

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Evaluación de la calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR EL:

Bach. CHAMBILLO CACÑAHUARAY, Jose Luis

AYACUCHO - PERÚ

2019

A mis padres; Aída y José Antonio quienes son mi motor y motivo siempre. A mi hermana Jaqueline, por su apoyo incondicional. A mis Amigos por tantos momentos compartidos.

AGRADECIMIENTO

Especial agradecimiento a mi *Alma Máter* la Universidad Nacional de “San Cristóbal de Huamanga” forjadora de profesionales, al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a la Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica y a sus docentes por sus enseñanzas y orientaciones durante mi formación profesional.

A mi Asesor Q.F. Luna Molero, Hugo Roberto, por contribuir en la investigación y por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	7
2.2.1. Leche	7
2.2.2. Queso	7
2.2.3. Calidad de los alimentos	17
2.2.4. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	18
2.2.5. Patologías más comunes relacionadas con ETAs	20
2.2.6. Norma bacteriológica para los alimentos de consumo humano	23
2.2.7. Medios de cultivo bacteriano	24
2.2.8. Reactivos de identificación	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Ubicación	29
3.2. Población	29
3.3. Muestra	30
3.4. Metodología y recolección de datos	30
3.4.1. Métodos instrumentales para la recolección de datos	30
3.4.2. Procedimiento para la recolección de datos	31
3.5. Análisis de datos	34
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1	Composición química del queso fresco.	15
Tabla 2	Clasificación general de los quesos por su contenido de humedad y grasa en extracto seco (GES).	15
Tabla 3	Bacterias indicadoras para el queso fresco.	23
Tabla 4	Distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para <i>Escherichia coli</i> en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.	37
Tabla 5	Distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para <i>Staphylococcus aureus</i> en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.	38
Tabla 6	Distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para <i>Salmonella sp.</i> en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.	39
Tabla 7	Resumen de la distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para cada enterobacteria en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.	40
Tabla 8	Porcentaje de quesos frescos artesanales aptos y no aptos para consumo humano comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.	41
Tabla 9	Comparación de frecuencias de la calidad microbiológica y recuento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella sp.</i> en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.	42
Tabla 10	Condiciones higiénico – sanitarias para la calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Formación del coágulo de caseína de quesos frescos artesanales comercializados en Huamanga, 2019.	10
Figura 2 Elaboración de quesos frescos artesanales, Huamanga, 2019.	12
Figura 3 Comparación de frecuencias no aptas según los mercados comercializados en la ciudad de Huamanga, 2019.	43

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Numeración de organismos <i>Escherichia Coli</i> . Huamanga, 2019.	61
Anexo 2	Numeración de <i>Staphylococcus Aureus</i> (coagulasa positiva). Huamanga, 2019.	62
Anexo 3	Investigación de <i>Salmonella sp.</i> Huamanga, 2019.	63
Anexo 4	Manual de análisis microbiológico de alimentos (DIGESA). Huamanga, 2019.	64
Anexo 5	Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Huamanga, 2019.	65
Anexo 6	Requisitos microbiológicos para el queso fresco según norma técnica peruana. Huamanga, 2019.	66
Anexo 7	Para 3 tubos cada uno 0.1, 0.01 y 0.001 gramos de inóculo, el número más probable (NMPs) por gramo y 95% de intervalo de confianza. Huamanga, 2019.	67
Anexo 8	Sanitización de estufas con clorhexidina en el laboratorio de microbiología. Huamanga, 2019.	68
Anexo 9	licuado de queso fresco con agua peptonada para preparación de diluciones en el laboratorio de microbiología. Huamanga, 2019.	69
Anexo 10	Control de calidad de caldos y agares por 24 horas previo al sembrado de las muestras. Huamanga, 2019.	70
Anexo 11	Reacción de indol con reactivo kovacs a muestras con presencia de gas y resultado positivo para <i>Escherichia coli</i> mediante la formación del anillo rojo. Huamanga, 2019.	71
Anexo 12	Presuntas colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> . Huamanga, 2019.	72
Anexo 13	Resultado coagulasa positivo para <i>Staphylococcus aureus</i> . Huamanga, 2019.	73
Anexo 14	Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en colonias con coloración rosa a rojo. Huamanga, 2019.	74
Anexo 15	Control de calidad del ambiente (laboratorio de microbiología) para <i>salmonella sp.</i> Huamanga, 2019.	75
Anexo 16	Resultados del control de calidad del ambiente (laboratorio de microbiología) para <i>salmonella sp.</i> Huamanga, 2019	76
Anexo 17	Exposición de los quesos frescos a la contaminación del suelo, polvo, sol, animales de los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019	77
Anexo 18	Contaminación cruzada con otros alimentos de los quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019	78

Anexo 19	Uso de indumentaria y protección de los quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019	79
Anexo 20	Matriz de consistencia. Huamanga, 2019.	80

RESUMEN

La calidad microbiológica de los alimentos es fundamental porque influye en su conservación y principalmente porque los microorganismos presentes en ellos, pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. La presente investigación es de tipo descriptivo que tiene por objetivo evaluar la calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018. Las muestras fueron analizadas en el área de microbiología que pertenece al Centro de Investigación en Bioquímica Clínica y Molecular de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; UNSCH, durante los meses de abril a julio del 2019. Aquí se evaluó la carga microbiana de *Escherichia coli* mediante tubos múltiples de fermentación y número más probable (NMP), *Staphylococcus aureus* a través de recuento en placa y *salmonella sp* por aislamiento e identificación; según DIGESA. Para *E. coli* se obtuvo 85,9 % dentro del límite microbiológico y 14,1 % fuera del límite, *S. aureus* 68,75 % dentro del límite y 31,25 % fuera de él, asimismo para *salmonella sp*. 70,3 % dentro del límite permitido y 29,7 % fuera del mismo; límites establecidos por la legislación peruana: NTP 202.195:2004 y NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01. Tras la evaluación de la calidad microbiológica, se concluyó que los quesos frescos artesanales comercializados en la ciudad de Huamanga no son aptos para consumo humano; donde el 53,1 % contiene al menos un microorganismo que sobrepasa los límites microbiológicos de acuerdo a las normas establecidas.

Palabras Clave: queso fresco, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella sp*. Huamanga.

I. INTRODUCCIÓN

El queso fresco artesanal, es un derivado lácteo importante en nuestra dieta y ampliamente consumido en Perú, se expende en cantidades apreciables en los diferentes mercados de la región, donde el público consumidor generalmente no conoce la procedencia, ni la elaboración la cual se realiza sin la debida calificación técnica¹. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son producidas por la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas con agentes químicos o microbiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor a nivel individual o en grupos de población. Millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres². El Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos, del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ), informó que en el Perú entre los años 1993 y 2001 se registraron 12 brotes de enfermedades producidas por el consumo de productos lácteos, los cuales comprendieron 11,5 % del total de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en esos años. Estos brotes afectaron a 1278 personas (de ellas, 24 fallecieron). Entre los agentes causales se encontraban *Salmonella spp.* (30,2 %), *S. thipy* (9,5 %), *Staphylococcus aureus* (1,6 %), *Shigella spp.* (1,6 %), *Shigella sonnei* (1,6 %). En general, el 58,7 % de los brotes fueron causados por bacterias². La elevada carga bacteriana presentes en el queso fresco, se debe principalmente a que este, es un alimento que otorga las condiciones adecuadas para el crecimiento acelerado de cualquier tipo de bacteria que llegue al producto, constituyendo un excelente sustrato para la proliferación de microorganismos como: *Salmonella sp*, *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otros; la presencia de estas bacterias en el alimento, son las causantes de muchas intoxicaciones alimentarias, causadas ya sea por microorganismos patógenos o por las toxinas que esos producen³.

Muchos de los quesos frescos comercializados en el país y en especial los de producción artesanal, son puestos a la venta en expendios ambulatórios, mercados, etc., los cuales presentan elevada carga microbiana, que refleja las deficiencias higiénicas en la manipulación y conservación del producto, representando un riesgo para la salud del consumidor⁴. Los resultados del presente estudio servirán como alcance para futuros estudios en calidad microbiológica de alimentos como el queso fresco artesanal, también se perseguirá apoyar a las instituciones interesadas en el tema, mediante la incorporación de estos conocimientos, y así adopten las medidas y precauciones en el proceso de elaboración y/o expendio de este producto, los cuales se consumen popularmente en la ciudad de Huamanga, asimismo cuidar de la salud pública evitando las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA). Para el análisis se usó los métodos de tubos múltiples de fermentación y número más probable (NMP) para *E. coli*, recuento en placa para *S. aureus* y aislamiento e identificación para *salmonella sp.* que consta en el manual de análisis microbiológico de alimentos (DIGESA). El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga cuyos resultados quedan plasmados en este informe. Como resultado de un estudio a nivel descriptivo, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Evaluar la calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018.

Objetivo específico

- Determinar el recuento de organismos de *Escherichia coli* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018.
- Determinar el recuento de colonias de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018.
- Determinar la presencia de colonias de *Salmonella sp.* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Lloisy⁵, en el año 2017 realizó el estudio “Evaluación fisicoquímica y microbiológica de queso elaborado en las localidades de Leymebamba, Molinopampa y la Florida-Pomacochas, Región Amazonas”, para el estudio se recolectaron 16 muestras de 200 g aproximadamente en diferentes centros de expendio. Las muestras fueron analizadas según los métodos: Para la cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios se utilizó el método de recuento en placa, la determinación de presencia y/o ausencia de entero bacterias, el método de siembra en placa y la técnica de siembra por estría, en la cuantificación de bacterias coliformes, el método de tubos múltiples de fermentación y la técnica del número más probable, para *salmonella* y *s. aureus*, el método de análisis establecido en el manual de análisis de microbiología de alimentos DIGESA el cual concluyeron que la calidad higiénico sanitario de los quesos fresco elaborado en las localidades presentan condiciones inadecuadas y no cumplen con las normas y regulaciones sanitarias vigentes, así el 18,75 % tienen un recuento inferior a 104 y el 81,25 % presentan un recuento superior a 105 UFC/g de bacterias mesófilos viables, lo que indica el uso de materias primas contaminadas, condiciones inadecuadas de procesamiento y conservación. El 100 % presenta enterobacterias. Para coliformes totales se encontró 1100 NMP/g como máximo y 335 NMP/g como mínimo, para coliformes fecales se encontró un mínimo de 11 y máximo de 1100 NMP/g. Asimismo, ausencia de *Salmonella sp* y *Shigella*. El recuento de *S. aureus*, en todas las muestras de quesos frescos superan 103 UFC/g, de este el 50 % superan 105 UFC/g, recuento que indica un peligro para el consumidor, por la posible presencia de enterotoxinas. Asimismo, del análisis microbiológico se concluye que el queso fresco procedente de Florida - Pomacochas reúne mejores condiciones microbiológicas, presenta una densidad microbiana mínima de coliformes totales (690 ± 78 NMP/g) y fecales (194 ± 101

NPM/g) en comparación a las localidades de Leymebamba y Molinopampa, el 42,9 % superan un recuento de 105 UFC/g de *staphylococcus*. En Molinopampa, las muestras presentan un recuento de 1100 NMP/g, sin embargo, hay diferencias en cuanto al recuento de coliformes fecales, se observa un recuento máximo de 850 NMP/g y un mínimo de 14 NMP/g, todas las muestras superan un recuento de 105 UFC/g de *S. aureus*. En Leymebamba, los recuentos de bacterias aerobias mesófilos viables superaron 104 UFC/g, y para *S. aureus* el 20 % supera un recuento de 105 UFC/g.

Trujillo⁶, en el año 2016 realizó el estudio “Análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expende en el mercado de Santa Rosa, ciudad de Riobamba”, en este estudio los materiales y métodos utilizados en las determinaciones fueron de Petrifilm 3M, los cuales son acreditados por las norma internacional Association of Official Agricultural Chemist (AOAC), las cuales también elaboran y validan los procedimientos utilizados por las normas NTE INEN, esto significa que los resultados son válidos y equivalentes a ser obtenidos por los procedimientos enunciados en las normas nacionales, en el concluyeron que mediante la determinación de las UFC/g de cada uno de los microorganismos en estudio en el queso fresco, el 100 % presentan contaminación con *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli* encontrándose todos por encima del máximo permisible por la norma NTE INEN 1528:2012, la cual indica para *Staphylococcus aureus* 102 UFC/g, para *Escherichia coli* 10 UFC/g, y el valor establecido para coliformes totales por la norma Nicaragüense NTON 03 022 - 99 norma de quesos frescos no madurados en donde el límite es 500 UFC/g, la comparación entre los recuentos y los valores establecidos en las respectivas normas se realizó por medio del Test T para una muestra en el Software Estadístico SPSS Statistics de IBM, el cual indicó que todos los recuentos de los microorganismos se encuentran significativamente por encima de los Índices máximos permisibles para el consumo humano.

Cueva⁷, en el año 2017 realizó el estudio “Evaluación de la calidad microbiológica de los quesos frescos que se expenden en los mercados del distrito de Tacna, julio – octubre, 2016”, en este estudio se tomaron 41 muestras de queso fresco (de leche de vaca) con un peso aproximado de 200 g cada una, las cuales fueron adquiridas en 11 mercados municipales del distrito de Tacna. Se evaluó la carga microbiana de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* siguiendo la metodología de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos

(ICMSF); mientras que, para coliformes y *Escherichia coli* se utilizó el método Petrifilm. Como resultado se encontró, coliformes totales en un 68,3 % (28 muestras), *E. coli* 70,70 % (29 muestras), *S. aureus* 63,4 % (26 muestras). No se detectó *Salmonella* en ninguna de las muestras. Se concluyeron que el 73,2 % (30) de las muestras excede el límite microbiológico permitido según la norma técnica sanitaria NTS N° 071 - MINSA/ DIGESA.

Haro⁸, en el año 2016 realizó el estudio “Análisis microbiológico de los quesos frescos comercializados en el mercado Simón Bolívar (San Alfonso) de la ciudad de Riobamba”, en este estudio el muestreo consistió en analizar los quesos frescos de siete puestos de comercialización, el cual se realizó por triplicado para cada muestra durante tres sábados consecutivos en el mes de diciembre del 2015 correspondientes 5-12-19, tomando como referencia la norma NTE INEN 0004:1984. Para la cuantificación de la carga microbiana se analizó coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y Aerobios mesófilos; mediante las técnicas de detección cualitativas por Petrifilm TM y la norma técnica ecuatoriana de control microbiológico de los alimentos. Para la determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable; se manejó mediante el procedimiento de diluciones sucesivas para facilitar la cuantificación (10^{-1} hasta 10^{-3}), posterior a la incubación y presencias de unidades formadoras de colonias UFC/mL se hicieron pruebas confirmatorias de los microorganismos en agar manitol, eosina azul de metileno y Plate count agar. Los resultados obtenidos de la investigación fueron : bacterias aerobias mesófilas ($6,29 \times 10^3$; $4,96 \times 10^6$; $1,43 \times 10^6$ UFC/mL); conteo de *Staphylococcus aureus* ($4,29 \times 10^3$; $1,73 \times 10^5$; $6,99 \times 10^4$ UFC/mL); número de coliformes totales ($4,19 \times 10^4$; $1,19 \times 10^5$; $2,29 \times 10^5$ UFC/mL); número de *Escherichia coli* ($1,13 \times 10^4$; 3×10^4 ; $1,46 \times 10^5$ UFC/mL) valores que comparados frente a los valores de referencia que muestra la norma NTE- INEN 1528-2012, se encuentran en valores mayores a los límites microbiológicos establecidos. Se concluyeron que la carga microbiana presente en los quesos frescos excede los límites permitidos por la norma correspondiente, por lo tanto, estos productos no son aptos para el consumo humano, por la mala calidad de los mismos.

Condo⁹, en el año 2016 realizó el estudio “Determinación de la calidad bacteriológica en quesos frescos artesanales que se expenden en el mercado Andrés Avelino Cáceres en la ciudad de Arequipa, mayo – agosto 2015”, en este estudio las muestras se adquirieron al azar mediante la compra de un queso fresco

artesanal de 100 g de cada puesto de venta, el cual fue colocado en una bolsa de polietileno de primer uso, debidamente rotulado. Seguidamente se llevaron las muestras al laboratorio. Se concluyeron que mediante el método del número más probable (NMP/10 g) la presencia de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* en las muestras de queso fresco, presentaron valores promedios menores a los parámetros establecidos por la norma de $5,43 \times 10^2$ NMP/10 g, $5,38 \times 10^2$ NMP/10 g. *Escherichia coli* presentó valores superiores al límite máximo establecido por la norma cuyo valor promedio fue $3,69 \times 10^2$ NMP/10 g, siendo este, un alimento inaceptable y de riesgo para la salud de las personas que lo adquieran. Para *Staphylococcus aureus* se usó el método de unidades formadoras de colonias (UFC/10 g), la que obtuvo valores superiores a la norma de $1,509 \times 10^3$ UFC/10 g y para *Salmonella sp.* no hubo registro de esta bacteria en los quesos frescos estudiados.

