



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Determinación de residuos de antibióticos y calidad microbiológica *Staphylococcus aureus* y enterobacterias en quesillos artesanales del cantón Saraguro.

Trabajo de Integración Curricular previa
a la obtención del título de Médica
Veterinaria.

AUTOR:

Milena Anabel Ambuludi Hualpa

DIRECTORA:

Ing. Stephanie Fernanda Chávez Arrese, MSc.

Loja – Ecuador

2023

Certificación


Loja, 24 de abril de 2023

Ing. Stephanie Fernanda Chávez Arrese, MSc.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo proceso de la elaboración del Trabajo de Titulación denominado: “**Determinación de residuos de antibióticos y calidad microbiológica *Staphylococcus aureus* y enterobacterias en quesillos artesanales del cantón Saraguro**” de autoría de la estudiante **Milena Anabel Ambuludi Hualpa**, con cédula de identidad Nro. **1150047346**, previa a la obtención del título de **MÉDICA VETERINARIA**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, apruebo y autorizo la presentación para la respectiva sustentación y defensa.



.....

Ing. Stephanie Chávez Arrese, MSc.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autoría

Yo, **Milena Anabel Ambuludi Hualpa**, declaro ser autora del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido de la misma. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma:



Cédula de Identidad: 1150047346

Fecha: 18 de mayo 2023

Correo electrónico: milena.ambuludi@unl.edu.ec

Teléfono o Celular: 0980334079

Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Titulación.

Yo, **Milena Anabel Ambuludi Hualpa**, declaro ser autora del Trabajo de Titulación denominado: “**Determinación de residuos de antibióticos y calidad microbiológica *Staphylococcus aureus* y enterobacterias en quesillos artesanales del cantón Saraguro**”, como requisito para optar el título de Médica Veterinaria autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los dieciocho días del mes de mayo del dos mil veintitrés.

Firma:



Autor: Milena Anabel Ambuludi Hualpa

Cédula: 1150047346

Dirección: Av. Villonaco

Correo electrónico: milena.ambuludi@unl.edu.ec

Teléfono: 0980334079

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora del Trabajo de Titulación: Ing. Stephanie Fernanda Chávez Arrese, MSc.

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a Dios por ser mi guía en la vida, mi fuerza y fortaleza en mis momentos de dificultad, a mis padres quienes siempre me han impulsado en el camino, por su apoyo incondicional, son los autores de mis días todo lo que soy se los debo a ustedes los admiro y amo tanto Lucia Hualpa y Ángel Ambuludi.

A mis hermanos Tatiana, Renato y Juan Diego por apoyarme, cuidarme y amarme desde siempre y por enseñarme que todo es posible con esfuerzo y dedicación los amo.

A mis gorditos Emilito y Camila que han llegado a llenarme de color el alma los amo en cada sonrisa sobrinos queridos, y a ti mi angelito José por cuidarme desde el cielito, gracias por estar y ver cristalizada una de las etapas más importantes de mi vida, con mucho amor para todos ustedes.

Milena Anabel Ambuludi Hualpa

Agradecimiento

Agradezco a mi familia por su apoyo absoluto, a la Universidad Nacional de Loja, la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la carrera de Medicina Veterinaria y todos los docentes que la integran, muchas gracias por brindarme sus conocimientos.

De manera muy especial a la Ing. Stephanie Chávez Arrese, MSc directora de mi Trabajo de Titulación, por guiarme durante todo este tiempo de igual forma a la Bioqím. Jessica Valdivieso, MSc gracias por su apoyo para el desarrollo de mi trabajo de titulación, a mis amigos quienes han formado parte de esta etapa de mi vida gracias por su apoyo incondicional.

Milena Anabel Ambuludi Hualpa

Índice de contenidos

Portada	i
Certificación	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Agradecimiento	vi
Índice de contenidos	ix
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Índice de anexos	xi
1 Título	1
2 Resumen	2
2.1 Abstract.....	3
3 Introducción	4
4 Marco Teórico	6
4.1 Calidad Higiénica Sanitaria	6
4.2 Inocuidad alimentaria	6
4.3 INEN. (Instituto Ecuatoriano de Normalización)	8
4.4 Calidad microbiológica de los alimentos	8
4.4.1 <i>Enterobacterias</i>	9
4.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
4.5 Residuos de antibióticos	11
4.5.1 <i>Betalactámicos</i>	12
4.5.2 <i>Sulfamidas</i>	12
4.5.3 <i>Tetraciclinas</i>	12
4.6 Métodos de detección de antibióticos	13
4.6.1 <i>Método de inmunoensayo enzimático Ring Bio</i>	13
4.6.2 <i>Pruebas microbiológicas</i>	13
4.6.3 <i>Técnicas cromatográficas</i>	13
5 Metodología	15
5.1 Áreas de Estudio	15
5.2 Procedimiento	15
5.2.1 <i>Enfoque Metodológico</i>	15
5.2.2 <i>Diseño de la Investigación</i>	15
5.2.3 <i>Tamaño de la Muestra y Tipo de Muestreo</i>	15

5.2.4	<i>Técnicas</i>	15
5.3	Procesamiento y Análisis de la Información	17
5.4	Consideraciones Éticas	17
6	Resultados	18
6.2	Residuos de antibióticos	18
6.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
6.4	Recuento de Enterobacterias.....	19
7	Discusión	20
8	Conclusiones	24
9	Recomendaciones	25
10	Bibliografía	26
11	Anexos	33

Índice de tablas

Tabla 1. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados	8
Tabla 2. Toxinas patógenas de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Tabla 3. Determinación de residuos de antibióticos	18
Tabla 4. Porcentaje de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de quesillo	19
Tabla 5. Porcentaje de Enterobacterias en muestras de quesillo del cantón Saraguro...	19

Índice de figuras

Figura 1. Porcentaje de crecimiento en placa para determinar *Staphylococcus aureus* . 18

Índice de anexos

Anexo 1. Flujograma aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Anexo 2. Flujograma aislamiento de recuento de Enterobacterias	34
Anexo 3. Análisis de detección rápida de antibióticos Ring Bio	35
Anexo 4. Procedimientos realizados para determinar <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Anexo 6. Pruebas bioquímicas para <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Anexo 5. Cálculos para la determinación de ufc en Enterobacterias	36
Anexo 7. Crecimiento en placa de Enterobacterias en agar MacConkey	38
Anexo 8. Crecimiento en placa de Enterobacterias en agar nutritivo	39
Anexo 9. Certificado de Inglés.....	40

1 Título

Determinación de residuos de antibióticos y calidad microbiológica *Staphylococcus aureus* y enterobacterias en quesillos artesanales del cantón Saraguro.

2 Resumen

El quesillo artesanal es uno de los productos más consumidos en Ecuador por su valor nutricional además de constituir un bien cultural alimentario, por ello este producto debe estar libre de microorganismos patógenos y residuos de antibióticos, dado que su presencia genera riesgos para la salud pública. En este estudio se planteó determinar la presencia de residuos de antibióticos y; de bacterias como *Staphylococcus aureus* además realizar un recuento de enterobacterias en quesillos artesanales del cantón Saraguro. La investigación tuvo un diseño observacional de corte transversal en la que se recolectaron 25 muestras de quesillo de la feria libre de Saraguro. Se utilizaron cultivos microbiológicos para determinar la presencia de microorganismos y un método de inmunoensayo enzimático Ring Bio para determinar la presencia de betalactámicos, sulfamidas y tetraciclinas. Se identificaron 5 muestras (20%) con residuos de antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, 2 muestras (8%) fueron positivas para *Staphylococcus aureus* y en todas las muestras se tuvo un recuento alto (100%) de enterobacterias. En base a los resultados se sugiere que existe una mala calidad higiénico sanitaria en los quesillos que se expenden en la feria libre del cantón Saraguro por lo que se recomienda realizar estudios de trazabilidad para conocer la procedencia del producto en toda la cadena de producción.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, Enterobacterias, calidad higiénico sanitaria, queso artesanal.

2.1 Abstract

Artisanal quesillo is one of the most consumed products in Ecuador because of its nutritional value, in addition to being a cultural food product. For this reason, this product should be free of pathogenic microorganisms and antibiotic residues since their presence generates risks to public health. This study aimed to determine the presence of antibiotic residues; and bacteria such as *Staphylococcus aureus* and to conduct a count of enterobacteria in artisanal cheeses from Saraguro canton. The research had a cross-sectional observational design in which we collected 25 samples of quesillo from the Saraguro fair; we used microbiological cultures to determine the presence of microorganisms, and we used a Ring Bio enzyme immunoassay method to determine the presence of beta-lactams, sulfonamides, and tetracyclines. We identified Five samples (20%) with antibiotic residues belonging to the tetracycline group 2 out of these specimens (8%) were positive for *Staphylococcus aureus*, and all samples had a high count (100%) of enterobacteria. Based on the results, we suggested that there is poor hygienic-sanitary quality in the cheese sold at the Saraguro canton's free fair, and we recommended that they perform traceability studies to determine the origin of the product throughout the production chain.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Enterobacteriaceae, hygienic-sanitary quality, artisan cheese

3 Introducción

El quesillo o queso fresco artesanal constituye una de las bases en la alimentación de la población ecuatoriana (Arteaga *et al.*, 2021) dado su aporte de proteína además es un bien cultural alimentario que sustenta una cadena de valor local de importancia económica que puede contribuir al desarrollo local y regional (Albuja *et al.*, 2020). En el año 2020, el mercado del queso en Ecuador se encontraba en plena fase de crecimiento, siendo el queso fresco la variedad más producida en el país por ser el preferido de los ecuatorianos (Pardillos, 2020).

