactámico de prueba se demuestra en términos de zona de inhibición disminuida para oxacilina y cefoxitina o aumento de la concentración inhibitoria mínima (MIC). Un patrón de resistencia heterogéneo puede causar dificultades para detectar cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) mediante métodos fenotípicos, es por ello que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es considerada como el estándar de oro para la detección y confirmación del gen *mecA* (Nair *et al.*, 2021).

Según recomienda Nair *et al.* (2021), es aconsejable de ser posible realizar una confirmación por PCR para la confirmación de MRSA ya que en su estudio demostró que de 105 cepas de MRSA resistentes a la cefoxitina, 95 eran positivas para el gen *mecA* en la PCR y 10 eran negativas para el gen *mecA*. Los resultados están en concordancia con otro estudio en India que detectó 92 aislamientos *mecA* positivos y 10 aislamientos como *mecA* negativos de 102 cepas de MRSA resistente a cefoxitina (Kali *et al.*, 2014). Sin embargo, las pruebas de PCR del gen *mecA* no detectarán nuevos mecanismos de resistencia como el gen *mecC* o fenotipos poco comunes como la resistencia límite a la oxacilina.

3.10.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la producción (amplificación) rápida de millones a miles de millones de un segmento específico de ADN. La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, denominados cebadores, para seleccionar un segmento del genoma que se amplificará, y luego múltiples sesiones de síntesis de ADN para amplificar ese segmento (*Reacción en cadena de la polimerasa PCR*, 2022).

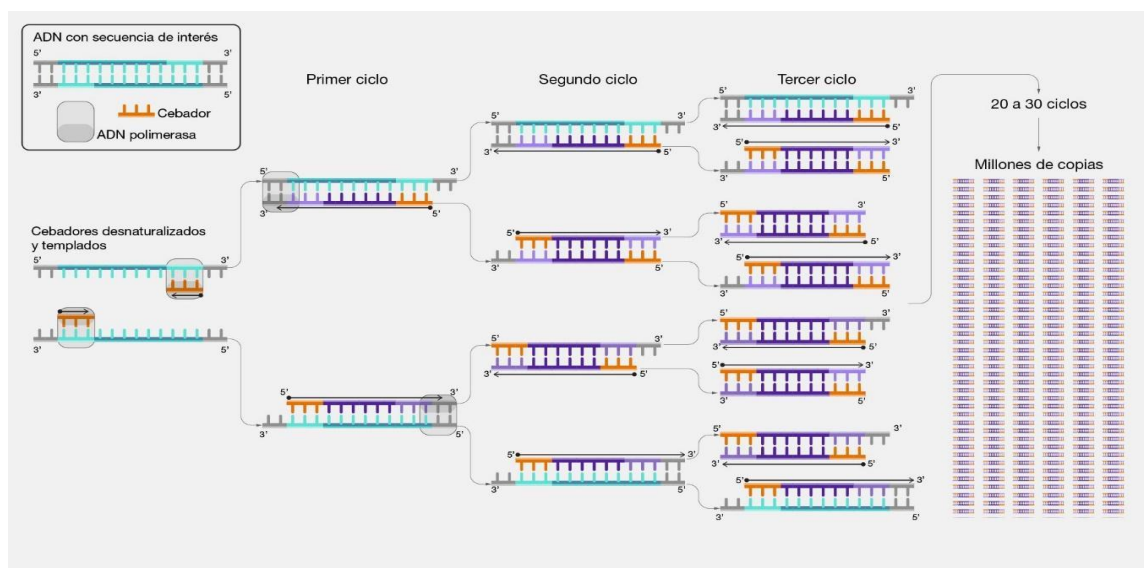
Acorde con Jiménez Moraleda *et al.* (2021), para amplificar un segmento de ADN utilizando la PCR, primero se calienta la muestra para la desnaturalización del ADN, es decir para que se separen las dos hebras. Luego, una enzima llamada Taq DNA polimerasa, que sintetiza (construye) dos nuevas hebras de ADN, utilizando las hebras originales como plantillas. Este proceso resulta en la duplicación del ADN original, en la que cada una de las nuevas moléculas contiene una hebra vieja y una hebra nueva de ADN.

Entonces, cada una de estas hebras puede usarse para crear dos copias nuevas, y así sucesivamente. El ciclo de la desnaturalización y síntesis del nuevo ADN se repite tantas como 30 o 40 veces, dando lugar a más de mil millones de copias exactas del segmento de ADN original. El proceso de ciclado completo de la PCR es automático y puede completarse en tan sólo unas pocas horas. El proceso es dirigido por una máquina llamada termociclador, que está programada para cambiar la temperatura de la reacción en intervalos cortos de tiempo (pocos minutos) para hacer posible la desnaturalización y síntesis del ADN (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

- i. Las etapas de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según Jiménez Moraleda *et al.* (2021) son:
- **Desnaturalización del ADN:** Es el momento en el que la plantilla de ADN de doble cadena se calienta para separarlo en dos cadenas simples. Se calienta a 94-95°C, durante 15-30 segundos, haciendo que los enlaces de hidrógeno entre las bases en dos cadenas de ADN se rompan y las dos se separen.
 - **Alineación del ADN:** Se baja la temperatura a 50-65°C, durante 10-30 segundos, para permitir que los cebadores (primers) de ADN se adhieran a la plantilla de ADN monocatenario mediante enlaces de hidrógeno.
 - **Ampliación del ADN:** Aumenta la temperatura a 72°C, durante 1 minuto, La Taq polimerasa construye la hebra complementaria. Se adhiere al primer y luego agrega bases de ADN a la hebra individual una por una en la dirección 5' a 3'.

Figura 9.

Esquema general de las etapas la PCR



Nota. Esquema obtenido de: (Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, 2022).

ii. Los reactivos y materiales necesarios para una PCR de acuerdo con el artículo de Jiménez Moraleda *et al.* (2021) son:

- Una plantilla de ADN: el ADN que se debe copiar, que generalmente se extrae y se purifica de la sangre o de otro tejido.
- Cebadores o iniciadores (primers): oligonucleótidos monocatenarios, que poseen de 20 a 30 bases de longitud, que se unen a la plantilla de ADN por los extremos para que la polimerasa inicie la reacción para empezar a sintetizar el material genético. Se necesitan dos cebadores para la PCR, cada uno de ellos complementario a una cadena de ADN que queremos amplificar, y delimitan la zona del ADN a amplificar. Estas dos hebras de ADN separadas son complementarias, y van en sentido opuesto (desde un extremo, el extremo 5', al otro, el extremo 3'); de manera que hay dos primers: uno directo (forward) y uno inverso (reverse).
- Una ADN polimerasa termoestable: para sintetizar el ADN. La ADN polimerasa Taq proviene de bacterias que pueden llegar a temperaturas superiores a los 90°C, por lo que puede soportar las temperaturas necesarias para romper las hebras de ADN en la etapa de desnaturalización del ADN.
- Oligonucleótidos dNTP (Trifosfatos de desoxirribonucleótidos): los componentes básicos del ADN son 4 tipos de nucleótidos, integrados por 4 bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina), por lo que para poder obtener nuevas moléculas de ADN (las copias) son indispensables estos componentes.
- Solución tampón: Utilizada para regular el pH, imitando las condiciones de acidez o basicidad en las que se produce la síntesis del material genético.

- Solución de cloruro de magnesio: el cloruro de magnesio se disocia y se libera Mg^{+2} , que se usan como cofactores de la polimerasa.
 - Termociclador: equipo programado para alterar la temperatura de la reacción cada poco minuto para permitir la desnaturalización y síntesis del ADN, de manera que el proceso completo finalice en cuestión de pocas horas.
- iii. Tipos de reacción en cadena de la polimerasa, según el objetivo y los requisitos que se tenga. Las más habituales son:

- PCR punto final (cualitativa):

Conocida como PCR convencional, en la cual los fragmentos de ADN amplificados son posteriormente visualizados en un gel de agarosa (electroforesis) y proporciona evidencia cualitativa de la presencia de ese fragmento de ADN en la muestra («PCR en tiempo real», 2023).

- PCR múltiple:

Con esta técnica lo que se busca es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

- RT-PCR:

Técnica que involucra dos procesos: la transcripción inversa a partir de ácido ribonucleico (ARN) sintetiza ADN complementario (ADNc), con el cual se realiza posteriormente la(s) PCR(s) correspondiente(s). De esta forma se pueden amplificar genes que estaban expresados en el momento del estudio (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

- PCR anidada:

Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

- PCR en tiempo real o cuantitativa:

De acuerdo con Jiménez Moraleda *et al.* (2021), el principio de esta técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. El producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción. El sistema garantiza de PCR en tiempo real garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia.

Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg^{+2} , el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Máster mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

- PCR Digital:

La PCR digital (dPCR) es una técnica en la que la muestra se fragmenta en múltiples reacciones individuales, permitiendo que en cada una de ellas haya cero, una o varias moléculas objetivo. Este método facilita la detección de un solo resultado positivo entre una gran cantidad de negativos, resolviendo así el clásico problema de “encontrar una aguja en un pajar”. En estos escenarios, la dPCR resulta más adecuada que la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), ya que posee un límite de detección mucho más bajo (QIAGEN, 2020).

La PCR digital se usa para detectar secuencias poco frecuentes, variaciones en el número de copias y elementos diana microbianos; para cuantificar mutaciones poco frecuentes, incluidas biopsias líquidas; análisis de célula única; medición de cargas víricas; análisis la expresión génica; cuantificación de genotecas de secuenciación de última generación (NGS). (QIAGEN, 2020).

La principal característica de la PCR digital es que permite la cuantificación absoluta de los ácidos nucleicos. Tras dividir la muestra, cada partición se somete al ciclo térmico convencional de PCR y luego se analiza para verificar si presenta (positiva) o no presenta (negativa) una señal de fluorescencia. Esta información permite calcular con exactitud la cantidad absoluta de moléculas presentes en la muestra. A diferencia de la qPCR, la dPCR no requiere el uso de curvas estándar y, por ello, ofrece un límite de detección inferior y mayor precisión (QIAGEN, 2020).

CAPÍTULO IV
METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de investigación:

Investigación del tipo experimental y el tipo de estudio, se clasifica como exploratorio prospectivo sobre la resistencia a la Meticilina de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de productos lácteos procesados en una planta artesanal de Nueva Concepción, Chalatenango.

4.2 Descripción o información del sitio de estudio:

Se realizó un estudio en una planta procesadora artesanal del municipio de Nueva Concepción en Chalatenango; la cual, se dedica al procesamiento de productos lácteos artesanales y tiene permiso de funcionamiento del Ministerio de Salud. En la actualidad ellos procesan queso fresco, quesillo, queso morolique, requesón y crema, de los cuales solo la leche semidescremada pasteurizada con 2% de grasa posee registro sanitario.

En promedio en la planta elaboran al día: 176.9 Kg de queso fresco, 127 Kg de quesillo, 36.3 Kg de queso morolique, 26.8 Kg de requesón y 126.8 litros de crema. Procesando en total 2,250 litros de leche diarias, aproximadamente.

4.3 Tipo de Muestreo y cálculo del tamaño de la muestra:

El muestreo realizado fue probabilístico, del tipo aleatorio simple. Para la determinación y selección de la muestra se hizo de forma dirigida seleccionando muestras de productos no pasteurizados (crema) y a partir de leche pasteurizada (queso fresco) durante los meses de febrero a junio de 2023.

4.3.1 Análisis de Riesgo según proceso y tipo de producto

Según la matriz de riesgo uno de los productos a analizar fue la crema, al ser un producto con mucha manipulación y sin pasteurizar, el riesgo de contaminación con presencia de patógenos es alto. El otro producto lácteo analizado fue el queso fresco ya que a pesar de elaborarse a partir de leche pasteurizada su proceso de producción requiere de muchas etapas de manipulación, lo cual representa una alta probabilidad de poder aislar a *S. aureus*.

Tabla 12.

Matriz de riesgo de lácteos procesados producidos en la planta de estudio.

PRODUCTO	PROCESO	
	Manipulación	Pasteurización
Queso fresco	ALTA	SI
Quesillo	MEDIANA	NO
Queso morolique	MEDIANA	NO
Requesón	BAJA	SI
Crema	ALTA	NO

Nota. Información obtenida por elaboración propia.

4.3.2 Cálculo de Tamaño de Muestra de Matrices Analizadas:

El tamaño muestral fue estimado aplicando la fórmula de Cannon y Roe (1982), diseñada para estudios de prevalencia en poblaciones finitas con pruebas diagnósticas imperfectas. Se asumió una prevalencia esperada (D) del 5%, con un nivel de confianza (NC) del 95% y una probabilidad mínima de detección de al menos una muestra positiva del 95%. Con base en estos parámetros, se estableció un tamaño mínimo de cinco unidades por matriz alimentaria (queso fresco y crema) por lote, lo que permitió cubrir adecuadamente el criterio normativo del RTCA 67.04.50:17 y garantizar robustez estadística en la detección del microorganismo objetivo.

$$n \cong \frac{(1 - (1 - NC)^{1/D})(N - \frac{1}{2}(SeD - 1))}{Se}$$

(Cannon, 2001).

Dónde:

n = tamaño de muestra necesario

N = tamaño de la población base

D = prevalencia esperada

NC= nivel de confianza

Se= Sensibilidad

Teniendo un total de: **108 muestras**

De las cuales 54 muestrearon 54 de queso fresco y 54 muestras de crema.

4.4 Procedimiento de toma de muestra y recepción para el análisis de laboratorio.

4.4.1 Equipo para muestreo:

- a. Etiquetas para identificar las muestras.
- b. Bolsas estériles con cierre hermético
- c. Hielera limpia y desinfectada, y suficientes bloques sustitutos de hielo (pingüinos) previamente congelados para el transporte de muestras.

4.4.2 Procedimiento:

Las muestras se recolectaron en bolsas plásticas transparentes Ziploc, en la presentación tal cual se comercializan estos productos al público en la sala de venta. Para el caso de la crema artesanal es envasada por el fabricante en bolsas plásticas grado alimentario, y en el caso del queso fresco es envasado en empaque al vacío. Cabe mencionar que algunos quesos no tenían vacío a la hora de ser comprados.

Se identificaron las muestras con la respectiva numeración y se llenó formulario según anexo 1. El peso de las muestras de manera individual fue mayor o igual a 200 gramos y se transportó en hieleras a temperatura de refrigeración no mayor a $(5\pm 1)^{\circ}\text{C}$, haciendo uso de hieleras y bloques sustitutos de hielo (pingüinos) previamente congelados.

4.4.3 Ingreso de muestra al laboratorio:

Las muestras se almacenaron en el laboratorio de microbiología de alimentos de la UCA a una temperatura de $(5\pm 1)^{\circ}\text{C}$ en refrigeradores específicos para almacenamiento de muestras de laboratorio, las cuales se analizaron semanalmente en un tiempo no mayor de 36 horas.

4.5 Metodología de Recuento de *Staphylococcus aureus* en muestras de cremas artesanales.

La metodología utilizada es la establecida por en el capítulo 12 del Manual Analítico Bacteriológico de la FDA. El método de análisis empleado fue el recuento directo de placas, que es adecuado para el análisis de alimentos. (FDA, 2016).

4.5.1 Equipos y materiales (FDA, 2016):

- Placas de Petri, vidrio o plástico (al menos 15 × 90 mm)
- Micropipetas con puntas estériles de 5 a 1000 µL.
- Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 mL, graduadas en unidades de 0.1 mL
- Tubos de dilución, vidrio resistente al borosilicato, con tapones de goma o tapas de rosca de plástico.
- Jeringas hipodérmicas estériles 5mL
- Recipientes para pipetas y placas de Petri, adecuados para protección
- Baño maría, para templar agar, controlado termostáticamente a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$.
- Incubadora con rango de trabajo de $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$.
- Contador de colonias, campo oscuro, con fuente de luz y placa de rejillas.
- Congelador, para mantener las muestras congeladas de $(-15 \text{ a } -20)^\circ\text{C}$.
- Asas bacteriológicas de nicromo de 3mm de diámetro o 10 µL.
- Autoclave capaz de alcanzar una temperatura de al menos $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$.
- Equipo automatizado VITEK® 2 COMPACT bioMérieux
- Espátulas de Drigalsky de vidrio estériles
- Balanza digital con capacidad de medir hasta 0.1 g
- Homogenizador peristáltico Stomacher
- Hotplate con agitador magnético.
- Homogenizador Vórtex
- pHmetro con una tolerancia de ± 0.1 unidades de pH.
- Ultracongelador con capacidad de temperatura de -86°C

- Tubos de microcentrifuga de 0.5 mL y 1.5 mL.
- Hisopos estériles para microbiología
- Calibrador vernier (Pie de rey
- Espectrofotómetro
- Microscopio óptico de campo claro con objetivos 4X, 10X, 40X, 100X.
- Termociclador
- Baño María digital
- Termohigrómetro digital
- Espectrofotómetro y programa informático de cuantificación NANO-DROP.
- Foto documentador de luz ultravioleta
- Cabina de bioseguridad

4.5.2 Medios y reactivos (FDA, 2016):

- Agua destilada estéril
- Agua peptonada buferada
- Agar Baird Parker Base
- Emulsión yema de huevo telurito de potasio
- Caldo infusión cerebro corazón (BHI)
- Agar manitol salado
- Agar Soja y Trypticaseína (TSA)
- Agar Müller-Hinton
- Agar Base Sangre
- Sangre desfibrinada de carnero comercial.
- Plasma de conejo con EDTA Liofilizado
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Reactivo Lugol para tinción gram
- Colorante Cristal violeta para tinción gram
- Colorante safranina para tinción gram

- Alcohol etílico grado reactivo
- Solución salina isotónica estéril.
- Ácido sulfúrico grado analítico
- Cloruro de bario grado analítico
- Glicerina grado reactivo
- Parafina líquida estéril (aceite de parafina)
- Discos de cefoxitina 30 µg (FOX) OXOID
- Tiras MIC Test Strip de cefoxitina Liofilmchem (FOX) 0.016 - 256 µg/mL.
- Ácido clorhídrico 1M (ajuste pH medios de cultivo)
- Hidróxido de sodio 1M (ajuste pH medios de cultivo)
- Cepa ATCC 43300 *Staphylococcus aureus* MRSA (Control positivo)
- Cepas ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* MSSA (Control negativo)
- Cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Especificidad Agar Baird Parker).
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Selectividad Agar Baird Parker)
- Tarjetas para equipo VITEK GP 2
- Solución Tris-HCl
- Solución tritón X-100 al 1%
- Lisozima (concentración 50 µg/mL).
- Solución Tris EDTA buffer pH=8
- Kit de extracción y purificación de ADN Bacteriano (Invitrogen™ PureLink™)
- Buffer TAE 50X para PCR
- Cebadores (primers) forward/reverse
- Taq DNA polimerasa
- Agua calidad biología molecular
- Gel de agarosa grado Biología Molecular
- Solución tampón TAE 1X para electroforesis
- Gel red colorante revelador fluorescente

- Papel Parafilm
- Solución buffer de carga 6X
- Marcador de peso molecular de ADN 100 kb
- PCR Nucleotido mix 10mM marca PROMEGA catálogo C1141
- ADN polimerasa GoTaq Flexi marca PROMEGA catálogo M8291

4.5.3 Atemperado de las muestras:

Se retiraron las muestras del refrigerador y se dejaron que alcancen la temperatura del laboratorio (22 ± 1)°C (el cual se verificará con termohigrómetro), generalmente esto toma más de una hora.

4.5.4 Condiciones esterilidad en la preparación de medios de cultivo, preparación la muestras e inoculaciones microbiológicas:

Se hizo uso de cabinas de seguridad biológica para la preparación de medios de cultivo en placa, para la preparación de las muestras y para la inoculación de medios de cultivo. Las cabinas utilizadas contaban con filtro HEPA con una eficiencia del 99.99% para retención de partículas de hasta 0.3 μm , que garantiza la limpieza ISO clase 5 en el área de trabajo; estas cabinas, están equipadas con una lámpara de luz ultravioleta que permite la desinfección del área de trabajo antes y después de haber sido utilizada.

Se llevaron a cabo los controles internos de las condiciones de trabajo, con el objeto de proporcionar la garantía de la esterilidad de los medios preparados y materiales auxiliares utilizados y en general, sobre la buena práctica en la realización de los ensayos microbiológicos realizados en este trabajo de investigación.

4.5.5 Preparación de la muestra (FDA, 2016):

- Se pesaron 25 gramos de muestra de forma estéril en bolsa para stomacher y se añadió el contenido de un frasco de dilución con 225 mL de agua peptonada buferada estéril APB ($\text{pH}=7.0\pm 0.2$), luego se agitó por 2 minutos utilizando agitador Stomacher a 260 RPM (Dilución 1:10 o 10^{-1}).
- Se tomaron con micropipeta estéril 1000 μL de la dilución anterior (evitando tomar muestras de espuma) y se procedió a añadirlo a un tubo de dilución que contiene 9 mL de Agua peptonada buferada APB estéril, luego se agitó en un homogenizador vortex (Dilución 1:100 o 10^{-2}).
- Posteriormente se tomaron con una micropipeta 1000 μL de la dilución anterior y se añadieron a un tubo de dilución que contiene 9 mL de Agua peptonada buferada APB estéril, se agitó en un vórtex para obtener la Dilución 1:1000 o 10^{-3} .

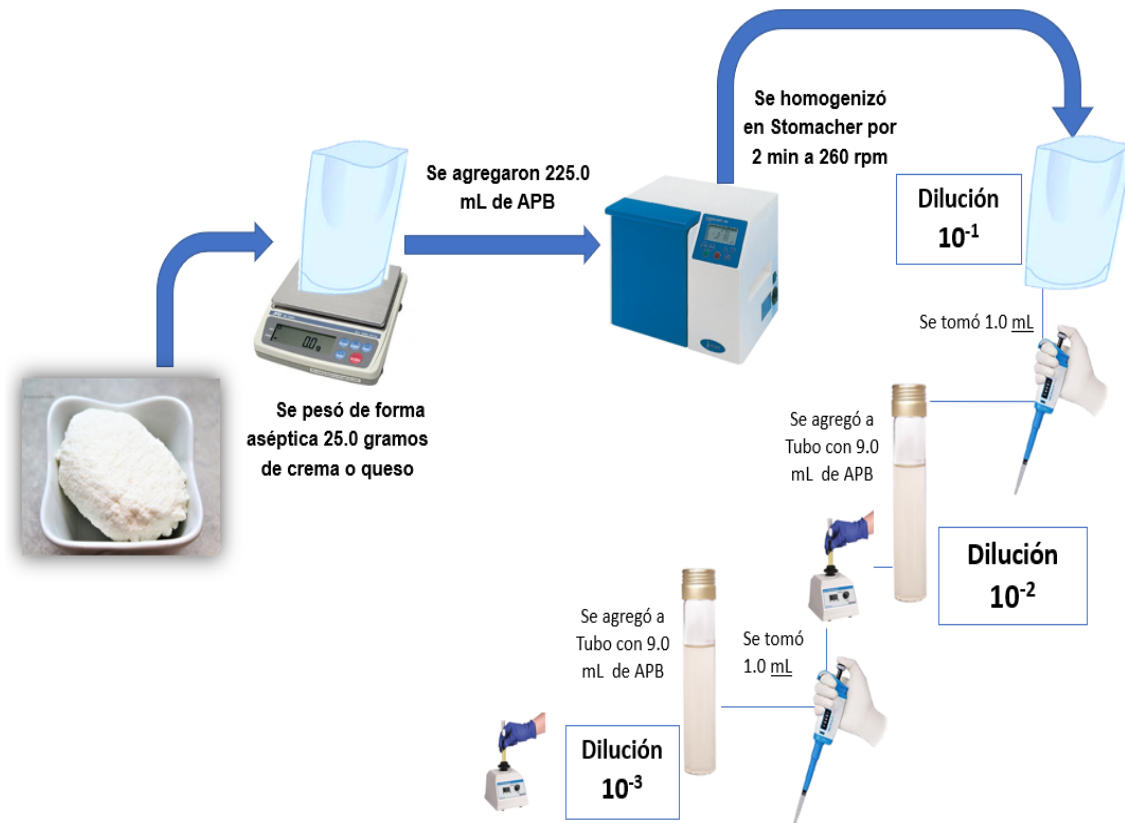
4.5.6 Aislamiento de cepas de *Staphylococcus spp.* (FDA, 2016):

- De cada una de las diluciones de muestra preparadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en (4.5.5), se procedió a transferir asépticamente el equivalente a una alícuota de 1 mL, repartida en 3 placas de agar Baird-Parker (0.4 mL, 0.3 mL y 0.3 mL de dilución de muestra respectivamente), distribuyendo cada inóculo de manera equitativa en la superficie del medio utilizando una varilla estéril de vidrio doblada (Espátula de Drigalsky).
- Se mantuvieron las placas en posición vertical hasta que el inóculo fuera absorbido por el agar (aproximadamente 10 minutos en placas secadas correctamente).
- Se incubaron en posición invertida entre 45 a 48 horas a una temperatura entre 35 a 37°C.