Espinosa¹⁰, en el año 2015 realizó el estudio “Evaluación sanitaria del queso fresco artesanal en el ejido Chihuahua, la Trinitaria, Chiapas, México”, en este estudio se recolectaron muestras de 50 g de queso fresco artesanal en los expendios en el ejido Chihuahua, La Trinitaria, Chiapas. Se determinó la presencia de coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* a partir de quesos frescos elaborados con leche de vaca sin pasteurizar para evidenciar deficiencias higiénicas en el procesamiento y comercialización. Se obtuvo como resultados: coliformes fecales con 1100 UFC/g por cada una de las muestras, *Staphylococcus aureus* con menos de 100 UFC/g, no se encontraron *Salmonella* ni *Listeria monocytogenes*. A pesar que *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* se encuentran dentro de los límites establecido en norma NOM-243-SSA1-2010; se concluyeron que la elevada cantidad de bacterias coliformes fecales encontrados indican malas prácticas de higiene en su elaboración, haciéndolos no aptos para consumo humano.

Caldas y Ogeerally¹¹, realizaron el estudio “Microorganismos indicadores de interés sanitario en queso artesanal tipo “telita”. Upata, municipio piar, estado Bolívar, septiembre - octubre 2008”, en este estudio se analizaron 30 muestras de quesos artesanales tipo “telita” y se determinaron el recuento de *estafilococos* coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus*) según la norma venezolana COVENIN 1292- 89 como indicador de manipulación, el número más probable (NMP) de bacterias coliformes según la norma venezolana COVENIN 1104-96 y

la presencia de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal. Como resultado se obtuvo que no hubo presencia de *S. aureus*, todos los crecimientos bacterianos correspondieron a *Staphylococcus* coagulasa negativo y los recuentos más elevados estuvieron en el orden de hasta 10⁴ diluciones decimales; los coliformes totales mostraron recuentos elevados (desde 10³ hasta ≤10⁵) y los coliformes fecales desde 10 hasta ≤10⁴ NMP/g. *Escherichia coli* estuvo presente en el 43,3 % de los quesos analizados. Se concluyeron que el queso artesanal tipo “telita” que se expende en los alrededores de Upata, estado Bolívar, evidencia fallas en la manipulación e higiene posterior a su elaboración; y por no cumplir con la norma sanitaria, se considera un producto de alto riesgo microbiológico para el consumidor.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. Definición de leche

Es el producto fresco del ordeño de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exento de calostro y que cumple con las características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas. Asimismo, la leche es una emulsión aceite en agua con los glóbulos grasos dispersados en la fase continua del suero, o una suspensión coloidal de las micelas de la caseína, proteínas globulares y partículas lipoproteicas. Por otra parte, es uno de los alimentos más completos que se encuentra en la naturaleza, por ser rica en proteínas, grasas, vitaminas y minerales, necesarias para la nutrición humana¹².

2.2.2. Definición de queso

Se entiende por queso al producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos

ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o técnicas de elaboración que comportan 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 que el producto definido en el apartado anterior¹³.

2.2.3. Queso fresco

Es el producto obtenido por coagulación de la leche pasteurizada, integral o parcialmente descremada, constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel más o menos deshidratado, que retiene un % de la materia de grasa, según el caso, un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales.

La producción de queso fresco consiste esencialmente en la obtención de la cuajada, que no es más que la coagulación de la proteína de la leche (caseína) por la acción de la enzima renina o cuajo¹⁴.

2.2.4. Características físico - químico del queso

En el Perú, el consumo de queso fresco, se ha incrementado, llegando al 75 % en relación al consumo de quesos madurados; esto debido a su bajo costo, a sus características nutricionales y usos variados¹⁵.

Los quesos frescos tienen un alto contenido de humedad y no han sufrido proceso de maduración, por lo que pueden tener sabor a leche fresca o a leche acidificada. Su consistencia suele ser pastosa y su color blanco. Por tener un alto contenido de humedad en la pasta (45 - 80 %), su tiempo de vida útil resulta corto, debiendo ser consumidos en pocos días. Su transporte y conservación debe hacer a temperatura de 4 – 10 °C; aun manteniendo la cadena de frío son altamente perecederos¹⁶.

Las proteínas son biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos, compuestas por carbono, hidrógeno y nitrógeno que representan el valor nutritivo de los productos concentrados como el queso. La caseína es la proteína más importante de la leche, que representa más del 80 % de sus proteínas totales, la lactoalbúmina y lactoglobulina constituyen las proteínas séricas principales que son arrastradas en el lactosuero¹⁷. El queso fresco de vaca según el centro nacional de alimentación y nutrición debe contener 17,5 % y un queso mantecoso 28 % en contenido de proteínas¹⁸.

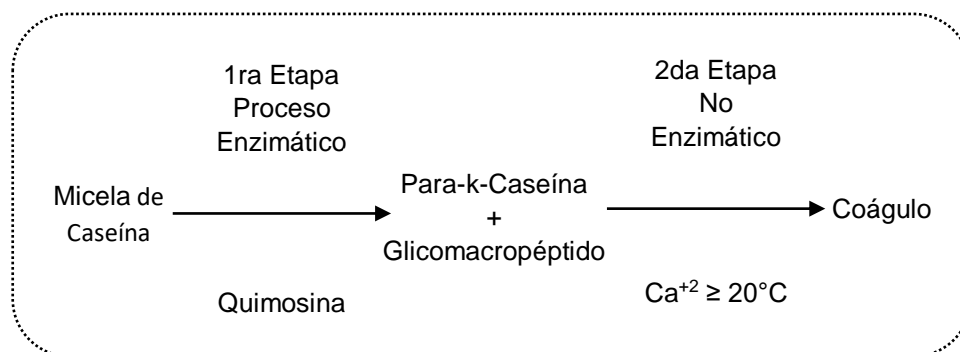
La coagulación de la leche genera la eliminación de suero lácteo, arrastrando también una parte de elementos solubles y proteínas no coaguladas de la leche (lactoalbúmina y lactoglobulina); sin embargo, al precipitar las proteínas, arrastran también moléculas de grasas. La grasa en la leche se encuentra distribuida en forma de glóbulos grasos, constituida fundamentalmente por triglicéridos, y en pequeñas cantidades por mono glicéridos, di glicéridos, ácidos grasos libres y otros lipoides como los fosfolípidos, carotenoides, etc. que contribuyen en la textura, sabor y color del queso, la zona superficial o membrana está compuesta por muchos componentes como agua, proteínas, fosfolípidos, glicéridos, ácidos grasos, esteroides, enzimas, etc. En los quesos, que tienen un tiempo de maduración y o almacenamiento, antes del consumo, la materia grasa sufre transformaciones que aportan características especiales, organolépticas y físicas que mejoran la consistencia y al rendimiento quesero. Los cambios sensoriales se deben a la lipólisis enzimática de los glicéridos de la leche a ácidos grasos libres generada por el metabolismo de la lipoproteína lipasa presente en la leche cruda y esteroides en los quesos elaborados con cuajo, ácidos grasos que pueden ser precursores de la síntesis de ésteres, lactonas y metilcetonas que se asocian a diversos sabores; en cuanto a la mejora del rendimiento quesero, elaboraron queso a partir de leche estandarizada con dos niveles diferentes de grasa: 0,9 y 5,1 %, estas al ser empacadas al vacío y almacenadas a 4 °C alrededor de 60 días, determinaron que la concentración de grasa no influye en el tiempo de vida útil sensorial pero si genera cambios sensoriales favorables de sabor, aroma, textura agradable asociado probablemente a la disminución de pH e hidrólisis de la caseína, además de mejorar el rendimiento quesero hasta un 33 % más que el semigraso.

El agua y la lactosa que queda en el queso influye en la textura y primordialmente en el crecimiento microbiano debido a la actividad de agua y fuente de carbonos, el que representa un sustrato rico para la síntesis de ácido láctico ($C_3H_6O_3$) generando desuerado y ablandamiento de la pasta del queso, determinando así el tiempo de conservación o vida útil y maduración del alimento¹⁹.

2.2.5. Elaboración del queso

El proceso de elaboración del queso es bastante simple, no obstante, involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos. Se trata esencialmente de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la proteína caseína por la acción enzimática o por acción de un ácido (comúnmente ácido láctico)²⁰.

El paso indispensable en la elaboración de los quesos, es la coagulación de la caseína, provocada mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas (cuajos de distintos tipos) y calcio. El proceso de formación del coágulo incluye 2 etapas.



Fuente: Jay J. Microbiología moderna de los alimentos (2009)²¹.

Figura 1: Formación del coágulo de caseína de quesos frescos artesanales comercializados en Huamanga, 2019.

En la primera etapa, se desarrolla un proceso enzimático modulado por la quimosina, la cual rompe los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met-106) presentes en la k-caseína, liberándose el glicomacropéptido en la solución.

En la segunda etapa, los agregados de para-k-caseína producen el coágulo. Hasta la etapa de coagulación, los procedimientos básicos en la elaboración de los diferentes tipos de quesos son muy similares; sin embargo, las etapas siguientes varían de acuerdo con el tipo de queso a producir²¹.

a. La materia prima y la estandarización

La mayoría de los quesos se elaboran a partir de leche de vaca; sin embargo, también se utilizan las leches de cabra, oveja, yegua, etc. La composición de la leche depende de algunos factores, como la raza del animal, la hora del ordeño, el periodo de la lactancia, la época del año y el tipo de alimentación del animal, por lo que debe ser estandarizada antes de iniciar el proceso. Generalmente, se ajustan los contenidos de grasas y de proteínas para que cumplan con los requerimientos mínimos de las normas vigentes. El contenido de proteínas se complementa añadiendo caseinatos²².

b. La pasteurización

La pasteurización brinda tanto ventajas como desventajas en el proceso de elaboración de queso. La leche debe ser sometida a un tratamiento térmico, antes

de ser procesada, para eliminar los microorganismos patógenos y facilitar el desarrollo del cultivo láctico; sin embargo, este tratamiento reduce el poder de coagulación de la leche e induce la precipitación de las proteínas, lo que puede causar problemas en el desuerado. Para disminuir al máximo los inconvenientes, se recomienda reducir el tratamiento térmico: realizarlo a una temperatura entre 62 y 65 °C, durante un tiempo entre quince y veinte segundos²².

c. La inoculación y la fermentación

La adición de cultivos lácticos o iniciadores durante esta etapa tiene como finalidad producir ácido láctico para acidificar la leche. La presencia del ácido favorece la coagulación de la leche cuando se adiciona la renina e influye en la textura, el aroma y la vida útil de los quesos.

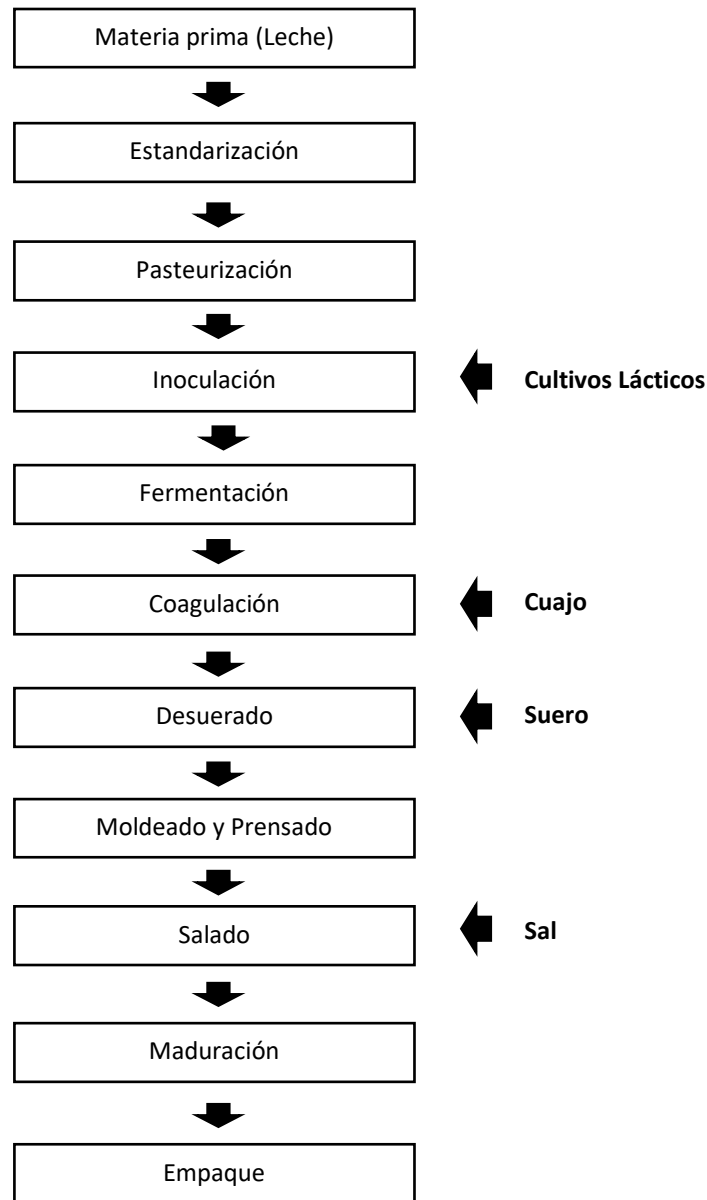
El cultivo iniciador que se agrega depende del tipo de queso que se va a elaborar. Si el queso es de pasta blanda se usan cultivos de acidificación rápida, como el compuesto por *Lactococcus lactis*, subespecie *lactis* y *Lactococcus lactis*, subespecie *cremoris*. Para obtener quesos de pasta dura y firme, se utilizan cultivos con capacidad proteolítica y lenta producción de ácido, por ejemplo, el formado por *Lactobacillus casei* y *Leuconostoc citrovorum*.

Antes de la inoculación de los cultivos iniciadores, es necesario ajustar la temperatura de la leche entre 28 y 32 °C, que es el intervalo óptimo para el crecimiento de los microorganismos. La concentración en la que se adicionan estos cultivos depende del tipo de queso por obtener y varía entre el 1 y el 6 % de la cantidad de leche que se desea fermentar. El tiempo de incubación a estas temperaturas oscila entre los 15 y los 60 minutos, y finaliza cuando se alcanza un pH entre 6,5 y 5,9²².

d. La coagulación

La coagulación de la leche consiste en la desestabilización o desnaturalización de las proteínas de la leche. Se puede realizar de dos formas: agregando ácidos (produciéndolos por vía microbiana) o enzimas. Algunos factores que afectan la coagulación son la temperatura, el pH y los contenidos de calcio y de fosfato de la leche.

Coagulación ácida: ocurre por la acumulación de ácido láctico producido por la fermentación; sin embargo, la cuajada que se obtiene por este método es desmenuzable y sin cohesión. También se efectúa por adición de otros ácidos, generalmente orgánicos.



Fuente: Hernández, A. Microbiología industrial²².

Figura 2: Elaboración de quesos frescos artesanales, Huamanga, 2019.

Coagulación enzimática: es la más frecuente. Se lleva a cabo por la adición de un conjunto de enzimas, denominado renina o cuajo común, extraído generalmente del estómago de los terneros. La mezcla está compuesta principalmente por las enzimas quimosina y pepsina. En la actualidad, se utilizan otras enzimas proteolíticas, como las pepsinas bovinas y porcinas, y las de origen microbiano “cuajo microbiano” que provienen, sobre todo, de los hongos *Mucor pusillus* o *Mucor miehe*. Antes de adicionar el cuajo, es conveniente ajustar la

temperatura de la leche entre 30 y 40 °C, intervalo óptimo de actividad de estas enzimas. Una vez agregado el cuajo, la leche se deja en reposo por un periodo de veinte a treinta minutos, que es el tiempo requerido para su coagulación. Para ayudar al proceso, se adiciona cloruro de calcio en una concentración entre 0,1 y 0,2 g/L de leche, ya que, al aumentar el calcio disponible, se favorece la precipitación de las proteínas.

