



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

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA A  
ANTIMICROBIANOS DEL QUESO FRESCO QUE SE EXPENDE EN  
EL MERCADO DE SANTA ROSA, CIUDAD DE RIOBAMBA**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: ALEXANDRA ANDREA TRUJILLO CHÁVEZ**

**TUTOR: DRA. SANDRA ESCOBAR**

**Riobamba – Ecuador**

**2016**

© 2016, Alexandra Andrea Trujillo Chávez.

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

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de titulación: “Análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expende en el mercado de Santa Rosa, Ciudad de Riobamba”, de responsabilidad de la Srta. Alexandra Andrea Trujillo Chávez”, ha sido cuidadosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizado para su presentación:

<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Dra. Sandra Escobar DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	-----	-----
Dr. Gerardo Medina MIEMBRO DE TRIBUNAL	-----	-----
Dra. Morella Guillén MIEMBRO DE TRIBUNAL	-----	-----

Yo, Alexandra Andrea Trujillo Chávez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales, los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 11 de noviembre de 2016.

-----

ALEXANDRA ANDREA TRUJILLO CHÁVEZ

060408937-5

## **DEDICATORIA**

A mí madre Alegría y mi padre Hugo por ser las personas más importantes e influyentes en mi vida y por medio de los cuales ha sido posible el cumplimiento de este sueño y meta.

A toda mi familia, amigos, compañeros y personas que han estado junto a mí incondicionalmente para apoyarme y darme fortaleza cuando más lo he necesitado.

Alexandra.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Dra. Sandra Escobar y al Dr. Gerardo Medina, por ser mis tutores, y más allá de todo eso, por brindarme siempre su apoyo, tiempo, conocimientos y demás durante la elaboración del trabajo de titulación.

A las Dras. Aida, Isabel y Paty por brindarme su ayuda y disposición en las instalaciones de los Laboratorios de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos.

A todos los catedráticos que han sido mis maestros y de una forma u otra me han brindado sus conocimientos para mi crecimiento académico y personal.

A todos, ¡Gracias!

Alexandra.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Paginas</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE DE GRÁFICOS.....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>INDICE DE ANEXOS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIII</b>
<b>SUMARY.....</b>	<b>XIV</b>
CAPITULO I.....	4
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Definición de leche .....	4
1.2. Definición de queso .....	5
1.3. Clasificación de los quesos .....	6
1.4. Elaboración del queso .....	9
1.5 Composición del queso .....	10
1.6. Fuentes de contaminación del queso.....	11
1.7. Enfermedades de Transmisión Alimentaria.....	13
1.7.1 Tipos de Enfermedades de Transmisión Alimentaria .....	15
1.7.2 Contaminantes en los alimentos.....	17
1.8. Indicadores biológicos de los quesos .....	17

1.8.1 Coliformes totales y fecales: .....	18
1.8.2 <i>Escherichia coli</i> : .....	19
1.8.3 <i>Staphylococcus aureus</i> :.....	20
1.9. Resistencia a antimicrobianos .....	21
1.9.1. Antecedentes de la resistencia a antimicrobianos .....	22
1.9.2. Mecanismos de resistencia de las bacterias: .....	23
1.10. Medios de Cultivo Bacteriano.....	23
1.10.1 Placas Petrifilm .....	24
1.10.2 Agar nutritivo .....	25
1.10.3 Agar Eosina Azul de Metileno .....	26
1.10.4 Agar Manitol Salado .....	27
1.10.5 Agar Muller Hinton.....	28
1.10.6 Caldo Verde Bilis Brillante.....	28
1.10.7 Agua de peptona.....	29
1.11 Técnica del Número Más Probable .....	30
1.12 Mercado Víctor Proaño de la ciudad de Riobamba.....	30
CAPÍTULO II .....	32
2. MARCO METODOLÓGICO.....	32
2.1 Lugar de la investigación. ....	32
2.2 Período de la investigación .....	32
2.3 Materiales, Equipos y Reactivos .....	32
2.4 Métodos.....	35
2.4.1 Recolección y transporte de muestras .....	36
2.4.2 Preparación de la solución madre y diluciones .....	36
2.4.3 Inoculación, incubación y recuento en placas Petrifilm 3M .....	38
2.4.4 Evaluación de la microbiota de queso en Agar PCA. ....	39