- Se seleccionaron las placas que contenían entre 20-200 colonias como criterio de placa contable.
- Se sumaron el número de colonias en placas triplicadas representadas por colonias que se identificaron bioquímicamente como *S. aureus* y se multiplicaron por el factor de dilución de la muestra. Se colocó como el número de UFC de *S. aureus*/g de alimento analizado.

Figura 10.

Preparación de muestras.



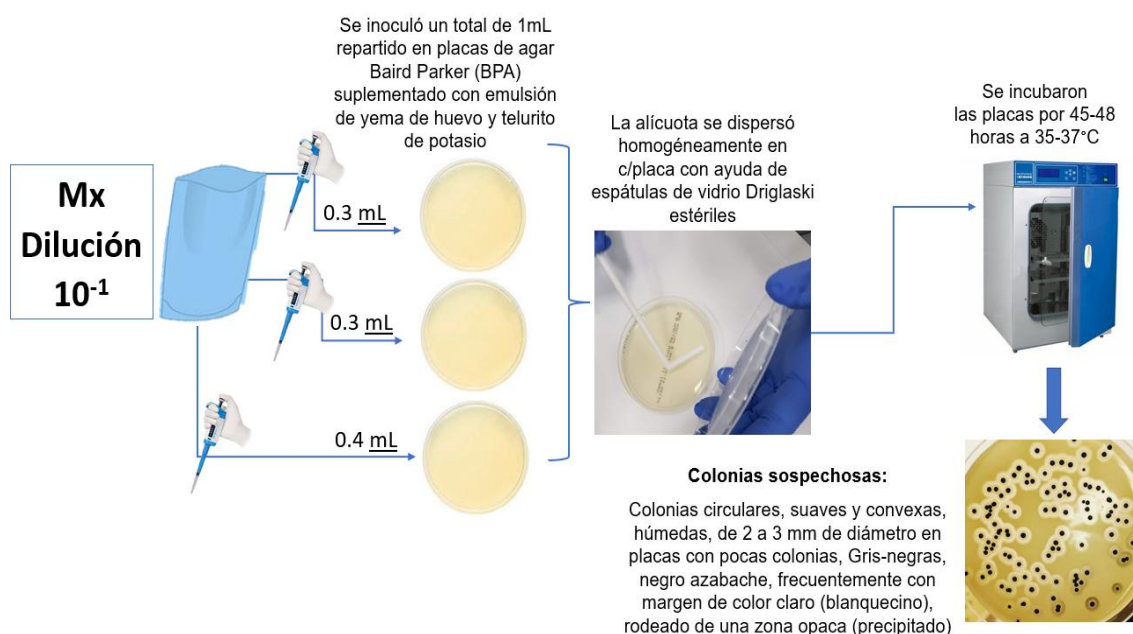
Nota. Elaboración propia, basado en (FDA, 2016).

Interpretación:

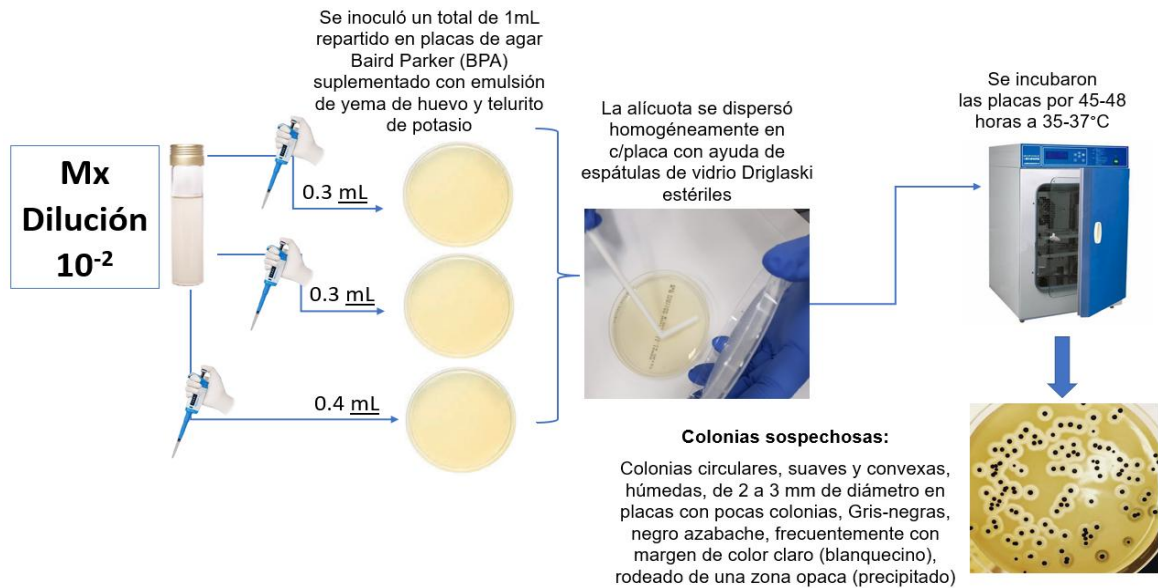
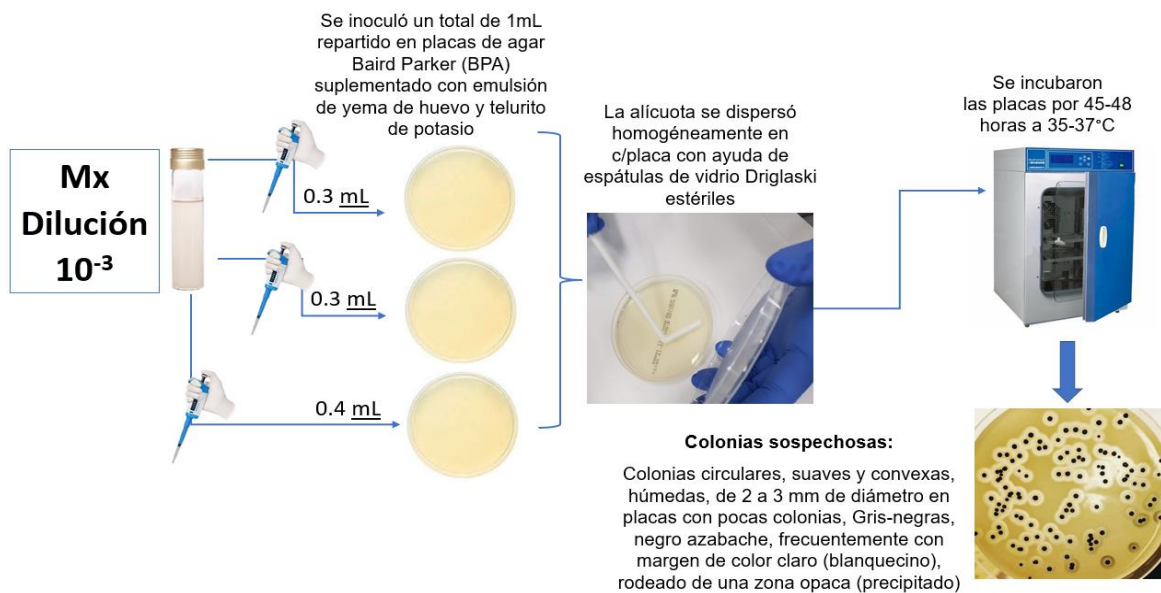
Las colonias de *S. aureus* en agar Baird Parker son típicamente circulares, suaves y convexas, húmedas, de (2 a 3) mm de diámetro en placas con pocas colonias, gris-negras, negro azabache, frecuentemente con margen de color claro (blanquecino), rodeado de una zona opaca (precipitado), y frecuentemente con una zona externa clara; las colonias de *S. aureus* tienen una consistencia mantecosa o gomosa cuando son tocadas con un asa bacteriológica. Ocasionalmente, se pueden encontrar cepas no lipolíticas de apariencia similar, excepto que las zonas opacas y claras circundantes están ausentes. (AOAC, 2019).

Figura 11.

Inoculación de la dilución 1:10 de muestra



Nota. Elaboración propia, basado en (FDA, 2016)

Figura 12.*Inoculación de la dilución 1:100 de muestra.**Nota.* Elaboración propia, basado en (FDA, 2016).**Figura 13.***Inoculación de la dilución 1:1000 de muestra.**Nota.* Elaboración propia, basado en (FDA, 2016).

4.5.7 Pruebas bioquímicas clásicas para la identificación preliminar de los aislados obtenidos (FDA, 2016).

- **Tinción gram:**

Los reactivos utilizados en la tinción de Gram fueron preparados y formulados acorde a la formulación definida por (FDA, 2016).

Preparación del frotis (Benavides Martínez, 2007):

- Se rotuló con un marcador un portaobjeto limpio, el cual se flameó para eliminar residuos de grasa.
- Se esterilizó el asa bacteriológica en la llama del mechero y se dejó enfriar por 30 segundos.
- Se colocó una gota de solución salina sobre el portaobjeto
- Con el asa estéril se colocó una colonia de los microorganismos a teñir, a partir de los crecimientos obtenidos en las placas en agar TSA en la gota de solución salina. No debe ser muy densa.
- Se dejó secar la preparación al aire y se fijó la suspensión al calor, pasándola ligeramente por la llama, evitando calentarse excesivamente.

Tinción bacteriana (Benavides Martínez, 2007):

- Se colocó solución de cristal violeta al frotis previamente preparado y se dejó secar por un minuto aproximadamente para actuar.
- Se enjuago con agua destilada.
- Se aplicó la solución de Lugol por un minuto.
- Se lava con agua destilada y se deja escurrir.
- Se decoloró con alcohol- acetona aproximadamente 15-20 segundos

- Inmediatamente después se enjuaga con agua destilada y se deja escurrir
- Se aplicó el colorante de contraste (safranina) por 30 segundos, se enjuaga, se deja escurrir y se seca al aire libre.
- Se examinará al microscopio con el objetivo de inmersión 100x, no olvidar colocar 1 gota de aceite de inmersión (ver anexo 10).

- **Prueba de la coagulasa (FDA, 2016):**

- Se tomaron con un asa estéril ≥ 4 colonias sospechosas de las placas que estaban dentro del rango de recuento de entre 20-200 colonias sospechosas de *S. aureus* en pequeños tubos (de microcentrífuga de 1.5 mL) que contenía previamente 300 μ L de caldo BHI estéril para emulsionar.
- Se inoculó con un asa estéril mediante estriado por agotamiento, una placa con medio TSA con la suspensión bacteriana obtenida del caldo BHI.
- Se incubó el tubo con suspensión de cultivo BHI y la placa con TSA por 18-24 horas a una temperatura entre (35-37) °C.
- Luego de la incubación, se añadió 0.5 mL de plasma de conejo reconstituido con EDTA, al tubo con los 300 μ L de suspensión de cultivo en BHI y se mezclaron bien.
- Se incubó cada cultivo en BHI con plasma de conejo a (35-37) °C, y se examinaron periódicamente cada hora durante un período de 6 h para detectar la formación de coágulos (Ver anexo 7).

Nota: Sólo coágulo firme y completo que permanece en su lugar cuando el tubo está inclinado o invertido se considera positivo para *S. aureus*.

Figura 14.**Bioquímica de la coagulasa.**

Se tomaron con un asa estéril 5 colonias características de *S. aureus* y se inocularon en 0.3 mL de caldo BHI en microtubo de 1.5 mL



Se incubaron los microtubos a 35–37 °C por 18–24h.



Se incubaron nuevamente a 35-37 °C y se examinaron periódicamente durante un rango de 6 h



A cada microtubo luego de la incubación se agregaron 0.5 mL de plasma de conejo con EDTA.

Nota. Elaboración propia, basado en (FDA, 2016)

- **Prueba de catalasa (FDA, 2016):**

- Se colocó una gota de solución de peróxido de hidrógeno 3% sobre un portaobjetos limpio.
- Con el asa estéril se tomó una de las colonias sospechosas de *S. aureus* de las placas con crecimientos en agar TSA de 24 horas.
- La colonia sospechosa se colocó sobre la gota de peróxido de hidrógeno previamente depositada en el portaobjetos.
- La producción de burbujas de gas (oxígeno) indica un resultado positivo (ver anexo 8).

- **Prueba de utilización anaeróbica del manitol (FDA, 2016):**

- Se inoculó en un tubo con agar manitol salado fuertemente con un asa en punta estéril cada una de las cepas sospechosas de *S. aureus* a partir de agar TSA con crecimiento de 24h.
- Se cubrió la superficie del agar con una capa de aceite de parafina estéril de al menos 25 mm de espesor.
- Se incubó por un período de 5 días a 35-37°C.
- El ácido se produce anaeróbicamente si el indicador cambia a amarillo en todo el tubo, se registró el resultado de la prueba (ver anexo 11).

- **La beta hemólisis en Agar Sangre de carnero al 5% (FDA, 2016):**

Para observar la beta hemólisis en agar sangre de carnero al 5%, se siguieron estos pasos:

- Se prepararon las placas de agar sangre de carnero al 5% según indica el fabricante del medio agar base sangre a la cual se le suplementó sangre desfibrilada de carnero comercial.
- Se le inocularon los aislados de interés en la superficie del agar realizando un estriado por agotamiento con asa estéril.
- Se incubaron las placas a 37°C durante 24-48 horas.
- Se examinaron las placas para observar la zona de hemólisis alrededor de las colonias bacterianas.
- Una zona clara y transparente alrededor de una colonia bacteriana indicó beta hemólisis y sugiere la producción de hemolisinas (ver anexo 9).

4.6 Conservación de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras:

Con un asa estéril se tomaron colonias del crecimiento en agar TSA (ver sección prueba de la coagulasa) de cada uno de los aislados confirmados de *Staphylococcus aureus* por las pruebas bioquímicas y tinción gram.

Las colonias en 0.3 mL de BHI (en un tubo de microcentrífuga) se inocularon por repique y se incubaron a (35-37) °C durante 24 horas por duplicado.

Se agregó a cada tubo 0.3 mL de solución estéril de glicerol al 40%. Después se identificaron los tubos de cada cepa conservada. Y se almacenaron en un ultracongelador a una temperatura de -70°C hasta su posterior uso (ver anexo 12).

4.7 Identificación microbiana confirmatoria de cepas con equipo VITEK 2 Compact (Ramos Pérez. 2023):

4.7.1 Metodología Preparación de la suspensión:

- Primeramente se calibró el equipo DensiChek™, con los estándares comerciales distribuidos por Biomerieux según especificaciones del fabricante del equipo, este conjunto de estándares incluye valores McFarland de 0.0 (blanco), 0.5, 2.0 y 3.0. Estos estándares garantizan resultados confiables y reproducibles en sus mediciones de turbidez de suspensiones bacterianas (ver Anexo 13).
- La información de la calibración del equipo DensiChek™, se registró debidamente en la bitácora de laboratorio.
- Este proceso de calibración se realizó cada vez que se ejecutó una jornada de identificación de cepas en el equipo VITEK 2 Compact.
- Se procedió a la activación de las cepas aisladas de las muestras de lácteos artesanales (quesos y cremas), tomando un vial de cada cepa de prueba

(almacenadas por duplicado) del ultracongelador a -70°C y se bajaron a temperatura de congelación comercial (-20°C) por 24 horas; posteriormente, se colocaron las cepas a temperatura de refrigeración (entre 4°C y 8°C) por otras 24 horas, luego se estriaron de forma aséptica las cepas de cada vial en placas con TSA incubadas por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- Luego se transfirió con asa estéril, a partir de un cultivo puro en Agar TSA, una cantidad suficiente de inóculo de la cepa de prueba a un tubo de ensayo de poliestireno claro estéril de (12x75) mm que previamente contenía 3 mL de solución salina estéril 0.45%, dispensado con una jeringa hipodérmica estéril de 5.0 mL.
- Se ajustó la turbidez del inóculo a 0.50-0.63 unidades de la escala de McFarland con el densitómetro DensiChek™, según especifica el inserto de las Tarjetas VITEK 2C, en el inserto de información del fabricante (ver anexo 14).

Figura 15.

Tarjetas de Identificación Vitek 2



Notas. Obtenido de (bioMérieux, 2025)

4.8 Procedimiento de Inoculación de la tarjeta VITEK GP 2C (Ramos Pérez. 2023):

Se colocó cada tubo de ensayo que contiene la suspensión bacteriana de prueba dentro de la gradilla especial del equipo (cassette), y cada tarjeta de identificación se colocó en la ranura cercana, insertando el tubo de transferencia dentro del tubo de ensayo con la suspensión bacteriana correspondiente (ver anexo 16).

4.8.1 Proceso de identificación Equipo VITEK 2 Compact:

- Se verificó que el equipo funcionaba correctamente, el software, hardware, impresora, lector de código de barras, antes de realizar cualquier identificación (ver anexo 15).
- Posteriormente se colocó el cassette con las muestras en el sistema VITEK GP 2C, relacionando con ayuda del Software del equipo cada código único de barra de cada tarjeta VITEK GP 2C a la posición respectiva de cada cepa de prueba en el cassette.
- Se configuró la información de cada cepa de prueba en el equipo VITEK, y se inició el análisis de identificación.
- Se inició el proceso de identificación automática. El sistema VITEK 2 Compact toma lecturas de la tarjeta a intervalos regulares.
- Luego de ejecutada con éxito la identificación, se procedió a editar e imprimir los resultados de identificación de las cepas microbianas. En cada informe de resultados se detalla el microorganismo identificado, el porcentaje de identificación y el bionúmero obtenido de cada uno de los aislados analizados (ver anexo 34).

4.9 Determinación fenotípica de la resistencia a antibióticos por la técnica de Kirby-Bauer. (CLSI, 2025).

4.9.1 Preparación de la turbidez 0.5 McFarland de las cepas microbianas de prueba y cepas de referencia de acuerdo con la guía M02-CLSI (2024).

Se calibró el equipo equipo DensiChek™, con los estándares comerciales distribuidos por Biomerieux según especificaciones del fabricante del equipo de igual forma que en el apartado 4.7.1.

4.9.2 Estandarización de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de alimentos y cepas control. (Arreces Martínez, 2015)

Para la estandarización de las cepas aisladas de las muestras de se procedió de la siguiente manera:

- De cada cepa de *S. aureus* aisladas de las muestras de productos lácteos identificadas mediante el sistema de identificación Vitek 2C y de las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina (control positivo) y *S. aureus* ATCC 25923 (control negativo) sensible a meticilina, previamente almacenadas en tubos de microcentrífuga. Se inocularon en placas de Petri con TSA por la técnica de estriado por agotamiento las cuales se incubaron a 35° C por 24 horas (ver anexos 17, 18 y 19).
- Con un asa de inocular estéril de se tomaron de 2 a 3 colonias de *Staphylococcus aureus* aisladas en agar TSA por la técnica de siembra por estría, y se transfirieron a un tubo estéril que contiene 3 mL de solución salina estéril al 0.85%.
- En el caso de aquellos tubos en que la turbidez fue mayor a la del estándar 0.5 McFarland al medirlo con el equipo DensiChek™, se agregó solución

salina al 0.85% para diluir, hasta que la turbidez coincida con la del estándar 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL).

4.9.3 Prueba de susceptibilidad a la meticilina (oxacilina) según CLSI (2025):

- Después del ajuste de turbidez dentro de los siguientes 15 minutos se sumerge un hisopo estéril en la suspensión bacteriana preparada en la sección 4.8.2, el cual se debe presionar sobre las paredes internas del tubo para quitar el exceso.
- Con el hisopo ya impregnado de la suspensión estandarizada aproximadamente a 10^8 UFC/mL, se inoculó a temperatura ambiente la superficie seca de una placa con Agar Mueller- Hinton.
- Se pasó el hisopo por toda la superficie, rotando 3 veces la placa aproximadamente 60° después de cada inoculación con lo cual se asegurará una distribución uniforme del inóculo.
- Se cerró la placa y se esperó por no más de 15 minutos para que la superficie del agar se seque.
- Después se colocó el disco de cefoxitina ($30\mu\text{g}$) y la tira MIC Test Strip Cefoxitin [FOX] 0.016-256 $\mu\text{g/mL}$, para la determinación de la concentración inhibitoria mínima, con ayuda de una pinza estéril presionando suavemente y colocándolos de modo que queden separados por no menos de 24 mm de centro a centro.
- Las placas se invirtieron e incubaron a 35°C en condiciones aerobias por un tiempo de 16-18 horas (ver anexo 21).
- Pasado este tiempo de incubación se procedió a la lectura del diámetro de los halos de inhibición con un pie de rey, cuidando de observar la placa en línea directamente vertical para evitar lecturas equivocadas por paralaje.
- Para la concentración Inhibitoria mínima por la prueba de MIC Test Strip de cefoxitina, se procedió a leer la prueba reportando la CIM en μg .

- Con los resultados de los diámetros de inhibición y la CIM se clasificó a los microorganismos como resistente, susceptible o de sensibilidad intermedia basándose en la tabla de interpretación de resultados dada por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) en su versión 2025 (ver anexo 22).

Nota: Para el disco de cefoxitina se debe medir cuidadosamente la zona de inhibición completa alrededor del disco, incluyendo el diámetro del disco en la medición con un calibrador vernier digital calibrado (pie de rey).

4.10 Presencia del gen *mecA* en cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.

La evaluación de la resistencia a meticilina en todas las cepas se realizó una vez que estaban identificadas y al conocer los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por los métodos de Kirby-Bauer y por Epsilometría (E-test). Como ninguna cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de productos lácteos artesanales presentó evidencia fenotípica de resistencia a la Cefoxitina (FOX); es por ello, que se evaluó genotípicamente la presencia del gen *mecA* únicamente a las cepas control positivo (ATCC 43300) y cepa control negativo (ATCC 25923) de *S. aureus*.

La técnica utilizada para confirmar la presencia del gen *mecA* es por medio de PCR punto final la cual consta de tres partes: extracción del DNA, amplificación del DNA e interpretación de los resultados.

4.10.1 Extracción del DNA:

Para la extracción del DNA cromosómico se realizó a partir de cultivos jóvenes de cepas de *S. aureus* previamente almacenadas en ultracongelación.

- Con un asa estéril se tomó del tubo de microcentrífuga del stock de trabajo en BHI con glicerol al 20% con las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC

25923 (Control negativo del gen *mecA*) y ATCC 43300 (Control positivo del gen *mecA*), y se sembraron con asa estéril respectivamente en placas de TSA y se incubaron por 24 horas a (35-37)°C.