Hasta la etapa de coagulación, los procedimientos básicos en la fabricación de los diferentes quesos son muy similares; sin embargo, las etapas siguientes varían de acuerdo con el tipo de queso por producir²².

e. El desuerado o escurrimiento

Una vez que la leche se ha coagulado, se debe cortar el coágulo. Primero, se hacen cortes en forma vertical y, luego, en forma horizontal hasta que la cuajada queda convertida en cubos pequeños. Este procedimiento ayuda a eliminar el suero, por el aumento que se logra en la superficie.

Además del corte de la cuajada, otros factores que contribuyen al desuerado son el aumento en la temperatura y la agitación. El calentamiento debe ser un proceso lento, aproximadamente 1 °C cada dos o tres minutos, pero depende del tipo de queso que se fabrique. La agitación se empieza cinco o diez minutos después de la coagulación de la leche y debe realizarse a una velocidad suficientemente alta para impedir que los cubos de cuajada estén en contacto, pero no tanto como para que se rompan²².

f. El moldeo y el prensado

El moldeo tiene como finalidad dar forma al queso y ayudar a que los gránulos de cuajada se aglomeren. Los moldes pueden ser redondos, cuadrados, cilíndricos o alargados. El prensado se realiza para endurecer la masa de queso y eliminar el exceso de suero.

Generalmente, el moldeo y el prensado se ejecutan utilizando el mismo equipo, pues los moldes tienen dispositivos que ejercen presión sobre el queso.

La presión que se ejerce y el tiempo de aplicación dependen del tipo de queso. Si se elaboran quesos blandos o semiblandos no es necesario aplicar presión, pues es suficiente con la que provoca el peso del queso. Este procedimiento se conoce como autoprensado y puede durar hasta veinticuatro horas. Es necesario, cada cierto lapso breve de tiempo, darle vuelta al queso para lograr que adquiera la consistencia deseada. Cuando se va a producir un queso de consistencia más dura, se utiliza las prensas neumáticas. Al usarlas, se debe controlar la presión

que se ejerce, pues si es muy alta se pueden romper los gránulos en lugar de endurecer la masa de queso²².

g. El salado

El salado de los quesos tiene varias funciones:

- Proporcionar sabor al producto (es la principal)
- Evitar la proliferación de microorganismos
- Ayudar al desuerado
- Contribuir a la formación de la corteza del queso.

En el proceso, se utiliza sal cristalizada o salmueras de diferentes concentraciones, de acuerdo con el tipo de queso. La sal cristalizada se esparce en la superficie del queso para que se disuelva con el agua superficial y se difunda, poco a poco, hacia el interior del queso. El salado por este método puede durar desde veinticuatro horas hasta varios meses; el queso se debe voltear diariamente para lograr una mejor distribución de la sal. Si se utiliza una salmuera, su concentración de sal debe oscilar entre el 14 y el 16 % p/p para quesos blandos y entre el 22 y el 24 % para quesos duros. Los quesos se sumergen en la salmuera, procurando que no queden partes expuestas en la superficie²².

2.2.6. Composición del queso

El agua contenida en el queso se elimina en una proporción distinta en cada variedad de queso, llevándose con ella una parte de los elementos solubles como las sales minerales y las proteínas no coaguladas que contienen leche. El agua que queda retenida en el queso desempeña una función muy importante: ya que es indispensable para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos y acondiciona la velocidad de las fermentaciones y la maduración, así como el tiempo de conservación, la textura y el rendimiento del proceso de elaboración del mismo.

El contenido graso tiene una gran influencia en la textura, el sabor, rendimiento y en el color del queso. La lactosa es un sustrato para la formación de ácido y por ende ésta interviene en la coagulación de la leche con la cual se elaborará el queso, el desuerado y la textura de la cuajada, y también en el crecimiento de los microorganismos.

La caseína genera múltiples compuestos aromáticos que caracterizan la percepción del olor del queso. Las proteínas encontradas en el suero quedan incluidas en la cuajada y por supuesto contribuyen al valor nutricional del queso y tiene gran importancia en el proceso de la maduración del mismo.

Los minerales influyen en la coagulación de la leche y modifican sobre el desuerado y la textura del queso²³.

La composición química se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 1: Composición química del queso fresco.

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Agua	45-65
Grasa	17-26
Proteína	15-25
Carbohidratos	2-3,5
Sales Minerales	2-4,5

Fuente: Aminot J. (2010)²³.

2.2.7. Clasificación de los quesos

Tabla 2: Clasificación general de los quesos por su contenido de humedad y grasa en extracto seco (GES).

CLASIFICACIÓN DEL QUESO			
Según su consistencia	Humedad (%)	Según su contenido de materia grasa	Grasa en extracto seco (GES),% m/m
Duro	< 36	Extra Graso	≥ 60
Semiduro	36 a 46	Graso	46 a 55
Blando	46 a 55	Semi Graso	25 a 45
Muy Blando	≥ 55	Semidescremado	10 a 25
-	-	Descremado	< 10

Fuente: Manual de productos lácteos industriales (2014)²⁴.

En nuestro país el Perú, los quesos se clasifican de la siguiente forma:

a. Según el proceso de elaboración:

- Quesos frescos.

Ejemplos: Mantecoso, tipo Cajamarca, Fresco, Ucayalino, Mozzarella, Cottage cheese.

- Queso madurado.

Ejemplo: Andino, Tilsit, Dambo, Gruyere, Parmesano, Camembert, Edam, Gouda, Provolone, Amazónico, Cheddar, Gorgonzola, Cuartirolo.

- Quesos fundidos.

Ejemplo: Queso fundido o procesado untable y para corte (rebanado).

b. Según la consistencia de la pasta:

- Quesos de pasta blanda (contenido de humedad de 52 % a 65 % en base húmeda).

Ejemplo: Camembert, Mantecoso, Ucayalino, Fresco, Mozzarella, Andino, Gorgonzola, Cottage chesse.

- Quesos de pasta semi-dura (contenido de humedad de 39 % a 51 %).

Ejemplo: Tilsit, Dambo, Edam, Gouda, Emmental, Gruyère, Paria.

- Quesos de pasta dura (contenido máximo de humedad de 38 % en base húmeda).

Ejemplo: Parmesano, Provolone, Amazónico, Cheedar.

c. Según el contenido de grasa en el extracto seco total:

- Doble crema: mínimo 60 % de grasa.
- Mantecoso: o crema de 45 % a menor de 60 % de grasa.
- Semi-mantecoso: de 25 % a menor de 45 % de grasa.
- Magro: De 10 % a menor de 25 % de grasa.
- Descremado: menos de 10 % de grasa.

El resultado de las características de cada tipo de queso está en función a varios factores extrínsecos e intrínsecos como son:

- Los factores físicos, fisicoquímicos: El pH, temperatura, y los efectos osmóticos.
- Los factores bioquímicos: Concentración y propiedades de las enzimas del cuajo, de las bacterias, de las levaduras y de los mohos.
- Los factores químicos: Proporción de calcio retenido en la cuajada, contenido de agua y sales.
- Los factores mecánicos: Corte, agitación, trituración y frotamiento.
- Los factores microbiológicos: Composición de la microflora vista bajo un aspecto dinámico.

La composición de los quesos en general presenta una variación de una variedad o tipo a otro, en la mayoría de los casos están definidos por su contenido de extracto seco total (EST) o sólidos totales (ST), que fluctúan desde 25 % hasta 75 %, y en lo referente al contenido de sólidos grasos o materia grasa expresados en base seca (ST), varían de 40 % a 50 % en quesos producidos a partir de leche entera con 3,3 a 3,5 % de materia grasa.

La fase no grasa de los quesos está formado por un 85 a 91 % que corresponde fundamentalmente a sustancias nitrogenadas, las sales y los productos derivados de la lactosa. La sustancia nitrogenada más importante es la caseína, la cual es degradada y se hace parcialmente soluble durante el afinado del queso. La lactosa es transformada en ácido láctico durante los primeros 110 días, luego el ácido desaparece, casi completamente, en los quesos muy maduros o añejados. Las sales minerales determinadas como cenizas varían de 0,9 a 2,6 % en el queso²⁴.

2.2.8. Calidad de los alimentos

La calidad es un concepto que está determinado por la unión de distintos factores relacionados todos ellos con la aceptabilidad del alimento.

En definición es un conjunto de atributos que hacen referencia de una parte a la presentación, composición y pureza, tratamiento tecnológico y conservación que hacen del alimento más o menos gustosa al consumidor y por otra parte al aspecto sanitario y valor nutritivo del alimento²⁵.

2.2.9. Calidad microbiológica de los alimentos

La calidad microbiológica de los alimentos es fundamental porque influye en su conservación y vida de anaquel y, sobre todo, porque los microorganismos presentes en ellos, pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por alimentos o ETAs. La detección de los microorganismos patógenos puede ser muy complicada, muy lenta y/o muy costosa para determinaciones rutinarias. Además, es concluyente cuando se encuentra un microorganismo patógeno, pero puede haber casos en que no se detecte por razones circunstanciales como el clima o la cantidad de individuos infectados que están contaminando, a pesar de que el manejo del alimento implique el riesgo de que el patógeno aparezca en cualquier momento. En todo caso, la investigación de microorganismos patógenos en alimentos no facilita un enfoque preventivo. Por esas razones, las normas en materia de alimentos, generalmente establecen la calidad microbiológica en términos de microorganismos indicadores. Éstos son organismos (o grupos) que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de microorganismos patógenos en alimentos. Además de que su detección en el laboratorio es más sencilla, rápida y/o económica, los microorganismos indicadores permiten un enfoque de prevención de riesgos, puesto que advierten manejo inadecuado y/o contaminación. Los principales microorganismos indicadores en alimentos son:

- Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso: mesófilos aerobios (o cuenta total), cuenta de hongos – levaduras y cuenta de coliformes totales.
- Indicadores de contaminación fecal: coliformes fecales, *E. coli*, *enterococos* y *Clostridium Perfringens*.

La selección de indicadores en un alimento depende fundamentalmente de los riesgos implicados y de lo que se requiera saber para liberar, controlar o mejorar el alimento, manteniendo el enfoque preventivo²⁶.

2.2.10. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las ETAs, son un conjunto de enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos y/o agua contaminados en cantidades suficientes como para afectar la salud del consumidor. Los agentes contaminantes pueden ser: agentes biológicos (bacterias y/o sus toxinas, hongos, virus, parásitos), agentes químicos (plaguicidas, fertilizantes, veneno, etc.), agentes físicos (metales, vidrio, madera, etc.)²⁵.

La contaminación bacteriana suele ser la de mayor frecuencia, el tiempo transcurrido hasta que se manifiesta la enfermedad y los síntomas varían de acuerdo al agente responsable de la contaminación. Los síntomas más frecuentes son vómitos, náuseas, diarrea y fiebre. Las bacterias causantes de enfermedad se llaman bacterias patógenas, no todas las personas tienen la misma sensibilidad frente a estas bacterias, los ancianos, las mujeres embarazadas, los niños y los enfermos son más susceptibles y en ellos los efectos pueden ser más serios.

Muchos microorganismos pueden propagarse en más de una forma, por lo que no siempre se tiene la certeza de que se trata de una enfermedad transmitida por alimentos. La distinción es importante para que las autoridades de salud pública establezcan cómo se está propagando una determinada enfermedad para adoptar medidas apropiadas para detenerla. Por ejemplo, las infecciones por *Escherichia coli* pueden propagarse a través de alimentos contaminados, agua de beber contaminada, piscinas contaminadas y de un niño a otro en guarderías. De la vía de propagación dependerán las medidas de control a aplicar, las cuales podrían variar entre retirar los alimentos contaminados de las tiendas, clorar una piscina o cerrar una guardería²⁶.

2.2.11. Presencia de microorganismos en alimentos

Se encuentran en una gran variedad de alimentos, conocidos como alimentos de alto riesgo y bajo riesgo. Existe también la posibilidad de que los alimentos se hayan contaminado durante su producción o recolección. Otra causa de contaminación se da en el hogar a través del uso de utensilios que fueron previamente utilizados para preparar alimentos contaminados, lo que puede llevar a la contaminación cruzada de los alimentos que se preparan. Los microorganismos presentes en los alimentos pueden ser: de origen endógeno, es decir que se encuentran en el interior de las estructuras del alimento (ej.: presencia de *Salmonella sp.* en huevos y carnes, o *Vibrio sp.* en productos marinos) y de origen exógeno, es decir, que se incorporan al alimento durante su manipulación

y procesado (ej.: los operarios son la fuente más importante de contaminación de alimentos con microorganismos como: *S. aureus* y *E. coli*, debido a que manipulan el producto durante todas las etapas del procesado, obtención, transformación, almacenaje, distribución, etc.). Por otro lado, los utensilios, superficies, y equipos pueden contaminar los alimentos debido a una mala sanitización de los mismos²⁷.

a. Contaminación de alimentos de alto riesgo

Los alimentos de alto riesgo son aquellos listos para comer que, bajo condiciones favorables de temperatura, tiempo y humedad pueden favorecer el crecimiento de bacterias patógenas. Estos alimentos se caracterizan por poseer alto contenido proteico, alto porcentaje de humedad, poseer baja acidez y requerir un control estricto de la temperatura de cocción y de conservación. El riesgo que tienen estos alimentos de sufrir alteraciones o deterioro es alto, por ello se recomienda realizar el manejo cuidadoso de los mismos, durante la compra, almacenamiento y elaboración²⁸.

b. Contaminación de alimentos de bajo riesgo

Son aquellos que permanecen estables a temperatura ambiente y no se echan a perder a menos que su manipulación sea inadecuada. Este grupo comprende alimentos con bajo contenido de agua, ácidos, conservados por agregado de azúcar y sal. El riesgo de sufrir alteración o deterioros es bajo, pero aun así se recomienda realizar un manejo cuidadoso de los mismos, especialmente en el almacenamiento²⁹.

c. Contaminación cruzada directa

La contaminación cruzada se produce cuando microorganismos patógenos, generalmente bacterias, son transferidos por medio de alimentos crudos, manos o utensilios a los alimentos sanos. De acuerdo a cómo esto suceda la contaminación cruzada se puede producir de dos formas:

- Cuando se mezclan alimentos cocidos con crudos en platos que no requieren posterior cocción (ensaladas, platos fríos, tortas con crema, postres, etc.).
- Cuando hay una mala ubicación de los alimentos en el refrigerador. Los alimentos listos para comer, toman contacto con los alimentos crudos y se contaminan. También ocurre cuando los alimentos listos para comer toman contacto con el agua de deshielo de pollos, carnes y pescados crudos²⁹.

d. Contaminación cruzada indirecta

Es la producida por la transferencia de contaminantes de un alimento a otro a través de las manos, utensilios, equipos, mesas, tablas de cortar, etc. Generalmente ocurre por el empleo de utensilios sucios o por mala higiene personal de quien manipula o vende los alimentos²⁷.

2.2.12. Patologías más comunes relacionadas con ETAs

La mayoría de las ETAs son ocasionadas por las bacterias *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *E. coli* y por un grupo de virus llamados calicivirus. Otros microorganismos relacionados con ETAs son: *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*²⁸.

a. Coliformes fecales (CF) o termotolerantes

Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales, capaces de fermentar la lactosa a 44,5 °C. Aproximadamente el 95 % del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella* en menor grado. Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal.

Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas. Esta denominación está ganando más adeptos actualmente, pues sería una forma más apropiada de definir este subgrupo que se diferencia de los coliformes totales por la característica de crecer a una temperatura superior.

La capacidad de reproducción de los coliformes fecales fuera del intestino de los animales homeotérmicos es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad. etc.

b. Enterobacterias

El gran grupo llamado de las Enterobacterias contiene diversos géneros de bacilos pequeños, Gram negativos, no esporulados, que fermentan la dextrosa produciendo ácido o ácido y gas y que son oxidasa negativos. Muchas especies son móviles. La familia recibió este nombre porque la mayor parte de los géneros son comensales o parásitos del intestino de los animales y del hombre. Según Pelczar, los coliformes ocupan las siguientes categorías taxonómicas²⁹:

Reino: Protista

División: Procariote.

Clase: Bacilos anaerobios, facultativos, Gram negativos.

Familia: Enterobacteriaceae.

Género: Escherichia.

Género: Citrobacter.

Género: Klebsiella.

Género: Enterobacter.

Género: Proteus.

Género: Shigella.

Género: Salmonella

Género: Morganella.

Género: Serratia

Género: Yersinia

Las enterobacterias pueden diferenciarse de la mayor parte de los bacilos Gram negativos no esporulados por su capacidad para reducir los nitratos a nitritos²⁹.