2.4.5 Determinación de Coliformes totales por la Técnica del Número Más Probable. ....	41
2.4.6 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Manitol Salado .....	44
2.4.7 Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> para antibiograma. ....	46
2.4.8 Antibiograma .....	48
CAPÍTULO III.....	52
3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN. ....	52
3.1 Análisis Microbiológico del queso fresco.....	52
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
3.1.2 Coliformes totales. ....	58
3.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	61
3.2 Antibiograma. ....	65
3.2.1 Antibiograma de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	65
3.2.2 Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> .....	67
CONCLUSIONES .....	69
RECOMENDACIONES .....	71

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1-1:</b> Clasificación de los quesos.....	7
<b>Tabla N° 2-1:</b> Composición química del queso fresco.....	11
<b>Tabla N° 3-1:</b> Requisitos Microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	13
<b>Tabla N° 4-1:</b> Composición y preparación del Agar Nutritivo.....	26
<b>Tabla N° 5-1:</b> Composición y preparación del Eosina Azul de Metileno.....	26
<b>Tabla N° 6-1:</b> Composición y preparación del Agar manitol Salado.....	27
<b>Tabla N° 7-1:</b> Composición y preparación del Agar Muller Hinton.....	28
<b>Tabla N° 8-1:</b> Composición y preparación del Agua de peptona.....	29
<b>Tabla N° 1-3:</b> Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm.....	53
<b>Tabla N° 3-3:</b> Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm 3M Staph Express para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
<b>Tabla N° 3-3:</b> Test T de Student para una muestra para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Tabla N° 4-3:</b> Muestras de Queso Fresco que fermentan el Agar Manitol Salado.....	57
<b>Tabla N° 5-3:</b> Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm 3M para Coliformes Totales.....	58
<b>Tabla N° 6-3:</b> Test de Student para Coliformes totales.....	59
<b>Tabla N° 6-3:</b> Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm 3M para <i>Escherichia coli</i> .....	61
<b>Tabla N° 8-3:</b> Test T de Student para una muestra para <i>Escherichia coli</i> .....	62
<b>Tabla N° 7-3:</b> Recuento de la microbiota analizada por la Técnica del Numero Más Probable.....	63
<b>Tabla N° 8-3:</b> Prueba confirmatoria de <i>Escherichia coli</i> de NMP en Agar Eosina Azul de Metileno.....	64
<b>Tabla N° 9-3:</b> Resultados del Antibiograma de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	65
<b>Tabla N° 10-3:</b> Resultados del Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> .....	67

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N° 1-1:</b> Clasificación del queso de acuerdo al contenido graso.....	8
<b>Gráfico N° 1-1:</b> Flujograma de la elaboración del queso.....	9
<b>Gráfico N° 3-1:</b> Agentes infecciosos en la leche.....	12
<b>Gráfico N° 2-1:</b> Factores que provocan las ETAs.....	15
<b>Gráfico N° 1-2:</b> Metodología para el análisis microbiológico.....	35
<b>Gráfico N° 1-2:</b> Preparación de agua peptonada y diluciones de la muestra.....	36
<b>Gráfico N° 2-2:</b> Inoculación, incubación y recuento en Placas Petrifim.....	38
<b>Gráfico N° 3-2:</b> Cultivo en Agar PCA.....	40
<b>Gráfico N° 4-2:</b> Técnica del Número Más Probable.....	41
<b>Gráfico N° 5-2:</b> Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
<b>Gráfico N° 6-2:</b> Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	46
<b>Gráfico N° 7-2:</b> Antibiograma.....	48
<b>Gráfico N° 8-2:</b> Tinción Gram.....	50
<b>Gráfico N° 1-3:</b> Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en UFC/g.....	55
<b>Gráfico N° 2-3:</b> Recuento de Coliformes totales en UFC/g.....	59
<b>Gráfico N° 3-3:</b> Recuento de <i>Escherichia coli</i> totales en UFC/g.....	62
<b>Gráfico N° 4-3:</b> Nivel de sensibilidad y resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
<b>Gráfico N° 5-3:</b> Nivel de sensibilidad y resistencia de <i>Escherichia coli</i> .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Almacenamiento de leche cruda.....	4
<b>Figura 2-1:</b> Queso fresco de leche cruda.....	5
<b>Figura 4-1:</b> <i>Escherichia coli</i> lente de inmersión 100X.....	19
<b>Figura 3-1:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> , lente de inmersión 100X.....	20
<b>Figura 5-1:</b> Placas Petrifilm .....	25
<b>Figura 6-1:</b> Cultivo de <i>S. aureus</i> en Agar Manitol Salado .....	27
<b>Figura 7-1:</b> Mercado Víctor Proaño.....	31
<b>Figura 8-1:</b> Ubicación del Mercado Víctor Proaño.....	31
<b>Figura 1-2:</b> Medio de cultivo Caldo Verde bilis brillante .....	42
<b>Figura 6-1:</b> Colonias de <i>E. coli</i> en Agar Eosina Azul de Metileno.....	43
<b>Figura 7-1:</b> <i>Escherichia coli</i> lente de inmersión 100X.....	44
<b>Figura 8-1:</b> Repiques.....	48
<b>Figura 9-1:</b> Antibiograma.....	50
<b>Figura 10-1:</b> Tinción Gram,.....	51