Sin embargo, existe un déficit en el cumplimiento de las buenas prácticas en su elaboración para obtener un queso fresco artesanal con calidad e inocuidad (Arteaga *et al.*, 2021). Se ha comprobado que la mayoría de quesos frescos que se expende en el mercado ecuatoriano son elaborados sin un previo tratamiento térmico de la leche lo que acarrea tener un elevado contaje microbiano (Villavicencio, 2018). Además, existe una manipulación incorrecta del producto, fallas de los controles apropiados de calidad en los procesos de transformación, producción y servicios de expendio de alimentos, así también, errores en los programas de saneamiento y buenas prácticas de manufacturas en la industria de los alimentos (Gonzales & Camargo, 2014).

Todo esto podría ocasionar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) que son un problema de salud pública, generan infecciones humanas por agentes patógenos e intoxicaciones por toxinas que producen un gran número de muertes a nivel mundial (Palomino & Muñoz, 2014). Por otro lado, la presencia de residuos de antibióticos de uso veterinario en alimentos de origen animal como la leche y sus derivados, se ha convertido en un problema de salud pública cuando residuos del fármaco llegan al consumidor en niveles que pueden ser perjudiciales para su salud, ocasionando reacciones alérgicas, toxicidad, desórdenes de la flora intestinal y resistencia microbiana (Talero *et al.*, 2014).

El desarrollo de este trabajo permitirá obtener información respecto a la salubridad en que el quesillo artesanal es expendido en la feria libre del cantón Saraguro, mediante la verificación de residuos de antibióticos y el nivel de microorganismos presentes en el mismo. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue determinar la calidad higiénico sanitaria en los quesillos artesanales comercializados en la feria libre del cantón Saraguro, y como objetivos específicos:

-Evaluar residuos de antibióticos: betalactámicos, sulfamidas y tetraciclinas en los quesillos expendidos en la feria libre.

-Evaluar la presencia de *Staphylococcus aureus* y enterobacterias en quesillos expendidos en la feria libre.

4 Marco Teórico

4.1 Calidad Higiénica Sanitaria

La OMS, (2018) define la calidad higiénico sanitaria como el conjunto de condiciones y medidas necesarias en todas las etapas de producción de un alimento, para garantizar su salubridad e inocuidad. Siendo importante para determinar si el producto final es apto para el consumo (FAO, 1996).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) alerta que la elaboración de alimentos en las áreas rurales, las condiciones higiénico sanitarias carecen del seguimiento y control requeridos para asegurar la obtención de productos de calidad (FAO, 2017).

Además, se señala que la comprobación de la calidad e inocuidad de los alimentos es de cumplimiento obligatorio por los productores y son controlados por los gobiernos (Komada *et al.*, 2020). Puesto que los riesgos asociados al ingerir un alimento contaminado, tiene incidencia directa a brotes de enfermedades, provocados por diferentes bacterias patógenas y parásitos, conocidas como enfermedades de transmisión alimentaria, ETA's (Zúñiga & Lozano, 2017).

Por ello, como parte del sistema de control de calidad, los productores de alimentos deben verificar materias primas, limpiar y desinfectar periódicamente los entornos de producción (Moretro & Langsrud, 2017), para reducir la carga bacteriana equivalente a la acumulación diaria de bacterias y para eliminar los patógenos que se introducen en el entorno de producción (Trond *et al.*, 2017), ya que estas bacterias pueden transferirse directamente, desde cuchillos rebanadoras o cintas transportadoras o indirectamente desde pisos o paneles de control a los alimentos durante el día de producción (García, 2018).

4.2 Inocuidad alimentaria

La inocuidad de los alimentos es el conjunto de condiciones y medidas necesarias durante la producción, almacenamiento, distribución y preparación de los alimentos para asegurar que una vez ingeridos no representen un riesgo apreciable para la salud del consumidor (OMS, 2018), siendo la calidad uno de los aspectos más importantes para la determinación de la inocuidad con sus respectivas características organolépticas (color, olor, sabor, textura) que deben de garantizar que dichos productos se encuentren libres de contaminantes físicos, químicos y microbiológicos (NCERT, 2009).

La inocuidad de los alimentos, se genera desde la producción primaria es decir en la finca y se transfiere a otras fases de la cadena alimentaria como la elaboración, el empaque, el transporte y la comercialización (Garzón, 2009).

La leche y los derivados lácteos se encuentran entre los alimentos más consumidos a nivel mundial dadas las características altamente nutritivas de estos alimentos ricos en proteínas, minerales, vitaminas y grasas, se impone una vigilancia especial por la calidad e inocuidad de estos productos (Flores *et al.*, 2020), de esta manera la leche cruda se encuentra entre los principales alimentos que pueden transmitir agentes etiológicos productores de infecciones o intoxicaciones alimentarias (FAO, 2018).

Entre los derivados lácteos se encuentran los quesos artesanales, que constituyen una de la principal forma de ingreso y tradición para el sector cooperativo y campesino de muchos países de Latinoamérica (Martínez *et al.*, 2019).

Generalmente el queso se elabora con leche de vaca no pasteurizada para su obtención utilizan un método muy rústico, el procedimiento para su fabricación no se encuentra estandarizado ni responde a las normas higiénicas, además, el almacenamiento del producto no es adecuado (Blanco, 2021) por lo que la fabricación del queso debe realizarse de acuerdo al Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública (INEN 1528, 2012), para prevenir la contaminación cruzada, y evitar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos (Albuja, 2020). Así mismo los límites máximos de plaguicidas y residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los establecidos en el Codex Alimentarius CAC/ MLR 1 y CAC/MLR 2 en su última edición respectivamente (INEN, 2012b).

Cuando el queso fresco no madurado sea sometido al análisis microbiológico correspondiente, debe poseer ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas (INEN, 2012b).

Por otro lado, la producción de quesos demanda gran cantidad de leche, lo que genera el lactosuero como subproducto (Culcay, 2021). El lactosuero es el residuo líquido que se obtiene después de la separación de la cuajada en la elaboración de quesos (Schaller, 2009), contiene más de la mitad de los sólidos presentes en la leche original, incluyendo alrededor del 20 % de las proteínas, la mayor parte de lactosa, minerales y vitaminas solubles, sin embargo, este subproducto industrial es poco aprovechado y además su vertido en las aguas residuales de la industria provocando contaminación ambiental (Acevedo *et al.*, 2015).

4.3 INEN. (Instituto Ecuatoriano de Normalización)

Los requisitos para la elaboración del queso fresco están establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528, la cual indica que la leche utilizada para su fabricación deberá cumplir con los requisitos de la norma NTE INEN 10, la misma que menciona que la leche debe pasar por un proceso de pasteurización, es decir que sea sometida a un proceso térmico el cual garantice la destrucción total de los microorganismos patógenos y microorganismos banales (saprofitos) sin alterar las características fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas de la misma (INEN, 2012^a).

Tabla 1. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	Ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15

Nota: Adaptado de Normativa del Instituto Ecuatoriano de Normalización 1338 (p.6), por INEN, 2012.

Donde:

n = número de muestras a examinar

m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad

M = índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad

c = número de muestras permisibles con resultados entre m y M (INEN, 2012).

4.4 Calidad microbiológica de los alimentos

Cuando no se trabaja dentro de las estrictas normas higiénicas y de inocuidad en la elaboración de los alimentos, existe un alto grado de probabilidad que aparezcan las ETA's, un conjunto de enfermedades que resultan por la ingestión de agua o alimentos contaminados en cantidades que afecten de manera nociva la salud del consumidor, pueden ser causados por patógenos, sustancias químicas o parásitos que contaminan los alimentos en distintos puntos de la cadena de producción (Kopper *et al.*, 2009).

Las bacterias generalmente implicadas en ETA's corresponden a las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Listeria monocytogenes* o a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella* (Ruiz *et al.*, 2017).

A nivel nacional se considera un tema de importancia, pues en un informe emitido por el Ministerio de Salud pública actualizado, se han notificado un total de 226 casos de intoxicación alimentaria en Ecuador, Loja ocupó el cuarto lugar por intoxicaciones alimentarias con un total de 17 casos, por infecciones de *Salmonella* ocupó el tercer lugar con un total de 6 casos, luego por Fiebre tifoidea y paratifoidea con un total de 3 casos (MSP, 2021).

Por ello la OMS, (2015) nos dice que es necesario en particular educar y capacitar a los productores de alimentos, los proveedores, las personas que manipulan alimentos y el público en general sobre la prevención de las enfermedades de transmisión alimentaria.

4.4.1 Enterobacterias

Enterobacteriaceae es la familia más grande y heterogénea de bacilos gramnegativos, de tamaño de (0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0 μm) ya sea móviles o inmóviles con flagelos peritricos y no forman esporas (Murray *et al.*, 2002), se multiplican bien en agar MacConkey, proliferan en medios aerobios y anaerobios (son anaerobios facultativos), fermentan en vez de oxidar glucosa, a menudo produciendo gas, son catalasa positiva, oxidasa negativa, la temperatura óptima de crecimiento es de entre 22 °C y 37 °C (Carroll *et al.*, 2017).