Para fines de laboratorio es conveniente dividir las enterobacterias en dos grupos de acuerdo con su capacidad de fermentar la lactosa:

- **Fermentadores de la lactosa:**

Producen ácido y/o gas de este azúcar rápidamente. Los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Enterobacter* se denominan en conjunto bacilos coliformes.

Escherichia coli

Son microorganismos Gram negativos, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, la mayoría de las cepas fermentan la lactosa liberando ácido y gas. Se desarrolla a 44 - 45 °C en medios complejos. Algunas cepas pueden desarrollarse a 37 °C, pero no a 44 – 45 °C y algunas no liberan gas. *Escherichia coli* no produce oxidasa ni hidroliza la urea. Es una bacteria que habita normalmente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, y desempeña un importante papel en la fisiología del intestino. Por ser un habitante regular y normal del intestino se usa desde hace un siglo como "el mejor" indicador de contaminación con materia fecal de los alimentos. Se halla en alimentos que han sufrido contaminación reciente, ya sea de seres humanos, operaciones agrícolas, animales y de aves salvajes. La vía de infección primaria es la ingestión, puede ocasionar gastroenteritis, diarreas y vómitos intensos, deshidratación. Frecuentemente es mortal si no se trata adecuadamente³⁰.

- **No fermentadores de la lactosa:**

Son incapaces de fermentar este azúcar o lo hacen tardía e irregularmente: se incluyen como patógenos. El género *Salmonella* (que puede producir las fiebres intestinales y las intoxicaciones alimenticias), el grupo Arizona, *Shigella* (bacilos de disentería), algunos *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia* y *Hafnia*³¹.

Salmonella sp.

Grupo de especies de microorganismos pertenecientes al género *Salmonella*, son bacterias pertenecientes al género *Salmonella*, familia enterobacteriaceae, se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo, generalmente son móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*), están ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de humanos, mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves y roedores, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Estas bacterias son capaces de sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés por largos periodos de tiempo, pueden resistir la deshidratación, sobrevivir en el suelo y en el agua³².

Las bacterias *Salmonella* causan varios tipos de infección. La mayoría de las veces estas bacterias causan gastroenteritis, pero a veces causan fiebre tifoidea, una infección más grave. Cuando el intestino está infectado, los síntomas comienzan generalmente entre 12 y 48 horas después de la ingestión de las bacterias. Se producen náuseas y cólicos abdominales, seguidos rápidamente por diarrea acuosa, fiebre y vómitos. Por lo general, la *Salmonella* remite en un término de 1 a 4 días. En ocasiones, los síntomas son más graves y duran mucho tiempo.

Staphylococcus aureus

Es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas de 0,8 – 1,0 µm de diámetro, que se divide en más de un plano, por lo que se agrupan irregularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de esporas. Son Gram positivos. Es una especie muy sensible a la acción del calor y de los desinfectantes. Su presencia o la de sus toxinas en los alimentos es signo evidente de falta de higiene. Una característica muy importante de este germen es que sus toxinas pueden ser causa de intoxicación cuando se ingiere con los alimentos. Producen enterotoxinas durante su reproducción en carne, productos lácteos y otros alimentos. En casos típicos, el alimento es de preparación reciente pero no se ha refrigerado en forma adecuada. Hay por lo menos seis tipos distintos de

enterotoxinas. El mecanismo molecular de la acción de la enterotoxina de *S. aureus*, se desconoce. Después que la enterotoxina preformada se ingiere, es absorbida en el intestino, donde estimula a receptores neurales. El estímulo es transmitido al centro del vómito, a menudo en proyectil (vómitos de manera intensa), asimismo pueden producir náuseas, diarreas, pero de corta duración, de varias horas a un día. La toxina actúa rápidamente, manifestándose los síntomas a las pocas horas de haber consumido el alimento contaminado. El envenenamiento alimentario estafilocócico es la forma más común de envenenamiento por alimentos.

En general, la presencia de un número elevado de *Staphylococcus aureus* en un alimento refleja higiene defectuosa por mala manipulación³³.

2.2.13. Norma bacteriológica para los alimentos de consumo humano

Los alimentos deben cumplir íntegramente con la totalidad de los criterios microbiológicos correspondientes a su grupo o subgrupo para ser considerados aptos para el consumo humano, y de acuerdo a la Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA aprueban la Norma Técnica Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, ubicado de esta forma al queso fresco³⁴.

Tabla 3: Bacterias indicadoras para el queso fresco.

Grupo 1: Leche y productos lácteos						
Subgrupo 1.8: Quesos no maduros (queso fresco, mantecoso, ricota, cabaña, crema, petit suisse, mozzarella, ucayalino, otros)						
AGENTE MICROBIANO	CATEGORÍA	CLASE	n	C	LÍMITE POR G	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	5 x 10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	-
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	-

Fuente: Norma técnica sanitaria N° 071 –MINSA -DIGESA³⁵.

“n” (minúscula): Número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote, que se analizan para satisfacer los requerimientos de un determinado plan de muestreo.

“c”: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o número máximo de unidades de muestra que pueden contener un número de microorganismos.

“m” (minúscula): Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a “m”, representa un producto aceptable y los valores superiores a “m” indican lotes aceptables o inaceptables.

“M” (mayúsculas): Los valores de recuentos microbianos superiores a “M” son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

2.2.14. Medios de cultivo bacteriano

El sistema más usado y adecuado para la identificación y cuantificación de microorganismos en una muestra ya sea de alimentos, agua o cualquiera sea ésta, es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio de análisis. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es un medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo propiamente dicho. Se han elaborado más de 10 000 medios de cultivo diferentes para el análisis de éstos.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial, éste debe reunir una serie de características y condiciones como son:

- Temperatura
- Grado de humedad
- Presión de oxígeno
- Grado correcto de acidez o alcalinidad.

Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo que pueda contaminarlo. La mayoría de las bacterias infecciosas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano ya que ese es su medio en el cual producen infecciones. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añadirán otros ingredientes y nutrientes.

El agar es un elemento solidificante gelatinizante muy empleado para la elaboración de medios de cultivo. Se mezcla completamente a la temperatura del agua hervida y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Es importante recalcar que el agar no tiene influencia directa en el crecimiento de las bacterias en el medio de cultivo³⁶.

2.2.15. Tipos de medios de cultivo

a. Medios generales: Son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

b. Medios de enriquecimiento: Son aquellos que favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás.

C. Medios selectivos: Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

d. Medios diferenciales: Son aquellos en los que se pone de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee³⁶.

2.2.16. Caldos de cultivo

a. Caldo EC con MUG

Medio utilizado para el recuento de coliformes, coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* en agua, alimentos y otros materiales.

En el medio de cultivo la tripteína es la fuente de péptidos, aminoácidos y nitrógeno. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable y favorece el desarrollo de bacterias coliformes, las sales biliares inhiben el crecimiento de la flora acompañante Gram positiva, las sales fosfato constituyen un sistema buffer que impide que los productos ácidos originados por la fermentación de lactosa afecten el crecimiento microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico³⁷.

b. Caldo de infusión cerebro corazón

Es un medio líquido de enriquecimiento, indicado su uso para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes nutricionalmente, tanto aerobios como anaerobios.

Es un medio de cultivo nutritivo tamponado, que contiene infusiones de tejidos de cerebro y corazón además de peptonas, que suministran proteínas y otros nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes y no exigentes³⁸.

c. Caldo rappaport – vassiliadis

Medio utilizado para enriquecimiento de especies de *Salmonella spp.* a partir de alimentos, y otros materiales de importancia sanitaria.

Medio de cultivo desarrollado originalmente por Rappaport et y luego modificado por Vassiliadis et en el cual se disminuyó la concentración de verde de malaquita.

Es un medio de cultivo nutritivo que contiene un sistema buffer de fosfatos, alta concentración de sales de magnesio y sodio y la presencia del colorante verde de malaquita (oxalato); que es inhibidora de organismos distintos de la *Salmonella*.

El enriquecimiento selectivo de especies de *salmonella* se debe a la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir y multiplicarse a presiones osmóticas relativamente altas (debido a la elevada concentración de cloruro de magnesio en el medio), a pH relativamente bajos, y porque se suprime el efecto tóxico de verde de malaquita hacia las *salmonellas* debido a la presencia de cloruro de magnesio. La incubación a 41 – 42 °C favorece la selectividad hacia las *salmonellas*³⁹.

2.2.17. Agares de cultivo

a. Agar baird parker

Medio de alta especificidad diagnóstica, selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positiva en alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.

Medio altamente nutritivo, en el cual la peptona de caseína y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los *estafilococos*. El agar es el agente solidificante. Permite el crecimiento selectivo de *estafilococos* ya que el telurito de potasio y el cloruro de litio inhiben el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra. La yema de huevo permite demostrar la actividad lecitínica de los microorganismos.

Los *estafilococos* coagulasa positiva reducen el telurito a telurio y originan colonias de color grisáceo-negro, y tienen actividad lecitínica, por eso actúan sobre la yema de huevo produciendo un halo claro alrededor de la colonia⁴⁰.

b. Agar diferencial de *salmonella*

El Agar diferencial de *salmonella* es una ligera modificación de la formulación original de Rambach utilizada para la diferenciación de especies de *Salmonella* de *Proteus* y otras bacterias entéricas. La producción de ácido a partir de propilenglicol es una característica novedosa de las especies de *Salmonella* y se utiliza en estos medios. Muchos de los medios como SS Agar, XLD Agar recomendados para la identificación y diferenciación de especies de *Salmonella* se basan en la fermentación de lactosa y la producción de sulfuro de hidrógeno.

La peptona especial y extracto de levadura proporciona compuestos carbonosos, nitrogenados, aminoácidos de cadena larga, vitaminas y otros factores de crecimiento que apoyan el crecimiento exuberante de la bacteria. El desoxicolato de sodio inhibe a los organismos Gram positivos que hacen que el medio sea selectivo para los microorganismos entéricos. El indicador BC se vuelve de color rosa en presencia de ácido producido por el propilenglicol. La capacidad de fermentación de la lactosa se determina mediante un indicador que puede detectar la presencia de la enzima β -galactosidasa.

Las bacterias que fermentan la lactosa (productoras de β -galactosidasa) producen una colonia de color azul violeta.

Las *salmonellas* producen ácido a partir del propilenglicol y al combinarlas con el indicador del pH se obtienen colonias típicas de color rojo rosado. Otras bacterias

entéricas Gram negativas forman colonias incoloras. *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis* producen colonias de color rosa a rojo. Se incuba a 35 - 37 °C durante 24 - 48 horas⁴¹.

2.2.18. Medios de enriquecimiento

a. Agua peptonada

Medio utilizado como diluyente y para el enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.

Medio de enriquecimiento no selectivo, en el cual la peptona proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Permite recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos a los que ha sido sometido el alimento. Además, puede ser utilizado como diluyente de muestras en reemplazo de solución fisiológica y como medio base para la fermentación de hidratos de carbono⁴².

b. Agua peptonada tamponada

Medio de cultivo empleado para el preenriquecimiento de microorganismos a partir de diferentes muestras. Es ampliamente utilizado en los protocolos de control higiénico de alimentos para la búsqueda de *Salmonella spp.*

El agua peptonada bufferada mantiene un pH alto durante el período de preenriquecimiento y anula los efectos del daño celular que pueden ocurrir a pH ácido.

En el medio de cultivo, la peptona es la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y los fosfatos forman un sistema buffer que regulan el pH del medio⁴³.

2.1.19. Reactivos de identificación

a. Plasma de conejo oxalato

El plasma de coagulasa de conejo es un plasma de conejo estandarizado, liofilizado, empleado para la detección cualitativa de la enzima coagulasa producida por *Staphylococcus aureus*.

La identificación de los *Staphylococcus* se basa en la morfología de las colonias, las características en cultivo y bioquímicas y el examen microscópico. Sin embargo, la detección de la coagulasa es el criterio más usado para la diferenciación entre las especies⁴⁴.

b. Reactivo kovacs (prueba del indol)

Se utiliza en la determinación de la capacidad de las bacterias para producir indol mediante la desaminación de triptófano.

Una reacción positiva indica la presencia de la enzima triptofanasa que reacciona con el triptófano para producir indol. El indol producido reacciona en medio ácido con el p-dimetilaminobenzaldehído del reactivo de la prueba de indol para formar un compuesto quinoidal de color rojo violeta.

El reactivo contiene 0,5 mL de 5 % de p-dimetilaminobenzaldehído disuelto en una solución de 25 % de ácido clorhídrico y 75 % de alcohol isobutílico⁴⁵.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación en Bioquímica Clínica y Molecular dentro del área de Microbiología de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de abril a julio del 2019.

3.1.1. Ubicación política

- Departamento: Ayacucho
- Provincia: Huamanga
- Distrito: Ayacucho
- Lugar: Avenida independencia con avenida universitaria (módulos)

3.1.2. Ubicación geográfica

- Latitud: 13° 8'51.08"S
- Longitud: 74°13'17.23"O
- Altitud: 2756 msnm aproximadamente.

3.2. POBLACIÓN

La población está constituida por quesos frescos expendidos en ocho mercados de la ciudad de Huamanga, con varios puntos de comercialización cada uno.

3.2.1. Criterios de inclusión

- Quesos de elaboración artesanal a baja escala.
- Quesos listos para ser comercializados (expendio).
- Quesos que han sufrido manipulación por el comercializador y contaminación externa: polvo, radiación solar, etc. al momento de adquirir el producto.

3.2.1. Criterios de exclusión

- Quesos elaborados a escala industrial (empresas).
- Proceso de elaboración del queso previo a su comercialización.

3.3. MUESTRA

64 muestras de queso fresco (de leche de vaca), de 200 g aproximadamente cada una, recolectadas de ocho mercados de la ciudad de Huamanga.

Criterio de muestreo: no probabilístico aleatorio.

3.4. METODOLOGÍA Y RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1. Métodos instrumentales para la recolección de datos.

a. Preparación de las muestras para su análisis

El muestreo se realizará según el manual de análisis de microbiología de alimentos DIGESA, siendo la unidad muestral 200 g aproximadamente de queso fresco, las cuales serán recolectadas en condiciones asépticas y con material estéril: bolsas herméticas, rotuladas y conservadas en cadena de frío para su transporte a las instalaciones del laboratorio⁴⁶.

- Trituración de la muestra

Esta operación se llevará a cabo mediante el homogenizador: licuadora, permitiendo una mezcla homogénea para preparar las diluciones.

Para obtener resultados óptimos es necesario limitar el tiempo y la velocidad⁴⁶.

b. Numeración de organismos - *Escherichia Coli*

- Método de tubos múltiples de fermentación – número más probable (NMP) Según DIGESA (2001).

Se utilizará caldo EC con MUG con incubación a 35 °C por tres horas y pasar a 45 °C por 24 horas en baño maría.

La confirmación de organismos *Escherichia coli* presentarán producción de gas, asimismo la formación de un anillo de coloración roja añadiendo 0,2 – 0,3 mL de reactivo kovacs⁴⁶.

c. Numeración de *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo)

- Método de recuento en placa según DIGESA (2001).

Se utilizará agar baird parker en placas (secas), se extenderá el inóculo e incubará las placas en posición invertida a 35 °C – 37 °C durante 30 a 48 horas.

Las placas que muestren colonias negras y brillantes de margen estrecho y blanco rodeadas de áreas claras que se extienden en el medio opaco tienen la probabilidad elevada de ser *S. aureus*.

Las colonias sospechosas se sembrarán en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) incubando durante 20 – 24 horas a 35 °C – 37 °C.

Finalmente, para la prueba de la coagulasa, transferir 0.3 mL del cultivo a 0.3 mL de plasma de conejo oxalato e incubar a 35 °C – 37 °C. La formación de un coágulo definido es indicativa de la actividad de la coagulasa⁴⁶.

d. Investigación de *Salmonella sp.*

- Método para el aislamiento e identificación de *Salmonella sp.* según DIGESA (2001).

Se llevará a cabo mediante varias etapas sucesivas:

Preenriquecimiento con agua peptonada tamponada en una relación de 1:9 y llevar a incubar a 35 °C por 24 horas.

Enriquecimiento selectivo con caldo rappaport – vassiliadis (RV). Incubar el caldo por 24 ± 2 horas a 43 °C en baño maría.

Aislamiento selectivo e identificación de *Salmonella sp.* en agar diferencial de salmonella. Incubar las placas a 24 ± 2 horas a 35 °C. Colonias rosa a rojo características⁴⁶.