- En un tubo estéril que previamente tenía 3.0 mL de agua calidad biología molecular se colocaron 2-3 colonias de las cepas de referencia, y se preparó una suspensión bacteriana que se ajustó hasta que la turbidez coincidiera con la del estándar 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), haciendo uso del equipo DensiChek™ el cual fue calibrado previamente según se detalló en la sección 4.7.1.

Nota: Si el inóculo se pasaba de la turbidez para diluir, se agregó más agua de calidad biología molecular, hasta lograr la turbidez deseada.

- Luego se continuó con el protocolo para preparar lisado de células bacterianas Gram positivas Invitrogen™, PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. establecido por el fabricante. (Invitrogen PureLink- DNA Extraction and Purification Kit, 2022).
- Inicialmente se programaron dos baños maría a 37°C y 55°C, respectivamente.
- Se utilizó el tampón de digestión de lisozima para el lisado de células bacterianas con la siguiente concentración (Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, EDTA 2.5 mM, Triton X-100 al 1%).
- Se agregaron a 200 µL de tampón de digestión, la cantidad necesaria de lisozima fresca con el fin de obtener una concentración final de lisozima de 20 mg/mL.
- Se colocaron 1 mL de la suspensión 0.5 McFarland de la cepa control positivo (ATCC 43300) y de la cepa control negativo (ATCC 25923) respectivamente a tubos de microcentrífuga de 2 mL y se centrifugaron a 2000 rpm (revoluciones por minuto) por 15 minutos a 8°C (Centrífuga de temperatura controlada).

- Se tomaron 100 μ L de sobrenadante de cada una de las cepas control.
- Se agregaron a cada tubo 180 μ L de tampón de digestión con lisozima
- Se mezcló bien mediante agitación breve en vórtex.
- Se incubó a 37°C durante 30 minutos.
- Se agregó 20 μ L de proteinasa K (suministrada con el kit).
- Se mezcló bien mediante agitación breve en vórtex.
- Se agregó 200 μ L de tampón de unión/lisis genómica PureLink® y se mezcló bien agitando brevemente en vórtex.
- Se incubó a 55°C durante 30 minutos.
- Se agregó 200 μ L de etanol al 96–100 % al lisado.
- Se mezcló bien agitando en vórtex durante 5 segundos para obtener una solución homogénea.

Figura 16.

Invitrogen™, PureLink™ Genomic DNA Mini Kit.



Nota. Obtenido del manual Invitrogen PureLink- DNA Extraction and Purification Kit (2022).

Unión del ADN:

- Se unió una columna de centrifugación PureLink™ en un tubo de recolección del kit.

- Se añadió 640 µL del lisado proveniente del proceso de extracción anterior (preparado con tampón unión/lisis genómica PureLink® y etanol a la columna de centrifugación)
- La columna se centrifugó a 10,000 rpm (revoluciones por minuto) por 1 minuto a temperatura ambiente.
- El tubo de recolección se desechó y se colocó la columna de centrifugado en un tubo de recolección PureLink™ limpio provisto por el kit.

4.10.2 Lavado de ADN:

- Se añadió 500 µl de tampón de lavado genómico 1 PureLink™ preparado con etanol a la columna.
- Se centrifugó la columna a 10,000 rpm (revoluciones por minuto) por 1 minuto a temperatura ambiente.
- El tubo de recolección se desechó y se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recolección PureLink™ limpio.
- Se añadió 500 µl de tampón de lavado genómico 2 PureLink™ con etanol a la columna.
- Se centrifugó la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el tubo de recolección.

4.10.3 Elución de ADN:

- Se colocó la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL.
- Se agregó 200 µL de PureLink® Genomic Elution Buffer a la columna.
- Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Se centrifugó la columna a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN genómico purificado.

4.10.4 Almacenamiento de ADN:

Para el almacenamiento a largo plazo, se almacenó el ADN purificado en tampón de elución genómica PureLink® a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que el ADN almacenado en agua está sujeto a hidrólisis ácida. Se almacenó el ADN purificado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para almacenamiento a largo plazo.

4.10.5 Cuantificación y pureza del ADN

Procedimiento (Shimadzu, 2017):

- La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro y programa informático de cuantificación BioSpec-Nano de Shimadzu.
- Para ello se tomó $2.0\text{ }\mu\text{L}$ como ADN molde extraído para verificar la pureza y concentración del ADN. El Pathlength seleccionado del equipo fue de (0.7 mm) adecuado para una concentración de muestra de $0.3\text{-}21\text{ OD}$ ($15\text{-}1000\text{ ng}/\mu\text{L dsDNA}$).
- Se colocó la alícuota de la muestra de ADN en la ventana de medición y mediante el uso del Software en el ordenador se inició de medición en la ventana del software.
- Todos los pasos del proceso, desde la configuración de la longitud del recorrido óptico, la medición, hasta la tarea de limpiar la muestra de la ventana de medición, se llevan a cabo automáticamente por el equipo (Shimadzu, 2025).

4.10.6 Amplificación del gen *mecA* por PCR punto final (convencional)

La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un equipo termociclador Eppendorf® Mastercycler®. Debido a que las muestras de lácteos no presentaron resistencia a la metilicina se procedió a trabajar con las cepas de control ATCC 25923 control negativo y ATCC 43300 control positivo.

Figura 17.

Termociclador Eppendorf® Mastercycler®



Nota. Elaboración propia.

Para la elaboración de la mastermix se utilizó GoTaq® Flexi DNA Polymerase con las siguientes concentraciones López-Vázquez *et al.* (2015):

Tabla 13.

Tabla de composición de la Máster mix

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACIÓN FINAL
5X GREEN GO TAQ FLEXI BUFFER	2.5 µL	1X
MgCl ₂ 25mM	4.0 µL	1.5 mM
dNTPS	1.0 µL	0.2 mM
Fower	1.0 µL	10 mM
Reverse	1.0 µL	
GoTaq DNA Polimerasa	0.125 µL	5 (µ/ µL)
Agua Grado molecular	10.375 µL	100 ng (<0.5 µg/50µL)
ADN Muestra	5.0 µL	
TOTAL	25 µL	

Nota. Elaboración propia.

Figura 18.

Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen mecA.

Secuencias de los partidores utilizados en la PCR y condiciones de amplificación. Sequences of the primers used for PCR and amplification conditions.		
Gen	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Tamaño am- plicón (pb)
<i>mecA</i>	Sentido: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC Antisentido: AGTTCCTGCAGTACCGGATTGC	533

Nota. Información obtenida de López-Vázquez *et al.* (2015)

Las condiciones de amplificación que se utilizaron en el Termociclador fueron las siguientes (López-Vázquez *et al.*, 2015):

Desnaturalización inicial: 94 °C por 5 min; desnaturalización 94 °C por 1 min; alineación: 55 °C por 1 min; extensión: 72 °C por 2 min 30 ciclos, y extensión final a 72 °C por 7 min.

Para la electroforesis se preparó un gel agarosa al 1%: se pesó 1 gramo de agarosa de la marca Ultra Pure™ Agarose de Invitrogen, se añadió 1000 µL de buffer TAE 50X y 100 ml agua destilada y 1 µL de Gel Red.

El marcador de peso molecular utilizado fue Invitrogen™ Estándar de ADN de 100 bp. Para la electroforesis se trabajó en papel parafilm de la siguiente manera: 1.0 µL de marcador de peso molecular en 4.0 µL de Agua grado molecular se colocó en el primer pocillo del gel.

Para cada muestra se usó 1 µL de Buffer de carga 6X Orange Blue y 5 µL de Muestra estas se colocaron en el gel agarosa según figura.

Las muestras se colocaron en el gel de la siguiente manera: en el tercer pocillo La cepa ATCC 29213, en el quinto pocillo La cepa ATCC 43300, en el séptimo pocillo un control de la extracción y en el noveno pocillo un control negativo

con agua grado molecular. La Electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios por 80 minutos.

4.11 Análisis estadístico de resultados esperados:

El análisis estadístico de la prevalencia de genes de resistencia de *S. aureus* se realizó mediante la prueba de hipótesis para la proporción con el uso del Minitab Statistical Software, con un nivel de confianza del 95% y un nivel de significación del 5%. Si la prevalencia del gen *mecA* es inferior al 1% se acepta la hipótesis nula, por el contrario si la prevalencia es superior al 1% se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.0 Recuentos microbianos de *S. aureus* en muestras de crema y quesos frescos artesanales.

Como puede observarse en la tabla 14, de los productos elaborados por la planta productora de estudio ubicada en Nueva Concepción Chalatenango de quesos frescos y cremas artesanales entre el 29-01-2023 y el 14-06-2023, todos superaron los límites máximos microbiológicos *para S. aureus* permitidos por el RTCA 67.04.50:17; el decir el 100% de los productos analizados nos son aptos para su comercialización en salas de venta, según la normativa Centroamericana vigente.

Valores reportados en otros estudios latinoamericanos como en Colombia, por ejemplo, se estimó una prevalencia del 31.9% en leche cruda de vacas, con mayor presencia en hatos pequeños (47%) (Gómez-López *et al.*, 2021). En Cuba, se ha documentado la presencia de *S. aureus* en la cadena de producción de queso fresco artesanal, asociada a deficiencias higiénico-sanitarias (Martínez-Vasallo *et al.*, 2019). En México, Salgado-Ruiz *et al.* (2016) reportaron una prevalencia del 52.6% de *S. aureus* en leche cruda y del 66.6% en manos de ordeñadores en sistemas lecheros de pequeña escala en el altiplano central, con alta frecuencia de genes de enterotoxinas y formación de biopelículas.

Además, Blanco Varillas *et al.* (2025) aislaron cepas MRSA en queso fresco artesanal comercializado en Oaxaca, confirmando la presencia de genes de virulencia y resistencia. Estas comparaciones refuerzan la gravedad del incumplimiento observado en el presente estudio y evidencian que, aunque la contaminación por *S. aureus* es un problema común en la región, la magnitud detectada en Nueva Concepción, Chalatenango, representa un escenario de riesgo particularmente elevado para la salud pública.

Para esta fase de aislamiento y recuento de microorganismos se realizaron y documentaron controles de calidad en los medios utilizados (control del pH, trazabilidad de fabricación), se llevaron bitácoras de preparación de medios de cultivo, bitácoras de control sobre los ciclos de autoclave (controles químicos, biológicos y cinta testigo), pruebas de esterilidad de los medios preparados y se realizaron ensayos de Rendimiento de los agares, caldos y soluciones preparados con cepas de referencia ATCC (ver anexo 32), acorde con las recomendaciones de la norma ISO 11133:2014. Estos controles respaldan el trabajo analítico realizado en la presente investigación y sea evidencia de la validez de los resultados emitidos en este trabajo de investigación (Ver anexos 2,3,4,5 y 6).

Tabla 14.

Resultados de recuentos microbianos para S. aureus y su comparación con criterios para vigilancia del RTCA 67.04.50:17.

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento S. aureus (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
01 crema	29-01-2023	2.8X10 ⁴ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	S. aureus m=10 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 29-01-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
02 crema		3.6X10 ⁴ UFC/g			
03 crema		1.7X10 ³ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)	M= 100 UFC/g	
04 crema		1.5X10 ³ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3		
05 crema		1.0X10 ⁴ UFC/g	Número de muestras de crema (n)=5		

c=1

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
06 queso	31-01-2023	1.2X10 ⁵ UFC/g **	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g M= 100 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 31-01-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
07 queso		<10.0 UFC/g *			
08 queso		9.9X10 ⁴ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)		
09 queso		1.6X10 ⁵ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3		
10 queso		1.1X10 ⁵ UFC/g	Número de muestras de queso (n)=5 c=1		
11 crema	06-02-2023	1.3X10 ⁴ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g M= 100 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 06-02-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
12 crema		1.4X10 ⁴ UFC/g			
13 crema		2.2X10 ⁴ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)		
14 crema		1.6X10 ⁴ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3		
15 crema		<10.0 UFC/g *	Número de muestras de crema (n)=5 c=1		

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?	
16 queso	07-02-2023	<10.0 UFC/g *	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 07-02-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
17 queso		<10.0 UFC/g *				
18 queso		<10.0 UFC/g *	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			
19 queso		<10.0 UFC/g *	Clase plan de muestreo: 3			m=10 UFC/g
20 queso		1.8X10 ⁵ UFC/g	Número de muestras de queso (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g
21 crema	12-02-2023	1.6X10 ⁴ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 12-02-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
22 crema		2.2X10 ⁴ UFC/g				
23 crema		2.2X10 ⁴ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			m=10 UFC/g
24 crema		2.4X10 ⁴ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3			
25 crema		3.2X10 ⁴ UFC/g	Número de muestras de crema (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
26 queso	14-02-2023	7.4X10 ⁴ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g M= 100 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 14-02-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
27 queso		7.0X10 ⁵ UFC/g **	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)		
28 queso		1.6X10 ⁵ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3		
29 queso		5.2X10 ⁵ UFC/g	Número de muestras de queso (n)=5		
30 queso		5.4X10 ⁴ UFC/g **	c=1		
31 crema	20-02-2023	4.1X10 ³ UFC/g **	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g M= 100 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 20-02-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
32 crema		3.9X10 ³ UFC/g **	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)		
33 crema		2.4X10 ³ UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3		
34 crema		3.5X10 ³ UFC/g **	Número de muestras de crema (n)=5		
35 crema		3.4X10 ³ UFC/g **	c=1		

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?	
36 queso	21-02-2023	<10.0 UFC/g *	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 21-02-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
37 queso		2.2X10 ⁴ UFC/g				
38 queso		5X10 ⁵ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			
39 queso		1.2X10 ⁴ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3			m=10 UFC/g
40 queso		<10.0 UFC/g *	Número de muestras de queso (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g
41 crema	05-03-2023	3.7X10 ³ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 05-03-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
42 crema		6.7X10 ³ UFC/g				
43 crema		7.8X10 ³ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			
44 crema		6.7X10 ³ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3			m=10 UFC/g
45 crema		7.8X10 ³ UFC/g	Número de muestras de crema (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?	
46 queso	07-03-2023	1.3X10 ⁶ UFC/g **	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 07-03-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
47 queso		1.1X10 ⁶ UFC/g **				
48 queso		<10.0 UFC/g *	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			
49 queso		>5.7X10 ⁶ UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3			m=10 UFC/g
50 queso		<10.0 UFC/g *	Número de muestras de queso (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g
51 crema	13-03-2023	2.3X10 ⁴ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 13-03-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
52 crema		2.6X10 ⁴ UFC/g				
53 crema		2.6X10 ⁴ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			
54 crema		2.3X10 ⁴ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3			m=10 UFC/g
55 crema		2.3X10 ⁴ UFC/g	Número de muestras de crema (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?	
56 queso	14-03-2023	5.0X10 ⁵ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 14-03-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
57 queso		4.8X10 ⁵ UFC/g				
58 queso		4.6X10 ⁵ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			
59 queso		8.0X10 ⁵ UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3			m=10 UFC/g
60 queso		<10.0 UFC/g *	Número de muestras de queso (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g
61 crema	10-05-2023	2.6X10 ³ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 10-05-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17	
62 crema		1.6X10 ³ UFC/g				
63 crema		3.0X10 ³ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)			
64 crema		2.5X10 ³ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3			m=10 UFC/g
65 crema		3.0X10 ³ UFC/g	Número de muestras crema (n)=5 c=1			M= 100 UFC/g

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
66 crema	13-05-2023	1.4X10 ⁴ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 13-05-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
67 crema		7.6X10 ³ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)	M= 100 UFC/g	
68 crema		6.2X10 ³ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3		
69 crema		7.4X10 ³ UFC/g	Número de muestras crema (n)=5		
70 crema		7.1X10 ³ UFC/g	c=1		
71 crema	20-05-2023	7.2X10 ³ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 20-05-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
72 crema		9.1X10 ³ UFC/g	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)	M= 100 UFC/g	
73 crema		1.8X10 ⁴ UFC/g	Clase plan de muestreo: 3		
74 crema		4.4X10 ⁴ UFC/g	Número de muestras crema (n)=5		
75 crema		2.0X10 ⁴ UFC/g	c=1		

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
76 queso	21-05-2023	5.1X10 ⁵ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	S. aureus m=10 UFC/g M= 100 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 21-05-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
77 queso		1.9X10 ⁶ UFC/g **			
78 queso		<10.0 UFC/g *	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)		
79 queso		8.2X10 ⁵ UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3		
80 queso		1.7X10 ⁴ UFC/g	Número de muestras de queso (n)=5 c=1		
81 queso	01-06-2023	>5.7X10 ⁶ UFC/g **	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	S. aureus m=10 UFC/g M= 100 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 01-06-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
82 queso		>5.7X10 ⁶ UFC/g **			
83 queso		>5.7X10 ⁶ UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3		
84 queso		5.3X10 ⁶ UFC/g **	Número de muestras de queso (n)=5		
85 queso		>5.7X10 ⁶ UFC/g **	c=1		

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
86 queso	02-06-2023	$>5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 02-06-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
87 queso		5.5×10^6 UFC/g **	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)	m=10 UFC/g	
88 queso		5.4×10^6 UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3	M= 100 UFC/g	
89 queso		$>5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Número de muestras de queso (n)=5		
90 queso		$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **	c=1		
91 crema	07-06-2023	4.3×10^5 UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i>	El Producto de fecha de fabricación 07-06-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
92 crema		9.4×10^5 UFC/g **	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)	m=10 UFC/g	
93 crema		1.4×10^6 UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3	M= 100 UFC/g	
94 crema		1.7×10^5 UFC/g	Número de muestras de crema (n)=5		
95 crema		8.9×10^5 UFC/g **	c=1		

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo de vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
96 queso	07-06-2023	$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g M= 100 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 07-06-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
97 queso		$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **			
98 queso		$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)		
99 queso		$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3		
100 queso		$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Número de muestras queso (n)=5 c=1		
101 queso	14-06-2023	$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Subgrupo del alimento: 1.9 quesos frescos, no madurados.	<i>S. aureus</i> m=10 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 14-06-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
102 queso		1.8×10^5 UFC/g			
103 queso		$> 5.7 \times 10^6$ UFC/g **	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)	M= 100 UFC/g	
104 queso		1.7×10^5 UFC/g	Clase plan de muestreo: 3 Número de muestras queso (n)=5 c=1		

No. Muestra	Fecha de elaboración de producto	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Criterio Plan de Muestreo vigilancia	Límite	¿Cumple criterio?
105 crema		3.6X10 ⁵ UFC/g	Subgrupo del alimento: 1.6 crema ácida (natilla).	<i>S. aureus</i>	
106 crema		1.4X10 ⁵ UFC/g **	Tipo de alimento: A (Alto Riesgo)	m=10 UFC/g	El Producto de fecha de fabricación 12-06-2023 no cumple con el criterio del RTCA 67.04.50:17
107 crema	12-06-2023	8.3X10 ⁵ UFC/g **	Clase plan de muestreo: 3	M= 100 UFC/g	
108 crema		1.1X10 ⁶ UFC/g **	Número de muestras de crema (n)=5		
			c=1		

Notas. Elaboración propia. Los productos artesanales no poseen número de lote solo fecha de elaboración con base a esa información se analizó la inocuidad de los mismos.

* Se reportaron como: <10.0 UFC/g, aquellos aislados que no fueron confirmados bioquímicamente como *S. aureus*, mediante pruebas bioquímicas preliminares y por VITEK 2 Compact.

**Recuento estimado= Recuento realizado en placa para las diluciones de muestra 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, cuyo número de colonias es inferior a 20 UFC y mayor 200 UFC (criterio de placa contable).

c=número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre m y M para que el alimento sea aceptable en un plan de muestreo de 3 clases.

5.1 Identificación bioquímica de aislados de *S. aureus*:

En la tabla 15, se puede observar que, de las 108 muestras procesadas, se lograron aislar 97 cepas del género *Staphylococcus* coagulasa positiva. Esta identificación preliminar se realizó utilizando la batería bioquímica clásica, conforme al capítulo 12 del Manual FDA-BAM. Esto representa una recuperación del 89.81% de este género bacteriano (con sospechas de pertenecer a la especie *aureus*) respecto al total de muestras analizadas.

El cien por ciento de los aislados bacterianos provenientes de las 54 muestras de quesos y 54 muestras de crema, presentaron la morfología microscópica de cocos gran positivos, pero de estos solo el 89.81% de los aislados tenían la forma clásica de racimo de uvas como es característico para el *Staphylococcus aureus* (ver anexo 10). Para la prueba de la catalasa, el 100% de todos los aislados presentaron prueba positiva con fuerte formación de burbujeo al aplicar peróxido de hidrógeno al 3% (ver anexo 8). Para la prueba de la β -hemólisis el 88.9% de los aislados obtenidos de las muestras de lácteos artesanales dieron una prueba positiva definida (beta-hemólisis completa), el 10.2% de los aislados dieron prueba negativa y el 0.93% de los aislados (el aislado 15) presentó una beta-hemólisis parcial (ver anexos 9).

Para todas las pruebas bioquímicas realizadas en la presente investigación se llevaron controles de reacción positiva y negativa para garantizar la calidad de los resultados obtenidos como puede evidenciarse al final de la tabla 15.

Tabla 15.*Pruebas bioquímicas de identificación preliminar (BAM-FDA)*

Pruebas bioquímicas preliminares realizadas						
Nº Cepa / Aislado	Tinción de Gram	Prueba Coagulasa	Prueba Catalasa	Fermentación anaerobia del Manitol	β -hemólisis	Identidad del aislado de prueba
crema 01, crema 02, crema 03, crema 04, crema 05 y queso 06	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>
queso 07	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	<i>Staphylococcus coagulasa -</i>
queso 08, queso 09, queso 10, crema 11, crema 12, crema 13, y crema 14	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>
crema 15	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+) Parcial	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>
queso 16, queso 17, queso 18, y queso 19.	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	Coco gram positivo (coagulasa -)
queso 20, crema 21, crema 22, crema 23, crema 24, crema 25, queso 26 y queso 27	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>

Pruebas bioquímicas preliminares realizadas						
Nº Cepa / Aislado	Tinción de Gram	Prueba Coagulasa	Prueba Catalasa	Fermentación anaerobia del Manitol	β -hemólisis	Identidad del aislado de prueba
queso 28, queso 29, queso 30, crema 31, crema 32, crema 33, crema 34 y crema 35	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +
36 queso	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)	Coco gram positivo (coagulasa -)
queso 37, queso 38 y queso 39	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +
40 queso	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	Coco gram positivo (coagulasa -)
crema 41, crema 42 y crema 43 crema 44, crema 45, queso 46 y queso 47	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +
queso 48	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)	Coco gram positivo (coagulasa -)
queso 49	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +
queso 50	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	Coco gram positivo (coagulasa -)
crema 51	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +

Pruebas bioquímicas preliminares realizadas						
N° Cepa / Aislado	Tinción de Gram	Prueba Coagulasa	Prueba Catalasa	Fermentación anaerobia del Manitol	β -hemólisis	Identidad del aislado de prueba
crema 52, crema 53, crema 54, crema 55, queso 56, queso 57, queso 58 y queso 59	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>
queso 60	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	Coco gram positivo (coagulasa -)
crema 61, crema 62, crema 63, crema 64, crema 65, crema 66, crema 67, crema 68 y crema 69	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>
crema 70, crema 71, crema 72, crema 73, crema 74, crema 75, queso 76 y queso 77	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>
queso 78	cocos gram positivos	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)	Coco gram positivo (coagulasa -)
queso 79, queso 80, queso 81, queso 82, queso 83, queso 84, queso 85 y queso 86	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i>

Pruebas bioquímicas preliminares realizadas						
Nº Cepa / Aislado	Tinción de Gram	Prueba Coagulasa	Prueba Catalasa	Fermentación anaerobia del Manitol	β-hemólisis	Identidad del aislado de prueba
queso 87, queso 88, queso 89, queso 90, crema 91, crema 92, crema 93 y crema 94	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +
crema 95, queso 96, queso 97, queso 98, queso 99, queso 100, queso 101 y queso 102	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +
queso 103, queso 104, crema 105, crema 106, crema 107 y crema 108	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	<i>Staphylococcus coagulasa</i> +
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	cocos gram positivos en racimo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Cepa control positivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	cocos gram positivos en racimo	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	Cepa control negativo

Nota. Elaboración propia.