Se aíslan comúnmente de las superficies de procesamiento en varios tipos de industrias alimentarias, y se reconocen como organismos de deterioro en muchos tipos de alimentos (Álvarez, 2011). Además, son organismos coliformes indicadores de contaminación de agua y alimentos y su detección o cuantificación puede indicar un procesamiento inadecuado y un saneamiento deficiente en el entorno de producción de los alimentos (Baylis *et al.*, 2011).

Se encuentra de forma libre en el suelo, agua y vegetación, así como de forma normal en la flora intestinal de los seres humanos y animales, comprende muchos géneros como: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* (Carroll *et al.*, 2017). Estos géneros determinan la aparición de infecciones cuya gravedad depende principalmente de la capacidad patológica o de la virulencia de la especie en cuestión, infecciones introducidas por los alimentos, provocan problemas intestinales, manifestada por diarreas y deshidratación (Murray *et al.*, 2002).

Se asocian en verduras frescas, carne, aves, pescado, huevos, productos lácteos, carnes procesadas y pan debido a las bajas temperaturas (<5 °C), pH bajo, y por limpiadores o desinfectantes durante el saneamiento y después si el enjuague es insuficiente (López *et al.*, 2019).

4.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva cuyo nombre refleja su tendencia a crecer en racimos, es inmóvil, no esporulada, no poseen cápsula, son anaerobias facultativas (Pasachova *et al.*, 2019), poseen un diámetro de entre 0,5 y 1,5 µm son capaces de crecer en una variedad de condiciones en presencia de una elevada concentración de sal y a temperaturas de 18-40 °C (Murray *et al.*, 2002). Es catalasa positiva, coagulasa positiva y oxidasa negativa también los estafilococos característicos aparecen como cocos grampositivos en racimos en frotis teñidos con la técnica de Gram (Carroll *et al.*, 2017).

Se reconoce como una bacteria indicadora de contaminación que está ampliamente distribuido en la naturaleza, incluyendo aire, agua, polvo y en las personas principalmente en la superficie corporal de la piel, las membranas mucosas, la cavidad laríngea, cavidad nasal y excrementos de animales (Trond *et al.*, 2017).

Por lo que pueden introducirse en los entornos de elaboración de alimentos a partir de la materia prima o por manipulación del personal, así también por contaminación cruzada debido a la limpieza insuficiente del equipo de procesamiento y almacenamiento en un ambiente contaminado (Quesada, 2007).

Se asocia con mayor frecuencia en productos frescos, carnes, aves, pescados, mariscos, leche refrigerada, producción de pastelería y productos con alto contenido de sal (carne curada), (López *et al.*, 2019).

Siendo *Staphylococcus aureus* la principal especie causante de intoxicaciones alimentarias, sobre todo en asociación con productos cárnicos y lácteos mal manipulados (Parilla *et al.*, 1993).

Tabla 2. *Toxinas patógenas de Staphylococcus aureus*

Toxinas	Patogenicidad
Toxina 1	Síndrome del shock tóxico (TSST -1).
Enterotoxinas A- O	Enfermedad diarreica aguda, vómitos, intoxicaciones alimentarias y cuadros de enterocolitis.
Específicamente (Enterotoxina A, C, D).	Asociada a la mayoría de intoxicaciones alimentarias, se atribuye a productos lácteos y derivados contaminados
Toxinas exfoliativas (toxinas epidermolíticas A y B o ETA y ETB)	Causan eritema de piel y desprendimiento, tal como se observa en los casos del síndrome de piel escaldada.

Nota: Adaptado de *Patología clínica: Características generales del Staphylococcus aureus*; 61 (1): 28-40, por E. Cervantes et al., 2014, Rev. Latinoam Patol Clin Med. (Cervantes et al., 2014)

4.5 Residuos de antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas extremadamente activas a bajas dosis que actúan frente a microorganismos tales como las bacterias, hongos o protozoarios (Brugueras & Morejón, 1998). Se han usado por décadas en animales como promotores de crecimiento, para el tratamiento de mastitis y otras enfermedades (Carrizales *et al.*, 2017). El problema empieza cuando no se respeta los tiempos de retiro, la dosificación y los residuos de los fármacos quedan en la leche, llegándose a encontrar residuos de fármacos en los alimentos (Lombardo, 2013).

Lo que afecta la salud del consumidor, al ocasionar efectos tóxicos directos, aparición de reacciones alérgicas, daños a la flora intestinal de los consumidores, sin embargo, la principal consecuencia de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos es el surgimiento y diseminación de la resistencia bacteriana (Tamayo, 2020).

Constituye además un problema para la fabricación de productos derivados de la leche, pudiendo verse afectado el proceso de elaboración y las características del producto final (Zola & Ernesto, 2016). En el queso la presencia de residuos dificulta la maduración al disminuir la retención de agua, originando textura blanda y sabor amargo, además el queso tiene mayor probabilidad de contaminación bacteriana (Villegas & Álvarez, 2018).

La Organización Mundial de la Sanidad Animal, decidió que todos los agentes antimicrobianos usados en animales destinados a la producción de alimentos, dividirlos

en agentes antimicrobianos de importancia crítica, agentes de importancia elevada y agentes de importancia (OMSA, 2019).

4.5.1 Betalactámicos

Este grupo de antibióticos son ampliamente utilizados, básicamente están divididos en dos clases las penicilinas y las cefalosporinas (Máttar *et al.*, 2009). De acuerdo a la OMSA los betalactámicos están dentro de los agentes antimicrobianos de importancia crítica, usado como fármaco profiláctico para aumentar el crecimiento de los animales y el rendimiento de su producción, para el tratamiento de septicemias, infecciones respiratorias, infección de vías urinarias y mastitis, aplicados principalmente en aves, bovinos, camélidos, caprinos, équidos, conejos, ovinos, suidos y peces (OMSA, 2019).

En las personas pueden provocar, reacciones adversas como erupciones maculopapulares, urticaria, fiebre, broncoespasmo, vasculitis, dermatitis exfoliativa y anafilaxia en distintos grados (Camacho *et al.*, 2018).

4.5.2 Sulfamidas

De acuerdo al OMSA las sulfamidas están dentro de los agentes antimicrobianos de importancia crítica, usados para prevención de brotes de enfermedades y la mejora en la eficiencia alimentaria y promoción del crecimiento, para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, infecciones de origen bacteriano, coccidial y protozoario, aplicados en aves, bovinos, camélidos, caprinos, équidos, conejos, ovinos, suidos y peces (OMSA, 2019).

Pueden causar reacciones de hipersensibilidad principalmente rash cutáneo, sin embargo, se desconocen manifestaciones anafilácticas ocasionadas por este tipo de residuos (Obregón *et al.*, 2020). Además, se ha descubierto que algunas sulfonamidas pueden ser potencialmente carcinogénicas (Werth, 2022).

4.5.3 Tetraciclinas

De acuerdo al OMSA las tetraciclinas están dentro de los agentes antimicrobianos de importancia crítica, usados para la prevención de enfermedades, también como aditivos en alimentos, como promotores del crecimiento en la cría de animales, para el tratamiento de numerosas enfermedades bacterianas y clamidiales, esta clase también tiene una importancia crítica para el tratamiento de los animales contra la Cowdriosis (*Ehrlichia ruminantium*) y la Anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) debido a la falta de

alternativas antimicrobianas, aplicados en aves, bovinos, camélidos, caprinos, équidos, conejos, ovinos, suidos y peces (OMSA, 2019).

Se asocian a problemas gastrointestinales, hipersensibilidad, reacciones alérgicas, disfunción renal, amarillamiento de los dientes, trastornos gastrointestinales, aumento de la presión intracraneal e infecciones en la piel, como rosácea y dermatitis perioral y pobre desarrollo fetal en humanos con un consumo subcrónico (Mookantsa *et al.*, 2016).

4.6 Métodos de detección de antibióticos

4.6.1 Método de inmunoensayo enzimático Ring Bio

Los inmunoensayos enzimáticos permiten el empleo de anticuerpos en ensayos para la determinación de analitos de una manera más útil y manteniendo la elevada sensibilidad alcanzada en la determinación analítica, se basan en la interacción entre un anticuerpo (Ab) y su antígeno (Ag) (Fernández, 2014).

El método de inmunoensayo enzimático Ring Bio permite determinar la presencia de antibióticos para leche y productos lácteos, validado por Institute for Agricultural, Fisheries and Food Research, reconoce los Límites Máximo de Residuos (LMR) contra estas 3 clases de medicamentos, ensayo de receptores con amplia especificidad para todos los (S+T+B) es una prueba confiable de detección cualitativa.

4.6.2 Pruebas microbiológicas

Implican la incubación de un organismo susceptible en presencia de la muestra de leche, en ausencia de antibióticos el organismo crece y puede ser detectado visualmente, en presencia de antibióticos el crecimiento del organismo se ve inhibido y se obtiene una zona de inhibición o ausencia de cambio de coloración que permite su identificación, estos métodos son muy simples y económicos, pero requieren varias horas para visualizar los resultados, siendo los más rápidos los que proporcionan resultados entre 2.5 y 4 h (Kantiani *et al.*, 2009). Además, las cepas empleadas se deben controlar constantemente para asegurar que no han desarrollado resistencia a los antibióticos a determinar (Babington *et al.*, 2012).

4.6.3 Técnicas cromatográficas

Permiten la identificación y cuantificación de diferentes residuos, incluso a muy bajas concentraciones, ya que muy pocos productos farmacéuticos son volátiles y tienen que ser derivatizados (Sanvicens *et al.*, 2011). Entre las técnicas cromatográficas, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la más universalmente aplicada,

empleando esta técnica cromatográfica se han descrito diferentes metodologías, principalmente acopladas a espectrometría de masas (Di Corcia & Nazzari, 2002).