3.4.2. Procedimiento para la recolección de datos.

a. Numeración de organismos - *Escherichia Coli*

- Método de tubos múltiples de fermentación – número más probable (NMP) según DIGESA (2001).

Día 1

Se pesó 10 g de la muestra, seguido se transfirió a un frasco de vidrio de boca ancha con tapa de 250 mL de capacidad (estériles, secos y rotulado). Seguido en la cabina de bioseguridad con filtro HEPA se abrió el frasco y se añadió 90 mL de agua peptonada (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) con la ayuda de una probeta de 100 mL de capacidad (estéril y seco), se homogenizó y se vertió a un vaso precipitado de 500 mL (estéril y seco). Con la ayuda de la batidora de mano (previamente esterilizado) se procedió a licuarlo, el licuado se incorporó a su respectivo frasco. Finalmente se tiene la dilución 10⁻¹.

Para preparar las diluciones decimales 10⁻² y 10⁻³ se tomó 9 mL de agua peptonada al 0.1 % en un tubo de ensayo con tapa (estériles y secos) más 1 mL de la dilución anterior.

Se transfirió porciones de 1 mL a 3 tubos con tapa (estériles y secos) conteniendo 10 mL de caldo EC con MUG (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) para cada dilución por 3 diluciones consecutivas (10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³). Seguido se agitó los tubos y se incorporó los tubos durham (estériles y secos) en posición invertida. Se

incubó los tubos a 35 °C por 3 horas, después se pasó a incubar a 45 °C en baño maría por 24 horas.

Día 2

Se examinó los tubos a las 24 horas para determinar la presencia de gas ósea el desplazamiento del medio en los tubos de fermentación o efervescencia (durham) cuando los tubos son descubiertos de sus tapas y agitados suavemente. Se reincubó tubos negativos por 24 horas adicionales.

Día 3

Se examinó por segunda vez para determinar la presencia de gas. Seguido se confirmó al instante añadiendo 0,2 mL del reactivo de kovacs a todos los tubos (con presencia o ausencia de gas). Los tubos con formación de anillo color rojo nos indicó la presencia de *Escherichia coli*. Finalmente se consultó en la tabla de NMP con el cual se determinó los resultados.

Lectura

El número de *Escherichia coli* por gramo se obtuvo multiplicando el coeficiente NMP por el inverso de la dilución de los tubos seleccionados.

$$(\text{NMP} \times \text{inverso de la dilución}) / 10 = \text{organismos E.C/g}^{46}$$

b. Numeración de *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo)

- Método de recuento en placa según DIGESA (2001).

Día 1

Se pesó 10 g de la muestra, seguido se transfirió a un frasco de vidrio de boca ancha con tapa de 250 mL de capacidad (estériles, secos y rotulado). Seguido en la cabina de bioseguridad con filtro HEPA se abrió el frasco y se añadió 90 mL de agua peptonada (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) con la ayuda de una probeta de 100 mL de capacidad (estéril y seco), se homogenizó y se vertió a un vaso precipitado de 500 mL (estéril y seco). Con la ayuda de la batidora de mano (previamente esterilizado) se procedió a licuarlo, el licuado se incorporó a su respectivo frasco. Finalmente se tiene la dilución 10^{-1} .

Para preparar las diluciones decimales 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} se tomó 9 mL de agua peptonada al 0.1 % en un tubo de ensayo con tapa (estériles y secos) más 1 mL de la dilución anterior.

Se transfirió 0.1 mL de cada dilución con pipeta de 1 mL de capacidad (estéril y seco) a la superficie del medio agar baird parker (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) en placas (estériles y secas), bajo la llama encendida del mechero de bunsen se extendió el inóculo con ayuda del asa drigalsky (esterilizado

previamente a la llama del mechero) hasta que sea absorbido por el medio. Se incubó las placas en posición invertida a 37 °C durante 48 horas.

Día 3

Se eligió las placas que contenían entre 20 y 200 colonias aisladas y se contó todas las colonias negras y brillantes de margen estrecho y blanco rodeadas de áreas claras que se extendieron en el medio opaco. La probabilidad de que estas colonias correspondieran a *S. aureus* era muy elevada. Asimismo, se contó también en aquellas colonias cuyo color fue negro brillante con o sin margen estrecho blanco y que no presentaban el área de aclaramiento.

Prueba de la coagulasa

Seguidamente se picó no menos de 5 colonias sospechosas de ser *S. aureus* y se sembró en tubos con tapa (estériles y secos) que contenían 10 mL de caldo de infusión cerebro corazón (BHI) (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) y se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Se pasó 0.2 mL del caldo a tubos con tapa (estériles y secos) conteniendo 0.2 mL de plasma de conejo oxalato y se incubó a 37 °C.

Se examinó los tubos a las 6 horas con el fin de detectar la presencia de coágulos, los tubos negativos se mantuvieron a temperatura ambiente y se volvió a leer a las 24 horas. La aparición de un coagulo bien definido fue indicativo de la actividad de la coagulasa.

Informe

Se calculó el número de unidades formadoras de colonia UFC/ g, multiplicando el número de colonias en la placa por el factor de dilución. Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

$$\text{N}^\circ \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución} = \text{UFC/g}^{46}$$

c. Investigación de *Salmonella sp.*

- Método para el aislamiento e identificación de *Salmonella sp.* según DIGESA (2001).

Día 1: Preenriquecimiento

Se pesó 10 g de la muestra, seguido se transfirió a un frasco de vidrio de boca ancha con tapa de 100 mL de capacidad (estériles, secos y rotulado). Seguido en la cabina de bioseguridad con filtro a se abrió el frasco y se añadió 90 mL de agua peptonada tamponada (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) con la ayuda de una probeta de 100 mL de capacidad (estéril y seco), se homogenizó y se vertió a un vaso precipitado de 500 mL (estéril y seco). Con la ayuda de la

batidora de mano (previamente esterilizado) se procedió a licuarlo, el licuado se incorporó a su respectivo frasco. Se dejó reposar por 60 min a temperatura ambiente y se llevó a incubar a 35 °C por 24 horas.

Día 2: Enriquecimiento selectivo

Se agitó suavemente la mezcla de muestra incubada, seguido se transfirió 1 mL de la mezcla a tubos con tapa (estériles y secos) que contenían 10 mL de caldo rappaport – vassiliadis (RV) (previamente autoclavado a 115 °C por 15 min) y se incubó el caldo por 24 horas a 43 °C en baño maría.

Día 3: Aislamiento selectivo e identificación de *salmonella sp.*

Se mezcló los tubos (agitándolos hasta homogenizar) y bajo la llama encendida del mechero de bunsen se sembró por agotamiento y estría en el medio de aislamiento diferencial: agar diferencial de salmonella (sin autoclavar) y se incubó las placas en posición invertida a 35 °C por 24 horas.

Finalmente se examinó las placas para detectar y contar la presencia de colonias sospechosas con *salmonella sp.*: colonias rosas a rojo características.

Informe ausencia / presencia

A partir de los resultados obtenidos en la prueba de identificación, se indicó la presencia / ausencia de *Salmonella sp.* en 10 g de queso fresco. Con 1 colonia identificada se consideró su presencia⁴⁶.

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el programa Microsoft Excel e IBM SPSS Statistics 24.

Los resultados de la evaluación de calidad microbiológica como organismos de *Escherichia coli*, unidades formadoras de colonias (UFC) para *staphylococcus aureus* y presencia/ausencia de *Salmonella sp.* se reportaron en tablas y figuras.

Se realizó la prueba de comparación de frecuencias (moda) para los valores de los tres tipos de enterobacterias en la cual se evaluó la cantidad de quesos aptos y no aptos para el consumo humano.

IV. RESULTADOS

Tabla 4: Distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para *Escherichia coli* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

Mercado	<i>Escherichia coli</i> X2 Rep.				Total	
	<10 Org. E.C/g		>10 Org. E.C/g		N°	%
	N°	%	N°	%		
Nazarenas	2	3,1	6	9,4	8	12,5
Santa Clara	8	12,5	0	-	8	12,5
Sr. Arequipa	8	12,5	0	-	8	12,5
Magdalena	8	12,5	0	-	8	12,5
12 de Abril	8	12,5	0	-	8	12,5
Carmen Alto	7	10,9	1	1,6	8	12,5
Nery García	6	9,4	2	3,1	8	12,5
M. Cáceres	8	12,5	0	-	8	12,5
Total	55	85,9	9	14,1	64	100

Tabla 5: Distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

Mercado	<i>Staphylococcus aureus</i> X2 Rep.				Total	
	<10 ² UFC/g		>10 ² UFC/g		N°	%
	N°	%	N°	%		
Nazarenas	8	12,5	0	-	8	12,5
Santa Clara	3	4,69	5	7,8	8	12,5
Sr. Arequipa	8	12,5	0	-	8	12,5
Magdalena	4	6,25	4	6,25	8	12,5
12 de Abril	6	9,38	2	3,13	8	12,5
Carmen Alto	5	7,8	3	4,69	8	12,5
Nery García	4	6,25	4	6,25	8	12,5
M. Cáceres	6	9,38	2	3,13	8	12,5
Total	44	68,75	20	31,25	64	100

Tabla 6: Distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para *Salmonella sp.* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

Mercado	<i>Salmonella sp.</i> X2 Rep.				Total	
	Ausencia		Presencia		N°	%
	N°	%	N°	%		
Nazarenas	7	10,9	1	1,6	8	12,5
Santa Clara	5	7,8	3	4,7	8	12,5
Sr. Arequipa	8	12,5	-	-	8	12,5
Magdalena	5	7,8	3	4,7	8	12,5
12 de Abril	7	10,9	1	1,6	8	12,5
Carmen Alto	5	7,8	3	4,7	8	12,5
Nery García	4	6,25	4	6,25	8	12,5
M. Cáceres	4	6,25	4	6,25	8	12,5
Total	45	70,3	19	29,7	64	100

Tabla 7: Distribución según el límite microbiológico permitido por el Ministerio de Salud (MINSA) para cada enterobacteria en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

Mercado	Mercados de Huamanga				Total	
	< Límite		> Límite		N°	%
	N°	%	N°	%		
<i>Escherichia coli</i>	55	85,9	9	14,1	64	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	68,75	20	31,25	64	100
<i>Salmonella sp.</i>	45	70,3	19	29,7	64	100

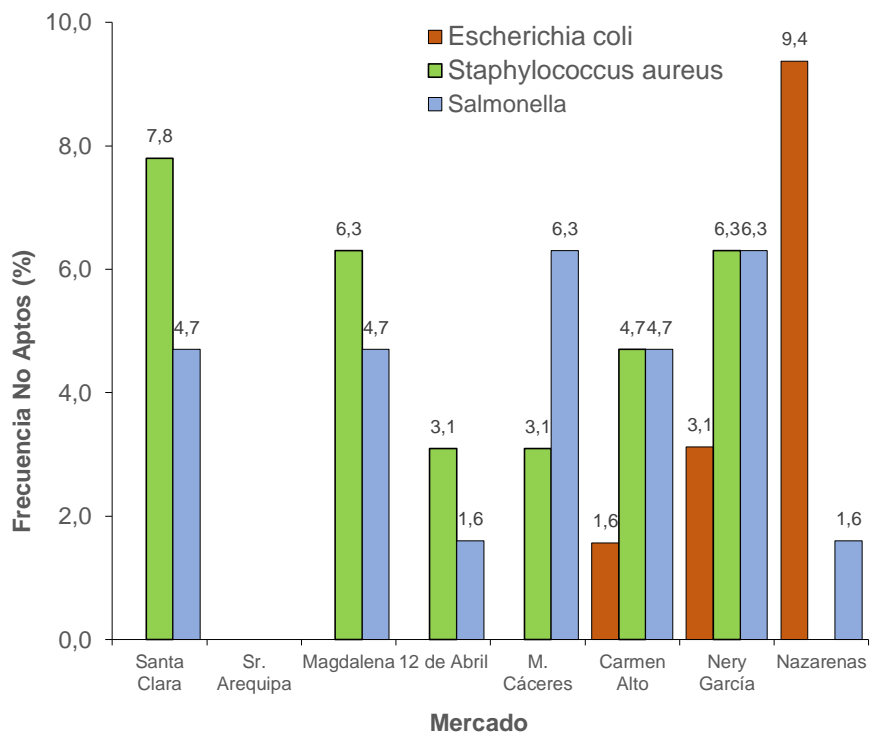
Tabla 8: Porcentaje de quesos frescos artesanales aptos y no aptos para consumo humano comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

Calidad Microbiológica	Quesos analizados	
	Nº	%
Aptos	30	46,9
No aptos	34	53,1
Total	64	100

Tabla 9: Calidad microbiológica de quesos frescos artesanales y recuento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

Mercado	<i>Escherichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Salmonella sp.</i>				Total	
	Apto		No apto		Apto		No apto		Ausencia		Presencia		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Nazarenas	2	3,1	6	9,4	8	12,5	0	0,0	7	10,9	1	1,6	8	12,5
Santa Clara	8	12,5	0	0,0	3	4,7	5	7,8	5	7,8	3	4,7	8	12,5
Sr. Arequipa	8	12,5	0	0,0	8	12,5	0	0,0	8	12,5	0	0,0	8	12,5
Magdalena	8	12,5	0	0,0	4	6,3	4	6,3	5	7,8	3	4,7	8	12,5
12 de Abril	8	12,5	0	0,0	6	9,4	2	3,1	7	10,9	1	1,6	8	12,5
Carmen Alto	7	10,9	1	1,6	5	7,8	3	4,7	5	7,8	3	4,7	8	12,5
Nery García	6	9,4	2	3,1	4	6,3	4	6,3	4	6,3	4	6,3	8	12,5
M. Cáceres	8	12,5	0	0,0	6	9,4	2	3,1	4	6,3	4	6,3	8	12,5
Total	55	85,9	9	14,1	44	68,8	20	31,3	45	70,3	19	29,7	64	100,0

Fuente: Software Estadístico IBM SPSS Statistics v. 24



Fuente: Software Estadístico IBM SPSS Statistics v. 24

Figura 3: Calidad microbiológica no apta de quesos frescos artesanales según los mercados comercializados en la ciudad de huamanga, 2019.

Tabla 10: Condiciones higiénico – sanitarias para la calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

Condiciones higiénico - sanitarias	Nazarenas		Santa Clara		Señor de Arequipa		Magdalena		12 de Abril		Carmen Alto		Nery García		Mariscal Cáceres	
	Cumple %	No cumple %	Cumple %	No cumple %	Cumple %	No cumple %	Cumple %	No cumple %	Cumple %	No cumple %	Cumple %	No cumple %	Cumple %	No cumple %	Cumple %	No cumple %
• Uso de indumentaria	x	100	50	50	10	90	50	50	20	80	20	80	10	90	x	100
• Adecuada manipulación del producto	20	80	50	50	60	40	50	50	20	80	30	70	10	90	20	80
• Refrigeración del producto	x	100	x	100	30	70	x	100	x	100	x	100	x	100	x	100
• Existencia y adecuada ubicación del puesto de expendio	80	20	50	50	60	40	70	30	50	50	50	50	x	100	70	30
• Exposición al suelo, sol, polvo, animales	50	50	50	50	10	90	40	60	50	50	50	50	80	20	20	80
• Contaminación cruzada con otros productos alimentarios	50	50	x	100	30	70	40	60	40	60	50	50	10	90	80	20

V. DISCUSIÓN

Todos los alimentos poseen un riesgo determinado de contaminación microbiológica y los factores de riesgo más altos incluyen alimentos de origen animal y de consumo sin cocimiento previo. Los quesos elaborados a partir de leche fresca poseen ambos factores y están involucrados en la mayoría de brotes reportados por intoxicación alimentaria.

En el presente trabajo se evaluó la calidad microbiológica de 64 muestras de quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, entre los meses de abril a julio del año 2019, donde se determinó que el 53,1 % de las muestras contiene al menos un microorganismo que sobrepasa los límites microbiológicos permitidos según la NTS N° 071 MINSA/DIGESA – V.01 y NTP 202. 195: 2004, lo cual expresa que la calidad microbiológica de este producto es deficiente, no aptos para el consumo humano.