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Toma de muestras y codificación del queso fresco
- Anexo B:** Preparación de las soluciones madre
- Anexo C:** Inoculación en el Medio Petrifilm
- Anexo D:** Incubación de las cajas Petrifilm
- Anexo E:** Recuento de Cajas Petrifilm
- Anexo F:** Resultados de la Técnica NMP
- Anexo G:** Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado
- Anexo H:** Crecimiento de *Escherichia coli* en Agar Eosina Azul de Metileno
- Anexo I:** Antibiograma
- Anexo J:** Repiques sucesivos
- Anexo K:** Tinción Gram
- Anexo L:** Esterilización de materiales
- Anexo M:** Requisitos microbiológicos de la Norma NTE INEN 1528:2102
- Anexo N:** Material para expendedores de queso fresco del mercado Santa Rosa
- Anexo O:** Aprobación del método estadístico

## RESUMEN

El análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expende en el mercado de Santa Rosa, Ciudad de Riobamba, pretende estudiar dicho producto alimenticio para conocer la calidad e inocuidad del mismo, con la finalidad de establecer si es o no apto para el consumo humano, el nivel de resistencia bacteriana y las repercusiones en la salud del consumidor. Esta investigación se aplicó a los 7 principales puntos de expendio por triplicado siguiendo el procedimiento y referencias de las Normas NTE INEN 1528 para quesos frescos no madurados, así como Internacionales, Norma mexicana NOM-243-SSA1-2010, Norma Nicaragüense NTON 03 022 – 99, analizándose *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales y *Escherichia coli*, dichos microorganismos con recuentos en Placas Petrifilm 3M, por ser eficientes y acreditadas para su uso, el procedimiento se manejó con tres diluciones consecutivas a partir de la dilución madre ( $10^{-1}$ ), las mismas que se inocularon, incubaron y contaron, para posteriormente realizar pruebas de confirmación en Placas Petri, también se realizó el antibiograma por el método Kirby Bauer encontrándose con resultados de  $1,3 \times 10^6$  UFC/g de *Staphylococcus aureus*,  $7 \times 10^5$  UFC/g de *Escherichia coli* y  $8,5 \times 10^5$  UFC/g de Coliformes totales, estos valores sobrepasan en todos los casos los máximos permisibles aptos para el consumo, por supuesto indican claramente una cadena agroalimentaria deficiente, en donde existe un gran nivel de contaminación de parte del medio en el cual se procesan, transportan y expenden los quesos frescos, por lo mismo se hace un llamado a las entidades de salud nacionales para que incluyan políticas que controlen eventos como éstos, no por medio de la clausura o cierre de estos puntos de expendio, sino con acercamiento a la comunidad, capacitación y apoyo a los ganaderos comercializadores, plantas lecheras y procesadoras.

### Palabras clave:

<QUESO>, <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>, <UFC/G>, <INOCUIDAD>, <RESISTENCIA BACTERIANA>.