5 Metodología

5.1 Áreas de Estudio

El presente estudio se realizó en la feria libre ubicada en el cantón Saraguro provincia de Loja cuyas coordenadas geográficas son: 3° 31'38" de latitud sur, y 79° 43'41" de longitud oeste, con una altitud 2.520 m.s.n.m. El lugar tiene un clima frío y templado con una temperatura promedio: 13,5 °C.

5.2 Procedimiento

5.2.1 Enfoque Metodológico

El enfoque metodológico es de carácter cuantitativo, debido a que la recolección de datos se basa en una medición numérica, es decir, las variables se miden en base a métodos estadísticos para sus conclusiones.

5.2.2 Diseño de la Investigación

La investigación fue observacional de corte transversal, en la que se determinó la presencia de residuos de antibióticos como betalactámicos, sulfamidas y tetraciclinas, así como las bacterias *Staphylococcus aureus*. También se realizó un recuento de enterobacterias, todo esto en quesillos elaborados de forma artesanal en la feria libre del cantón Saraguro.

5.2.3 Tamaño de la Muestra y Tipo de Muestreo

Se utilizaron 25 muestras de quesillo, una por cada puesto de expendio del producto. Este número fue determinado en base a una observación previa del lugar y considerando a todas las personas que se dedican a la distribución de este producto dentro de la feria libre.

5.2.4 Técnicas

- **Residuos de antibióticos**

Para la detección de residuos de antibióticos se utilizó el test rápido de inmunoensayo enzimático Ring Bio, consistió en colocar en un envase estéril 25 ml del lactosuero del quesillo, se procedió a colocar la tira reactiva para retirarla luego de 3 min, se esperó 3 minutos más, hasta que las líneas de los diferentes antibióticos tomarán color.

Para la lectura si la muestra es positiva, las líneas de los diferentes antibióticos, tomaron un color lila claro como la línea de control, y se observó en el manual del Kit Ring bio, (Anexo 3).

Análisis microbiológicos

Se tomó media libra de quesillo de cada uno de los expendios, el mismo que fue transportado en un cooler a una temperatura de 0 a 4 °C, por 3 horas hasta el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Nacional de Loja (INEN, 1999).

Para la dilución madre, se procedió a pesar 10 gramos de quesillo en 90 ml de agua peptonada (10^1) y se realizó diluciones seriadas (10^{-2}) para *Staphylococcus aureus* hasta (10^{-3}) para Enterobacterias (INEN, 1998).

- ***Staphylococcus aureus***

A partir de la dilución 10^{-2} se sembró por método de estriado en placa en agares diferenciales Baird Parker y agar Sal manitol, se procedió a incubar a temperatura de 37°C durante 24 h, también se aplicó un control negativo de cada agar para evidenciar la esterilidad de los medios de cultivo.

Se seleccionó las colonias sospechosas en base a las características macroscópicas en agar Baird Parker (colonias negras con bordes incoloros, rodeados de una zona opaca) y agar sal manitol (colonias amarillas rodeadas de un halo amarillo). Luego se procedió a realizar pruebas bioquímicas coagulasa (+), catalasa (+), oxidasa (-), como confirmación y tinción gram (cocos gram positivos), todo el procedimiento se basó en la normativa INEN 1529-14 presente en el (Anexo 1).

- **Recuento de Enterobacterias**

A partir de la dilución 10^{-3} , se inoculó 1 ml en placas Petri previamente esterilizadas y se vertió en agar MacConkey a temperatura de 37°C durante 24 h, se procedió a realizar el recuento en unidades formadoras de colonias aplicando la fórmula establecida por la normativa INEN, se aplicó un control negativo de cada agar para evidenciar la esterilidad de los medios de cultivo, el procedimiento se basó en la normativa INEN 1529-13 presente en el (Anexo 2).

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0, 1n_2)d}$$

En donde:

Σc = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas:

V = Volumen inoculado en cada caja Petri;

n_1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada:

n_2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada:

d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada ($d = 1$ cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

5.3 Procesamiento y Análisis de la Información

Se presentaron las variables de forma descriptiva se usaron para evaluar calidad microbiológica medidas de tendencia central (medias), y dispersión (desviación estándar e intervalos de confianza máximo y mínimo) para variables numéricas y para evaluar residuos de antibióticos se usaron tablas de frecuencias absolutas y relativas para variables categóricas.

5.4 Consideraciones Éticas

No se requiere de consideraciones éticas debido a que es un estudio observacional y no se trabaja con animales.

6 Resultados

6.2 Residuos de antibióticos

De las 25 muestras analizadas, 5 resultaron positivas a la presencia de residuos de antibióticos, específicamente al grupo de tetraciclinas, es decir un 20% de las muestras contenían residuos (Tabla 3).

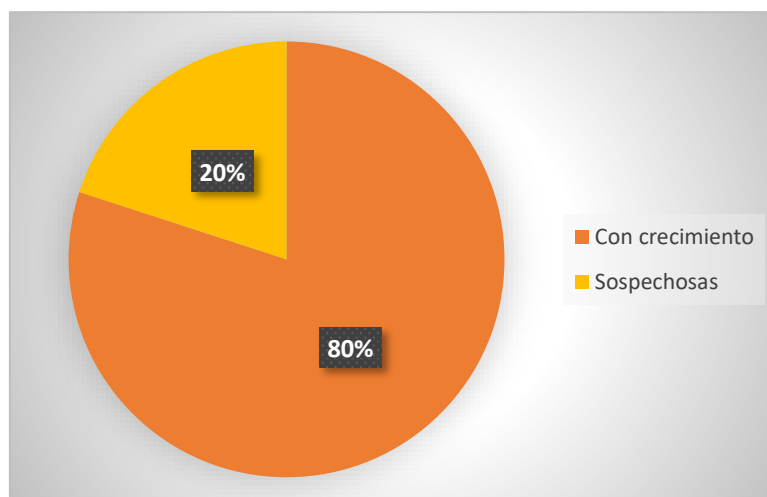
Tabla 3. Determinación de residuos de antibióticos

Antibióticos	Muestra	%
Betalactámicos		
Presencia	0	0
Ausencia	25	100
Sulfamidas		
Presencia	0	0
Ausencia	25	100
Tetraciclinas		
Presencia	5	20
Ausencia	25	80

6.3 Staphylococcus aureus

De las 25 muestras estudiadas se obtuvo un crecimiento bacteriano en 16 muestras (64%) y en base a las características macroscópicas en los medios diferenciales se seleccionaron 4 placas (16 %) como sospechosas a *Staphylococcus aureus* (Figura 1).

Figura 1. Porcentaje de crecimiento en placa para determinar *Staphylococcus aureus*



Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas (Anexo 3, 4) y se pudo confirmar que 2 muestras (8%) tuvieron *Staphylococcus aureus* del total de las muestras analizadas (Tabla 4).

Tabla 4. Presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de quesillo

Microorganismo	Muestra	%
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Presencia	2	8
Ausencia	23	92
Total	25	100

Las muestras determinadas como sospechosas y no determinadas para *S. aureus* se definieron como *S. coagulasa* negativa, asociadas.

6.4 Recuento de Enterobacterias

Se realizó cultivos de la dilución 10^{-3} en agar MacConkey y nutritivo (control positivo Anexo 7), donde se obtuvo crecimiento en todas de las placas. Posteriormente se contabilizó el número de colonias (Anexo 6) obteniendo como resultado un 100% de crecimiento de enterobacterias que superan los valores permitidos, es decir, no cumple con los rangos establecidos en la normativa INEN 1529-13 (Tabla 5).

Tabla 5. Presencia de enterobacterias en muestras de quesillo del cantón Saraguro

Microorganismo	Muestra	%
Recuento enterobacterias		
Cumple	0	0
No cumple	25	100
Total	25	100

7 Discusión

De acuerdo con los resultados encontrados en el quesillo se demostró la presencia de *Staphylococcus aureus* en un 8% del total de 25 muestras estudiadas en la feria libre de Saraguro. Otros estudios evidencian mayor presencia de *Staphylococcus aureus* como el de Ruíz *et al.*, (2017) en quesos costeños artesanales expendidos en los municipios del departamento de Córdoba Colombia, en donde determinan la presencia en un 41,4% de 360 muestras, y concluyen que la presencia de este microorganismo refleja las deficiencias higiénicas durante la elaboración y manipulación del producto. Así mismo Cárdenas, (2020) en su investigación en Perú en quesos artesanales expendidos en 4 ferias libres, encontró *Staphylococcus aureus* en el 100% de muestras, mencionan que dicho resultado podría deberse a una deficiencia de las condiciones higiénicas durante la elaboración, transporte y expendio. Ya que esta bacteria está presente en el cuerpo de animales y el hombre, principalmente en la piel, las fosas nasales, faringe, boca y manos lo que convierte a los manipuladores en potenciales contaminantes (Møretro & Langsrud, 2017) Así como *Staphylococcus coagulasa* negativa; *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes* , *Staphylococcus intermedius*, también residentes de la microbiota del ser humano y animales, representan un riesgo de contaminación por alimentos (Predari, 2007).

Es importante considerar que las técnicas de aislamiento de la bacteria (medios de cultivo e incubación) empleados en ambos estudios para la confirmación del microorganismo, así como el tamaño de la muestra (360 y 48 respectivamente) podrían haber influido en los valores obtenidos en sus resultados.