En la evaluación de *Escherichia coli* (tabla 4) se encontró que las muestras excedían el límite microbiológico máximo permitido en 14,1 % y los que no excedían en un 85,9 % respectivamente. La prueba de *Escherichia coli* es considerada de gran importancia ya que sirve como indicador directo o indirecto de contaminación fecal en los alimentos y también como indicador de la posible presencia de bacterias patógenas entéricas en los productos lácteos como el queso fresco. Se puede contrastar estos resultados con los trabajos de Trujillo, que en el 2016 en un estudio de “Análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expendió en el mercado de Santa Rosa, ciudad de Riobamba, se obtuvieron resultados para *E. coli* en un 100 % encontrándose por encima del máximo permisible por la norma NTE INEN 1528:2012, Cueva, en el año 2017 realizó el estudio “Evaluación de la calidad microbiológica de los quesos frescos que se expendían en los mercados del distrito de Tacna, julio – octubre, 2016”, donde se encontró que el 70,7 % (29

muestras) de *E. coli* excedió el límite microbiológico permitido según la norma técnica sanitaria NTS N° 071 - MINSA/ DIGESA, Haro, en el año 2016 realizó el estudio “Análisis microbiológico de los quesos frescos comercializados en el mercado Simón Bolívar (San Alfonso) de la ciudad de Riobamba”, se encontró que la carga microbiana de *E. coli* presente en los quesos frescos exceden los límites permitidos por la norma NTE- INEN 1528-2012, por lo tanto esos productos no eran aptos para el consumo humano, por la mala calidad de los mismos. Condo, en el año 2016 realizó el estudio “Determinación de la calidad bacteriológica en quesos frescos artesanales que se expenden en el mercado Andrés Avelino Cáceres en la ciudad de Arequipa, mayo – agosto 2015” donde *Escherichia coli* presentó valores superiores al límite máximo establecido por la norma, siendo este, un alimento inaceptable y de riesgo para la salud de las personas que lo adquieran, asimismo Caldas y Ogeerally , realizaron el estudio “Microorganismos indicadores de interés sanitario en queso artesanal tipo “telita”. Upata, municipio piar, estado Bolívar, septiembre - octubre 2008” donde *Escherichia coli* estuvo presente en el 43,3 % de los quesos analizados. Se concluyeron que el queso artesanal tipo “telita” que se expende en los alrededores de Upata, estado Bolívar, evidencia fallas en la manipulación e higiene posterior a su elaboración; y por no cumplir con la norma sanitaria, se considera un producto de alto riesgo microbiológico para el consumidor.

El resultado obtenido para *Escherichia coli* en las muestras de queso fresco analizados en los mercados de Huamanga refleja que aun siendo un porcentaje menor presentó deficiencias higiénicas en la manipulación del producto que se comercializa en los mercados analizados, lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor.

En la evaluación de *Staphylococcus aureus*, de las 64 muestras analizadas el 31,25 % (tabla 5) mostraron recuentos superiores a los límites permitidos y los que no excedían en un 68,75 % respectivamente. La presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento se interpreta como indicativo de contaminación a partir de la piel, la boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos; de igual manera, el material, equipos sucios, materias primas de origen animal (leche de vaca) y exposición ambiental pueden ser la fuente de contaminación.

Estos resultados son cotejados con los de Lloisy, que en el año 2017 realizó el estudio “Evaluación fisicoquímica y microbiológica de queso elaborado en las localidades de Leymebamba, Molinopampa y la Florida-Pomacochas, Región

Amazonas”, en el cual se determinó que el recuento de *Staphylococcus aureus*, en todas las muestras de quesos frescos superan las 103 UFC/g, de este el 50 % superan las 105 UFC/g, recuento que indica un peligro para el consumidor, por la posible presencia de enterotoxinas estafilocócicas. Trujillo (Riobamba - 2016), concluyó que el 100 % de quesos analizados presentaron contaminación con *Staphylococcus aureus*; encontrándose todos por encima del máximo permisible por la norma NTE INEN 1528:2012. Cueva (Tacna - 2017) encontró *Staphylococcus aureus* en un 63,40 % (26 muestras) los cuales excedían el límite microbiológico permitido según la norma técnica sanitaria NTS N° 071 - MINSA/DIGESA. Haro (Riobamba – 2016), concluyó que la carga microbiana de *Staphylococcus aureus* presente en los quesos exceden los límites permitidos por la norma NTE- INEN 1528-2012.

Espinosa, en el año 2015 realizó el estudio “Evaluación sanitaria del queso fresco artesanal en el ejido Chihuahua, la Trinitaria, Chiapas, México”, donde determinó resultados menores de 100 UFC/g para *Staphylococcus aureus*, asimismo Caldas y Ogeerally (Bolívar – 2008), obtuvo que no hubo presencia de *S. aureus*, ya que todos los crecimientos bacterianos correspondieron a *Staphylococcus coagulasa* negativo.

Según los diferentes estudios realizados, los niveles de *Staphylococcus aureus* superan los límites máximos permisibles en porcentajes mayores, a diferencia, el estudio realizado en los mercados de Huamanga obtuvo un porcentaje de 31,25 % por encima del límite permitido por las normas técnicas; aun siendo menor el porcentaje representa un alimento contaminado carente de higiene, no apto para el consumo de la población.

En cuanto a la investigación de *Salmonella sp.* (Tabla 6) en quesos frescos artesanales se evidenció su presencia en un 29,7 % y ausencia en 70,3 % de las 64 muestras analizadas. La presencia de *Salmonella sp.* en un alimento es responsable de la salmonelosis cuyo factor de riesgo son las condiciones higiénicas ya que el modo de transmisión, es fecal-oral. Por este motivo, estas infecciones son más frecuentes donde existe un menor control de la calidad, la preparación y manipulación de los alimentos. Así podemos concertar estos resultados con los estudios de Cueva (Tacna – 2017), en la cual no se detectó *Salmonella* en ninguna de las muestras del mercado en estudio. Condo (Arequipa – 2016), determinó que no hubo registro de esta bacteria en los quesos frescos

estudiados. Finalmente, Espinosa (México – 2015), Evidenció que *Salmonella* se encuentra dentro de los límites establecido en norma NOM-243-SSA1-2010.

Así podemos observar que en los mercados de la ciudad de Huamanga si se evidenció la presencia de *salmonella sp.* en cierto porcentaje, lo que pone en riesgo de contraer fuertes infecciones a causa de esta bacteria por los consumidores.

Los quesos frescos surtidos a los diferentes mercados de la ciudad de Huamanga son provenientes de Lucanas, Puquio, Andamarca, Coracora, Incuyo, Huancasancos, Paras, Pampa Cangallo, quebradas de Llauta y Laramate, Viscapalca del distrito de Pilpichaca de la provincia de Huaytará, entre otras⁴⁸, las cuales guardan diferentes factores para que estos tengan la presencia de distintos microorganismos; así predecimos: contaminación durante el ordeño, vacas con mastitis, en la elaboración usando recipientes sucios o mal lavados, así como ambientes inadecuados con corrientes de aire y polvo, la inadecuada conservación, manipulación y expendio del producto; por ejemplo no mantener en refrigeración, ubicar el producto en el piso, tener descubierto el producto, no uso de indumentaria, entre otros cuidados para asegurar la calidad del producto.

En la figura 3 se reporta la comparación de las muestras analizadas, donde encontramos los mercados de Nazarenas, Santa Clara, Señor de Arequipa, Magdalena, 12 de abril, Carmen Alto, Nery García y Mariscal Cáceres. Así en el análisis todas presentaron al menos 2 tipos de enterobacterias en diferente porcentaje a excepción del mercado Señor de Arequipa que se mantuvo exento de estas 3 bacterias, el cual lo hace apto para el consumo humano. El motivo por el cual resultó limpio microbiológicamente puede deberse a que en todo el proceso de elaboración y final expendio se mantuvo conservado en adecuadas condiciones dentro de lo posible, por ejemplo, que se mantuvieron debidamente tapados, algunos refrigerados, no contacto con el suelo, lugares con temperaturas bajas, los cuales favorecieron su inocuidad.

Por otro lado, los mercados que presentaron los 3 tipos de enterobacterias fueron Nery García y Carmen Alto, puesto que presentaron deficiencias en la conservación del producto ejemplo de ello exposición al sol, recipientes en contacto con el suelo, falta de indumentaria, forma de expender, falta de conocimiento sobre higiene y manipulación del producto; todo ello vuelve susceptible de contaminarse y ser medio de proliferación de estos microorganismos. Este resultado hace que el consumidor este proclive de contraer

enfermedades infecciosas que pueden ser de bajo o alto nivel de cuidado, poniendo en riesgo su salud.

Con la prueba comparación de frecuencias, podemos afirmar que el recuento de enterobacterias si influye en la calidad microbiológica de los quesos frescos artesanales; y que existe una relación inversamente proporcional entre el recuento de enterobacterias y la calidad microbiológica, tal es decir que si el recuento de enterobacterias es elevado tendremos una calidad microbiológica deficiente.

VI. CONCLUSIONES

1. La calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018 no es apta para consumo humano, donde el 53,1 % contiene al menos un microorganismo que sobrepasa los límites microbiológicos permitidos según la NTS N° 071 MINSA/DIGESA – V.01 y NTP 202. 195: 2004.
2. El recuento de organismos de *Escherichia coli* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018 obtuvo un 85,9 % dentro del límite microbiológico y 14,1 % fuera del límite.
3. El recuento de colonias de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018 dio como resultado un 68,75 % dentro del límite microbiológico y 31,25 % fuera del límite.
4. La presencia de colonias de *Salmonella sp.* en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018. Resultó en un 70,3 % dentro del límite microbiológico y 29,7 % fuera del mismo.

VII. RECOMENDACIONES

1. Promocionar las buenas prácticas de manipulación de alimentos en los diferentes mercados de la región, mediante charlas informativas y de asesoramiento a los vendedores y consumidores.
2. Realizar la vigilancia respectiva y continua para el cumplimiento de las normas por parte de las autoridades sanitarias.
3. Realizar más estudios microbiológicos, con el fin de mejorar la calidad sanitaria de los quesos frescos artesanales, debido a su gran producción y comercialización en nuestra ciudad.
4. Realizar campañas de educación y concientización al personal que expende los quesos frescos artesanales sobre hábitos higiénicos y medidas de prevención contra las infecciones transmitidas por las bacterias.
5. Realizar futuros estudios ampliando el número de muestra, el tamaño, poblacional, evaluando en diferentes mercados y en diferentes épocas del año.
6. Implementar el uso de aditivos, preservantes y/o antibióticos naturales con el fin de controlar el crecimiento y multiplicación de microorganismos en los quesos frescos artesanales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

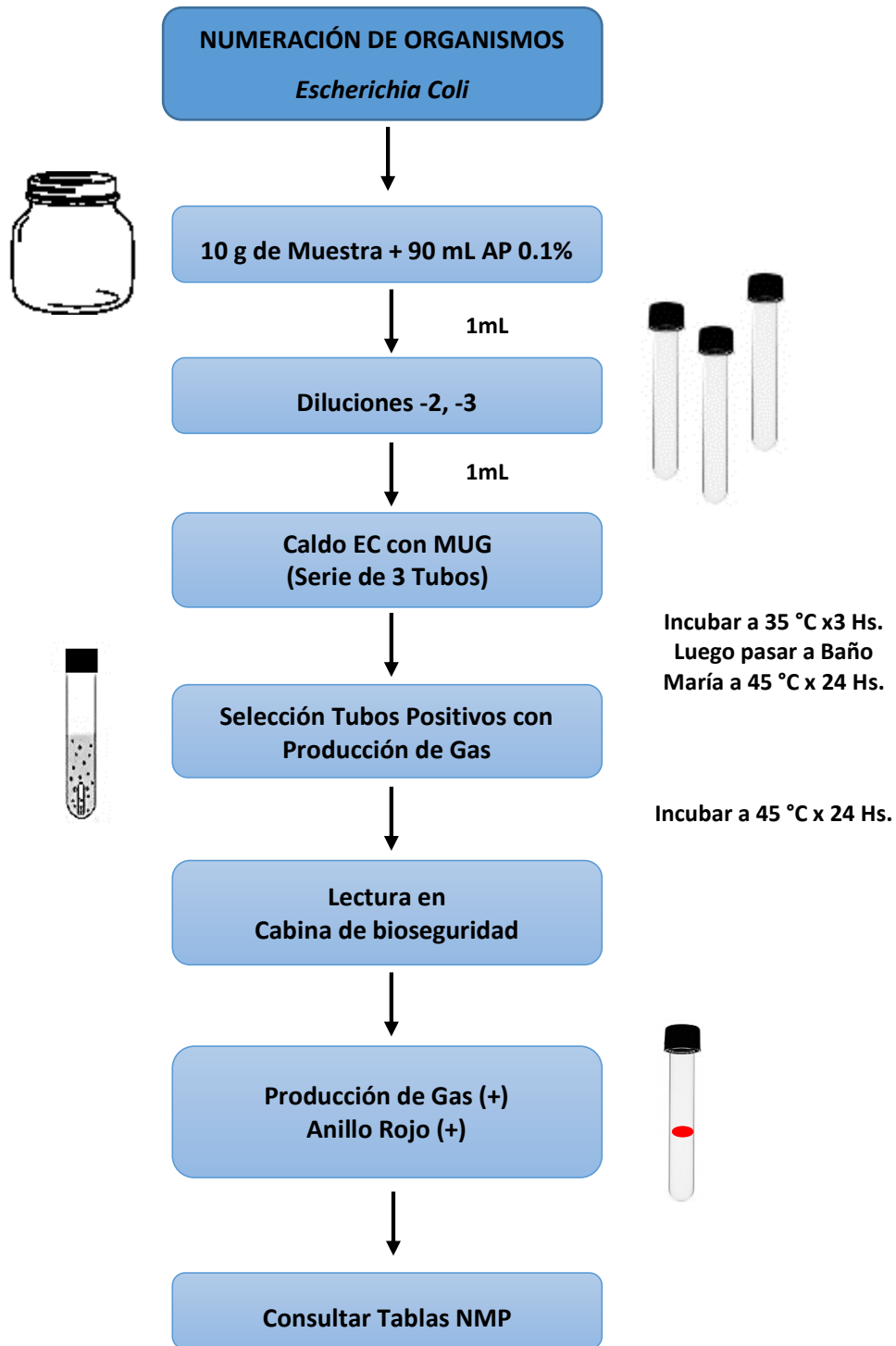
1. Lujan D, Valentín M. Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima–Perú. [Sede web]. Perú: 2006. Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos_frescos.pdf.
2. Delgado R, Torres D. Evaluación del queso fresco artesanal expendido en los mercados del distrito de Lima, Perú, y la posible acción bactericida de *Lactobacillus* spp. Rev Panam Salud Pública. 2003.158 p.
3. Álvarez Y. Efecto del *Lactobacillus casei* ATCC 393TM sobre el *Escherichia coli* durante la vida comercial del queso fresco [Tesis]. Universidad Nacional del Callao; 2011.
4. Cristóbal R, Mautua D. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp”. Revista Panamericana de Salud Pública. 2003, 14(3).
5. Lloysy G. Evaluación fisicoquímica y microbiológica de queso fresco elaborado en las localidades de leymeamba, molinopampa y la florida-pomacochas, región amazonas [Tesis]. Universidad de Chachapoyas; 2017.
6. Trujillo A. Análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expende en el mercado de santa rosa, ciudad de Riobamba [Tesis]. Universidad de Riobamba – Ecuador; 2016.
7. Cueva A. Evaluación de la Calidad Microbiológica de los quesos frescos que se expenden en los mercados del distrito de Tacna, julio – octubre, 2016 [Tesis]. Universidad de Tacna; 2017.
8. Haro J. Análisis microbiológico de los quesos frescos comercializados en el mercado simón bolívar (san Alfonso) de la ciudad de Riobamba [Tesis]. Universidad de Riobamba – Ecuador; 2016.
9. Condo D. Determinación de la calidad bacteriológica en quesos frescos artesanales que se expenden en el mercado Andrés Avelino Cáceres en la ciudad de Arequipa, mayo – agosto 2015 [Tesis]. Universidad de Arequipa; 2016.
10. Espinosa L. Evaluación sanitaria del queso fresco artesanal en el ejido chihuahua, la trinitaria, Chiapas [Tesis]. Universidad de México; 2015.
11. Caldas L, Ogeerally P. Microorganismos indicadores de interés sanitario en queso artesanal tipo “telita”. Upata, municipio piar, estado bolívar. Septiembre - octubre 2008 [Tesis]. Universidad de Bolívar; 2008.
12. Castillo J, Chaves J. Implementación de la documentación de las buenas prácticas de manufactura y establecimiento de los manuales de procedimiento de las pruebas fisicoquímicas en la planta de enfriamiento. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. [Tesis]. Universidad de Bogotá, 2008.
13. Codex Standard. Norma general del Codex para el queso [Sede Web]. Perú: CXS; 1978. [Citado 16 de agosto de 2018]. Disponible en: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/CXS_283s.pdf.
14. González M. Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Amarillo y Yogurt [Sede Web]. Panamá: Senacyt; 2002. [Citado 16 de agosto de 2018]. Disponible en: http://www.argenbio.org/doc/tecnologia_para_la_elaboracion_de_queso.pdf.
15. Law B, Tamime, A. Technology of cheese making. Segunda edición. Reino Unido: Wiley Blackwell; 2011. 512 p.