## SUMMARY

The microbiological analysis and antimicrobial resistance of fresh cheese sold in the market of Santa Rosa, Riobamba City, intends to study its quality and safety, in order to establish whether it is suitable for the human consumption, besides the level of bacterial resistance and the impact on consumer health. The present research applied to the seven main points of sale in triplicate following the procedure and references of NTE INEN 1528 standards for fresh unripened cheeses, as well as International Standards: Mexican Standard NOM-243-SSA1-2010, Nicaraguan Standard NTON 03022-99 by analyzing of *Staphylococcus aureus*, total Coliforms and *Escherichia coli*. These microorganisms with counts in Petrifilm Dishes 3M, that are efficient and credited for their use, the procedure was handled with three consecutive dilutions from the mother dilution ( $10^{-1}$ ), also were inoculated, incubated and counted for confirmation tests in Petri dishes. It performed the antibiogram through the Kirby Bauer method showing the next results:  $1,3 \times 10^6$  CFU/g of *Staphylococcus aureus*,  $7 \times 10^5$  CFU/g of *Escherichia coli* and  $8,5 \times 10^5$  CFU/g of total coliforms. It compared statistically by the T-Test for a sample, demonstrating that the values exceeded in all cases the maximum allowable for consumption. It indicates a clearly deficient agro-food chain, noticing a high level of contamination that comes from the environment in which fresh cheeses are processed, transported and expended, and then the national health entities called to include policies to control such events. Rather than by means of the closing of these points of sale, but with approach to the community, training and support to the cattle dealers, dairy and processors plants

### Keywords:

<CHEESE>, <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>, <CFU/G>, <SAFETY>, <BACTERIAL RESISTANCE>.

## **INTRODUCCIÓN**

En el Ecuador, en la Sierra Central, específicamente en la provincia de Chimborazo, en la Sultana de los Andes ciudad Riobamba existe un mercado de gran popularidad y concurrencia “Víctor Proaño”, más conocido como el Mercado Santa Rosa, que se encuentra situado en el Barrio del mismo nombre en las calles Rocafuerte y Villarroel, junto a la iglesia de Santa Rosa, lugar en donde se expenden gran cantidad de productos, como lácteos y derivados, principalmente procesados artesanalmente y de origen agrícola.

Un producto que es muy solicitado es el queso fresco obtenido de leche cruda, un lácteo que no puede faltar en la mesa, por ser un alimento de la canasta básica, éste es expendido por gran variedad de artesanos y vendedores ambulantes que se encuentran tanto al interior como al exterior del mercado en condiciones insalubres, quienes expenden los quesos frescos elaborados con leche cruda sin ninguna medida de higiene, ya que éstos son quesos artesanales que no llevan ningún registro sanitario, tampoco se embalan en un material adecuado para su conservación y como resultado de esto no hay inocuidad.

Se los encuentra en el mercado a condiciones ambientales y no en cadena de frío, razón por la cual éste es el problema principal ya que existe una elevada contaminación de microorganismos al no haber un control adecuado en su elaboración, embalaje, almacenamiento y conservación que ocasionan daños en la salud de los consumidores generando diferentes patologías conocidas como ETAS (Enfermedades Transmitidas por Alimentos).

Las personas que elaboran estos quesos pertenecen a un estatus socio económico bajo, por lo mismo no tienen el conocimiento técnico e higiénico sanitario, como Buenas Prácticas de Manufactura o Buenas Prácticas de Higiene, para la producción de queso.

El mercado Santa Rosa no tiene una distribución adecuada para el expendio de los quesos frescos, siendo de forma desordenada y exponiendo al producto a contaminación ambiental, condiciones de temperatura y humedad inadecuadas que fácilmente hacen que el queso sea vulnerable a contaminación directa y cruzada por parte de los microorganismos, convirtiéndose en un producto insalubre para el consumo humano.

Un daño colateral que presenta el uso inadecuado de antibióticos en los bovinos, es la resistencia microbiana, la cual afecta tanto a los mismos vacunos como al consumidor final del derivado lácteo, en donde los microorganismos presentan una inmunidad ante los efectos de antibióticos, así como también una mayor frecuencia de infecciones que deben ser tratadas con fármacos de amplio espectro, los mismos que son utilizados sin la prescripción de un médico veterinario y adquiridos por los ganaderos al ser de venta libre en las agroveterinarias y usados de forma inadecuada.

Se estima que cada año las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria o hídrica se cobran la vida de 2,2 millones de personas, en su mayoría niños (OMS, 2016). La primera estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria muestra que casi 1 de cada 10 personas enferman cada año al ingerir alimentos contaminados.

Los niños menores de 5 años corren un riesgo particularmente grande y 125.000 niños mueren cada año de enfermedades de transmisión alimentaria (OMS, 2015), esto tomando en cuenta solamente los casos que se reportan a nivel mundial ante la OMS.