5.2 Confirmación de identificación de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas:

Como se puede observar en la tabla 15, de los 97 aislados totales que fueron identificados como *Staphylococcus coagulasa* positiva en el apartado 5.1, solo 96 de estas fueron confirmadas como *S. aureus*, con un porcentaje probabilidad de identificación de entre 94 y 99 haciendo uso del sistema de identificación VITEK 2 Compact. El aislado 15, que fue clasificado como *Staphylococcus coagulasa* positiva (ver tabla 16) fue confirmado como *Staphylococcus pseudintermedius* por el sistema VITEK 2C, lo cual demuestra la importancia que representa contar con un sistema más sensible y con mayor especificidad analítica, para la identificación de cepas microbianas antes de realizar ensayos de sensibilidad.

La identificación precisa ayuda a dirigir la prueba de sensibilidad hacia los antimicrobianos correctos, minimizando errores y optimizando el tiempo de tratamiento ante una infección. Los sistemas automatizados ofrecen una identificación más rápida y precisa, lo que es crucial para la gestión de infecciones y la implementación de estrategias de uso de antimicrobianos.

Tabla 16.

Confirmación de las cepas de Staphylococcus coagulasa positiva, como S. aureus mediante equipo automatizado VITEK 2C.

Nº Cepa / Aislado	Identidad Microorganismo de prueba VITEK 2 Compact	Bionúmero Resultados VITEK	% de probabilidad de identificación
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402047773271	95 %
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066363231	99 %
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066761231	99 %
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067363231	99 %
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402062761231	99 %

Nº Cepa / Aislado	Identidad Microorganismo de prueba VITEK 2 Compact	Bionúmero Resultados VITEK	% de probabilidad de identificación
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067363231	99 %
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067363231	99 %
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402067763231	99 %
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067773031	95 %
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763231	99 %
15	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	030402067323231	75%
20	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763231	99 %
21	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402066763231	99 %
22	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402023763231	99 %
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402063763231	99 %
24	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402062763211	99 %
25	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067363231	99 %
26	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067761231	99 %
27	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067771231	94 %
28	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067661031	99 %
29	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402063763231	99 %
30	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067663231	99 %
31	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402062763231	99 %
32	<i>Staphylococcus aureus</i>	010402066763231	99 %
33	<i>Staphylococcus aureus</i>	010402063763231	99 %
34	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067763231	99 %
35	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402063763231	99 %
37	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763231	99 %
38	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402062761231	99 %
39	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066263231	99 %
41	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066771231	95 %
42	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066761231	99 %
43	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066763031	99 %
44	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066363231	99 %
45	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763031	99 %
46	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763031	99 %

Nº Cepa / Aislado	Identidad Microorganismo de prueba VITEK 2 Compact	Bionúmero Resultados VITEK	% de probabilidad de identificación
47	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067363231	99 %
49	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067763031	99 %
51	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402077763231	95 %
52	<i>Staphylococcus aureus</i>	030400067363031	99 %
53	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763031	99 %
54	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763031	99 %
55	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067763031	99 %
56	<i>Staphylococcus aureus</i>	010402066763231	99 %
57	<i>Staphylococcus aureus</i>	010402063763231	99 %
58	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067763031	99 %
59	<i>Staphylococcus aureus</i>	010402067763231	99 %
61	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
62	<i>Staphylococcus aureus</i>	070400066763231	99 %
63	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066263231	99 %
64	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402043763231	99 %
65	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067761031	99 %
66	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066771231	99 %
67	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763031	99 %
68	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067763031	99 %
69	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402063763031	99 %
70	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067763031	99 %
71	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402073663231	96 %
72	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402063263231	99 %
73	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402062263231	99 %
74	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402063763031	99 %
75	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402073663271	99 %
76	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
77	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402062763231	99 %
79	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066763231	99 %
80	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402062763231	99 %
81	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402073763231	99 %
82	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402063763231	99 %
83	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402062763231	99 %

Nº Cepa / Aislado	Identidad Microorganismo de prueba VITEK 2 Compact	Bionúmero Resultados VITEK	% de probabilidad de identificación
84	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067773231	99 %
85	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066663231	99 %
86	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402047771271	95 %
87	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066773231	94 %
88	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402062763231	99 %
89	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402072763231	96 %
90	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402067761031	99 %
91	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
92	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
93	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
94	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402077763231	95 %
95	<i>Staphylococcus aureus</i>	050402072763231	96 %
96	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066763231	99 %
97	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066363231	99 %
98	<i>Staphylococcus aureus</i>	010402062763231	99 %
99	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402076763231	95 %
100	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066763031	99 %
101	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
102	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066363231	99 %
103	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763271	99 %
104	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066363231	99 %
105	<i>Staphylococcus aureus</i>	030402066363231	99 %
106	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402077763231	99 %
107	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402066763231	99 %
108	<i>Staphylococcus aureus</i>	070402067771231	95 %
Cepa control ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	010402022763271	99 %

Nota. Elaboración propia.

5.3 Susceptibilidad fenotípica a la Meticilina de cepas de *S. aureus*.

Al realizar las pruebas de susceptibilidad fenotípica a antimicrobianos mediante los métodos de Kirby-Bauer y Epsilometría (ver tabla 17), se determinó que ninguna de las 96 cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de productos lácteos artesanales y confirmadas con el sistema de identificación VITEK 2C, mostró resistencia a la Cefoxitina (FOX). Asimismo, se observó una concordancia total entre los resultados de ambas técnicas; es decir, el 100% de las cepas de *S. aureus* catalogadas como sensibles por el método de Kirby-Bauer, también resultaron sensibles a la Cefoxitina (FOX) mediante Epsilometría (E-test).

Aunque no se identificaron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), conforme a los puntos de corte definidos en la Tabla 2C de la guía M100 del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2025), los datos presentados en la tabla 14 ponen de manifiesto el elevado nivel de contaminación detectado de este patógeno en los productos lácteos artesanales analizados representa un riesgo considerable para la salud pública. Esto se debe a que, con recuentos tan altos de *Staphylococcus aureus* en los alimentos, existe una probabilidad significativa de presencia de enterotoxinas termoestables, las cuales pueden provocar intoxicaciones alimentarias agudas incluso en ausencia de bacterias viables. Por consiguiente, se enfatiza la necesidad de fortalecer los controles microbiológicos (Argudín *et al.*, 2010; Hennekinne *et al.*, 2012; Ministry for Primary Industries, 2014).

Tabla 17.*Resultados de Ensayos de Susceptibilidad al antimicrobiano Cefoxitina (FOX).*

Nº Cepa / Aislado Confirmado como <i>S. aureus</i>	Punto de corte según guía M100 CLSI (2025)	Concentración Mínima Inhibitoria por Epsilometría (µg/mL)	Diámetro halo de inhibición Kirby Bauer (mm)	Interpretación fenotípica de Resistencia a FOX
1		3.0	29.58	SENSIBLE
2		4.0	28.49	SENSIBLE
3		3.0	29.41	SENSIBLE
4		3.0	28.46	SENSIBLE
5		3.0	28.38	SENSIBLE
6		4.0	28.03	SENSIBLE
8		2.0	28.75	SENSIBLE
9		3.0	29.69	SENSIBLE
10	Puntos de Corte	4.0	29.13	SENSIBLE
11	halos de Inhibición	4.0	27.45	SENSIBLE
12	técnica de Kirby	2.0	27.92	SENSIBLE
13	Bauer diámetros:	4.0	28.50	SENSIBLE
14	Sensible ≥22 mm	2.0	29.60	SENSIBLE
20	Resistente ≤21	3.0	29.02	SENSIBLE
21	mm	4.0	28.27	SENSIBLE
22		4.0	29.24	SENSIBLE
23		3.0	28.64	SENSIBLE
24	Puntos de Corte	3.0	26.98	SENSIBLE
25	Concentración	1.5	30.85	SENSIBLE
26	Mínima Inhibitoria	4.0	28.33	SENSIBLE
27	técnica de	3.0	28.58	SENSIBLE
28	Epsilometría:	4.0	28.18	SENSIBLE
29	Sensible ≤4µg/mL	3.0	30.08	SENSIBLE
30	Resistente ≥8	3.0	26.51	SENSIBLE
31	µg/mL	2.0	28.29	SENSIBLE
32		3.0	27.76	SENSIBLE
33		3.0	27.43	SENSIBLE
34		2.0	29.63	SENSIBLE
36		3.0	28.7	SENSIBLE
37		3.0	28.18	SENSIBLE
38		3.0	29.35	SENSIBLE

Nº Cepa / Aislado Confirmado como <i>S. aureus</i>	Punto de corte según guía M100 CLSI (2025)	Concentración Mínima Inhibitoria por Epsilometría (µg/mL)	Diámetro halo de inhibición Kirby Bauer (mm)	Interpretación fenotípica de Resistencia a FOX
39		3.0	29.49	SENSIBLE
40		1.0	30.62	SENSIBLE
41		3.0	28.19	SENSIBLE
42		3.0	27.43	SENSIBLE
43		3.0	28.48	SENSIBLE
44		3.0	29.11	SENSIBLE
45		4.0	26.55	SENSIBLE
46		3.0	26.28	SENSIBLE
47		2.0	29.29	SENSIBLE
49		3.0	24.72	SENSIBLE
51	Puntos de Corte halos de Inhibición	4.0	27.63	SENSIBLE
52	técnica de Kirby Bauer diámetros:	2.0	29.49	SENSIBLE
53		3.0	27.00	SENSIBLE
54	Sensible ≥22 mm	1.5	31.77	SENSIBLE
55		2.0	30.34	SENSIBLE
56	Resistente ≤21 mm	3.0	29.67	SENSIBLE
57		3.0	29.34	SENSIBLE
58		4.0	27.26	SENSIBLE
59		4.0	30.78	SENSIBLE
61	Puntos de Corte Concentración	4.0	27.93	SENSIBLE
62	Mínima Inhibitoria	3.0	29.05	SENSIBLE
63	técnica de Epsilometría:	2.0	29.25	SENSIBLE
64		3.0	28.72	SENSIBLE
65	Sensible ≤4µg/mL	3.0	27.70	SENSIBLE
66		3.0	30.32	SENSIBLE
67	Resistente ≥8 µg/mL	4.0	28.1	SENSIBLE
68		4.0	27.37	SENSIBLE
69		3.0	29.26	SENSIBLE
70		4.0	27.49	SENSIBLE
71		3.0	28.98	SENSIBLE
72		3.0	29.86	SENSIBLE
73		3.0	29.68	SENSIBLE
74		3.0	28.64	SENSIBLE

Nº Cepa / Aislado Confirmado como <i>S. aureus</i>	Punto de corte según guía M100 CLSI (2025)	Concentración Mínima Inhibitoria por Epsilometría (µg/mL)	Diámetro halo de inhibición Kirby Bauer (mm)	Interpretación fenotípica de Resistencia a FOX
75		3.0	29.40	SENSIBLE
76		3.0	28.91	SENSIBLE
77		3.0	29.32	SENSIBLE
79		4.0	28.13	SENSIBLE
80		3.0	29.16	SENSIBLE
81		3.0	28.50	SENSIBLE
82		3.0	28.79	SENSIBLE
83		3.0	28.31	SENSIBLE
84		3.0	27.59	SENSIBLE
85		3.0	28.23	SENSIBLE
86	Puntos de Corte halos de Inhibición	2.0	28.94	SENSIBLE
87	técnica de Kirby Bauer diámetros:	3.0	28.20	SENSIBLE
88		3.0	28.09	SENSIBLE
89	Sensible ≥22 mm	3.0	28.56	SENSIBLE
90		4.0	28.37	SENSIBLE
91	Resistente ≤21 mm	3.0	27.02	SENSIBLE
92		3.0	27.57	SENSIBLE
93		3.0	27.78	SENSIBLE
94		2.0	29.12	SENSIBLE
95	Puntos de Corte	3.0	29.51	SENSIBLE
96	Concentración	3.0	27.13	SENSIBLE
97	Mínima Inhibitoria	3.0	30.04	SENSIBLE
98	técnica de Epsilometría:	3.0	28.36	SENSIBLE
99	Sensible ≤4µg/mL	3.0	28.94	SENSIBLE
100		4.0	28.95	SENSIBLE
101	Resistente ≥8 µg/mL	3.0	28.73	SENSIBLE
102		3.0	28.95	SENSIBLE
103		4.0	28.05	SENSIBLE
104		3.0	28.12	SENSIBLE
105		3.0	28.48	SENSIBLE
106		3.0	27.95	SENSIBLE
107		3.0	28.47	SENSIBLE
108		4.0	27.18	SENSIBLE

Nº Cepa / Aislado Confirmado como <i>S. aureus</i>	Punto de corte según guía M100 CLSI (2025)	Concentración Mínima Inhibitoria por Epsilometría (µg/mL)	Diámetro halo de inhibición Kirby Bauer (mm)	Interpretación fenotípica de Resistencia a FOX
Control positivo ATCC 43300		24.0	11.13	RESISTENTE
Control negativo ATCC 25923		2.0	29.64	SENSIBLE

Nota. Elaboración propia.

5.4 Detección del gen de resistencia de *S. aureus* a la meticilina (*mecA*) por PCR punto final.

Luego de la etapa de extracción se evaluó la concentración del ADN extraído mediante el Equipo BioSpec-Nano de Shimadzu y evaluó la pureza del ácido nucleico extraído. Según los resultados obtenidos se comprobó una adecuada cantidad y calidad del ADN presente en los productos de extracción de las cepas de referencia ATCC 43300 y ATCC 25923 de *S. aureus*; además en la etapa de extracción se llevó un control negativo de extracción (en el cual se utilizaron todos los reactivos involucrados en la extracción, pero en lugar de muestra se utilizó agua calidad biología molecular).

De acuerdo Hernández Henríquez & Morales Rivas (2017), La pureza del ADN se obtiene por la relación entre la relación de OD260/280, donde OD= Densidad óptica, absorbancia correspondiente a una longitud de trayectoria de 10 mm.

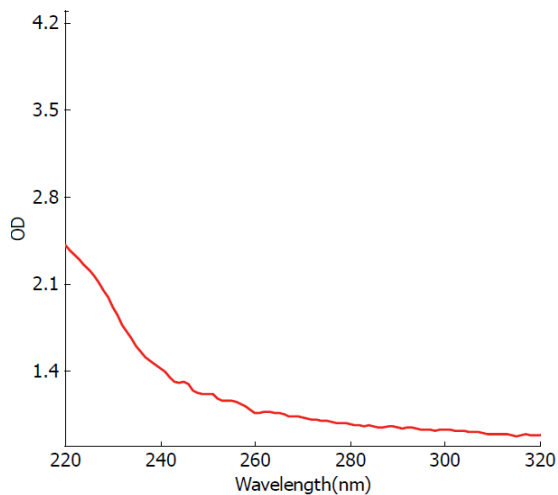
Una preparación pura del ADN debe presentar un cociente de entre 1.8 y 2.0. en general los valores altos OD 260/280 indican una posible contaminación con ARN y los valores bajos de OD 260/230 indican presencias de contaminantes como con sales, carbohidratos, fenoles. Los ácidos nucleicos extraídos presentaron una relación 260/280 cercano 2.0 por lo tanto se acepta generalmente como "pura" para el ADN; extraído (Thermo Scientific, 2020).

Figura 19.**Lectura concentración y pureza del ADN cepa *S. aureus* ATCC 43300**

No. : 4
 Sample Name : SaureusATCC43300(1E)
 Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
 Analyte : dsDNA
 DateTime : 24 12 03 10:33:19

Nucleic Acid Conc : 9.15 ng/μL
 OD260/280 : 1.93
 OD260/230 : 0.18

Item	Result
OD260	1.060
OD280	0.972
OD230	1.912
OD320	0.877
Pathlength (mm)	0.660
Dilution	1.000



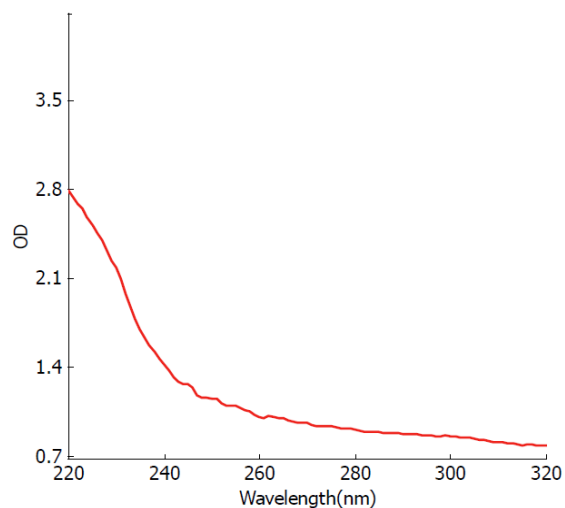
Nota. Elaboración propia

Figura 20.**Lectura concentración y pureza del ADN cepa *S. aureus* ATCC 25923**

No. : 5
 Sample Name : SaureusATCC25923(1E)
 Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
 Analyte : dsDNA
 DateTime : 24 12 03 10:35:15

Nucleic Acid Conc : 11.20 ng/μL
 OD260/280 : 1.78
 OD260/230 : 0.16

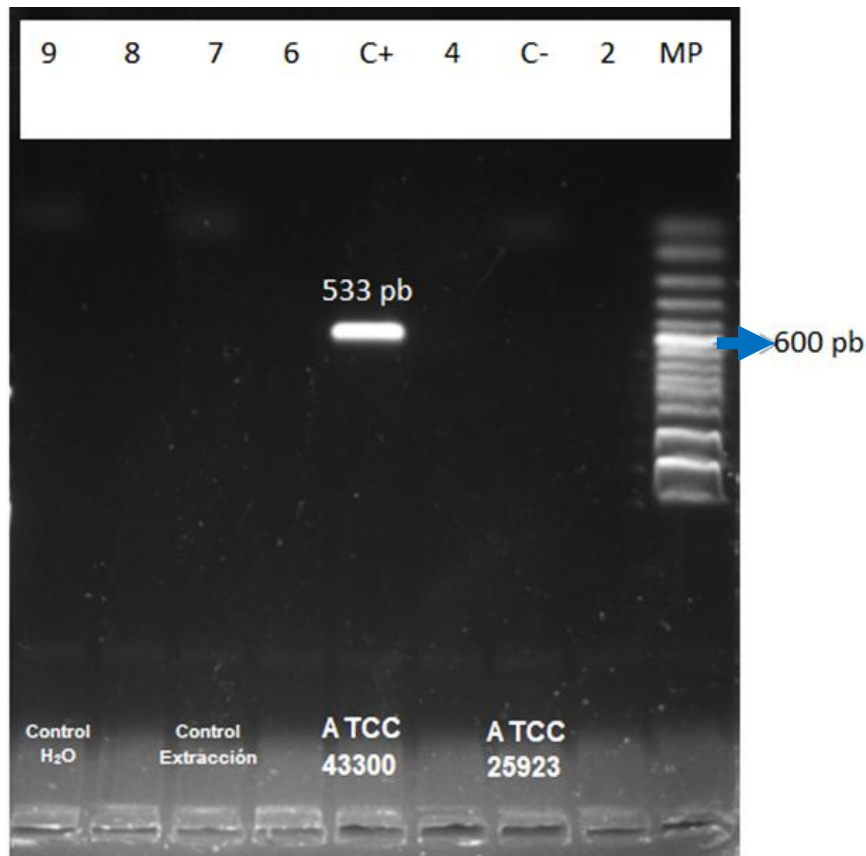
Item	Result
OD260	1.005
OD280	0.907
OD230	2.179
OD320	0.781
Pathlength (mm)	0.660
Dilution	1.000



Nota. Elaboración propia

Figura 21.

Visualización de la gel en el Fotodocumentador AXYGEN Corning Brand



Se trabajaron la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (control negativo del gen *mecA*) y la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (control positivo del gen *mecA*) en PCR punto final como se apreciaren la figura 20.

En el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular (MP), en el pocillo #3 se colocó el ADN de la cepa control negativo (C-) que como se puede observar no amplificó, en el pocillo #5, se colocó la cepa control positivo (C+), la cual amplificó correctamente con un peso molecular de 533 pares de bases aproximadamente, por último en el pocillo #7 se colocó un blanco (control negativo de extracción), para garantizar cualquier problema en la fase de extracción de ácidos nucleicos.

5.5 Cálculo de la Prevalencia de la resistencia fenotípica a la Meticilina

De acuerdo con Pita Fernández *et al.* (2004), la fórmula para calcular la Prevalencia (P) utilizando el número de individuos con la condición (N) y la población total (T) es:

$$\text{Prevalencia (P)} = (N/T) \times 100$$

Lugar:

- Prevalencia (P) es la proporción o porcentaje estimado de la población con una condición específica de estudio.
- Número de individuos con la condición (N) es el recuento de individuos que tienen la condición de interés.
- Población total (T) es toda la población objeto de estudio.

La multiplicación por 100 es para expresar la prevalencia como porcentaje.

Como todos los aislado fueron sensibles a la Meticilina, por lo métodos fenotípicos (ver tabla 20), entonces:

$$\% \text{ Prevalencia} = \frac{\text{Número de aislados resistentes a la Meticilina (MRSA)}}{\text{Número de Cepas totales aisladas e identificadas como } S. aureus} \times 100$$

$$\% \text{ Prevalencia} = \frac{0 \text{ aislados resistentes a meticilina (MRSA)}}{96 \text{ aislados confirmados como } S. aureus} \times 100$$

$$\% \text{ Prevalencia} = 0.00\%$$

5.6 Cálculo de la Prevalencia del gen *mecA* de genotípica a la Meticilina.

La ausencia del gen *mecA* en las cepas aisladas de productos lácteos artesanales, aun cuando fue validada mediante controles positivos y negativos, podría atribuirse a distintos factores contextuales. Una posible explicación es la baja presión selectiva por antibióticos en los entornos de producción artesanal, donde el uso de antimicrobianos suele ser limitado, lo que restringe la selección y persistencia de cepas portadoras de genes de resistencia (Martinez *et al.*, 2019). Además, el muestreo se realizó en un periodo definido entre febrero y junio de 2023, lo que impide descartar la influencia de factores estacionales en la circulación de cepas *mecA*-positivas, dado que se ha reportado una variabilidad significativa en la prevalencia de resistencia antimicrobiana a lo largo del año (Blanquart *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2021).

Estas consideraciones refuerzan la necesidad de realizar estudios longitudinales y multicéntricos que permitan caracterizar la dinámica temporal y geográfica de este tipo de mecanismos de resistencia en matrices alimentarias de origen artesanal. Por tanto la prevalencia de la presencia del gen *mecA* en las muestras de lácteos (queso fresco y crema) artesanales coincide numéricamente con de la Prevalencia de la resistencia fenotípica a la Meticilina; es decir, 0.00%

5.7 Comprobación de hipótesis de investigación:

Se realizó la prueba de hipótesis para la proporción, con un nivel de confianza del 95% y un nivel de significación del 5%.

La hipótesis nula de la investigación es H_0 :

“La prevalencia de cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) aisladas de lácteos procesados en plantas artesanales de Nueva Concepción

Chalatenango evidenciada mediante métodos microbiológicos y por métodos moleculares es menor o igual al 1%.”