En un estudio realizado por Villavicencio, (2018) sobre contaminación microbiológica en queso fresco en el Ecuador, según la Universidad del Litoral mencionan que se ha comprobado que la mayoría de quesos frescos que se expende en el mercado ecuatoriano son elaborados sin un previo tratamiento térmico adecuado de la leche lo que acarrea tener un elevado contaje microbiano. Esto lo corrobora Ferrín *et al.*, (2020) en su estudio realizado en Ecuador en el mercado municipal de la provincia de Manabí en 51 quesos artesanales se evidenció presencia de *Staphylococcus aureus* en todas las muestras, todos los autores concuerdan que la leche que se destina para la elaboración de quesos no pasa por un proceso de pasteurización, condición que podría estar propiciando a la contaminación.

También un estudio realizado por Manfredi & Rivas, (2019) en Argentina sobre un brote de intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus* evidenció que 37 niños y 10 adultos presentaron síntomas gastrointestinales, principalmente vómitos (95%) y dolores abdominales con menor frecuencia los pacientes informaron de diarrea (5%), de los niños afectados 5 fueron internados con signos de deshidratación, la presencia de la bacteria en el alimento demuestra malas prácticas de manufactura.

En cuanto al recuento de Enterobacterias en este estudio se obtuvo en todas las muestras valores que sobrepasan los límites microbiológicos establecidos en la normativa INEN en nuestro país 1 x 10³. Datos que coinciden con un estudio realizado por Arteaga *et al.*, (2021), en queserías artesanales de cuatro cantones (Chone, Pedernales, El Carmen y Flavio Alfaro) situadas al norte de la provincia de Manabí, donde evidenció que en total de 156 muestras la cuantificación supera los límites de aceptabilidad establecidos en la normativa nacional, lo que podría relacionarse a las deficiencias en el procesamiento y almacenamiento en temperaturas inadecuadas de los quesos que favorecen el crecimiento de patógenos responsables de ETA's.

Así mismo Espinoza *et al.*, (2020) en su estudio de quesos frescos realizado en Babahoyo manifestó que el 88,57% de 35 muestras recolectadas en 3 mercados municipales, reportaron valores que están fuera del rango permisible de la normativa como límite de carga bacteriana para la comercialización del producto.

También Calampa, (2017) en su estudio en quesos frescos en Perú en muestras de la feria libre, la cuantificación de Enterobacterias en todas las muestras superó los rangos permisibles de la normativa técnica peruana 202.195, autores que corroboran la inadecuada condición de manipulación e higiene durante su fabricación. De igual manera Costa *et al.*, (2016) en investigación realizado en Chile en quesos comerciales y artesanales evidenció en todas las muestras analizadas recuentos de Enterobacterias que superaron el límite máximo establecido en el Reglamento Sanitario de los Alimentos de 10 000 UFC/g, lo que indicaría contaminación siendo uno de los principales factores no mantener la cadena de frío del producto. Por otro lado un publicación de Likar & Jevšnik, (2006) confirmó que en la industria láctea y sus productos derivados es necesaria la refrigeración inmediata, a temperaturas de 4 a 5°C lo que es fundamental para su conservación y evitar la proliferación de microorganismos. Así mismo Molleda, (2016) en su estudio de frecuencia de Enterobacterias en queso fresco, carne molida y fresa en el mercado mayorista, encontró que la enterobacteria predominante en queso es *Escherichia coli* con 47%, seguida de *Enterobacter* con 29% lo que indica una contaminación de

origen fecal, debido al incumplimiento de las normas higiénicas sanitarias. También Bayona & Martín, (2012) mencionan que la contaminación se debe a factores como la mala higiene del personal, la contaminación del equipo del procesamiento, aguas contaminadas, heces animales y la falta de asepsia de las superficies.

En cuanto a residuos de antibióticos en este estudio se encontraron 5 muestras positivas para tetraciclinas lo que corresponde al 20% del total de muestras analizadas de lactosuero del queso. Datos similares dio a conocer Culcay (2021), en su estudio realizado en muestras de lactosuero de queso fresco en Cuenca donde evidenció la presencia del 27,4% para tetraciclinas. También Carrizales *et al.*, (2017) en su estudio de monitoreo de antibióticos en quesos industriales y artesanales en 125 muestras confirmó que la familia de antibióticos de mayor frecuencia fue la de los betalactámicos (96%) seguida de las tetraciclinas (77%) y sulfonamidas (8%) resultados que podrían deberse a la falta del cumplimiento de la normativa sobre todo con la legislación sanitaria. Además de acuerdo al OMSA (2019), las tetraciclinas son agentes antimicrobianos sumamente importantes para la medicina veterinaria por su amplia gama de aplicaciones, como promotores de crecimiento y para el tratamiento de numerosas enfermedades bacterianas y clamidiales, en diversas especies animales, esta clase también tiene una importancia crítica para el tratamiento de los animales contra la coudriosis (*Ehrlichia ruminantium*) y la anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) debido a la falta de alternativas antimicrobianas.

Por otro lado, la leche representa la materia prima para la elaboración del queso, misma que puede estar contaminada por residuos de medicamentos veterinarios (Guerrero *et al.*, 2009). En una publicación en leche realizada por Benítez *et al.*, (2019), en la parroquia Chicana del cantón Yantzaza, de 108 muestras evidenciaron la presencia de sulfamidas en un 9,26 %, de betalactámicos un 8,33% y en mayor cantidad tetraciclinas con un 17,59%.

Así mismo, Cattaneo *et al.*, (2009) menciona que en ganadería bovina los antibióticos más usados son la Penicilinas G con un 90%, seguido por tetraciclinas con un 75%. Lo que coincide con Sawant *et al.*, (2005) al mencionar que el uso continuo, y muchas veces en exceso, de betalactámicos (penicilina) en la ganadería lechera, ha incrementado la incidencia de cepas de bacterias resistentes, razón por la cual son usados otros antibióticos, principalmente las tetraciclinas.

También Trujillo, (2019) menciona que la tetraciclina es de mayor uso por los productores ganaderos para el tratamiento de sus animales, reporto que los pequeños

productores usan las tetraciclinas en un 64.70% y penicilinas G 58.8%, posiblemente, este patrón obedezca al amplio uso de estos antibióticos para diferentes tipos de enfermedades en animales de producción OMSA, (2019). Otra posibilidad, es que los productores usan antibióticos en base a las recomendaciones dadas por los vendedores en almacenes agropecuarios y en base a previas experiencias con médicos veterinarios (Redding *et al.*, 2013).

8 Conclusiones

- Se encontró un porcentaje considerable de residuos antibióticos correspondientes al grupo de tetraciclinas en los quesillos artesanales de la feria libre del cantón Saraguro.
- Se determinó poca presencia de *Staphylococcus aureus* en los quesillos artesanales de la feria libre del cantón Saraguro.
- La presencia de enterobacterias en los quesillos, superaron los valores máximos establecidos en la norma INEN ,1529-14.
- La calidad higiénico sanitaria de los quesillos artesanales expendidos en la feria libre del cantón Saraguro es deficiente porque existe la presencia de agentes patógenos perjudiciales para la salud pública, así como residuos de antibióticos.

9 Recomendaciones

- Se sugiere realizar estudios con mayor número de muestras de lugares donde sea expandido el quesillo artesanal.
- Se debería realizar un estudio de trazabilidad para conocer la procedencia de contaminación de los quesillos, durante toda la cadena de producción.
- Se recomienda identificar y cuantificar otras bacterias que pudieran estar presentes en el quesillo que se expende en las ferias libres de Saraguro.

10 Bibliografía

- Acevedo, D., Jaimes, J. D., & Espitia, C. R. (2015). Efecto de la Adición de Lactosuero al Queso Costeño Amasado. *Información tecnológica*, 26(2), 11-16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200003>
- Albuja, A., Gallegos, J., Cali, P., & Hernández, P. (2020). *Evaluación de la calidad microbiológica del queso de hoja tradicional de Ecuador elaborado artesanal e industrialmente – Anales RANF*. https://analesranf.com/articulo/8602_03/
- Álvarez, E. (2011). Determinación del cumplimiento de las normas de higiene y de la calidad sanitaria en alimentos preparados y expedidos en kioscos escolares de colegios nacionales del distrito de Wanchaq-Cusco. *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*. <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/1057>
- Arteaga, A., Armenteros, M., Quintana, D., Martínez, A., Arteaga, R. A., Armenteros Amaya, M., Quintana García, D., & Martínez Vasallo, A. (2021). Evaluación de las buenas prácticas en la elaboración de queso artesanal en Manabí, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 43(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2021000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Babington, R., Matas, S., Marco, M.-P., & Galve, R. (2012). Current bioanalytical methods for detection of penicillins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(6), 1549-1566. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5960-4>
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., & Davies, A. (2011). *The enterobacteriaceae and their significance to the food industry*. <https://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/EP-Enterobacteriaceae.pdf>
- Bayona, R., & Martín, A. (2012). Prevalencia de salmonella y enteroparásitos en alimentos y manipuladores de alimentos de ventas ambulantes y restaurantes en un sector del norte de bogotá, colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 267-274.
- Benítez, N., Fernández, P., Sisalima, R., & Ochoa, B. (2019). *Residuos de antibióticos en leche cruda fluida en la parroquia Chicaña del Cantón Yantzaza de la provincia de Zamora Chinchipe*. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara*. <http://revistacmvl.jimdofree.com/suscripción/volumen-17/antibióticos-en-leche/>
- Blanco, J. (2021). *diseño y creación, en la empresa inversiones melissa del caribe sas, de una ruta de producción y comercialización de un queso costeño certificado y con altos*

estándares de calidad, alineado a las necesidades saludables y de alimentación consciente del mercado, apoyados en un proceso de producción innovador. 62.