El estudio de análisis microbiológico en los quesos frescos de leche cruda es de gran valor ya que nos permite evaluar la calidad microbiológica del producto (queso fresco de leche cruda), cuantificando la carga microbiana en base a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y Coliformes totales, que son los principales causantes de las ETAS (Enfermedades Transmitidas por Alimentos).

Es de vital importancia determinar la resistencia microbiana a antibióticos, ya que al establecer la presencia de microorganismos resistentes permite sugerir la modificación de las terapias utilizadas en el tratamiento de infecciones de transmisión alimentaria y otras relacionadas con la microbiota ya descritos de la Norma NTE INEN.

Por medio del estudio de Análisis de la microbiota y resistencia antimicrobiana del queso fresco que se expenden en el mercado Santa Rosa se pretende la obtención de datos que permitan conocer los microorganismos más frecuentes que se encuentran en el queso fresco y que son los responsables de diferentes patologías como infecciones gastrointestinales, infecciones de las vías respiratorias altas, Salmonelosis, entre otras.

El estudio microbiológico nos permitirá conocer si el alimento es inocuo o no y por ende si es apto para el consumo humano, de acuerdo con las ordenanzas municipales está prohibido la venta de quesos frescos artesanales elaborados a partir de leche cruda, pero hasta la actualidad en diferentes mercados de Riobamba y del país se siguen vendiendo estos quesos, que de una u otra manera representan un peligro, debido a su inseguridad por las condiciones de elaboración.

Se capacitó a los comercializadores del lugar a través de charlas y trípticos con la finalidad de mejorar la calidad de los productos que en el lugar se expenden, ya que no sería posible la erradicación de la venta de este producto, una prueba de esto son las ordenanzas municipales que prohíben este acto pero en realidad se continua comercializando, por lo que la mejor opción es el acercamiento a los expendedores y ganaderos e instruirles en el uso y aplicación de Buenas Prácticas de Higiene, uso racional de medicamentos veterinarios, resistencia bacteriana y demás normas de calidad.

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Definición de leche

“Líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor relativamente y (pH) próxima a la neutralidad” (Lacasa, 1985, p 15)

La Leche es el producto íntegro y fresco (del día) resultante del ordeño de una o varias vacas, sanas, bien alimentadas y en reposo a ambiente natural, exenta de calostro y que cumpla con las características físicas químicas y microbiológicas establecidas por las normas y reglamentos tanto nacionales como internacionales, con la finalidad de ofrecer un producto al consumidor seguro, inocuo y principalmente de calidad. (NTE INEN, 2012)



**Figura 1-1:** Almacenamiento de leche cruda

Fuente: Trujillo A.2016

Según la NTE INEN 9:2012 la leche es producto de la secreción mamaria o ubres normal de animales bovinos lecheros (vacas) sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción de productos de diferente constitución o proveniencia, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo (NTE INEN, 2012)

Es importante mencionar que la leche cruda es el producto lácteo obtenido de uno o varios ordeños realizados durante el día de manera completa, ininterrumpida e higiénica, que aun no a sufrido ningún

proceso, adición o sustracción de componentes propios o ajenos a la misma, la cual puede ser apta para el consumo.

## 1.2. Definición de queso

“El queso fresco es el producto que está dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación” (Gil, 2010, p8). Siendo éste el resultado de la coagulación y posterior amasado de la leche proveniente de bovinos sanos y exento de sustracción o adición de componentes extras excepto cuajo o sal.

Según a NTE INEN 1528:2012 define al queso como el 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 (NTE INEN, 2012) además que debe cumplir con las características tanto físicas, químicas y microbiológicas de la norma en mención, asegurando así un producto inocuo y de calidad para la mesa del consumidor.



**Figura 2-1:** Queso fresco de leche cruda

Fuente: Trujillo A. 2016

De acuerdo con el Codex Alimentarius el queso puede ser obtenido generalmente de dos formas básicas diferentes, mediante:

***(a) Por la coagulación total o parcial de la proteína de la leche.***

Leche desnatada o descremada, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y posterior escurrimiento parcial del suero (líquido de color verde) que se desprende como consecuencia de dicha coagulación y rompimiento o mezcla de la misma. (Codex alimentarius, 2011.)

De esta manera se cumple el principio de que la elaboración del queso resulta en una congregación de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, por ende el contenido de proteína del queso deberá ser más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso.

***(b) Por técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína.***

Esto permite que los productos obtenidos de la leche posean las características físicas, químicas y organolépticas que el producto obtenido por la primera técnica la coagulación total o parcial de la proteína de la leche (Codex alimentarius, 2011.)