Ecuación de cálculo prueba de hipótesis para la proporción (Probabilidad y Estadística, 2023):

$$Z = \frac{\bar{p} - P_0}{\sqrt{P_0(1 - P_0)/n}} =$$

Donde:

\bar{p} = es la proporción de la media de la muestra.

P_0 = es la proporción de la media propuesta por el investigador, en este caso es 0.01 (1%)

X= 0 cepas resistentes a meticilina

n= 96 aislados confirmados como *S.aureus*

Entonces:

$$H_0: \bar{p} \leq P_0$$

Es decir partimos de que $H_0: \bar{p} = 0.01$

$$H_1: \bar{p} > 0.01$$

Cálculos:

$$\bar{p} = \frac{x}{n} = \frac{0 \text{ aislados resistente a Meticilina}}{96 \text{ aislados } S. aureus} = 0$$

Entonces:

$$Z_{calculado} = \frac{\bar{p} - P_0}{\sqrt{P_0(1 - P_0)/n}} = \frac{0.0 - 0.01}{\sqrt{0.01(1 - 0.01)/96}} = -0.985$$

Aplicando valor absoluto del Z calculado: $Z_{calculado} = |-0.985| = 0.985$

Tabla 18.

Tabla de niveles de confianza para prueba de hipótesis.

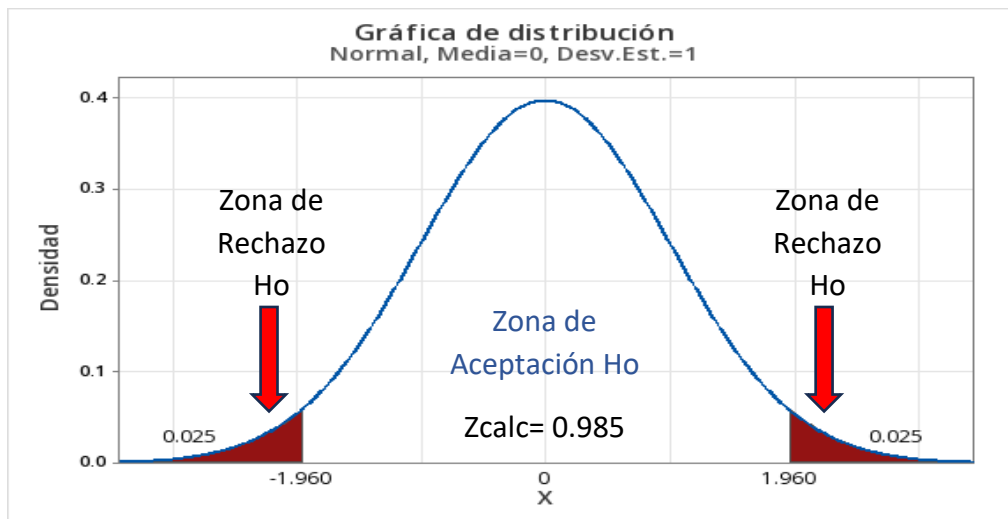
Nivel de confianza (1- α)	Nivel de significación (α)	Valor crítico ($Z_{\alpha/2}$)
0.80	0.20	1.282
0.85	0.15	1.440
0.90	0.10	1.645
0.95	0.05	1.960
0.99	0.01	2.576
0.995	0.005	2.807
0.999	0.001	3.291

Nota. Obtenido de (Probabilidad y Estadística, 2023)

Al leer el valor Z crítico de tablas para un nivel de confianza del 95% y un nivel de significación del 5%, entonces: $Z_{\text{crítico de tablas}} = 1.960$

Figura 22.

Gráfica distribución normal prueba de Hipótesis



Nota. Gráfico obtenido con Minitab® Statistical Software

Entonces:

$$Z_{\text{calculado}} = 0.9685$$

$$Z_{\text{crítico de tablas}} = 1.960$$

Como $Z_{\text{calculado}} < Z_{\text{crítico de tablas}}$; por tanto, se acepta la hipótesis nula H_0 de esta investigación.

Los resultados obtenidos demuestran un incumplimiento generalizado de los criterios microbiológicos de inocuidad establecidos en el RTCA 67.04.50:17, con recuentos de *Staphylococcus aureus* superiores al valor máximo permitido ($M = 100$ UFC/g) en la totalidad de las muestras procesadas de queso fresco y crema artesanal (COMIECO, 2018). Esta situación refleja condiciones higiénico-sanitarias deficientes en el entorno artesanal de producción láctea en Nueva Concepción, Chalatenango, y representa un riesgo concreto para la salud pública, especialmente en poblaciones vulnerables.

No obstante, un hallazgo relevante es que, a pesar del alto nivel de contaminación, todas las cepas de *S. aureus* resultaron sensibles a meticilina, tanto por el método de Kirby-Bauer con discos de cefoxitina como por Epsilometría (E-test), siguiendo los puntos de corte establecidos por el CLSI (2025). Además, la confirmación mediante PCR punto final mostró ausencia del gen *mecA* en las cepas aisladas y amplificación exitosa en los controles positivos, lo que valida la eficiencia del protocolo molecular implementado. Este resultado sugiere que, aunque hay una alta exposición a *S. aureus*, no se detectaron cepas del tipo MRSA en el contexto evaluado.

Dichos hallazgos podrían explicarse por una baja presión selectiva por antimicrobianos en los entornos de producción artesanal, donde el uso de antibióticos es generalmente limitado (Martinez *et al.*, 2019), o bien por una circulación restringida de cepas que portan elementos genéticos como SCCmec

(Blanquart *et al.*, 2017). Sin embargo, esto no excluye el riesgo potencial: la presencia de *S. aureus* toxigénico, incluso sensible, en alimentos listos para el consumo continúa siendo una causa importante de intoxicaciones alimentarias, ya que sus enterotoxinas son termoestables y conservan su actividad biológica incluso tras tratamientos térmicos moderados (Argudín *et al.*, 2010; Hennekinne *et al.*, 2012).

Por último, el enfoque normativo planteado en uno de los objetivos — verificar el cumplimiento del RTCA— permitió establecer una conexión directa entre los hallazgos microbiológicos y el marco regulatorio vigente, generando evidencia útil para fortalecer programas de vigilancia y control sanitario en entornos artesanales de producción alimentaria.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES:

Las muestras de quesos frescos y crema elaboradas artesanalmente en el municipio de Nueva Concepción, Chalatenango, no cumplieron con los límites microbiológicos establecidos en el RTCA 67.04.50:17 para *Staphylococcus aureus*. Todos los lotes analizados superaron el valor máximo aceptable (M = 100 UFC/g), lo que representa una situación de riesgo sanitario importante para los consumidores.

Se logró el aislamiento y confirmación de 96 cepas de *Staphylococcus aureus* a partir de 108 muestras de productos lácteos artesanales, mediante métodos microbiológicos clásicos y confirmación automatizada con el sistema VITEK 2 Compact, evidenciando una alta frecuencia de contaminación por este microorganismo.

Las pruebas fenotípicas de sensibilidad a meticilina, mediante métodos de Kirby-Bauer y Epsilometría (E-test) con cefoxitina, indicaron que el 100% de las cepas aisladas fueron sensibles, clasificándose como *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (MSSA) de acuerdo con los criterios del CLSI M100 (2025).

La técnica de PCR punto final confirmó la capacidad del laboratorio para detectar el gen *mecA*, aunque su presencia no fue identificada en ninguna de las cepas aisladas. La validación se realizó exitosamente mediante cepas ATCC de referencia, lo que garantiza la confiabilidad del proceso molecular implementado.

La prevalencia tanto fenotípica como genotípica de resistencia a meticilina fue del 0.0% en las cepas analizadas. Aunque este hallazgo es favorable desde el punto de vista clínico y sanitario, debe interpretarse con cautela y ser evaluado periódicamente debido al potencial de diseminación horizontal de genes de resistencia.

La aplicación conjunta de métodos microbiológicos, normativos y moleculares permitió cumplir los objetivos del estudio con rigurosidad y generar evidencia útil para la evaluación de la inocuidad microbiológica en entornos de producción artesanal de alimentos. Este trabajo constituye un insumo valioso para fortalecer futuras acciones de vigilancia alimentaria y normativa en el país.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda fortalecer los controles oficiales de calidad e inocuidad alimentaria en establecimientos artesanales, a través de programas de inspección periódica que aseguren el cumplimiento del RTCA 67.04.50:17 y la NSO 67.01.01:06, especialmente en productos lácteos listos para el consumo.

Implementar planes de formación técnica dirigidos a los productores artesanales sobre buenas prácticas de manufactura, higiene durante la elaboración, almacenamiento y transporte, además del control microbiológico de sus productos, con enfoque en prevención de enfermedades transmitidas por alimentos.

Se recomienda expandir el monitoreo de cepas de *S. aureus* en productos lácteos artesanales en otros municipios del país, con especial énfasis en determinar la presencia de genes de resistencia como *mecA*, *mecC* u otros elementos del casete cromosómico *SCCmec*, incluso en cepas fenotípicamente sensibles.

Además recomendamos realizar estudios longitudinales o estacionales para determinar posibles variaciones en la prevalencia de *S. aureus* y su resistencia, considerando factores como clima, época de mayor producción, y origen de la leche utilizada (cruda o pasteurizada).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Adame-Gómez, R., Toribio-Jimenez, J., Vences-Velazquez, A., Rodríguez-Bataz, E., Santiago Dionisio, M. C., & Ramirez-Peralta, A. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Artisanal Cheeses in México. *International Journal of Microbiology*, 2018, 8760357. <https://doi.org/10.1155/2018/8760357>

Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., González-Rocha, G., Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., & González-Rocha, G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 7–14. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>

Anuarios de estadísticas agropecuarias (2021-2022) (pp. 18-21). (2022). Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.mag.gob.sv/anuarios-de-estadisticas-agropecuarias/>

Arreces Martínez, G. del C. (2015). *Determinación de la multirresistencia a los antibióticos en cepa de Staphylococcus aureus, aislada de leche cruda de vaca obtenida de una lechería del departamento de Santa Ana* [Tesis de grado, Universidad de El Salvador]. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/8772/>

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>

Association of Official Analytical Methods. Official Method 975.55: Enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods: Official Methods of Analysis of AOAC International, 2019.

Benavides Martínez, H. A. (2007). Propuesta de guía de aplicación de técnicas de microbiología (bacterias y hongos) para ser utilizado en microbiología general [Bachelor, Universidad de El Salvador]. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4768/>

Benítez Cruz, E. E., & Centi Lima, K. G. (2012). Determinación de la resistencia del *Staphylococcus aureus* aislado de quesos no madurados comercializados en el Mercado Central de San Salvador, a los antibióticos de prueba seleccionados. [Bachelor, Universidad de El Salvador]. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2757/>

bioMérieux. (2025). *VITEK® 2 COMPACT. sistema de identificación microbiana*. <https://www.biomerieux-industry.com/es/products/vitek-2-compact-sistema-de-deteccion-microbiana-para-aplicaciones-farmaceuticas>

Blanco Varillas, A. X., Santiago Onofre, E. J., Oliva López, L. D., Bernabe Pineda, M., & Galicia-Jiménez, M. M. (2025). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in artisanal cheese from Puerto Escondido, Oaxaca, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 28(2).

Blanquart, F., Lehtinen, S., & Fraser, C. (2017). An evolutionary model to predict the frequency of antibiotic resistance under seasonal antibiotic use, and an application to *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1858), 20170679. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0679>

Cannon, R. M. (2001). Sense and sensitivity—surveys based on an imperfect test. *Preventive Veterinary Medicine*, 49(3–4), 141–163. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(01\)00184-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00184-2)

Carroll, K. C. (2016). Estafilococos. *Microbiología médica* (27.^a ed., p. 213). McGraw-Hill Interamericana Editores.

Centers for Disease Control and Prevention (2019). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). <https://www.cdc.gov/mrsa/lab/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention (2021). *Microbios y enfermedades transmitidos por los alimentos*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-schettino, P. M. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Caracter%C3%ADsticas-generales-del-Staphylococcus-aureus-Cervantes-Garc%C3%ADa-Garc%C3%ADa-Gonz%C3%A1lez/ce74286096b1957f2b500227962fc322047972bd>

CLSI. (2024). M02. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (14th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/>

CLSI. (2025). *M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (35.^a ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/companion/m100-plus/>

Código de Salud, (1988). <https://www.asamblea.gob.sv/sites/default/files/documents/dictamenes/09AFB345-2139-422B-AD51-90863B026D9.pdf>

Consejo de ministros de Integración Económica de Centroamérica. (2013). RTCA 67.04.65:12. Uso de términos lecheros. Diario Oficial No. 400. <https://www.defensoria.gob.sv/wp-content/uploads/2023/03/RTCA-USO-TERMINOS-LECHEROS.pdf>

Consejo de ministros de Integración Económica de Centroamérica. (2018). RTCA 67.04.50:17 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la inocuidad de los alimentos (Primera revisión), Diario Oficial No. 420. https://osartec.gob.sv/wp-content/uploads/download-manager-files/82_d_o__rtca_67.04.50_17_alimentos_criterios_microbiologicos.pdf

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2008). NSO 67.01.01:06, Leche Cruda De Vaca. Especificaciones. (Primera actualización), Diario Oficial No. 380. https://osartec.gob.sv/wp-content/uploads/download-manager-files/47_d.o._nso_leche_cruda_de_vaca.pdf

De Aguiar, F. R. M., Rocha, L. Q., Barboza, M. M. O., Sampaio, T. L., Nogueira, N. A. P., & de Menezes, R. R. P. P. B. (2022). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in «coalho» cheese produced in Brazil. *The Journal of Dairy Research*, 1-4. <https://doi.org/10.1017/S0022029922000073>

Food and Drug Administration U.S. (2016). *Staphylococcus aureus*: Vol. Chapter 12. Bacteriological Analytical Manual. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>

Forbes, B. A. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Médica Panamericana.

- Gasca, F. (2021). *Composición nutricional de la leche y su papel en la salud humana*. AMHIGO. <https://amhigo.com/actualidades/ultimas-noticias/120-nutricion-e-higado/1215-composicion-nutricional-de-la-leche-y-su-papel-en-la-salud-humana>
- Gutiérrez-Venegas, G., & Cardoso-Jiménez, P. (2006). Ácido lipoteicoico: Receptores y mecanismo de transducción. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(2), 41-49.
- Gómez-López, M. D., Ramírez, N. F., & Vélez, J. A. (2021). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en leche cruda de vacas lecheras en el Valle del Cauca, Colombia. *Revista de Salud Animal*, 43(1), 1–10.
- Hamdan, A., González-García, S., & Bustos Martínez, J. (2016). Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.02.002>
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815–836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- Hércules, R., & Joel, E. (2017). *Propuesta de un modelo competitivo ante el TLC con Estados Unidos para los productores artesanales de lácteos de la zona suroeste de Chalatenango*. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/158826>

Hernández Henríquez, G. E., & Morales Rivas, R. M. (2017). Aislamiento e identificación de hongos causantes de antracnosis en *Musa paradisiaca* L. (Platano) y hongos antagonistas [Bachelor, Universidad de El Salvador]. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/14078/>

Herrera A., F., & Santos B., J. (2015). PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus* METICILINA- RESISTENTES EN QUESO DOBLE CREMA ARTESANAL. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 29–37. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-42262015000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Invitrogen PureLink- DNA Extraction and Purification kit. (2022). Thermo Fisher Scientific. <https://www.fishersci.com/shop/products/invitrogen-purelink-genomic-dna-mini-kit-3/K182001>

ISO 11133:2014, Microbiology of Food, Animal Feed and Water — Preparation, Production, Storage and Performance Testing of Culture Media. 2014, 2014, <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:11133:ed-1:v2:en>.

Jiménez Moraleda, B., Fuentes Martín, M. J., Sabanza Belloso, M., López Gómez, M., Miguel Molinos, A. C., & Ciprian Negru, G. (2021). Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. *Revista Sanitaria de Investigación*, 2(8), 125.

- Jiménez Velásquez, S. del C., Torres Higuera, L. D., Parra Arango, J. L., Rodríguez Bautista, J. L., García Castro, F. E., & Patiño Burbano, R. E. (2020). Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus spp.* obtenidos de leche bovina en Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>
- Johler, S., Sihto, H.-M., Macori, G., & Stephan, R. (2016). Sequence variability in staphylococcal enterotoxin genes seb, sec, and sed. *Toxins*, 8(6), 169. <https://doi.org/10.3390/toxins8060169>
- Kali, A., Stephen, S., & Umadevi, S. (2014). Laboratory evaluation of phenotypic detection methods of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomedical Journal*, 37(6), 411-414. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.132907>
- López-Vázquez, M., Martínez-Castañeda, J. S., Talavera-Rojas, M., Valdez-Alarcón, J. J., & Velázquez-Ordóñez, V. (2015). Detección de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México. *Archivos de medicina veterinaria*, 47(2), 245-249. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2015000200018>
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(18), 3057-3071. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>

Martins González, A. G., Peres Marques, L. M., Amorim Gomes, M. da S., Beltrão, J. C., Pinheiro, M. G., Ramires Esper, L. M., de Paula, G. R., Arneiro Teixeira, L., & Aguiar-Alves, F. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: Evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 364(23). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx232>

Martínez-Vasallo, M. J., Pérez-Rodríguez, F., & González-González, A. (2019). Evaluación microbiológica del queso fresco artesanal en Cuba: implicaciones para la inocuidad alimentaria. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 57(3), 1–9.

Martínez, E. P., Cepeda, M., Jovanoska, M., Bramer, W. M., Schoufour, J., Glisic, M., *et al.* (2019). Seasonality of antimicrobial resistance rates in respiratory bacteria: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 14(8), e0221133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221133>

MIC Test Strip. (2023). Liofilchem. <https://www.liofilchem.com/featured-products/mic-test-strip.html>

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2009). IV Censo Agropecuario 2007 y 2008. Resumen nacional. <https://www.mag.gob.sv/censos-agropecuarios/>

Ministry for Primary Industries (MPI). (2014). Microbial Pathogen Data Sheet: *Staphylococcus aureus*. Ministry for Primary Industries, New Zealand. <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/11051/direct>

Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8088. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>

Nair, D., Shashindran, N., Kumar, A., Vinodh, V., Biswas, L., & Biswas, R. (2021). Comparison of Phenotypic MRSA Detection Methods with PCR for *mecA* Gene in the Background of Emergence of Oxacillin-Susceptible MRSA. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 27(9), 1190-1194. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0361>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). *Producción y productos lácteos: Composición de la leche*. FAO. <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>

Organización Panamericana de la Salud. (2016). *Descriptorios en Ciencias de la Salud*. Recuperado 15 de abril de 2023, de <https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=13592>

Pasachova Garzón, J., Ramírez Martínez, S., & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32), 25–38. <https://doi.org/10.25058/24629448.3631>

PCR en tiempo real. (2023). *Facultad de Química UNAM*. Recuperado 23 de abril de 2023, de <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/pcr-en-tiempo-real/>

Pita Fernández, S., Pértega Díaz, S., & Valdés Cañedo, F. (2004). Medidas de frecuencia de enfermedad. *Cadernos de atención primaria*, 11(2), 101–105. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2330047>

Plan de competitividad municipal del municipio de Nueva Concepción–Chalatenango (p. 111). (2012). USAID. https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PA00KW43.pdf

Probabilidad y Estadística. (2023). Prueba de hipótesis para la proporción. Probabilidad y Estadística. <https://www.probabilidadyestadistica.net/prueba-de-hipotesis-para-la-proporcion/>

QIAGEN. (2020). *PCR Digital: Tecnología de PCR Digital basada en nanoplacas*. <http://www.qiagen.com/es/applications/digital-pcr>

Ramos Pérez, Daniel. *Identificación Bioquímica Bacteriana Mediante Sistema VITEK 2. Curso de Microbiología Experimental. UNAM, 2023*, https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/10202/mod_resource/content/1/Identificacion%20VITEK%202.pdf.

Reacción en cadena de la polimerasa PCR (2022). National Human Genome Research Institute (NHGRI). <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>

Resistencia a los antibióticos. (2021). [Text]. <https://medlineplus.gov/spanish/antibioticresistance.html>

Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2014). *Sherris: Microbiología médica* (5.^a ed.). McGraw-Hill Interamericana.

Salina, M., Servián, N., Romero, M., Samudio, T., Ruiz, V., Rojas, W., Riquelme, F., Riera, H., Rodríguez, D., Serrano, J., Rolón, S., Romero, C., Saldívar, F., Salvaré, P., Samaniego, G., Segovia, G., Rivas, E., Sisa, M., Sotomayor, M., ... Ramos, P. (2018). Portación de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos de servicios gastronómicos de Asunción, Paraguay (2017). *Rev. salud pública Paraguay*, 28-33.

Salgado-Ruiz, T. B., Rodríguez, A., Gutiérrez, D., Martínez, B., García, P., Espinoza-Ortega, A., *et al.* (2016). Characterisation of *Staphylococcus aureus* from small-scale dairy systems in the highlands of central Mexico. *Digital* CSIC. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/143041/4/Molecular%20characterization-Salgado%20et%20al.pdf>

Shimadzu. (2017). *Spectrophotometer for Life Science BioSpec-nano*. Shimadzu. https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/brochures/24305/c101-e112.pdf

- Shimadzu. (2025). *BioSpec-nano Spectrophotometer for Life Science*.
<https://www.shimadzu.com/an/products/molecular-spectroscopy/uv-vis/uv-vis-nir-spectroscopy/biospec-nano/index.html>
- Sosa, L., Espinoza, L. C., Marcia Fuentes, J., Enríquez de Madrid, M. de L., & Rojas Campos, N. (2022). *Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de staphylococcus aureus resistentes a meticilina obtenidos de dos centros hospitalarios de Tegucigalpa, Honduras*. *Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus obtained from two hospitals in Tegucigalpa, Honduras*. <https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.03.55>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sun, D. S., Kissler, S. M., Kanjilal, S., Olesen, S. W., Lipsitch, M., & Grad, Y. H. (2021). Large variation in the association between seasonal antibiotic use and resistance across multiple bacterial species and antibiotic classes. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248670>
- Tang, J.-N., Tang, C., Wang, Y., Chen, J., Liu, J., Liu, L., & Yue, H. (2012). Surveillance study of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from goats of different slaughterhouses in Sichuan, China. *Annals of Microbiology*, 62, 1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0370>

Thermo Scientific. (2020). Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. NanoDrop. Thermo Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>

Torres Segarra, S. M., & Pacheco Cárdenas, K. E. (2021). Staphylococcus aureus resistentes a metilina en alimentos. Vive Revista de Salud, 4(12). Recuperado de Revista Vive

Titouche, Y., Hakem, A., Houali, K., Meheut, T., Vingadassalon, N., Ruiz-Ripa, L., Salmi, D., Chergui, A., Chenouf, N., Hennekinne, J. A., Torres, C., & Auvray, F. (2019). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the TiziOuzou area of Algeria. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6876-6884. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16208>

Universidad de Zulia. (2005). Microbiología de la leche I: guía práctica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. <https://www.virtualpro.co/biblioteca/microbiologia-de-la-leche-i-guia-practica>.

VIGEPES-05. (2019). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en El Salvador. <https://vigepes.salud.gob.sv/>

Zendejas Manzo, G. S., Avalos Flores, H., & Soto Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 122.

ANEXOS

Anexo 1.

Muestras de Queso y Crema artesanales.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 2.

Preparación de Medios de Cultivo Estériles en Autoclave.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 3.

Indicadores Químicos y Biológicos Utilizados en ciclos de Autoclave en Medios de Cultivo preparados y su interpretación de cumplimiento.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 4.

Control del pH en Medios de Cultivo preparados.