- Brugueras, M., & Morejón, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347-361.
- Calampa, L. (2017). *Evaluación fisicoquímica y microbiológica de queso fresco elaborado en las localidades de Leymebamba, Molinopamba y la Florida—Pomacochas Región Amazonas* [Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]. <https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/1189/Informe%20de%20tesis%20Calampa%20Guivin.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cárdenas, N. (2020). *Frecuencia de Staphylococcus aureus en quesos de elaboración artesanal, comercializados en Chupaca*. <https://repositorio.upla.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12848/2321/TESIS%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carrizales, K. B. M., Ramírez, M. A. T., Pérez, M. N., Gallardo, C. P., Aguilar, D. G. G., & Guerrero, I. E. M. (2017). Monitoreo de antibióticos en quesos industrializados y artesanales en Jalisco. *e-CUCBA*, 8, Article 8. <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i8.80>
- Carrizales, K., Ramírez, M., Pérez, M., Gallardo, C., Aguilar, D., & Guerrero, I. E. M. (2017). Monitoreo de antibióticos en quesos industrializados y artesanales en Jalisco. *e-CUCBA*, 8, Article 8. <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i8.80>
- Carroll, K., Hobden, J., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., Mitchell, T., McKerrow, J., & Sakanari, J. (2017). *Microbiología médica* (27a. Edición). <https://bibliotecaia.ism.edu.ec/Repo-book/m/MicrobiologiaMedica.pdf>
- Cattaneo, A. A., Wilson, R., Doohan, D., & LeJeune, J. T. (2009). Bovine veterinarians' knowledge, beliefs, and practices regarding antibiotic resistance on Ohio dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3494-3502. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1575>
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Costa, M., Retamal, J., Rodríguez, A., Chavarría, P., Parra F, J., Contreras, A., & Forsythe, S. (2016). Inocuidad microbiológica de quesillos comerciales y artesanales expendidos en Chillán. *Revista chilena de nutrición*, 43(2), 172-179. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000200010>
- Culcay, A. (2021). *Determinación de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en lactosuero de queso fresco*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/20975/1/UPS-CT009255.pdf>

- Di Corcia, A., & Nazzari, M. (2002). Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography. A*, 974(1-2), 53-89. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00905-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00905-6)
- Espinoza, F., Murrieta, A., Córdova, M., & Nevárez, G. C. (2020). Análisis microbiológico de quesos frescos comercializados en la ciudad de Babahoyo. *Journal of Science and Research*, 5(CININGEC), Article CININGEC.
- FAO. (1996). *Manual de control de la calidad de los alimentos*. <https://www.fao.org/3/t0867s/t0867s.pdf>
- FAO. (2017). *El futuro de la alimentación y la agricultura*. <https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- Fernández, F. (2014). *Bioplataformas electroquímicas para la detección de antibióticos en leche*. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/27779/1/T35575.pdf>
- Ferrín, Y., Guevara, J., Andrade, J., Macías, E., & López, M. (2020). *evolución de la presencia de staphylococcus aureus en queso fresco artesanal del mercado municipal del cantón junín de la provincia de manabí*. <https://docplayer.es/196383666-Evaluacion-de-la-presencia-de-staphylococcus-aureus-en-queso-fresco-artesanal-del-mercado-municipal-del-canton-junin-de-la-provincia-de-manabi.html>
- Flores, Y., Armenteros, M., Riverón, Y., Díaz, D., & Martínez, A. (2020). *Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de los quesos frescos artesanales de la provincia Mayabeque, Cuba*. 42. https://www.researchgate.net/profile/Yaneisy-Flores/publication/355929335_Evaluacion_de_la_calidad_higienico-sanitaria_de_los_quesos_frescos_artesanales_de_la_provincia_Mayabeque_Cuba/links/628fdb2c660ab61f846b57b/Evaluacion-de-la-calidad-higienico-sanitaria-de-los-quesos-frescos-artesanales-de-la-provincia-Mayabeque-Cuba.pdf
- García, D. (2018). *Actualización y redacción de POES para diferentes maquinas en el área de producción para tener definido cuál es la forma adecuada de realizar una mejor limpieza en las áreas*. <http://reini.utcv.edu.mx/bitstream/123456789/446/1/9434.pdf>
- Garzón, T. (2009). *La inocuidad de alimentos y el comercio internacional*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902009000300009
- Gonzales, Y., & Camargo, C. (2014). *Acciones para la gestión de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en un restaurante con servicio bufet*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1657-70272012000100010&lng=e&nrm=iso&tlng=es

- Guerrero, D., Motta, R., Gamarra, G., Benavides, E., Roque, M., & Salazar, M. (2009). Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda comercializada en el Callao. *Ciencia e Investigación*, 12(2), 79-82. <https://doi.org/10.15381/ci.v12i2.3401>
- INEN. (2012a). Leche pasteurizada. Requisitos. En *Norma técnica ecuatoriana* (Primera edición).
- INEN. (2012b). Norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos. En *Norma técnica ecuatoriana* (Primera edición). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1528.pdf>
- Kantiani, L., Farré, M., Sibum, M., Postigo, C., López de Alda, M., & Barceló, D. (2009). Fully automated analysis of beta-lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(11), 4285-4295. <https://doi.org/10.1021/ac9001386>
- Komada, Y., Okajima, I., & Kuwata, T. (2020). The Effects of Milk and Dairy Products on Sleep: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249440>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. <http://www.proyectosame.com/brotes/Apoyo/Bibliograf%C3%ADa/26.%20Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos.pdf>
- Likar, K., & Jevšnik, M. (2006). Cold chain maintaining in food trade. *Food Control*, 17(2), 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.009>
- Lombardo, M. (2013). *Nuevas metodologías analíticas para la determinación de quinolonas y otros residuos en muestras alimentarias y ambientales*. Universidad de Granada. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/26380>
- Manfredi, E. A., & Rivas, M. (2019). Brote de intoxicación alimentaria en un jardín de infantes de la provincia de Buenos Aires. *Revista argentina de microbiología*, 51(4), 354-358. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.008>
- Martínez, A., Ribot, A., Riverón, Y., Remón, D., Martínez, Y., Jacsens, L., & Uyttendaele, M. (2019). Staphylococcus aureus in the production chain of artisan fresh cheese. *Revista de Salud Animal*, 41(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2019000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 11, 579-590. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000400009>