**Queso fresco.**

Es el producto no madurado, ni escaldado, moldeado, íntegro, de textura relativamente firme, levemente granular, elaborado con leche entera o semidescremada, coagulada con enzimas, cuajo, ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácticos al cual generamente también se le llama queso blanco.

**1.3. Clasificación de los quesos**

Según la Norma NTE INEN 1528: 2012 el queso de acuerdo a su composición y características físicas, se clasifica en:

Según la norma oficial mexicana nom-121-SSA-1-1994, la misma que clasifica el queso de acuerdo a su proceso, que podemos observar en la tabla N°1-1:

**Tabla N° 1-1:** Clasificación de los quesos.

<b>Tipo</b>	<b>Subtipo</b>
<b>Frescos</b>	Frescales
	De pasta cocida
	Acidificados
<b>Madurados</b>	Madurados prensados de masa dura
	Madurados prensados
	De maduración con mohos
<b>Procesados</b>	Fundidos
	Fundidos para untar
<b>Otros quesos</b>	Frescos
	Madurados
	Procesados

**Fuente:** Norma (Técnica Mexicana, 1994)

### **Según el proceso de elaboración:**

#### **Frescos:**

Siguen una fermentación láctica y llegan al consumidor inmediatamente después de ser elaborados, estos quesos se fabrican con la finalidad de ser consumidos sin pasar por condiciones de maduración o procesos que alarguen el tiempo para ser consumidos (Técnica Mexicana, 1994). Dispone de un elevado contenido de humedad y una vida comercial y útil mucha más corta que los quesos madurados o sometidos a diferentes métodos.

#### **Madurados:**

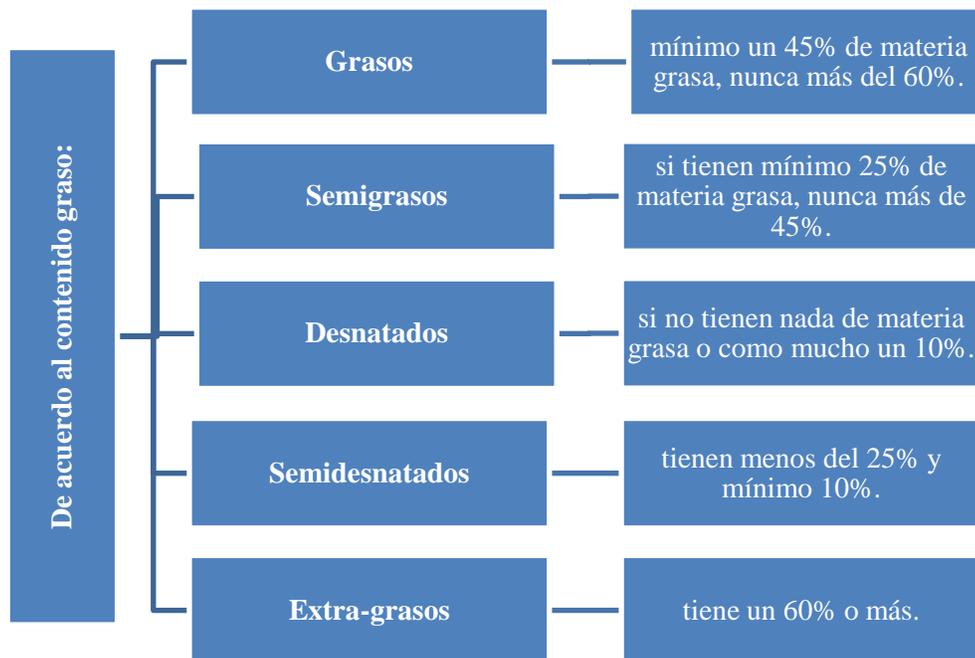
Sufren procesos como la fermentación láctica, además de otras transformaciones rigurosas, a fin de conseguir un mayor afinado, sabor o valor nutricional en el producto. Los quesos que se someten a condiciones adecuadas de maduración o procesos para que desarrollen características propias que los

diferencien de otros. (Técnica Mexicana, 1994) De acuerdo con el tiempo de maduración pueden existir diferentes tipos de quesos, entre ellos los más principales los que se describen a continuación.