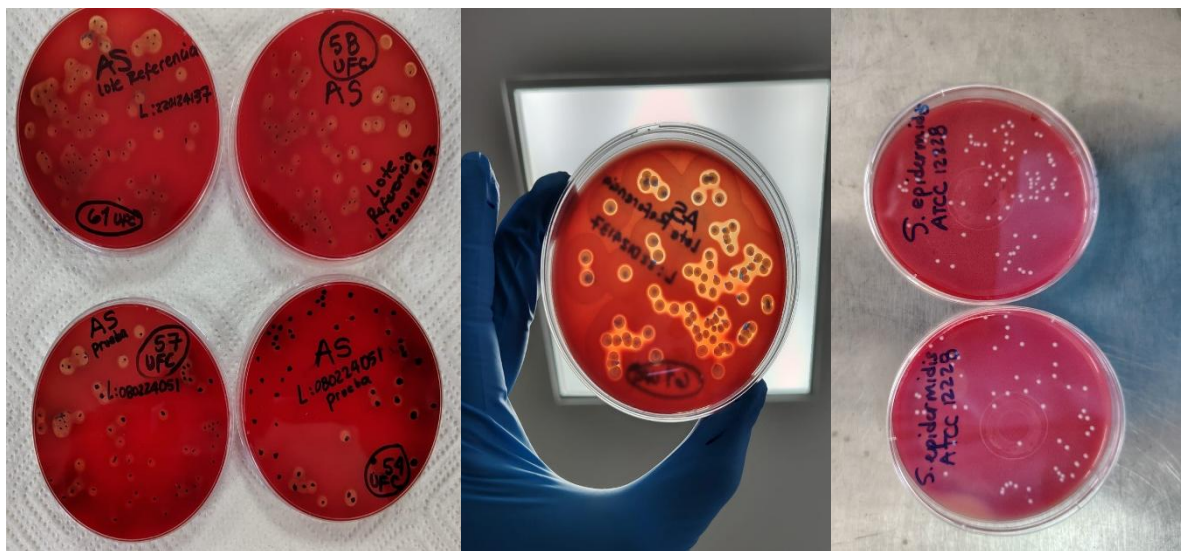
Nota. Elaboración propia.

Anexo 5.

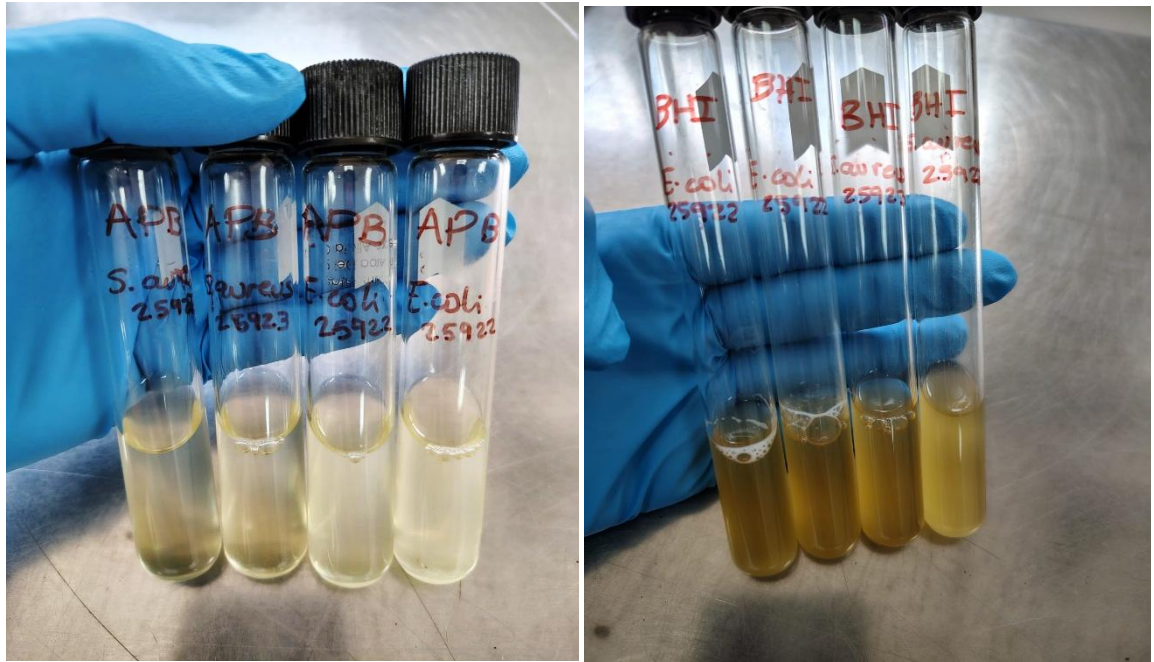
Ensayos de Rendimiento de Medios de Cultivo preparados acorde con ISO 11133:2014 (Productividad, Selectividad y Especificidad de Medios Cualitativos y Cuantitativos).



Nota. Ensayo de Rendimiento Agar Baird Parker, a la Izquierda Productividad con S. aureus ATCC 25923, al centro Especificidad con S. epidermidis ATCC 12228 y Selectividad con E. coli ATCC 25922. Elaboración propia.



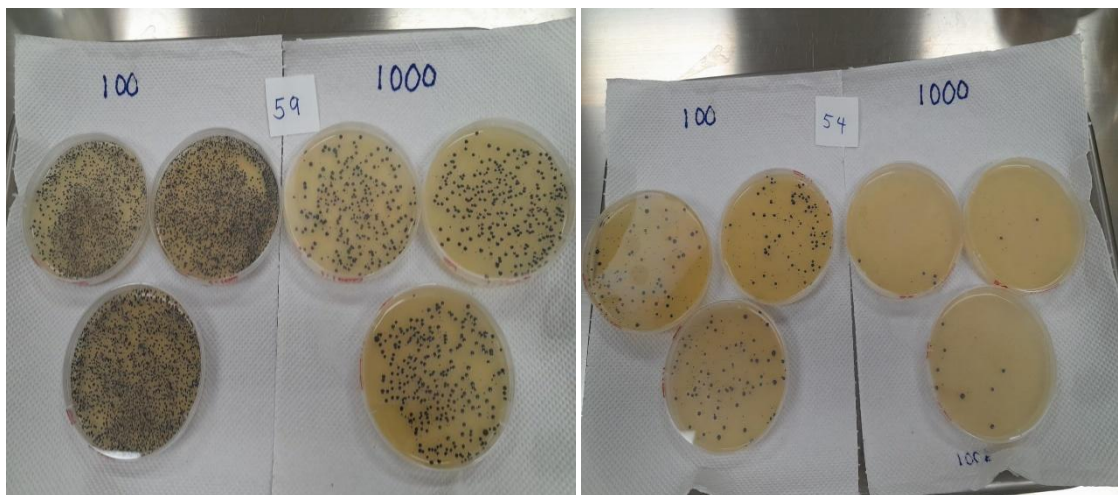
Nota. Ensayo de rendimiento Agar Sangre Izquierda (Productividad con S. aureus ATCC 25925) y a la derecha (S. epidermidis ATCC 12228 no hemolítica) tras 48 horas de incubación a 37°C. Elaboración propia.



Nota. Ensayo de caldo BHI y APB con cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. Elaboración propia.

Anexo 6.

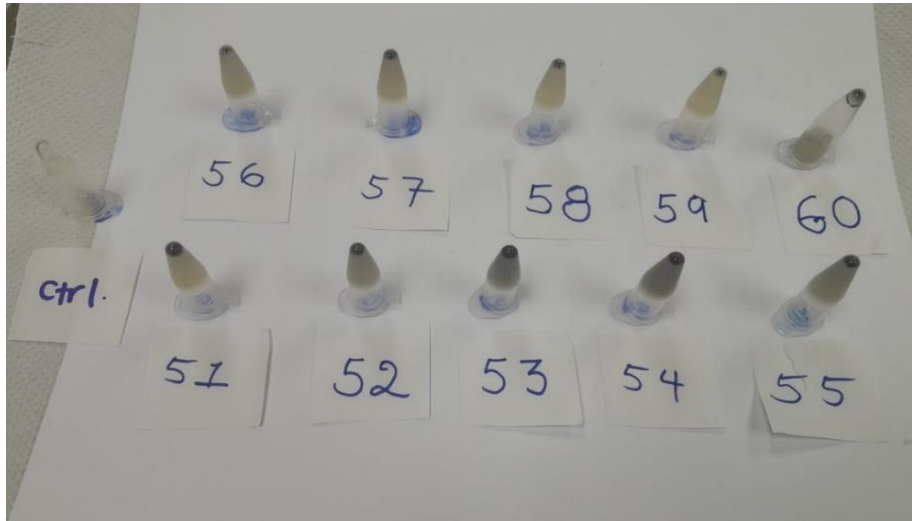
Resultados Muestras Analizadas para recuento de S. aureus.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 7.

Prueba bioquímica de la coagulasa con Plasma de Conejo + EDTA.



Nota. Elaboración propia. Control Negativo (-) *S. epidermidis* ATCC 12228

Anexo 8.

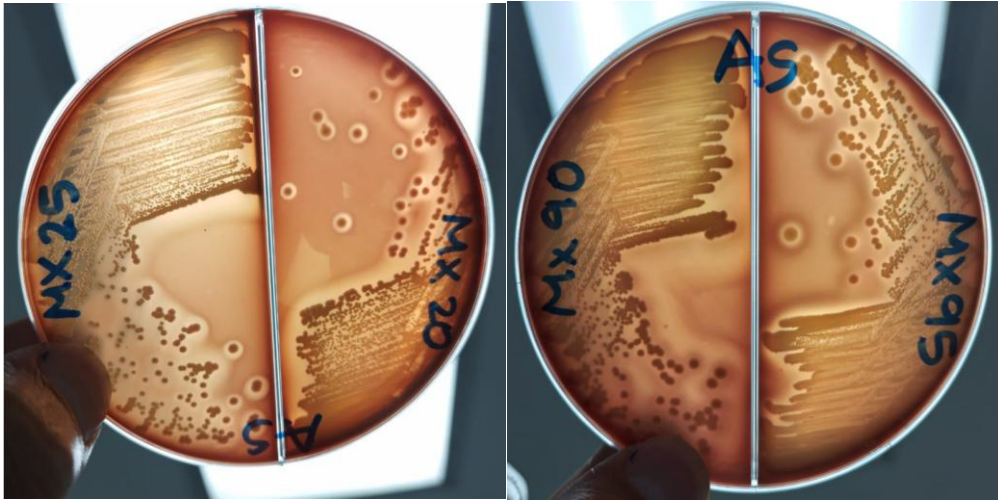
Prueba bioquímica de la catalasa en cepas aisladas de muestras.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 9.

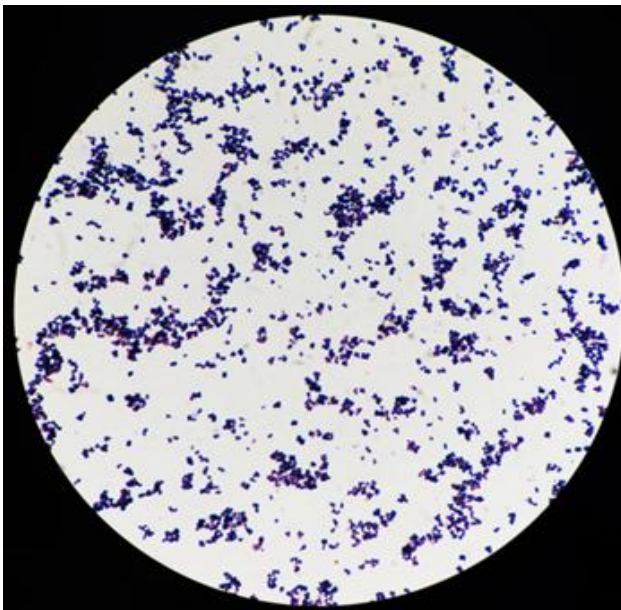
Prueba de la β -hemólisis en Agar Sangre de carnero al 5%.



Nota. Elaboración propia

Anexo 10.

Tinción de gram aislado de Staphylococcus aureus en muestras



Nota. Elaboración propia

Anexo 11.

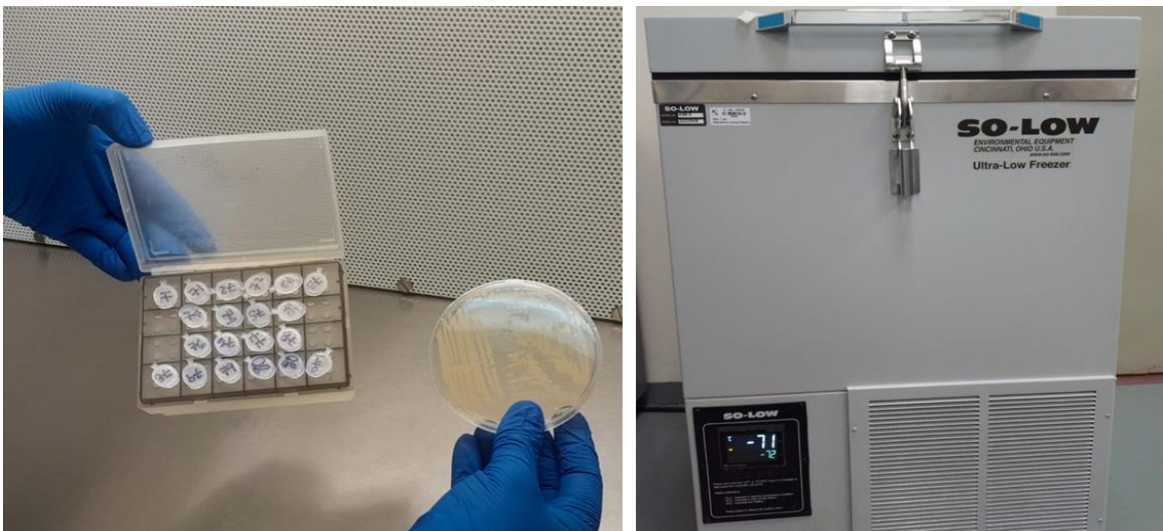
Utilización anaerobia del manitol de aislados de prueba, y cepa control negativo (S. epidermidis ATCC 12228)



Nota. Elaboración propia.

Anexo 12.

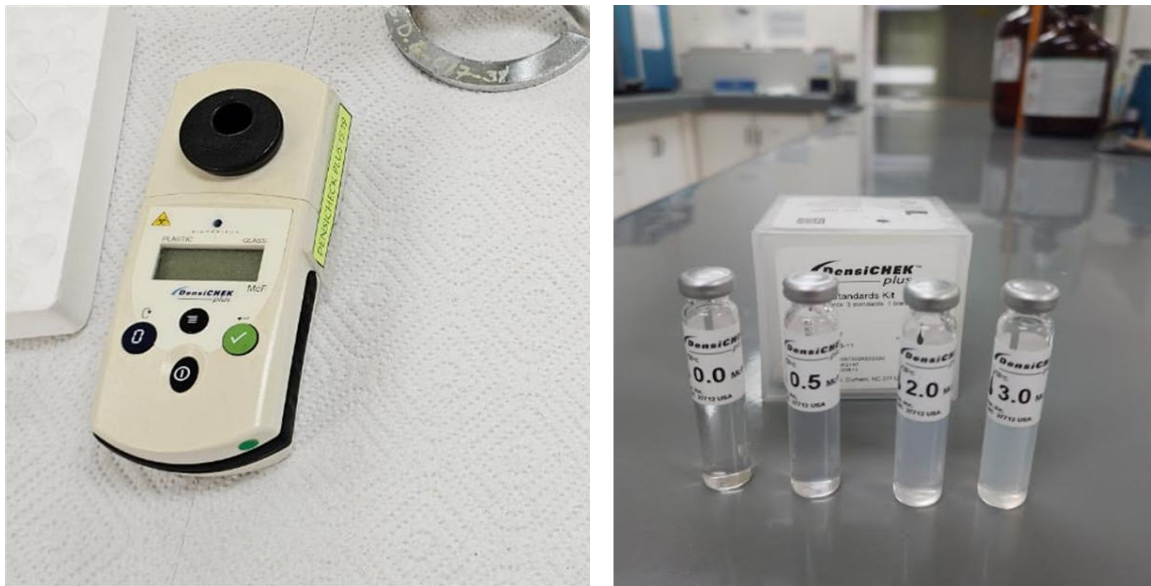
Conservación de cepas microbianas en BHI con glicerol estéril al 20%



Nota. Elaboración propia.

Anexo 13.

Calibración de DensiChek™ con sus estándares McFarland



Nota. Elaboración propia.

Anexo 14.

Preparación de suspensiones de las cepas de prueba para confirmación de identificación con equipo VITEK 2 Compact.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 15.

Equipo VITEK 2 Compact de Laboratorio Bacteriología Veterinaria RLV-MAG.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 16.

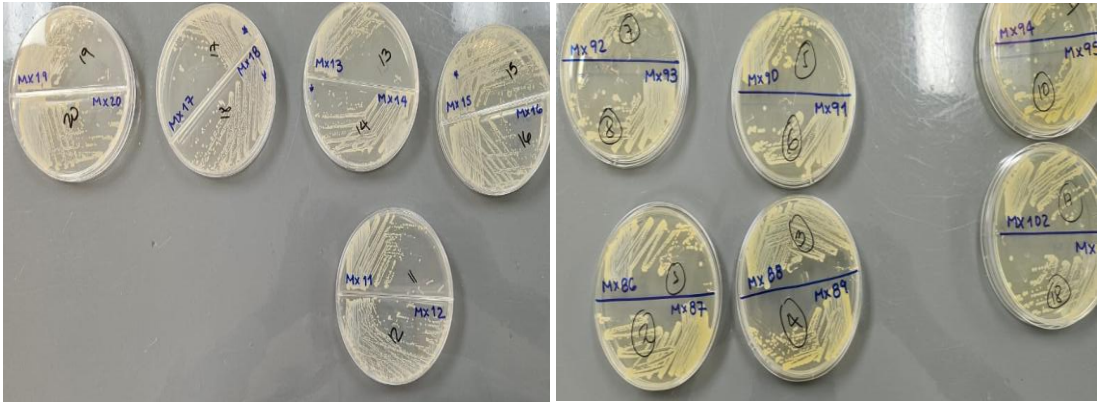
Inoculación de tarjetas VITEK e ingreso del cassette en el equipo.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 17.

Activación de cepas para aplicación de técnica de Kirby Bauer y Epsilometría.



Nota: Elaboración propia.

Anexo 18.

Estandarización de suspensión bacteriana 0.50 McFarland para ensayos de Sensibilidad a los antimicrobianos.



Nota. Elaboración propia

Anexo 19.

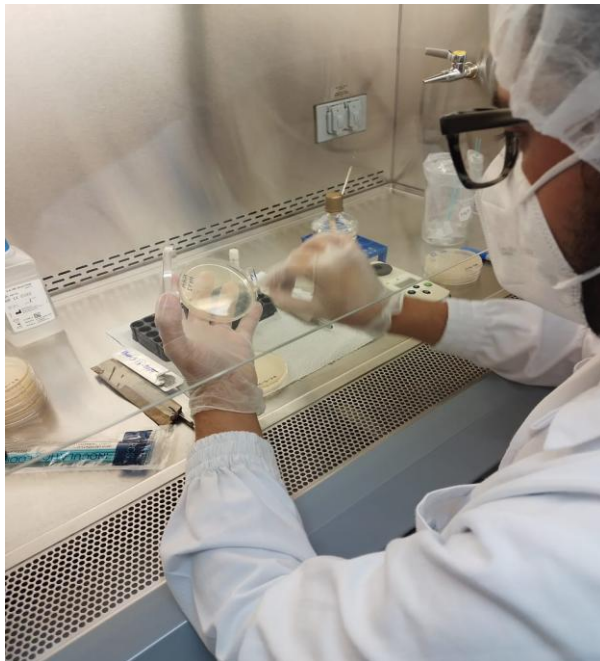
Activación de cepas de referencia ATCC para pruebas de susceptibilidad fenotípica a la meticilina.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 20.

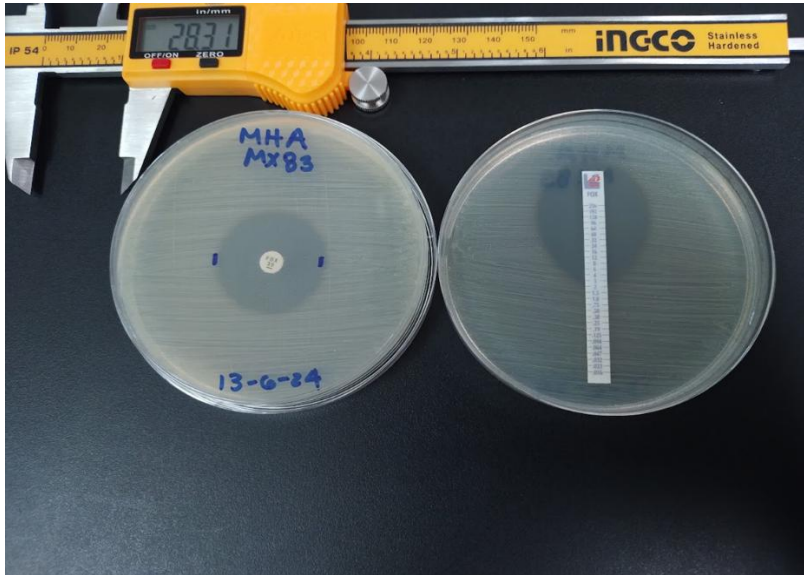
Realización de pruebas de susceptibilidad fenotípica a la meticilina.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 21.

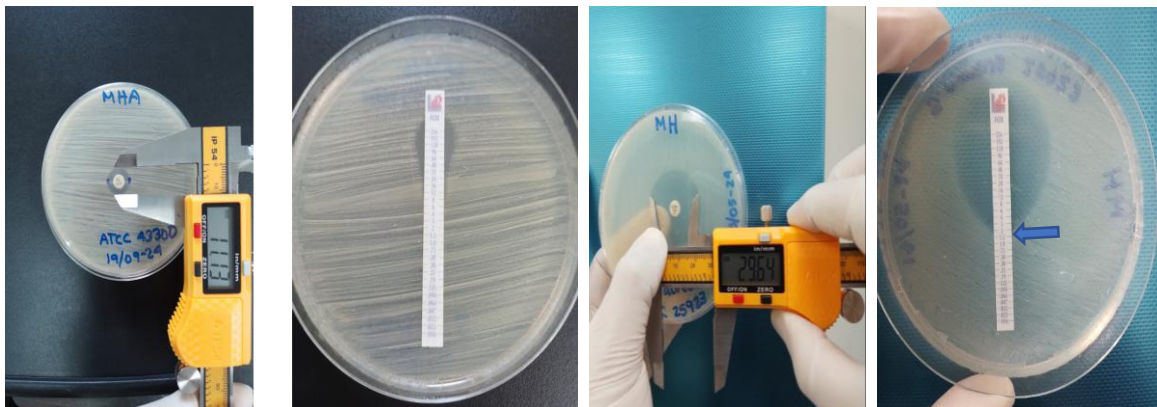
Lectura de pruebas de sensibilidad fenotípica a la meticilina de cepas aisladas de muestras.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 22.

*Lectura de pruebas de sensibilidad fenotípica a la meticilina de cepas control positivo (izq. *S. aureus* ATCC 43300) y control negativo (derecha ATCC 25923).*



Nota. Elaboración propia.

Anexo 23.