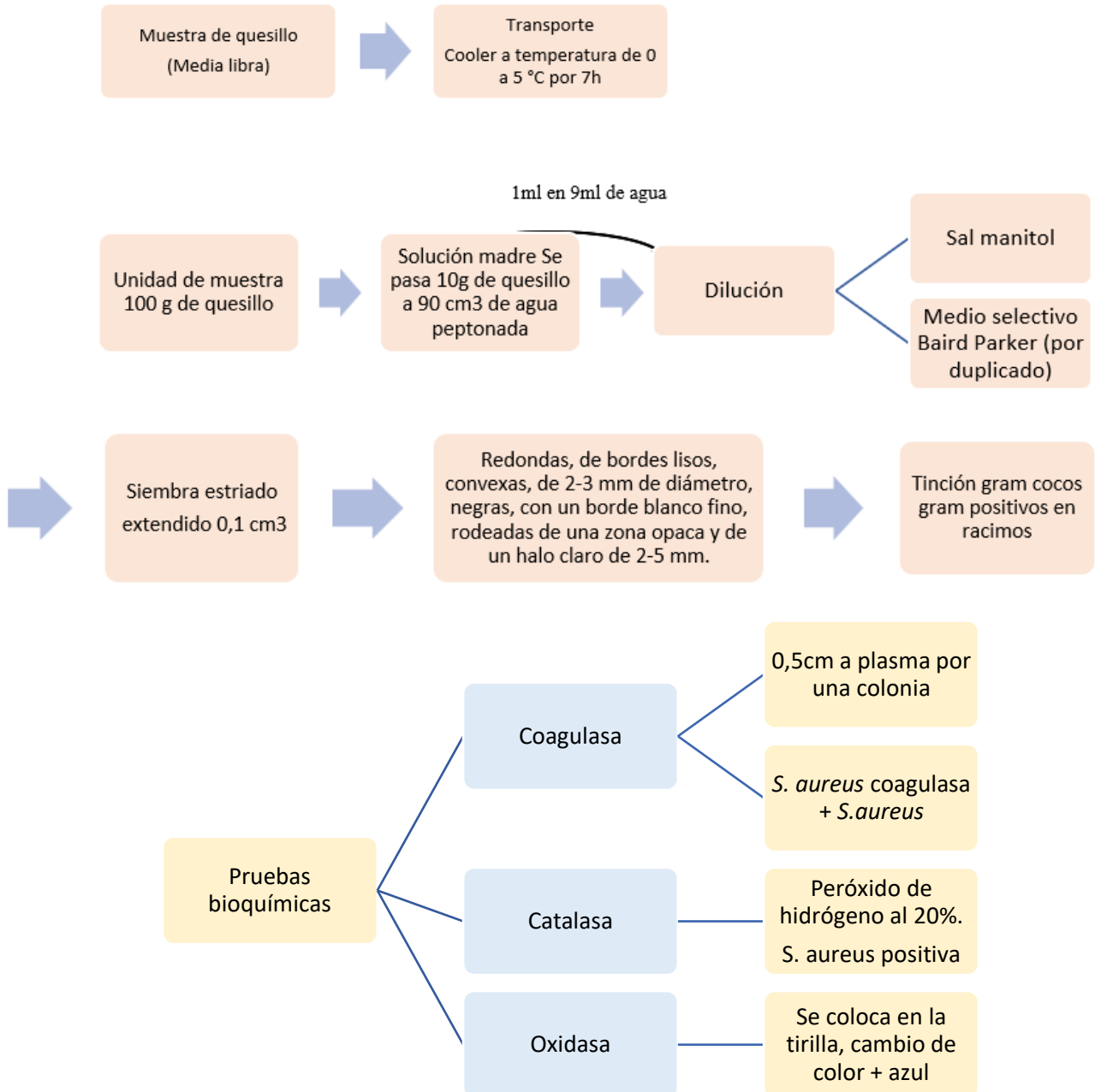
- Molleda, M. (2016). *Frecuencia de enterobacterias en queso fresco, carne molida y fresca en el mercado matorista «La Parada»* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/4645/Molleda_rm.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Mookantsa, S. O. S., Dube, S., & Nindi, M. M. (2016). Development and application of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry. *Talanta*, *148*, 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.006>
- Mørretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(5), 1022-1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- Moretro, T., & Langsrud, S. (2017). *Bacterias residenciales en superficies en la industria alimentaria y sus implicaciones para la seguridad y la calidad de los alimentos*. <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12283>
- MSP. (2021). *Subsistema de vigilancia sive—Alerta enfermedades transmitidas por agua y alimentos Ecuador*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/06/GACETA-ETAS-SEM-22.pdf>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfäfer, M. (2002). *Microbiología Medica*. <https://pdfcoffee.com/microbiologia-medica-murray-7ed-pdf-free.html>
- NCERT. (2009). *Human ecology and family sciences: Vol. Parte I* (First edition, p. 16). Shagun Offset Press. <https://ncert.nic.in/textbook/pdf/kehe1ps.pdf>
- OMS. (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>
- OMS. (2018). *Calidad e inocuidad de alimentos*. <https://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/inocuidad-alimentos.aspx>
- OMSA. (2019). *Lista de agentes antimicobianos importantes para la medicina veterinaria*.
- Palomino, C., & Muñoz, Y. (2014). *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y limitaciones*. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020
- Pardillos, M. (2020, abril 29). *El mercado del queso en Ecuador*. ICEX. <https://es.scribd.com/document/585985074/doc2020851677-a-3>

- Parilla, M., Vázquez, L., Saldater, O., & Nava, L. (1993). *Brote de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario*. <https://www.redalyc.org/pdf/106/10635505.pdf>
- Pasachova, J., Ramirez Martinez, S., & Muñoz Molina, L. (2019). Staphylococcus aureus: Generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38. <https://doi.org/10.22490/24629448.3631>
- Predari, S. (2007). Estafilococos coagulasa negativos: El enemigo silente. *Revista argentina de microbiología*, 39(1), 1-3.
- Redding, L. E., Barg, F. K., Smith, G., Galligan, D. T., Levy, M. Z., & Hennessy, S. (2013). The role of veterinarians and feed-store vendors in the prescription and use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. *Journal of Dairy Science*, 96(11), 7349-7354. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7045>
- Ruiz, M. J., Colello, R., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2017). Efecto inhibitorio de Lactobacillus spp. Sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 174-177. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>
- Ruiz, R., Meneo, N., & Chams, L. M. (2017). Valoración microbiológica de queso costeño artesanal y evaluación higiénico-locativa de expendios en Córdoba, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 19, 311-317. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n3.54853>
- Sanvicens, N., Mannelli, I., Salvador, J.-P., Valera, E., & Marco, M.-P. (2011). Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(3), 541-553. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.006>
- Sawant, A. A., Sordillo, L. M., & Jayarao, B. M. (2005). A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2991-2999. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72979-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72979-9)
- Schaller, A. (2009). *Sueros de lechería*. https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/revista/ediciones/44/cadenas/r44_06_SueroLacteo.pdf
- Tamayo, L. V. (2020). Importancia de los residuos de enrofloxacin en cuyes. *Universidad Científica del Sur*. <https://repositorio.cientifica.edu.pe/handle/20.500.12805/1091>
- Trujillo, C. (2019). *Identificación de factores que predisponen el uso de antibióticos en la producción ganadera bovina*. 85.
- Villavicencio, A. (2018). *Relacion entre la ausencia de tratamiento térmico de la leche con la contaminación microbiológica del queso fresco en el catón Píllaro*. [Universidad

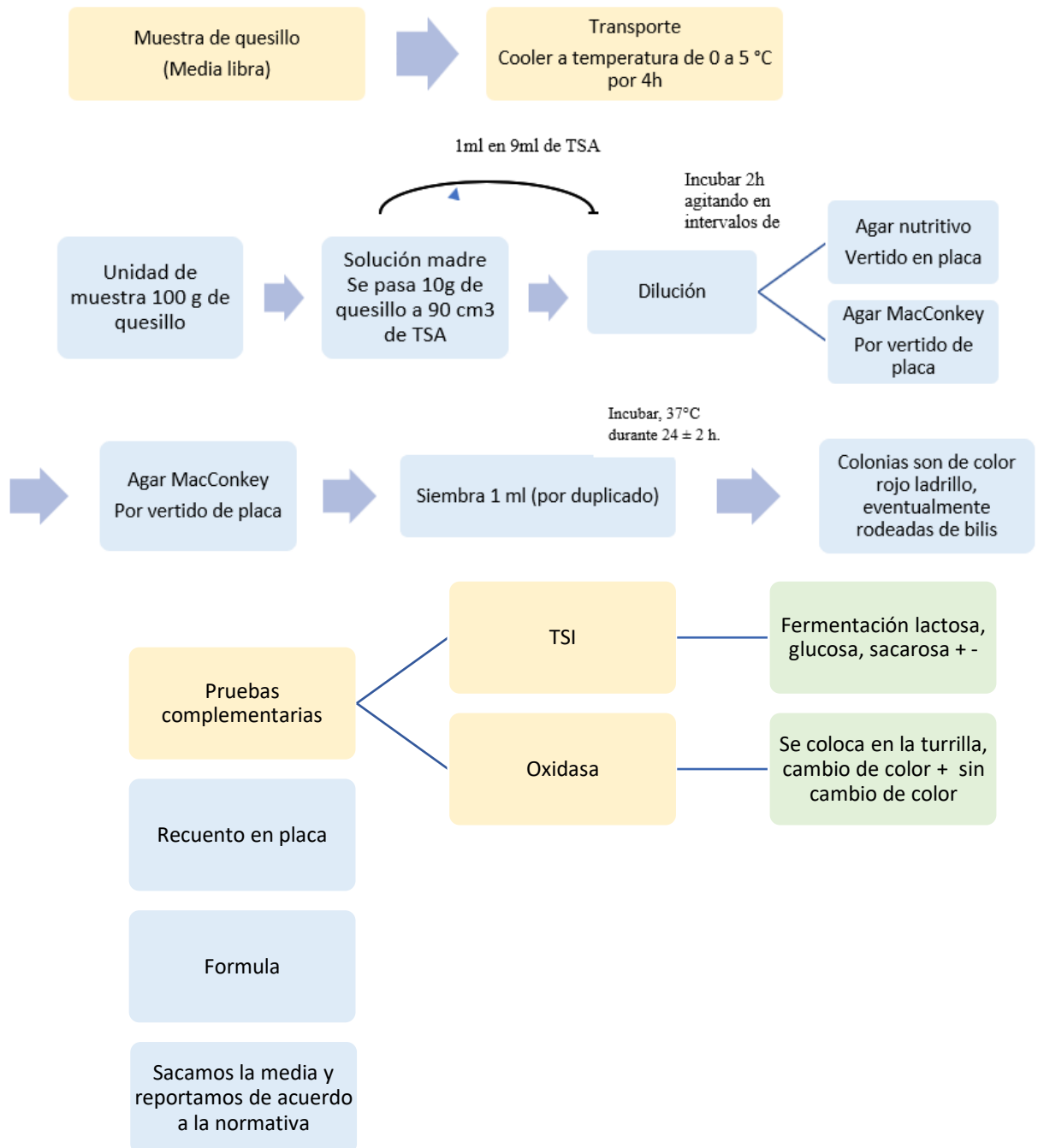
- TécnicadeAmbato].<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3397/3/PAL150.pdf>
- Villegas, L., & Álvarez, L. M. (2018). *Análisis de la frecuencia en la aparición de antibióticos en leche bovina colectada por la empresa ALIVAL*. <https://hdl.handle.net/11059/9509>
- Werth, B. (2022). *Sulfonamidas—Enfermedades infecciosas*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/sulfonamidas>
- Zola, C., & Ernesto, J. (2016). *Efecto de la presencia de enrofloxacin en la leche sobre la elaboraciony características delquesode cabra*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/61100>
- Zúñiga, R., & Lozano, C. (2017). *Revista de Infectología y Microbiología Clínica*. 37. <http://www.amimc.org.mx/wp-content/uploads/2017/11/EIM3-2017w.pdf#page=25>