- a) Queso tierno, maduración inferior a 21 días
- b) Queso oreado, maduración de 21 a 90 días
- c) Queso semicurado, maduración de 3 a 6 meses
- d) Queso curado maduración mayor a 6 meses

Los quesos se pueden clasificar en diferentes tipos dependiendo de una serie de características, como pueden ser, de acuerdo al contenido graso como se observa en el Gráfico N° 1-1:

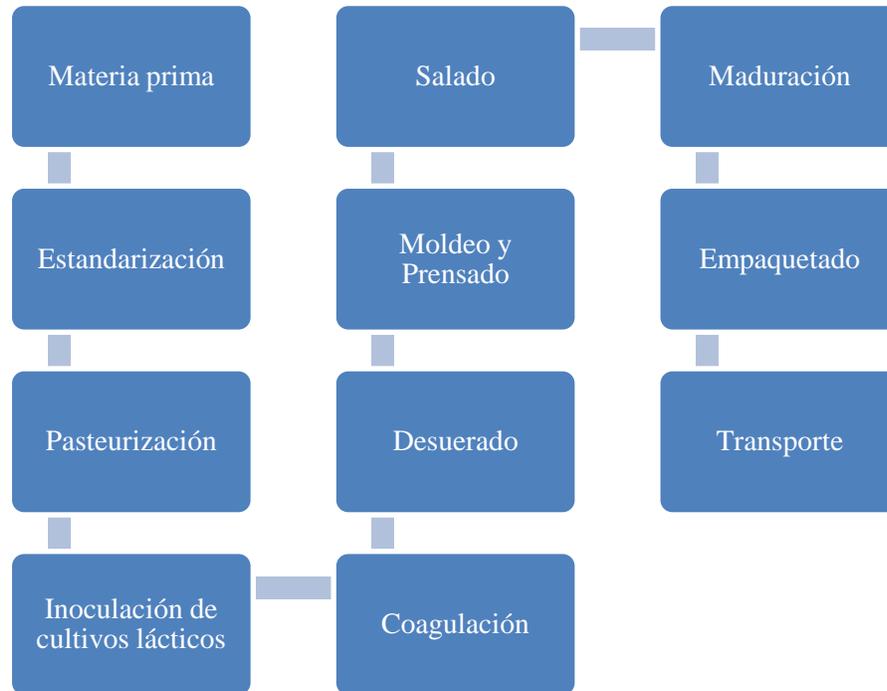
**Gráfico N° 1-1:** Clasificación del queso de acuerdo al contenido graso



**Fuente:** UNIFEM, 1996, pp 7-10

#### 1.4. Elaboración del queso

Gráfico N° 2-1: Flujograma de la elaboración del queso



Fuente: Hernández, 2006.

Según la FAO 2011 el procedimiento para la elaboración del queso es el siguiente:

- Dejar enfriar o calentar en dependencia de la temperatura que esté la leche a 38 grados centígrados.
- Añadir a la leche un gramo de cloruro de calcio con la finalidad de recuperar el calcio perdido en el proceso de calentamiento
- Disolver un cuarto de pastilla de cuajo en un cuarto de taza con agua, agregando un poquito de sal y en caso de el cuajo estar en estado líquido añadir un mililitro de cuajo líquido por cada 10 litros de leche.
- Mezclar el cuajo y la leche y agitar durante un minuto por medio de una paleta adecuada para el acto y aséptica.
- Dejar reposar la leche por 45 minutos.

- f) Mecer o cortar la cuajada que se ha formado con un cuchillo o paleta limpia en cuadrillos preferiblemente de un centímetro cuadrado.
- g) Mover o mecer la cuajada nuevamente con una paleta de acero inoxidable durante cinco minutos.
- h) Elevar la temperatura de la cuajada a 40 grados centígrados durante cinco minutos aproximadamente.
- i) Dejar en reposo la cuajada durante cinco minutos.
- j) Quitar el suero de la cuajada en tela brin, en bandeja de plástico o acero inoxidable si es el caso. Guardar el suero, ya que puede utilizarse para otros procesos (requesón) o procesos posteriores en la industria.
- k) Agregar 3 onzas o cucharadas de sal de cocina.
- l) Amasar la cuajada en un molino manual y recoger el queso molido en una bandeja de acero inoxidable.
- m) Colocar la cuajada molida en el molde o empaque a utilizar los cuales también deben ser de acero inoxidable siendo este material el requerido en la industria para el procesamiento de alimentos.
- n) Colocar el queso envasado en bandejas de acero inoxidable.
- o) Guardar en refrigeración a 4°C (FAO, 2011, pp 5-9)

### **1.5 Composición del queso**

Según Aminot (1991), el queso es el resultado de la concentración selectiva de la leche, mediante el proceso de cuajado mecido y posterior desuerado, amasado y envasado, todo esto en condiciones asépticas.