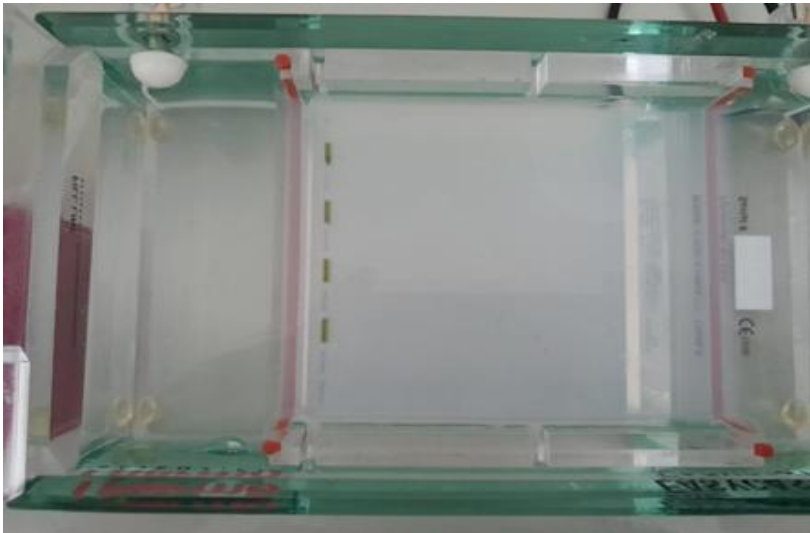
Amplificación del gen de resistencia a Meticilina *mecA*.



Nota. Elaboración propia.

Anexo 24.

Posición de las muestras en la cabina para electroforesis



Nota. Elaboración propia.

Anexo 25.

Ficha para toma de fichas de muestras de alimentos.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA MAESTRIA MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS	
FICHA PARA TOMA DE MUESTRAS DE ALIMENTOS	
N°: <u>5</u>	
DATOS DE LA PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA	
Nombre de quien toma la muestra: <u>Ruth Adalina Saravia H.</u>	
DATOS DE LA MUESTRA	
Fecha de toma de la muestra (día/mes/año):	<u>31/01/23</u> Hora: <u>8:00am</u>
Tipo de Alimento:	Queso fresco <input type="checkbox"/> Crema <input checked="" type="checkbox"/> Morolique <input type="checkbox"/> Refrigerado <input checked="" type="checkbox"/> No refrigerado <input type="checkbox"/>
Lugar de la toma de muestra:	Planta <input type="checkbox"/> Mercado <input type="checkbox"/> Sala de venta <input checked="" type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/>
Dirección del establecimiento:	Municipio <u>N.C.</u> Departamento <u>Chalatenango</u> País: <u>E.S.</u>
Recolectada en:	Bolsa plastica <input checked="" type="checkbox"/> Caja de cartón <input type="checkbox"/> Hoja de huerta <input type="checkbox"/> Empaque al vacío <input type="checkbox"/>
Metodo a analizar:	Petrifilm: <input type="checkbox"/> Tradicional: <input checked="" type="checkbox"/>

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA MAESTRIA MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS	
FICHA PARA TOMA DE MUESTRAS DE ALIMENTOS	
N°: <u>6</u>	
DATOS DE LA PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA	
Nombre de quien toma la muestra: <u>Ruth Adalina Saravia H.</u>	
DATOS DE LA MUESTRA	
Fecha de toma de la muestra	<u>31/01/23</u> Hora: <u>8:00am</u>
Tipo de Alimento:	Queso fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crema <input type="checkbox"/> Morolique <input type="checkbox"/> Refrigerado <input checked="" type="checkbox"/> No refrigerado <input type="checkbox"/>
Lugar de la toma de muestra:	Planta <input type="checkbox"/> Mercado <input type="checkbox"/> Sala de venta <input checked="" type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/>
Dirección del establecimiento:	Municipio <u>N.C.</u> Departamento <u>Chalatenango</u> País: <u>E.S.</u>
Recolectada en:	Bolsa plastica <input checked="" type="checkbox"/> Caja de cartón <input type="checkbox"/> Hoja de huerta <input type="checkbox"/> Empaque al vacío <input checked="" type="checkbox"/>
Metodo a analizar:	Petrifilm: <input type="checkbox"/> Tradicional: <input checked="" type="checkbox"/>

Consultar fichas completas en el siguiente link:

<https://www.dropbox.com/s/cl/fi/ml2havo9rozu6c5cfawux/FichasMuestreo.pdf?rlkey=tj18wp8o0cc4ds0cfg2yi0i2z&st=2d2f55ko&dl=0>

Anexo 26.

Bitácora de Registro de Preparación y Prueba de Esterilidad de Medios de Cultivo.

Bitácora de Registro de Preparación y Prueba de Esterilidad de Medios de Cultivo Tesis Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos "Prevalencia del gen de Resistencia a Metilicina (mecA) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de lácteos artesanales"	
Medio de Cultivo Preparado:	Agua Peptonada Bufferada (APB)
Fecha de preparación:	03/02-23
Lote del medio:	030223001
Suplemento utilizado:	N/A
Cálculos de preparación: 20.0g de medio ——— 1000 mL H ₂ O _{dest.} X ——— 2500 mL H ₂ O _{dest.} X = 50.0g medio	pH previo a esterilización por autoclave: 7.13 pH post esterilización por autoclave: 7.03
Fecha y hora inicio prueba esterilidad:	03/02-23 (5:00 pm)
Fecha y hora fin prueba esterilidad:	05/02-23 (5:00 p.m.)
Elaboró Medio:	Rodrigo Escobar
	Resultado esterilidad: CUMPLE <input checked="" type="checkbox"/> NO CUMPLE <input type="checkbox"/> (2 tubos de prueba) El medio no presenta evidencia de crecimiento. Verificó preparación: Ruth Saravia

Bitácora de Registro de Preparación y Prueba de Esterilidad de Medios de Cultivo Tesis Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos "Prevalencia del gen de Resistencia a Metilicina (mecA) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de lácteos artesanales"	
Medio de Cultivo Preparado:	Agar Baird Parker (BPA)
Fecha de preparación:	03/02-23
Lote del medio:	030223002
Suplemento utilizado:	Emulsión yema de huevo + Telurito de potasio (75ml)
Cálculos de preparación: 60.0g de medio ——— 1000 mL H ₂ O _{dest.} X ——— 1500 mL H ₂ O _{dest.} X = 90.0g medio	pH previo a esterilización por autoclave: 7.18 pH post esterilización por autoclave: 6.98
Fecha y hora inicio prueba esterilidad:	03/02-23 (5:00 pm)
Fecha y hora fin prueba esterilidad:	05/02-23 (5:00 pm)
Elaboró Medio:	Rodrigo Escobar
	Resultado esterilidad: CUMPLE <input checked="" type="checkbox"/> NO CUMPLE <input type="checkbox"/> (2 placas de prueba) El medio no presenta evidencia de crecimiento. Verificó preparación: Ruth Saravia

Bitácora de Registro de Preparación y Prueba de Esterilidad de Medios de Cultivo Tesis Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos "Prevalencia del gen de Resistencia a Metilicina (mecA) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de lácteos artesanales"	
Medio de Cultivo Preparado:	Caldo infusión cerebro corazón (BHI)
Fecha de preparación:	03/02-23
Lote del medio:	030223003
Suplemento utilizado:	N/A
Cálculos de preparación: 37.0g de medio ——— 1000 mL H ₂ O _{dest.} X ——— 30.0 mL H ₂ O _{dest.} X = 1.11 g de medio	pH previo a esterilización por autoclave: 7.41 pH post esterilización por autoclave: 7.33
Fecha y hora inicio prueba esterilidad:	03/02-23 (5:00pm)
Fecha y hora fin prueba esterilidad:	05/02-23 (5:00pm)
Elaboró Medio:	Rodrigo Escobar
	Resultado esterilidad: CUMPLE <input checked="" type="checkbox"/> NO CUMPLE <input type="checkbox"/> (1 tubo de prueba 5ml) El medio no presenta evidencia de crecimiento. Verificó preparación: Ruth Saravia

Consultar la bitácora completa en el siguiente link:

<https://www.dropbox.com/scl/fi/sgggyqoyukmardvhiazf/MediosCultivo.pdf?rlkey=wo0pw21i15fmvmbha5y4l1d5n&st=zozvnayb&dl=0>

Anexo 27.

Bitácora de Registro de Esterilización por Autoclave de Medios de Cultivo

Registro de Esterilización por Autoclave de medios de cultivo - Tesis Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos "Prevalencia del gen de Resistencia a Meticilina (mecA) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de productos lácteos artesanales".							
Control Biológico	Fecha y hora inicio esterilización	Fecha y hora fin esterilización	Medio de cultivo preparado	Equipo de autoclave utilizado	Fecha y hora inicio incubación indicador biológico	Fecha y hora final incubación indicador biológico	Ejecutor
3M Attest™ REF 1252 (C) (D) & Sterilmatic™ REF 1250 (C) (D) 3M REF 1251 (C) (D)	03/02-23 3:25 pm	03/02-23 4:15 pm	APB L: 030223001 BPA L: 030223002 BHI L: 030223003	Sterilmatic Market Forge Modelo: STM-EX	04/02-23 8:00 am	04/02-23 11:00 am	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Conforme</p> <p>REF 1250 Type 4</p> <p>Line turns as dark or darker than color</p> </div> <div> </div> </div>						
3M Attest™ REF 1252 (C) (D) & Sterilmatic™ REF 1250 (C) (D) 3M REF 1251 (C) (D)	04/02-23 6:15 pm	04/02-23 7:05 pm	TSA L: 040223004	Sterilmatic Market Forge	05/02-23 10:00 am	05/02-23 1:00 pm	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Conforme</p> <p>REF 1250 Type 4</p> <p>Line turns as dark or darker than color</p> </div> <div> </div> </div>						
3M Attest™ REF 1252 (C) (D) & Sterilmatic™ REF 1250 (C) (D) 3M REF 1251 (C) (D)	13/02-23 3:30 pm	13/02-23 4:15 pm	APB L: 130223005 BPA L: 130223006	Sterilmatic Market Forge	13/02-23 4:30 pm	13/02-23 7:30 pm	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Conforme</p> <p>REF 1250 Type 4</p> <p>Line turns as dark or darker than color</p> </div> <div> </div> </div>						
3M Attest™ REF 1252 (C) (D) & Sterilmatic™ REF 1250 (C) (D) 3M REF 1251 (C) (D)	16/02-23 2:35 pm	16/02-23 3:15 pm	BHI L: 160223008 MSA L: 160223007 TSA L: 160223009	Sterilmatic Market Forge	16/02-23 4:30 pm	16/02-23 7:30 pm	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Conforme</p> <p>REF 1250 Type 4</p> <p>Line turns as dark or darker than color</p> </div> <div> </div> </div>						
3M Attest™ REF 1252 (C) (D) & Sterilmatic™ REF 1250 (C) (D) 3M REF 1251 (C) (D)	18/02-23 4:00 pm	18/02-23 4:43 pm	APB L: 180223010 BHI L: 180223011 MSA L: 180223012	Sterilmatic Market Forge	18/02-23 5:00 pm	18/02-23 8:00 pm	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Conforme</p> <p>REF 1250 Type 4</p> <p>Line turns as dark or darker than color</p> </div> <div> </div> </div>						
3M Attest™ REF 1252 (C) (D) & Sterilmatic™ REF 1250 (C) (D) 3M REF 1251 (C) (D)	22/02-23 4:15 pm	22/02-23 4:47 pm	BPA L: 220223013 BHI L: 220223014 TSA L: 220223015	Sterilmatic Market Forge	22/02-23 5:10 pm	22/02-23 8:10 pm	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Conforme</p> <p>REF 1250 Type 4</p> <p>Line turns as dark or darker than color</p> </div> <div> </div> </div>						
3M Attest™ REF 1252 (C) (D) & Sterilmatic™ REF 1250 (C) (D) 3M REF 1251 (C) (D)	27/02-23 4:30 pm	27/02-23 5:20 pm	APB L: 270223016 BPA L: 270223017 BHI L: 270223018	Sterilmatic Market Forge	28/02-23 7:00 am	28/02-23 10:00 am	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Conforme</p> <p>REF 1250 Type 4</p> <p>Line turns as dark or darker than color</p> </div> <div> </div> </div>						

NOTAS: (1) El proceso de autoclavado se realiza a 121°C por 15 minutos. (2) La incubación de los controles biológicos 1252 3M se realizará a una T° 50 ±2°C en el equipo Attest Reader 290 de 3M por 3 horas. (3) La incubación de los indicadores biológicos Steriltest GST E6 de Biorchem se realizará a una T°C de 58 ±2°C en una incubadora de laboratorio por 24 horas (revelado visual).

Nota. Elaboración Propia

Registro de Esterilización por Autoclave de medios de cultivo - Tesis Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos "Prevalencia del gen de Resistencia a Meticilina (mecA) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de productos lácteos artesanales".							
Control Biológico	Fecha y hora inicio esterilización	Fecha y hora fin esterilización	Medio de cultivo preparado	Equipo de autoclave utilizado	Fecha y hora inicio incubación indicador biológico	Fecha y hora final incubación indicador biológico	Resultado
3M Atest <small>REF: 91100</small> <small>LOT: 002724035</small>	04/03-23 3:00 pm	04/03-23 3:50 pm	MSA L: 040323019 APB L: 040323020	Sterilmatic Market Forge	04/03-23 4:00 pm	04/03-23 7:00 pm	ME <small>REF: 1250</small> <small>Type 4</small> <small>Line turns as dark or darker than col</small>
	08/03-23 3:35 pm	08/03-23 4:20 pm	BPA L: 080323021 BHI L: 080323022 TSA L: 080323023 APB L: 080323024	Sterilmatic Market Forge	08/03-23 5:00 pm	08/03-23 8:00 pm	ME <small>REF: 1250</small> <small>Type 4</small> <small>Line turns as dark or darker than col</small>
Liofilchem STERILtest GST E6 <small>REF: 91100</small> <small>LOT: 002724035</small>	18/03-23 3:20 pm	18/03-23 4:10 pm	MSA L: 180323025 BPA L: 180323026 BHI L: 180323027	Sterilmatic Market Forge	18/03-23 5:00 pm	19/03-23 5:00 pm	ME <small>REF: 1250</small> <small>Type 4</small> <small>Line turns as dark or darker than col</small>
	13/05-23 4:32 pm	13/05-23 5:15 pm	APB L: 130523028 BPA L: 130523029 TSA L: 130523030 MSA L: 130523031	Sterilmatic Market Forge	13/05-23 6:00 pm	14/05-23 6:00 pm	ME <small>REF: 1250</small> <small>Type 4</small> <small>Line turns as dark or darker than col</small>
Liofilchem STERILtest GST E6 <small>REF: 91100</small> <small>LOT: 002724035</small>	24/05-23 3:45 pm	24/05-23 4:28 pm	APB L: 240523032 BPA L: 240523033 BHI L: 240523034 TSA L: 240523035 MSA L: 240523036	Sterilmatic Market Forge	24/05-23 5:15 pm	25/05-23 5:15 pm	ME <small>REF: 1250</small> <small>Type 4</small> <small>Line turns as dark or darker than col</small>
	31/05-23 4:25 pm	31/05-23 5:12 pm	APB L: 310523037 BPA L: 310523038 BHI L: 310523039 TSA L: 310523040	Sterilmatic Market Forge	31/05-23 6:00 pm	01/06-23 6:00 pm	ME <small>REF: 1250</small> <small>Type 4</small> <small>Line turns as dark or darker than col</small>
Liofilchem STERILtest GST E6 <small>REF: 91100</small> <small>LOT: 002724035</small>	07/06-23 3:42 pm	07/06-23 4:23 pm	APB L: 070623041 BPA L: 070623042 BHI L: 070623043 TSA L: 070623044 MSA L: 070623045	Sterilmatic Market Forge	07/06-23 5:30 pm	08/06-23 5:30 pm	ME <small>REF: 1250</small> <small>Type 4</small> <small>Line turns as dark or darker than col</small>

NOTAS: (1) El Proceso de autoclavado se realiza a 121°C por 15 minutos. (2) La incubación de los controles biológicos 1292 3M se realizará a una T° 60 ±2°C en el equipo Atest Reader 290 de 3M por 3 horas. (3) La incubación de los indicadores biológicos Steriltest GST E6 de Liofilchem se realizará a una T°C de 58 ±2°C en una incubadora de laboratorio por 24 horas (revelado visual).

Nota. Elaboración Propia

Registro de Esterilización por Autoclave de medios de cultivo - Tesis Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos "Prevalencia del gen de Resistencia a Meticilina (mecA) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de productos lácteos artesanales".									
Control Biológico	Fecha y hora inicio esterilización	Fecha y hora fin esterilización	Medio de cultivo preparado	Equipo de autoclave utilizado	Fecha y hora inicio incubación indicador biológico	Fecha y hora final incubación indicador biológico	Ejeció	Resultado	Control químico autoclave
Liofilchem STERILtest GST E6 REF: 91100 E: 032724035 M 2026-03-27	15/06-23 4:37 pm	15/06-23 5:20 pm	APB L: 150623046 BPA L: 150623047 MSA L: 150623048 TSA L: 150623049	Sterilmatic Market Forge	15/06-23 6:00 pm	16/06-23 6:00 pm		Conforme	
	08/02-24 5:20 pm	08/02-24 6:08 pm	TSA L: 080224050 AS L: 080224051	Sterilmatic Market Forge	08/02-24 6:30 pm	09/02-24 6:30 pm		No conforme	
Liofilchem STERILtest GST E6 REF: 91100 E: 032724035 M 2026-03-27	01/03-24 4:20 pm	01/03-24 5:07 pm	TSA L: 010324052 AS L: 010324053	Sterilmatic Market Forge	01/03-24 5:30 pm	02/03-24 5:30 pm		Conforme	
	23/04-24 5:10 pm	23/04-24 5:56 pm	TSA L: 230424054 MHA L: 230424055	Sterilmatic Market Forge	23/04-24 6:20 pm	24/04-24 6:20 pm		No conforme	
Liofilchem STERILtest GST E6 REF: 91100 E: 032724035 M 2026-03-27	04/06-24 12:50 pm	04/06-24 2:00 pm	MHA L: 040624056 TSA L: 040624057	YamatO SMS 10 Autoclave	04/06-24 3:20 pm	05/06-24 3:20 pm		Conforme	
								Conforme	
								No conforme	
								Conforme	
								No conforme	

NOTAS: (1) El Proceso de autoclavado se realiza a 121°C por 15 minutos. (2) La incubación de los controles biológicos 1292 3M se realizará a una T° 50 ±2°C en el equipo Attest Reader 250 de 3M por 3 horas. (3) La incubación de los indicadores biológicos Steriltest GST E6 de Liofilchem se realizará a una T°C de 58 ±2°C en una incubadora de laboratorio por 24 horas (revelado visual).

Nota. Elaboración Propia.

Consultar el documento completo en el siguiente link:

<https://www.dropbox.com/scl/fi/7sd1kls62qsq4tbw2ujfb/EsterilizacionAutoclave.pdf?rlkey=86b6blpv0631035lxgmvvcjui&st=qpkvr2ji&dl=0>

Anexo 28.

Registro de Ensayos de Rendimiento de Medios de Cultivo Cuantitativos

Registro de Ensayos de Rendimiento de medios de cultivo cuantitativos - Tesis Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos "Prevalencia del gen de Resistencia a Meticilina (<i>mecA</i>) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de productos lácteos artesanales"												
Fecha y hora inicio ensayo	Nombre del medio y lote de prueba	Nombre del medio y lote de referencia	Cepa de Referencia Utilizada	Función evaluada	Condiciones (Temperatura y tiempo de incubación)	Recuentos Medio Probado (UFC/placa)	Recuentos Medio Referencia (UFC/placa)	Ratio Productividad (P1)*	Criterio de aceptación	Fecha y hora fin ensayo	Resultado	Realizado por:
21/08/2023 1:00 pm	Band Parker Agar Liofilichem REF: 610064 Lote producción: 04021502 V: 30/09/2023	Agar TSA Merck Ref: L05158.0500 Lote producción: VN902638 V: 05/11/2024. Lote medio preparado: TSA 12022936 Pr (S. aureus) = 1.01 Pr (E. coli) = 1.11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P10	37°C ± 1°C por 48 horas	P1= 117 P2= 122	P3= 20 P4= 15	P1= 0.976	P1 ≥ 0.5 UFC, redondas, convexas, brillantes y de color negro o gris oscuro con halo	23/08/2023 1:00 pm	Conforme	[Firma]
21/08/2023 1:00 pm		N/A	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ESPF	37°C ± 1°C por 48 horas	N/A	N/A	N/A	UFC, pequeñas, negras a grises sin halo	23/08/2023 1:00 pm	Conforme	[Firma]
21/08/2023 1:00 pm		N/A	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	SEL	37°C ± 1°C por 48 horas	N/A	N/A	N/A	Inhibición completa	23/08/2023 1:00 pm	Conforme	[Firma]
21/08/2023 1:00 pm	Agar Triplex y Soya (TSA)	Agar TSA Merck Ref: L05158.0500 Lote producción: VN902638 V: 05/11/2024.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P10	37°C ± 1°C por 48 horas	P1= 115 P2= 111	P3= 119 P4= 112	P1= 0.978	P1 ≥ 0.7 UFC, grandes, opacas, convexas, con borde circular y de color blanco a amarillo dorado.	23/08/2023 1:00 pm	Conforme	[Firma]
21/08/2023 1:00 pm	Liofilichem REF: 610652 Lote producción: 071211301 V: 02/06/2025	Lote medio referencia preparado ILY MAG**. TSA 12022936 Pr (S. aureus) = 1.01 Pr (E. coli) = 1.11	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	P10	37°C ± 1°C por 48 horas	P1= 56 P2= 53	P3= 50 P4= 55	P1= 1.038	P1 ≥ 0.7 UFC, redondas, convexas y brillantes, de color blanco a ligeramente rosado.	23/08/2023 1:00 pm	Conforme	[Firma]
12/02/2024 11:00 am	Agar Sangre de camero al 5% (AS) Liofilichem REF: 620005 Lote: 081720501 V: 16/06/2024	Agar Sangre de camero al 5% (AS) Liofilichem REF: 610005 Lote: 11020302 V: 03/11/2024	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P10	37°C ± 1°C por 48 horas	P1= 57 P2= 54	P3= 58 P4= 61	P1= 0.933	P1 ≥ 0.7 UFC, redondas, elevadas, convexas, de color gris a amarillo, con una zona de beta-hemólisis	14/02/2024 11:00 am	Conforme	[Firma]
12/02/2024 11:00 am		Lote medio referencia preparado ILY MAG**. AS 220124137 Pr (S. aureus) = 0.940	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ESPF	37°C ± 1°C por 48 horas	N/A	N/A	N/A	UFC, blancas, opacas, elevadas, con un tamaño de alfiler de 1 a 2 mm de diámetro sin hemólisis.	14/02/2024 11:00 am	Conforme	[Firma]

Nota: Los Ensayos de rendimiento para funciones de Productividad (P10), Selectividad (SEL) y Especificidad (ESPF) fueron realizadas según especificaciones de la ISO 1133:2014, en cuanto a preparación de la cepa de trabajo, tiempos de incubación y criterios de aceptación para medios de cultivo cuantitativos probados. *Para ratio de productividad se utilizó la ecuación: $P1 = (P1 + P2) / (P3 + P4)$

**ILY MAG = Medio Preparado y Ensayo de Rendimiento Realizado por El Laboratorio de Preparación de Reactivos y Medios de Cultivo de la Red de Laboratorios Veterinarios del MAG. Acreditado ISO/IEC 17025:2017.

Nota. Elaboración Propia.

Anexo 29.

Registro de Ensayos de Rendimiento de medios de cultivo cualitativos.