16. Robinsón R. Microbiología Lactológica. Vol. II. Zaragoza-España: Acribia; 1987. 295 p.
17. Días D. Comportamiento y evaluación de las proteínas de la leche (caseína y del lactosuero) frente al tratamiento térmico y pH. Lima, Perú; 2010. 167 p.
18. Instituto Nacional de Salud. Tablas peruanas de composición de alimentos. Lima, Perú: CENAN; 2009.
19. González E. Caracterización de la composición físico química del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehuatla, municipio de Minatitlán. Veracruz (México); 2010.
20. Romero R. Microbiología y parasitología humana. 3ra Ed. México: Panamericana; 2007.
21. Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos. 4ta Ed. Zaragoza (España): Ed. Acribia S.A; 2002.
22. Hernández, A. Microbiología industrial. 1ra Ed. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia; 2003.
23. Aminot J. Ciencia y Tecnología de la leche. Zaragoza-España: Acribia, S.A; 2010.
24. Artica L. Manual de productos lácteos industriales. 1ra edición. Perú - Lima: Editorial TEIA; 2014.
25. Hispavista. Calidad de los Alimentos [Sede Web]. España. [Citado 17 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://controldealimentos.galeon.com/contenido.htm>.
26. Grabow and M. Snozzi. Microorganismos indicadores [Sede Web]. USA. [Citado 17 de diciembre de 2018]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores_6422.pdf.
27. Brawde A. Medical microbiology and infectious diseases international textbook of medicine. Vol. II: Etth ed. USA: Saunders Co; 2011.
28. Hobbs B. Higiene y Toxicología de los alimentos. 3ra Ed, Editorial Acribia, S.A., Zaragoza - España; 2010.
29. Larrañaga I, Rodríguez M, Fernández J. Control e higiene de los alimentos grado superior. Mc Graw Hill - España. 16 – 20.
30. Fracier W, Westhoff D. Microbiología de los alimentos. 3ra Ed, Editorial española Acribia S. A.; 2012.
31. Pelczar M, Reid R. Microbiología. México: Editorial Mc Graw – Hill; 2014.
32. Tarazona J. Familia de las Enterobacterias. 2da Ed. Lima – Perú: Editorial La confianza; 2009.
33. Cornejo J. Análisis microbiológico de bebidas superficiales vivas e inertes y evaluación sanitaria en comedores populares del P.P.J.J. Alto San Martín – Mariano Melgar – Arequipa en el último trimestre del 2008 [Tesis]. Universidad de Arequipa; 2009.
34. Parra M. Durango J. Mattar S. Microbiología, Patogénesis, Epidemiología, clínica y Diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. MVZ. Córdoba; 2012.
35. Minsa/Digesa. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. NTS N° 071–MINSA/DIGESA-V.01. Lima – Perú; 2008.
36. Pascual A, Calderón Y, Vicente A. Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2da Ed. Madrid – España; 2014.
37. Laboratorios Himedia. EC con Mug Medio [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 02 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M1042.pdf>

38. Laboratorios Himedia. Caldo de Infusión Cerebro Corazón [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 02 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/TD/M210.pdf>
39. Laboratorios Himedia. Caldo Rappaport Vassiliadis [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 09 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M880.pdf>
40. Laboratorios Himedia. Agar Baird Parker [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 09 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M043.pdf>
41. Laboratorios Himedia. Agar diferencial de salmonella [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 09 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M1082.pdf>
42. Laboratorios Himedia. Agua Peptonada [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 12 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M028.pdf>
43. Laboratorios Himedia. Agua Peptonada Tamponada [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 15 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M614S.pdf>
44. Laboratorios Himedia. Plasma de Conejo Oxalato [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 16 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/FD248.pdf>
45. Laboratorios Himedia. Reactivo Kovacs [Sede Web]. India: Himedia laboratorios Pvt. Ltd.; 2015. [Citado 16 de Setiembre de 2018]. Disponible en: <https://himedialabs.com/TD/R008.pdf>
46. Ministerio de Salud Digesa. Manual de Análisis Microbiológico de Alimentos. Digesa. 2001. 182.
47. Comisión de reglamentos técnicos y comerciales INDECOPI. Norma técnica peruana establece los requisitos microbiológicos de la leche y productos lácteos: Queso fresco. NTP 202.195. Lima – Perú; 2004.
48. Moya E. Quesos ayacuchanos: ¿Cómo potenciar su gran valor cultural y comercial? La revista Agraria [revista en Internet] 2015 [acceso 15 de octubre de 2019]; 171(8). Disponible en: <https://es.scribd.com/document/353904080/LRA171-quesosayacuchanos>.

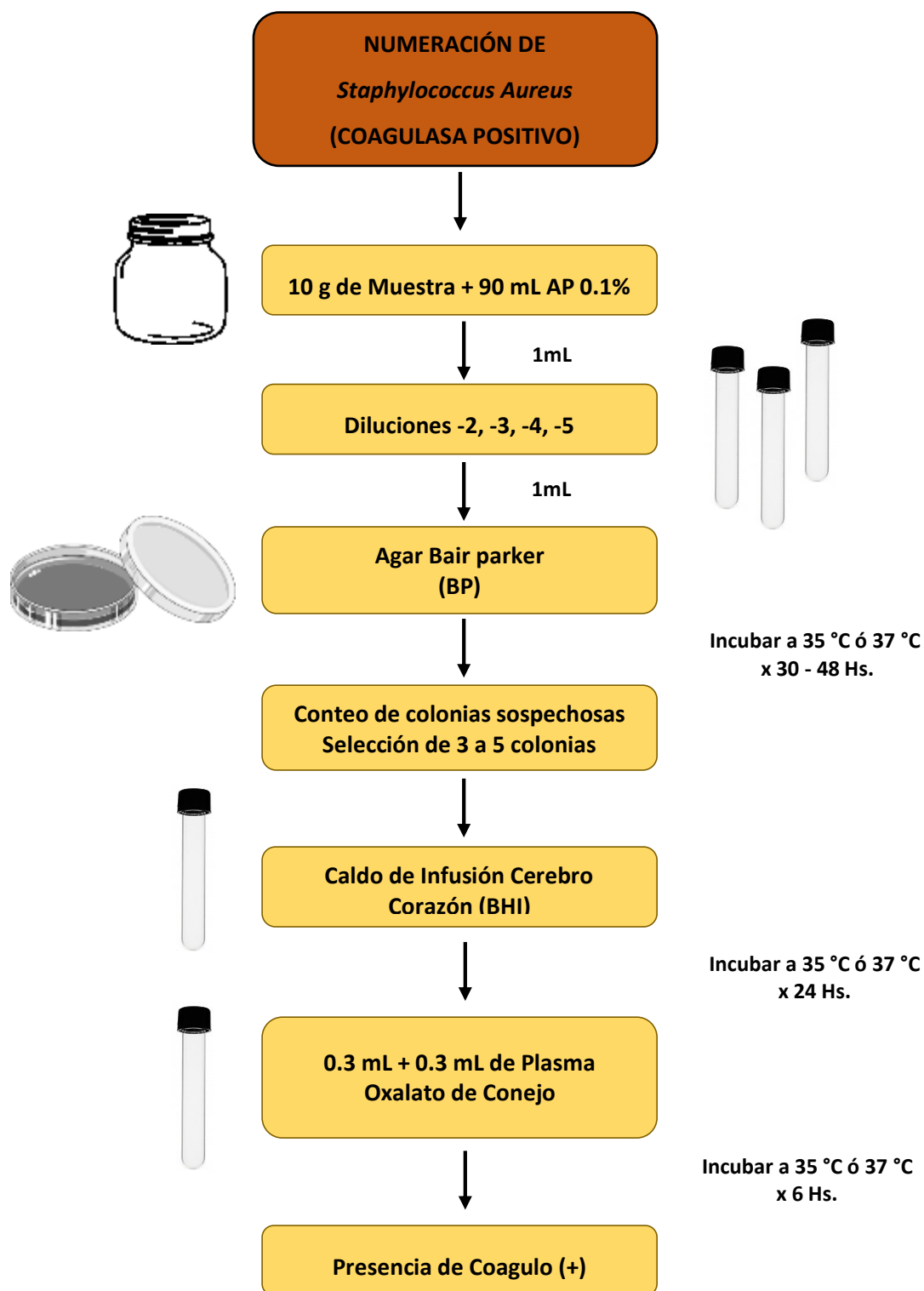
ANEXOS

Anexo 1: Numeración de organismos *Escherichia Coli*. Huamanga, 2019.



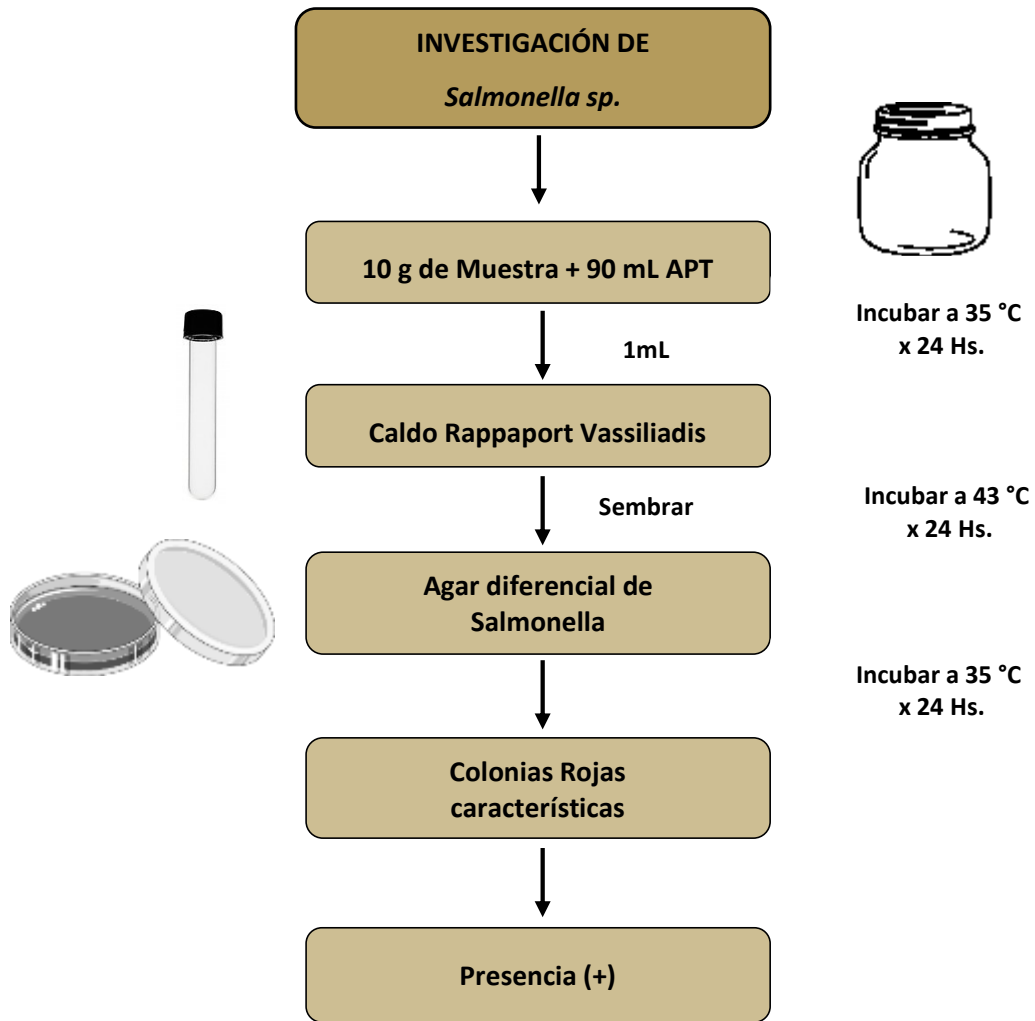
Fuente: Manual de análisis microbiológico de alimentos DIGESA.

Anexo 2: Numeración de *Staphylococcus Aureus* (coagulasa positiva).
Huamanga, 2019.



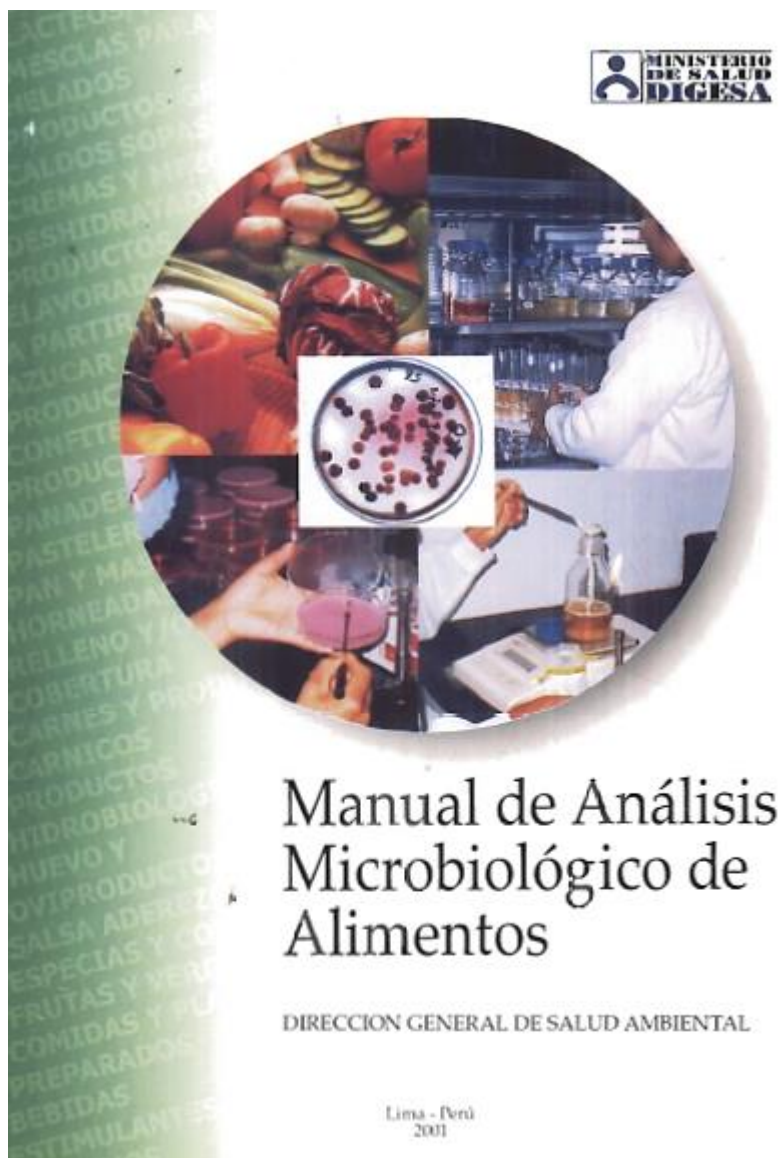
Fuente: Manual de análisis microbiológico de alimentos DIGESA.

Anexo 3: Investigación de *Salmonella sp.* Huamanga, 2019.



Fuente: Manual de análisis microbiológico de alimentos DIGESA.

Anexo 4: Manual de análisis microbiológico de alimentos (DIGESA). Huamanga, 2019.



Fuente: Minsa – DIGESA

Anexo 5: Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Huamanga, 2019.

<p>SALUD</p> <p>Aprueban "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano"</p> <p>RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 591-2008/MINSA</p> <p>Lima, 27 de agosto del 2008</p>	<p>Artículo 2°.- La Dirección General de Salud Ambiental a través de la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis se encargará de la difusión e implementación de la citada norma.</p> <p>Artículo 3°.- Derogar la Resolución Ministerial N° 615-2003-SA/DM.</p> <p>Artículo 4°.- La Oficina General de Comunicaciones dispondrá la publicación de la referida Norma Técnica contenido en la presente Resolución en el Portal de Internet del Ministerio de Salud, en la dirección; http://www.minsa.gob.pe/portal/06transparencia/normas.asp.</p> <p>Regístrese, comuníquese y publíquese HERNÁN GARRIDO-LECCA MONTAÑEZ Ministro de Salud</p>
--	--

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Aprobar la NTS N° 071 - MINSA/DIGESA-V.01. "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano" que forma parte integrante de la presente resolución.