11 Anexos

Anexo 1. Flujoograma aislamiento de *Staphylococcus aureus*



Anexo 2. Flujoograma aislamiento de recuento de Enterobacterias

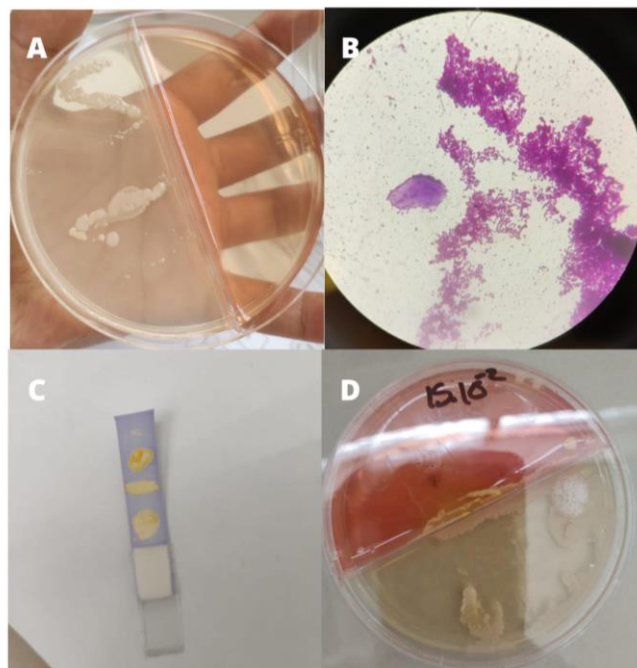


Anexo 3. Análisis de detección rápida de antibióticos Ring Bio



Nota: Procedimiento para la detección de residuos de antibióticos mediante Ring bio, lectura de las tirillas

Anexo 4. Procedimientos realizados para determinar *Staphylococcus aureus*

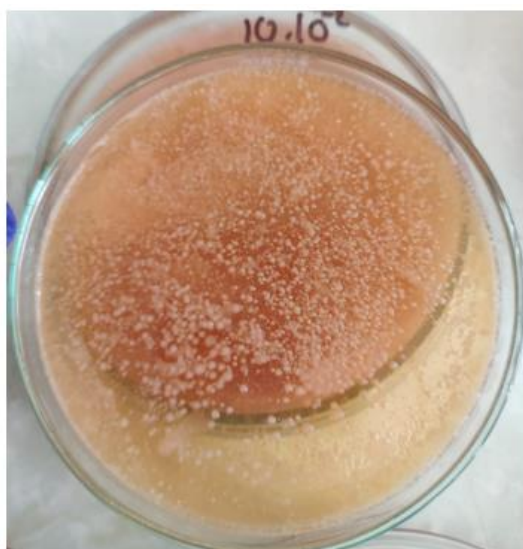


Nota: Determinación de *Staphylococcus aureus*. A. Crecimiento microbiológico en agar Sal manitol, colonias de coloración amarilla. B. Tinción Gram: presencia de bacilos Gram-positivos. Pruebas bioquímicas: C. oxidasa y D. catalasa.

Anexo 6. Pruebas bioquímicas para *Staphylococcus aureus*

Pruebas bioquímicas confirmatorias					
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Posibles positivas	Catalasa	Oxidasa	Coagulasa	T Gram	
9	+	-	-	+	
11	+	-	+	+	
15	+	-	+	+	
19	-	-	+	+	

Anexo 5. Cálculos para la determinación de unidades formadoras de colonias en Enterobacterias



Dilución (10^{-2})

Número de colonias contadas: 1025



Dilución (10^{-3})

Número de colonias contadas: 1150

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

En donde:

c = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas:

V = Volumen inoculado en cada caja Petri;

n1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada:

n2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada:

d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

$$N = \frac{1456}{1(1 + 0,1x1)10^{-2}}$$

$$N = 132363,64$$

$$N = 1,32 \times 10^5$$

Nota: Conteo para determinación de enterobacterias, en muestr

Anexo 7. Crecimiento en placa de Enterobacterias en agar MacConkey

Enterobacterias				
Muestra	Crecimiento en Placa		Resultado	
	Disolución 10²	Disolución 10³	Disolución 10²	Disolución 10³
1	2564	1182	2,33X10 ⁵ ufc/ml	1,07X10 ⁵ ufc/ml
2	2342	1900	2,13X 10 ⁵ ufc/ml	1,73X10 ⁵ ufc/ml
3	2562	1786	2,33X10 ⁵ ufc/ml	1,62X10 ⁵ ufc/ml
4	1456	1276	1,32X10 ⁵ ufc/ml	1,16X10 ⁵ ufc/ml
5	1432	1324	1,30X10 ⁵ ufc/ml	1,20X10 ⁵ ufc/ml
6	1456	1150	1,32X10 ⁵ ufc/ml	1,05X10 ⁵ ufc/ml
7	1230	998	1,12X10 ⁴ ufc/ml	9,07X10 ⁵ ufc/ml
8	1110	935	1,01X10 ⁴ ufc/ml	8,50X10 ⁵ ufc/ml
9	2142	1898	1,95X10 ⁵ ufc/ml	1,73X10 ⁵ ufc/ml
10	1999	1275	1,82X10 ⁵ ufc/ml	1,16X10 ⁵ ufc/ml
11	2835	1678	2,58X10 ⁵ ufc/ml	1,53X10 ⁵ ufc/ml
12	1707	1306	1,55X10 ⁵ ufc/ml	1,19X10 ⁵ ufc/ml
13	1218	1311	1,11X10 ⁵ ufc/ml	1,19X10 ⁵ ufc/ml
14	1465	1167	1,33X10 ⁵ ufc/ml	1,06X10 ⁵ ufc/ml
15	2715	1453	2,47X10 ⁵ ufc/ml	1,32X10 ⁵ ufc/ml
16	2005	1465	1,82X10 ⁵ ufc/ml	1,33X10 ⁵ ufc/ml
17	1452	1432	1,33X10 ⁵ ufc/ml	1,30X10 ⁵ ufc/ml
18	1764	1025	1,60X10 ⁴ ufc/ml	9,32X10 ⁵ ufc/ml
19	2365	1965	2,15X10 ⁵ ufc/ml	1,79X10 ⁵ ufc/ml
20	2543	1008	2,31X10 ⁴ ufc/ml	9,16X10 ⁵ ufc/ml

21	1491	1376	1,36X10 ⁵ ufc/ml	1,25X10 ⁵ ufc/ml
22	1800	1643	1,64X10 ⁵ ufc/ml	1,49X10 ⁵ ufc/ml
23	1987	956	1,81X10 ⁴ ufc/ml	8,69X10 ⁵ ufc/ml
24	2598	2567	2,36X10 ⁵ ufc/ml	2,33X10 ⁵ ufc/ml
25	1689	1245	1,54X10 ⁵ ufc/ml	1,13X10 ⁵ ufc/ml

Anexo 8. Crecimiento en placa de Enterobacterias en agar nutritivo

Crecimiento en placa		
Muestra	Dilución 10³	Resultado
1	987	8,97X10 ⁵ ufc/ml
2	1005	9,14 X10 ⁵ ufc/ml
3	1025	9,32X10 ⁵ ufc/ml
4	1050	9,55X10 ⁵ ufc/ml
5	950	8,64 X10 ⁵ ufc/ml
6	1017	9,25X10 ⁵ ufc/ml
7	987	8,97X10 ⁵ ufc/ml
8	1043	9,48X10 ⁵ ufc/ml
9	1030	9,36X10 ⁵ ufc/ml
10	1013	9,21X10 ⁵ ufc/ml
11	996	9,05X10 ⁵ ufc/ml
12	1097	9,97X 10 ⁵ ufc/ml
13	1000	9,09X10 ⁵ ufc/ml
14	890	8,09X10 ⁵ ufc/ml
15	1019	9,26X10 ⁵ ufc/ml
16	1005	9,14X10 ⁵ ufc/ml
17	987	8,97X10 ⁵ ufc/ml
18	1010	9,18X10 ⁵ ufc/ml
19	965	8,77X10 ⁵ ufc/ml
20	1018	9,25X10 ⁵ ufc/ml

21	876	7,96X10 ⁵ ufc/ml
22	975	8,86X10 ⁵ ufc/ml
23	1010	9,18X10 ⁵ ufc/ml
24	1078	9,80X10 ⁵ ufc/ml
25	989	8,99X10 ⁵ ufc/ml

Anexo 9. Certificado de Inglés

English Speak Up Center

Nosotros "English Speak Up Center"

CERTIFICAMOS que

La traducción del resumen de tesis "DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y CALIDAD MICROBIOLÓGICA STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ENTEROBACTERIAS EN QUESILLOS ARTESANALES DEL CANTÓN SARAGURO." documento adjunto solicitado por la señorita Milena Anabel Ambuludi Hualpa con cédula de ciudadanía número 1150047346 ha sido realizada por el Centro Particular de Enseñanza de Idiomas "English Speak Up Center"

Esta es una traducción textual del documento adjunto. El traductor es competente y autorizado para realizar traducciones.

Loja, 18 de mayo de 2023

Elizabeth Sánchez Burneo
Mg. Sc. Elizabeth Sánchez Burneo
DIRECTORA ACADÉMICA

DIRECCIÓN: SUCRE 707-A ENTRE AZUAY Y MIGUEL RÍOFRIO
TELÉFONO: 099 5263 764