Fecha y hora inicio ensayo	Nombre del medio y lote de prueba	Copa de referencia utilizada	Función evaluada	Condiciones (Temperatura y tiempo de incubación)	Criterio de aceptación	Fecha y hora fin ensayo	Resultado	Realizado por
21/08/2023 1:00 pm	Agua Peplomada Bulferada (APB) Liofilchem REF: 611014 Lote producción: 102321303 Vence: 07/10/2025	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	PIRO	37°C ± 1°C por 48 horas	2 tubos de medio con buena turbidez	23/08/2023 1:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	PIRO	37°C ± 1°C por 48 horas	2 tubos de medio con buena turbidez	23/08/2023 1:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm	Caldo inhihición cerebro corazón (CIC) OXOID Código: CH11539 Lote producción: 3124409 Vence: 2025.08.31	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	PIRO	37°C ± 1°C por 48 horas	2 tubos de medio con buena turbidez	23/08/2023 1:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	PIRO	37°C ± 1°C por 48 horas	2 tubos de medio con buena turbidez	23/08/2023 1:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm	Medio manual sal (MMS) Liofilchem REF: 610029 Lote producción: 090721301 Vence: 29/07/2025	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	PIRO	37°C ± 1°C por 48 horas	URC. Colonias amarillentas con cambio de color del medio a amarillo	23/08/2023 1:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	PIRO	37°C ± 1°C por 48 horas	URC rojas sin cambio de color del medio, se mantiene rojo	23/08/2023 1:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	SEL	37°C ± 1°C por 48 horas	Inhibición completa	23/08/2023 1:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm	Plasma de conejo + BDTA Remel OXOID REF: R21060 Lote producción: 481096 V:19/10/2023	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Control positivo de reacción	37°C ± 1°C por 48 horas	Formación de un coágulo firme en el plasma de conejo + BDTA	21/08/2023 5:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Control negativo de reacción	37°C ± 1°C por 48 horas	No se forma coágulo en el plasma de conejo + BDTA	21/08/2023 5:00 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm	Peróxido de hidrógeno al 3% Marca: OXIGEN Laboratorios Suizos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Control positivo de reacción	37°C ± 1°C por 48 horas	Formación de burbujas abundante	21/08/2023 1:05 pm	Conforme No conforme	
21/08/2023 1:00 pm		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Control negativo de reacción	37°C ± 1°C por 48 horas	No se forma burbujas observable	21/08/2023 1:05 pm	Conforme No conforme	
13/05/2024 1:00 pm	Muebler Hinton Agar (MHA) Gállego: CMO3378 Lote de producción: 3379558 V: 20/10/2026	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (MSSA)	Control negativo de resistencia (LSI, 2025)	37°C ± 1°C por 48 horas	MHI ≤ 4 µg/ml. Colonias (epidemiología) Diámetro inhibición ≥ 22 mm (Kirby- Bauer)	14/05/2024 8:00 pm	Conforme No conforme	
19/09/2024 2:00 pm		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43308 (MRSA)	Control positivo de resistencia (LSI, 2025)	37°C ± 1°C por 48 horas	MHI ≥ 8 µg/ml. Colonias (epidemiología) Diámetro inhibición ≤ 21 mm (Kirby- Bauer)	20/09/2024 10:00 pm	Conforme No conforme	

Nota: Los Ensayo de rendimiento para funciones de Productividad (PIRO), Selectividad (SEL) fueron realizadas según especificaciones de la ISO 11133:2014, en cuanto a preparación de la copa de trabajo, tiempos de incubación y criterios de aceptación para medios de cultivo cualitativos probados.

Nota. Elaboración Propia.

Anexo 30.

Certificado de calidad de los medios de Cultivo empleados.

Liofilchem® Certificate of Analysis

Page 1 of 1

Product	Batch	Expiration date		
BAIRD PARKER AGAR BASE Ref. 610004 – 620004	040821502	2023.09.30		
Physical quality control	Specification	Results		
Expected pH-value (25°C)	7.2 ± 0.2	7.2		
Appearance of powder	Homogeneous	Conforms		
Colour of powder	Beige	Conforms		
Appearance of prepared medium	Opalescent	Conforms		
Colour of prepared medium	Yellow	Conforms		
Microbiological Performance				
Tested according to CLSI M22-A3, ISO 11133-1 and ISO 11133-2 Reference media: Tryptic Soy Agar				
Productivity, Method of control: Quantitative Inoculum: 10 ⁴ -100 CFU/ml				
Control strains	Incubation	Expected Results	Specification	Results
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Aerobic, 24-48 h 35 ± 2°C	P _R ≥ 0.5	Good growth, black colonies surrounded by halo (lecithinase production)	Conforms
Selectivity, Method of control: Qualitative Inoculum: 10 ⁴ -10 ⁶ CFU/ml				
Control strains	Incubation	Specification	Results	
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Aerobic, 24-48 h 35 ± 2°C	Inhibition	Conforms	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	Aerobic, 24-48 h 35 ± 2°C	None to poor growth, brown colonies, no halo	Conforms	
Specificity, Method of control: Qualitative Inoculum: 10 ⁴ CFU/ml				
Control strains	Incubation	Specification	Results	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 1228	Aerobic, 24-48 h 35 ± 2°C	Poor to good growth, black colonies, no halo	Conforms	
<i>Proteus mirabilis</i> 25933	ATCC® Aerobic, 24-48 h 35 ± 2°C	Good growth, brown colonies, no halo	Conforms	
Batch Release				
Approved Date	13.04.2021	Signature	Quality Control (D. Vitagliano) <i>Dario Vitagliano</i>	
The results reported were obtained at the time of release.				

Nota. Obtenido a través del proveedor del producto.

Consultar los certificados de calidad completos en el siguiente link:

<https://www.dropbox.com/scl/fi/eplp8bbiiz2bdqv5z7wc0/CertificadosMedios.pdf?rlkey=qvj9y4fhlcko14puymd7w15n3&st=ahw68nr2&dl=0>

Anexo 31.

Certificados de calidad sensidiscos y MIC Test Strip (MTS) para Ensayos Fenotípicos de Sensibilidad Cefoxitina (FOX).

ThermoFisher
SCIENTIFIC



Page 1 of 1

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT CT0119B
FOX30 CEFOXITIN

LOT NUMBER 3646845

EXPIRY DATE 2026.03.22

DATE OF MANUFACTURE 2023.03.23

Delivery/Customer information

Date Printed
2024.05.13

Delivery No.

Customer
Customer Order Number

Microbiological Performance

Assay (mcg/disc) 33.3

Tested in accordance with current CLSI methodology

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC@25923	29	23 - 29
<i>Escherichia coli</i> ATCC@25922	25	23 - 29
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC@49226	40	33 - 41

Tested in accordance with current EUCAST methodology

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC@29213	28	24 - 30
<i>Escherichia coli</i> ATCC@25922	25	23 - 29
<i>Staph. aureus</i> MRSA NCTC12493	19	14 - 20



The above have been tested in our Product Performance Laboratory using conventional procedures and control ATCC and NCTC cultures, where appropriate, and have met the specified test parameters. Additional challenging strains may also be employed.

The accuracy of the information provided in this certificate of analysis / conformity is considered reliable. However, it is important to note that (i) the information is only applicable, and (ii) the product is only approved, for the product's intended use as specified on the label, specification, and website. No warranty is hereby implied. This certificate may only be reproduced in its entirety and cannot be replicated partially or in any altered form.

Lot Accepted. 2023.03.29

This certificate is produced electronically and valid without a signature.

ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection.
NCTC and National Collection of Type Cultures are registered trade marks of the Health Protection Agency.

OXOID LIMITED
Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England
www.ThermoFisher.com

Nota. Obtenido a través del proveedor del producto.

Liofilchem®
Certificate of Analysis

Page 1 of 1

Product	Batch	Production date	Expiration date
Cefoxitin FOX 0.016-256 µg/mL	011822047	18.01.2022	2025.01.17

Ref.

92066 – 920660 – 920661

Antimicrobial Susceptibility Testing
Tested according to current CLSI methodology

Control strains	Medium	Inoculum	Incubation	Expected Results MIC range (mg/L)	Results MIC(mg/L)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	Mueller Hinton II Agar	0.5 McFarland in saline	35 ± 2°C, ambient 16-20 h	1–4	3
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Mueller Hinton II Agar	0.5 McFarland in saline	35 ± 2°C, ambient 16-20 h	2–8	2
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	Mueller Hinton Chocolate Agar	0.5 McFarland in broth	36 ± 1°C, 5% CO ₂ 20-24 h	0.5–2	0.5
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC® 25285	Brucella Blood Agar w Hemin and Vitamin K1	1 McFarland in broth	36 ± 1°C, anaerobically, 24-72 h	2–8	4
<i>Bacteroides thetaotaomicron</i> ATCC® 29741	Brucella Blood Agar w Hemin and Vitamin K1	1 McFarland in broth	36 ± 1°C, anaerobically, 24-72 h	8–64	24
<i>Eggerthella lenta</i> ATCC® 43055	Brucella Blood Agar w Hemin and Vitamin K1	1 McFarland in broth	36 ± 1°C, anaerobically, 24-72 h	2–16	8

Batch Release

Approved			
Date	02.02.2022	Signature	Quality Control (This document has been established electronically and is valid without signature)
The results reported were obtained at the time of release.			

Nota. Obtenido a través del proveedor del producto.





Anexo 32.

Certificados de calidad Cepas de Referencia ATCC empleadas.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS: Product Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 (CRM) (6) Lot Number: 360-544** Reference Number: ATCC® 25923™* Passage from Reference: 1 Expiration Date: 2023/10/31	RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Jackie L Mackedanz Release Date: 2021/12/16
---	---





Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1)	
See attached ID System results document.	
Other Features/ Challenges: Results	
(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE
**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.	
Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.	
Individual products are traceable to a recognized culture collection.	
 TESTING CERT #2655.01	(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.
	(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.
 REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2455.02	(5) Microbiologics has determined each pellet of this reference material to be sufficiently homogeneous for its intended use. (6) This product has high confidence of identification.

Nota. Obtenido a través del proveedor del producto.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS: Product Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0852 Lot Number: 852-96** Reference Number: ATCC® 43300™** Passage from Reference: 3 Expiration Date: 2025/12/31	RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Kavitha Gobalan Release Date: 2024/02/01
---	--

Performance	
Macroscopic Features: Large, circular, convex, entire edge, cream, glistening; two colony types, one has large zone of beta hemolysis, the other is weakly beta hemolytic.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1)	
See attached ID System results document.	
Other Features/ Challenges: Results	
(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): positive (1) Oxacillin agar screen: growth (1) Cefoxitin (30 mcg - Disk Susceptibility): \leq 21 mm	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE
**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.	
Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.	
Individual products are traceable to a recognized culture collection.	
(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.	
 TESTING CERT #2655.01	
	(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.
 REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2455.02	

Nota. Obtenido a través del proveedor del producto.

Consultar los certificados de calidad completos en el siguiente link:

<https://www.dropbox.com/scl/fi/thzu71obh2y8nkzhc65vn/CepasMicroATCC.pdf?rlkey=bycxp69r9eql0ep9nh3jvor6o&st=9kirdx8l&dl=0>

Anexo 33.

Bitácora de control de análisis de cepas procesadas mediante el sistema de Identificación VITEK 2 Compact.

CONTROL DIARIO VITEK 2 COMPACT															
Fecha	Código muestra	N° muestra	ID GP	AST GP	ID GN	AST GN	ANC	NH	BCL	Densidad inoculo	Verificación de patrones			Realizado por	Observaciones
											0.5	2.0	3.0		
14/02-24	Tesiscepa 01	010224	✓							0.63	0.46	1.91	2.91	CS	Tesis Ing. Rodrigo Esco bar
14/02-24	Tesiscepa 02	020224	✓							0.62				CS	
14/02-24	Tesiscepa 03	030224	✓							0.52				CS	
14/02-24	Tesiscepa 04	040224	✓							0.57				CS	
14/02-24	Tesiscepa 05	050224	✓							0.50				CS	
14/02-24	Tesiscepa 06	060224	✓							0.60				CS	
14/02-24	Tesiscepa 07	070224	✓							0.51				CS	
14/02-24	Tesiscepa 08	080224	✓							0.63				CS	
14/02-24	Tesiscepa 09	090224	✓							0.52				CS	
14/02-24	Tesiscepa 10	100224	✓							0.62				CS	
14/02-24	Tesiscepa 11	110224	✓							0.63				CS	
14/02-24	Tesiscepa 12	120224	✓							0.62				CS	
14/02-24	Tesiscepa 13	130224	✓							0.55				CS	
14/02-24	Tesiscepa 14	140224	✓							0.63				CS	
14/02-24	Tesiscepa 15	150224	✓							0.60				CS	
14/02-24	Tesiscepa 16	160224	✓							0.54				CS	
14/02-24	Tesiscepa 17	170224	✓							0.57				CS	* Cultivo mixto
14/02-24	Tesiscepa 18	180224	✓							0.59				CS	
14/02-24	Tesiscepa 19	190224	✓							0.55				CS	
14/02-24	Tesiscepa 20	200224	✓							0.59				CS	
14/02-24	Tesiscepa 21	210224	✓							0.63	0.47	1.95	2.92	CS	
22/02-24	Tesiscepa 22	220224	✓							0.51				CS	
22/02-24	Tesiscepa 23	230224	✓							0.58				CS	
22/02-24	Tesiscepa 24	240224	✓							0.62				CS	
22/02-24	Tesiscepa 25	250224	✓							0.54				CS	
22/02-24	Tesiscepa 26	260224	✓							0.62				CS	
22/02-24	Tesiscepa 27	270224	✓							0.59				CS	
22/02-24	Tesiscepa 28	280224	✓							0.61				CS	
22/02-24	Tesiscepa 29	290224	✓							0.63				CS	

Donde: ID: Identificación; GP: Gram Positivo; GN: Gram Negativo; AST: Test de Sensibilidad Antimicrobiana; BCL: Bacilio; NH: Neisseria-Haemophilus; ANC: Anaerobias-Carinetiformes.
Densidad de inoculo de bacterias: 0.5 a 0.63; NH y ANC: 2.7 a 3.3

Nota. Elaboración Propia.

CONTROL DIARIO VITEK 2 COMPACT															
Fecha	Código muestra	N° muestra	ID GP	AST GP	ID GN	AST GN	ANC	NH	BCL	Densidad inoculo	Verificación de patrones			Realizado por	Observaciones
											0.5	2.0	3.0		
22/02-24	Tesiscepa 30	300224	✓							0.60				CS	Tesis Ing. Rodrigo Esco bar/ES
22/02-24	Tesiscepa 31	310224	✓							0.57				CS	
22/02-24	Tesiscepa 32	320224	✓							0.63				CS	
22/02-24	Tesiscepa 33	330224	✓							0.53				CS	
21/02-24	Tesiscepa 34	340224	✓							0.61				CS	
22/02-24	Tesiscepa 35	350224	✓							0.63				CS	
22/02-24	Tesiscepa 36	360224	✓							0.56				CS	
22/02-24	Tesiscepa 37	370224	✓							0.54				CS	
22/02-24	Tesiscepa 38	380224	✓							0.58				CS	
22/02-24	Tesiscepa 39	390224	✓							0.56				CS	
22/02-24	Tesiscepa 40	400224	✓							0.62				CS	
29/02-24	Tesiscepa 41	410224	✓							0.57	0.46	1.91	2.92	CS	
29/02-24	Tesiscepa 42	420224	✓							0.54				CS	
29/02-24	Tesiscepa 43	430224	✓							0.52				CS	
29/02-24	Tesiscepa 44	440224	✓							0.61				CS	
29/02-24	Tesiscepa 45	450224	✓							0.61				CS	
29/02-24	Tesiscepa 46	460224	✓							0.58				CS	
29/02-24	Tesiscepa 47	470224	✓							0.63				CS	
29/02-24	Tesiscepa 48	480224	✓							0.42				CS	
29/02-24	Tesiscepa 49	490224	✓							0.60				CS	
29/02-24	Tesiscepa 50	500224	✓							0.63				CS	
29/02-24	Tesiscepa 51	510224	✓							0.51				CS	
29/02-24	Tesiscepa 52	520224	✓							0.55				CS	
29/02-24	Tesiscepa 53	530224	✓							0.59				CS	
29/02-24	Tesiscepa 54	540224	✓							0.57				CS	
29/02-24	Tesiscepa 55	550224	✓							0.61				CS	
29/02-24	Tesiscepa 56	560224	✓							0.59				CS	
29/02-24	Tesiscepa 57	570224	✓							0.54				CS	
29/02-24	Tesiscepa 58	580224	✓							0.63				CS	

Donde: ID: Identificación; GP: Gram Positivo; GN: Gram Negativo; AST: Test de Sensibilidad Antimicrobiana; BCL: Bacilio; NH: Neisseria-Haemophilus; ANC: Anaerobias-Carinetiformes.
Densidad de inoculo de bacterias: 0.5 a 0.63; NH y ANC: 2.7 a 3.3

Nota. Elaboración Propia.

CONTROL DIARIO VITEK 2 COMPACT

Fecha	Código muestra	N° muestra	ID		AST		ANC	NH	BCL	Densidad inoculo	Verificación de patrones			Realizado por	Observaciones
			GP	GF	GN	GN					0.5	2.0	3.0		
29/02-24	Tesiscepa 59	590224	✓							0.50				CW	Tesis Ing. Rodrigo Escobar
29/02-24	Tesiscepa 60	600224	✓							0.61				CW	UES
07/03-24	Tesiscepa 61	610324	✓							0.52	0.47	1.92	2.94	CW	"
07/03-24	Tesiscepa 62	620324	✓							0.56				CW	"
07/03-24	Tesiscepa 63	630324	✓							0.51				"	"
07/03-24	Tesiscepa 64	640324	✓							0.53				"	"
07/03-24	Tesiscepa 65	650324	✓							0.59				"	"
07/03-24	Tesiscepa 66	660324	✓							0.58				"	"
07/03-24	Tesiscepa 67	670324	✓							0.60				"	"
07/03-24	Tesiscepa 68	680324	✓							0.50				"	"
07/03-24	Tesiscepa 69	690324	✓							0.52				"	"
07/03-24	Tesiscepa 70	700324	✓							0.62				"	"
07/03-24	Tesiscepa 71	710324	✓							0.57				"	"
07/03-24	Tesiscepa 72	720324	✓							0.55				"	"
07/03-24	Tesiscepa 73	730324	✓							0.59				"	"
07/03-24	Tesiscepa 74	740324	✓							0.62				"	"
07/03-24	Tesiscepa 75	750324	✓							0.55				"	"
07/03-24	Tesiscepa 76	760324	✓							0.62				"	"
07/03-24	Tesiscepa 77	770324	✓							0.61				"	"
07/03-24	Tesiscepa 78	780324	✓							0.59				"	"
07/03-24	Tesiscepa 79	790324	✓							0.57				"	"
07/03-24	Tesiscepa 80	800324	✓							0.51				"	"
07/03-24	Tesiscepa 81	810324	✓							0.57				"	"
07/03-24	Tesiscepa 82	820324	✓							0.55				"	"
07/03-24	Tesiscepa 83	830324	✓							0.60				"	"
07/03-24	Tesiscepa 84	840324	✓							0.52				"	"
07/03-24	Tesiscepa 85	850324	✓							0.63	0.48	1.93	2.92	CW	"
20/03-24	Tesiscepa 86	860324	✓							0.55				CW	"
20/03-24	Tesiscepa 87	870324	✓							0.55					"

Donde: ID: Identificación; GP: Gram Positivos; GN: Gram Negativos; AST: Test de Sensibilidad Antimicrobiana; BCL: Bacillus; NH: Neisseria-Haemophilus; ANC: Anaerobias-Corineformes.
Densidad de inoculo de bacterias: 0.5 a 0.63, NH y ANC: 2.7 a 3.3

Nota. Elaboración Propia.

CONTROL DIARIO VITEK 2 COMPACT

Fecha	Código muestra	N° muestra	ID		AST		ANC	NH	BCL	Densidad inoculo	Verificación de patrones			Realizado por	Observaciones
			GP	GF	GN	GN					0.5	2.0	3.0		
20/03-24	Tesiscepa 88	880324	✓							0.60				CW	Ing. Rodrigo Escobar Tesis
20/03-24	Tesiscepa 89	890324	✓							0.59				"	UES
20/03-24	Tesiscepa 90	900324	✓							0.56				"	"
20/03-24	Tesiscepa 91	910324	✓							0.61				"	"
20/03-24	Tesiscepa 92	920324	✓							0.54				"	"
20/03-24	Tesiscepa 93	930324	✓							0.58				"	"
20/03-24	Tesiscepa 94	940324	✓							0.58				"	"
20/03-24	Tesiscepa 95	950324	✓							0.50				"	"
20/03-24	Tesiscepa 96	960324	✓							0.51				"	"
20/03-24	Tesiscepa 97	970324	✓							0.52				"	"
20/03-24	Tesiscepa 98	980324	✓							0.53				"	"
20/03-24	Tesiscepa 99	990324	✓							0.59				"	"
20/03-24	Tesiscepa 100	1000324	✓							0.54				"	"
20/03-24	Tesiscepa 101	1010324	✓							0.55				"	"
20/03-24	Tesiscepa 102	1020324	✓							0.56				"	"
20/03-24	Tesiscepa 103	1030324	✓							0.63				"	"
20/03-24	Tesiscepa 104	1040324	✓							0.55				"	"
20/03-24	Tesiscepa 105	1050324	✓							0.62				"	"
20/03-24	Tesiscepa 106	1060324	✓							0.57				"	"
20/03-24	Tesiscepa 107	1070324	✓							0.60				"	"
20/03-24	Tesiscepa 108	1080324	✓							0.62				"	"

Nota. Elaboración Propia.

Anexo 34.

Resultados VITEK 2C de Confirmación bioquímica de cepas de *S. aureus* aisladas de Productos lácteos artesanales.

Cliente de bioMérieux:

Informe de examen

Equipo N°:

Editado por: LabSuper

Nombre del paciente: UES, FQF

N° paciente: Tesiscepa01

Aislamiento: 010224-1 (Aprobado)

Tipo de tarjeta: GP Código de barras: 2422691403266772 Prueba de instrumento: 0000139C70C0 (VITEK2C)

Técnico de preparación: Laboratory Supervisor(LabSuper)

Bionúmero: 070402047773271

Cantidad de organismo:

Organismo seleccionado: *Staphylococcus aureus*

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	N° de lote: 2422691403	Fecha caduc.: 09-abr-2025 13:00 CDT
	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,67 horas	Finalizado: 14-feb-2024 16:38 CST
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	95% Probabilidad <i>Staphylococcus aureus</i> Bionúmero: 070402047773271 Nivel de confianza: Identificación muy buena		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) <i>Staphylococcus aureus</i> NOVO(1),			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Nota. Elaboración propia.

Cliente de bioMérieux:

Informe de examen

Equipo N°:

Editado por: LabSuper

Nombre del paciente: UES, FQF

N° paciente: Tesiscepa02

Aislamiento: 020224-1 (Aprobado)

Tipo de tarjeta: GP Código de barras: 2422691403266773 Prueba de instrumento: 0000139C70C0 (VITEK2C)

Técnico de preparación: Laboratory Supervisor(LabSuper)

Bionúmero: 070402066763231

Cantidad de organismo:

Organismo seleccionado: Staphylococcus aureus

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	N° de lote: 2422691403	Fecha caduc.: 09-abr-2025 13:00 CDT
	Estado: Final	Tiempo de análisis: 3,93 horas	Finalizado: 14-feb-2024 15:54 CST
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Staphylococcus aureus Bionúmero: 070402066763231 Nivel de confianza: Identificación excelente		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Nota. Elaboración propia.

Consultar los certificados de calidad completos en el siguiente link:

<https://www.dropbox.com/scl/fi/f10wb68r4o9rrcx2jzezu/Resultados-Vitek-2C-Completos-Mx-01-108.pdf?rlkey=kmb1i8ld44kk7seanpfi823b4&st=15kddxo8&dl=0>