NTS N° 071 - MINSA/DIGESA-V.01
NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO

1.8 Quesos no madurados (queso fresco, mantecoso, ricotta, cabaña, crema, petit suisse, mozzarella, ucayalino, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	5×10^2	10^3
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	10^2
<i>Escherichia coli</i>	8	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	--
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	---

Fuente: NTS N° 071 – MINSA/DIGESA-V.01.

Anexo 6: Requisitos microbiológicos para el queso fresco según norma técnica peruana. Huamanga, 2019.

NORMA TÉCNICA PERUANA	NTP 202.195 2004
--------------------------	---------------------

Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales-INDECOPI
Calle de La Prosa 138, San Borja (Lima 41) Apartado 145

LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Queso fresco. Requisitos

MILK AND MILK PRODUCTS. Cool cheeses. Requirements

TABLA 2 - Requisitos Microbiológicos

REQUISITOS	n	m	M	c	MÉTODOS DE ENSAYO
Numeración de coliformes a 30 °C/ g	5	10^2	10^3	2	FIL-IDF 73B:1998
Numeración de coliformes a 45 °C/ g	5	10	10^2	2	APHA:1992 C.24
Numeración de Estafilococos coagulasa positivos/ g	5	10	10^2	1	FIL-IDF 145A:1997
Detección de <i>Salmonella sp</i> / 25 g	5	0	-	0	FIL-IDF 93B:1995
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> / 25 g	5	0	-	0	BAM/FDA:1995

Fuente: NTP 202.195 (2004)⁴⁷.

Anexo 7: Para 3 tubos cada uno 0.1, 0.01 y 0.001 gramos de inóculo, los NMPs por gramo y 95% de intervalo de confianza. Huamanga, 2019.

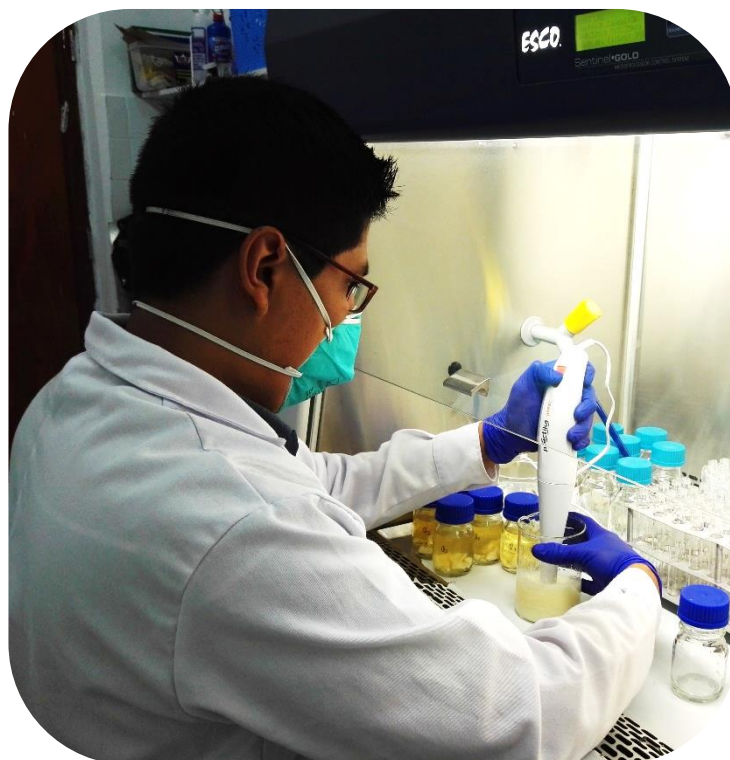
Tubos Positivos			NMP /g	Límite de 95% de Confianza		Tubos Positivos			NMP /g	Límite de 95% de Confianza	
0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto	0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Fuente: Minsa – DIGESA

Anexo 8: Sanitización de estufas con clorhexidina en el laboratorio de microbiología. Huamanga, 2019.



Anexo 9: Licuado de queso fresco con agua peptonada para preparación de diluciones en el laboratorio de microbiología. Huamanga, 2019.



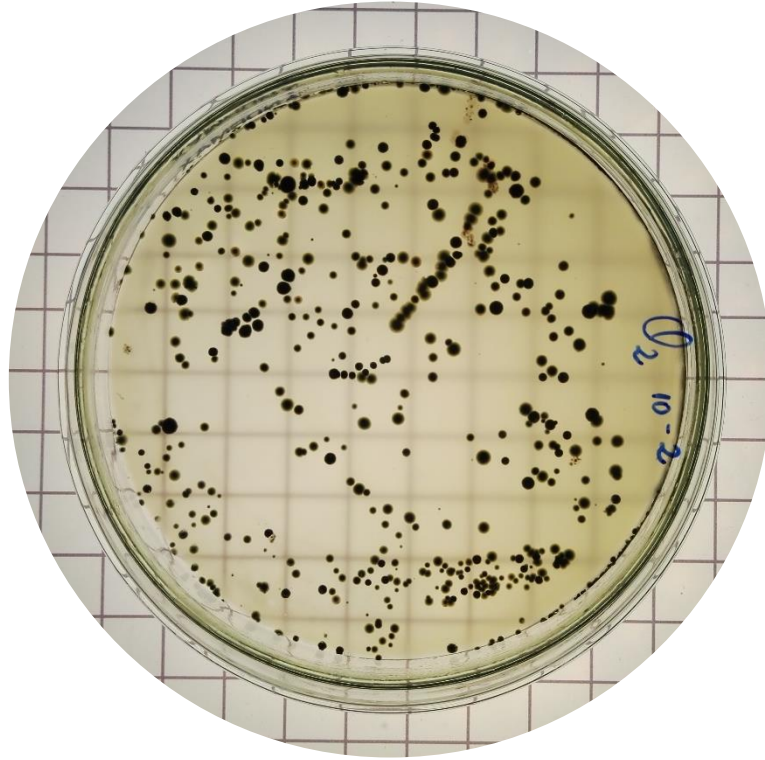
Anexo 10: Control de calidad de caldos y agares por 24 horas previo al sembrado de la muestra. Huamanga, 2019.



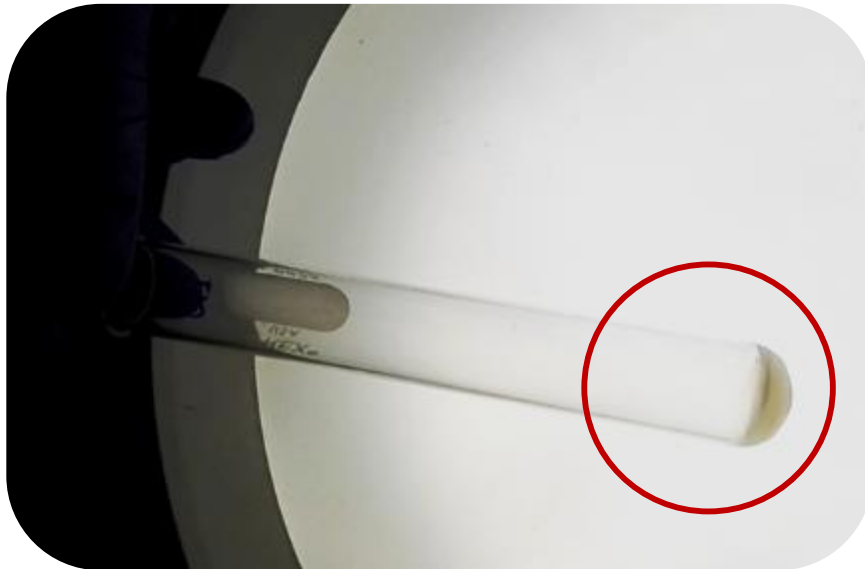
Anexo 11: Reacción de indol con reactivo kovacs a muestras con presencia de gas y resultado positivo para *Escherichia coli* mediante la formación del anillo rojo. Huamanga, 2019.



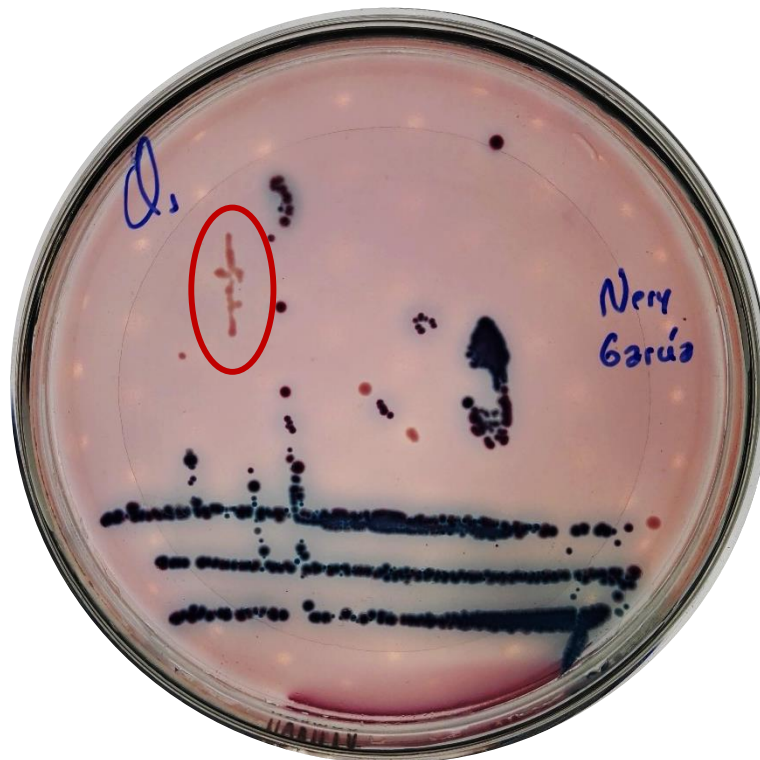
Anexo 12: Presuntas colonias de *Staphylococcus aureus*. Huamanga, 2019.



Anexo 13: Resultado coagulasa positivo para *Staphylococcus aureus*.
Huamanga, 2019.



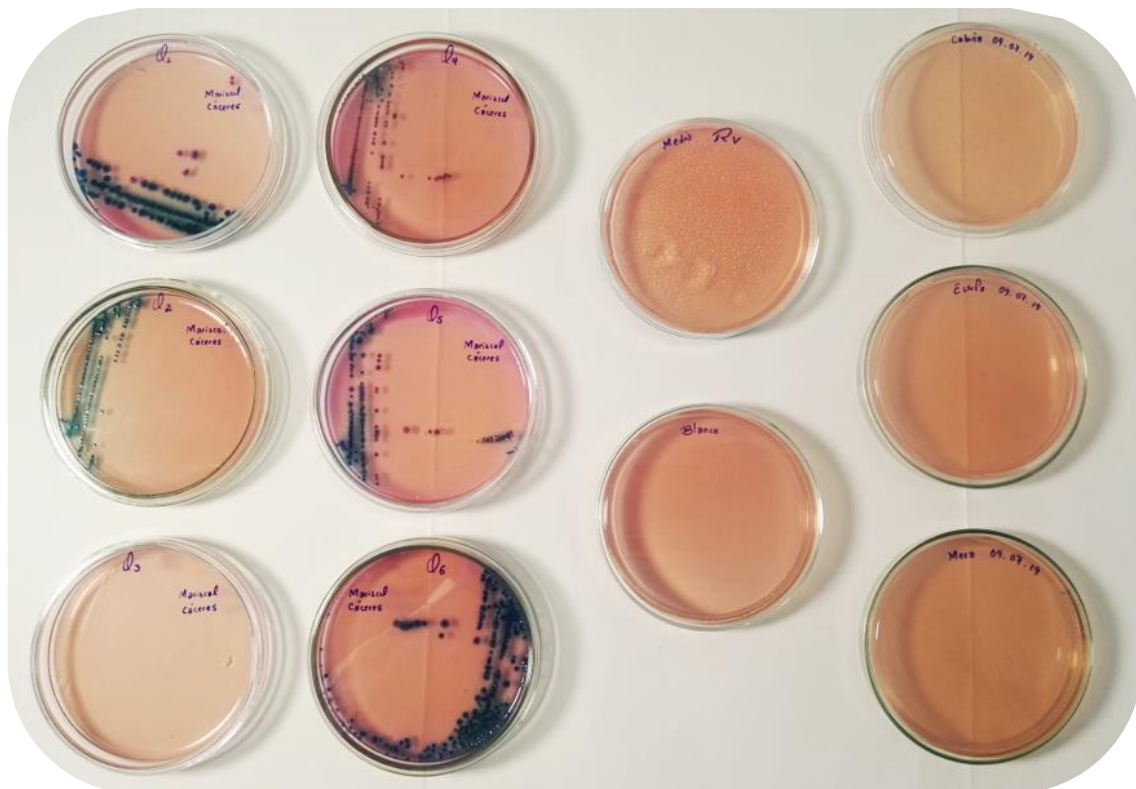
Anexo 14: Presencia de *Salmonella* sp. en colonias con coloración rosa a rojo.
Huamanga, 2019.



Anexo 15: Control de calidad del ambiente (laboratorio de microbiología) para *salmonella sp.* Huamanga, 2019.



Anexo 16: Resultados del control de calidad del ambiente (laboratorio de microbiología) para *salmonella* sp. Huamanga, 2019.



Anexo 17: Exposición de los quesos frescos a la contaminación del suelo, polvo, sol, animales de los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.



Anexo 18: Contaminación cruzada con otros alimentos de los quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.



Anexo 19: Uso de indumentaria y protección de los quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.



Anexo 20: Matriz de consistencia. Huamanga, 2019.

Título: Evaluación de la calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2019.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Habrá calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018?	<p>Objetivos Generales Evaluar la calidad microbiológica en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar el recuento de organismos de <i>Escherichia coli</i> en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018. Determinar el recuento de colonias de <i>staphylococcus aureus</i> en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018. Determinar la presencia de colonias de <i>salmonella sp.</i> en quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga, 2018. 	<p>Definición de leche Definición de queso Queso fresco Características físico - químico del queso Elaboración del queso</p> <ul style="list-style-type: none"> La materia prima y la estandarización La pasteurización La inoculación y la fermentación La coagulación El desuerado o escurrimiento El moldeo y el prensado El salado <p>Composición del queso Clasificación de los quesos Calidad de los alimentos Calidad microbiológica de los alimentos Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) Presencia de microorganismos en alimentos Patologías más comunes relacionadas con ETAs</p> <ul style="list-style-type: none"> Coliformes fecales (CF) o termotolerantes Enterobacterias - Fermentadores de la lactosa: <i>Escherichia coli</i> - No fermentadores de la lactosa: <i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <p>Norma bacteriológica para los alimentos de consumo humano. Medios de cultivo bacteriano Tipos de medios de cultivo</p>	Los quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga carecen de calidad microbiológica.	<p>Variable Independiente: Quesos frescos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Huamanga</p> <p>Variable Dependiente: Calidad microbiológica</p> <p>Indicadores: -E. Coli > 10 UFC/g < 10 UFC/g -Staphylococcus aureus > 100 UFC/g < 100 UFC/g -Salmonellas sp Ausencia/10 g Presencia/10 g</p>	<p>Tipo de Investigación: Descriptivo</p> <p>Población: La población está constituida por quesos frescos expendidos en ocho mercados de la ciudad de Huamanga, con varios puntos de comercialización cada uno, para evaluar la calidad microbiológica de este alimento.</p> <p>Muestra: Queso fresco (de leche de vaca), de 200 g cada uno, en ocho mercados de la ciudad de Huamanga.</p> <p>Criterio de muestreo: No probabilístico aleatorio</p> <p>Método: a. Numeración de Organismos <i>Escherichia Coli</i> Método de tubos múltiples de fermentación – número más probable (NMP) b. Numeración de <i>Staphylococcus aureus</i> (Coagulasa positivo) Método de recuento en placa c. Investigación de <i>Salmonella sp.</i> Método para el aislamiento e identificación de <i>Salmonella sp.</i></p> <p>Análisis de datos: Se elaborará una hoja de cálculo en un Software informático (Microsoft office – Excel 2016) para realizar los respectivos gráficos. Posteriormente, los datos se llevarán a un Software Estadístico SPSS.</p>