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. (Aminot, 1991, pp 20, 33.)

El contenido graso tiene una gran influencia en la textura, el sabor, rendimiento y en el color del queso (Aminot, 1991, pp 20, 33.). 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. (Aminot, 1991, pp 20, 33.)

Los minerales influyen en la coagulación de la leche y modifican sobre el desuerado y la textura del queso, la composición química se puede observar en la siguiente tabla:

**Tabla N° 2-1:** Composición química del queso fresco.

<b>Composición química del queso fresco.</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Porcentaje</b>
Agua	60.00 %
Grasa	19.00%
Proteína	17.00%
Carbohidratos	2.00%
Sales minerales	2.00%

**Fuente:** Aminot, 1991, pp 20, 33.

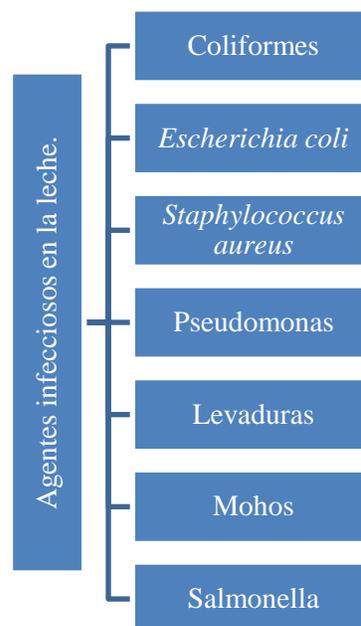
### **1.6. Fuentes de contaminación del queso**

El queso fresco es un medio rico en proteínas, grasa, minerales y carbohidratos lo cual obviamente se presta para ser un producto alimenticio en donde las bacterias y hongos por el contenido de agua que presenta, prosperan y se desarrollan rápidamente a niveles en los que alcanzan bacteremia, es decir que pueden infectar o ser causa de enfermedades transmisibles en este caso por alimentos a quienes lo consumen.

“Por el hecho de que el producto final contenga suero y sea comercializado a temperatura ambiente hacen del mismo un sustrato genial para el crecimiento y desarrollo de bacterias, tanto deteriorativas para el queso fresco, como patógenas que puedan modificar las características organolépticas del producto y producir brotes de intoxicación alimentaria en las personas” (Llanca, 2007, pp 22-26)

Durante la transformación de leche cruda obtenida de los bovinos a queso fresco resulta importante considerar tres grupos de microorganismos: Bacterias, levaduras y mohos. (Llanca, 2007, pp 22-26) De todos estos, existen algunos beneficios o ventajas para la elaboración del queso y otros por supuesto indeseables, originados de la higiene deficiente, suciedad y prácticas tecnológicas erróneas, donde se incluye:

**Gráfico N° 3-1:** Agentes infecciosos en la leche.



**Fuente:** Battro, 2010, p 54

La cantidad de bacterias que estén presentes en el producto final, en este caso, el queso refleja las condiciones sanitarias bajo las cuales la leche ha sido obtenida, transportada y procesada hasta obtener el queso, además permite determinar el período de preservación de ésta o de sus derivados.

Las principales fuentes de contaminación en la leche cruda y por ende del queso por presencia de microorganismos están constituidas por superficies tales como las ubres del animal, los utensilios y

el material de embalaje (Battro, 2010, p 54) A continuación se describen los índices máximos o la cantidad de bacterias que puede tener el queso.

**Tabla N° 3-1:** Requisitos Microbiológicos para quesos frescos no madurados.

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>	<b>Metodo de ensayo</b>
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	200	10 <sup>2</sup>	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	5	10	10 <sup>2</sup>	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	Ausencia	-	-	ISO 11290-1
Salmonella en 25 g	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
<p>Donde:</p> <p>n= Número de muestras a examinar.</p> <p>m= Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.</p> <p>M= Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.</p> <p>c= Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.</p>					

Fuente: Norma NTE INEN 1528 Quesos frescos no madurados, 2012

### 1.7. Enfermedades de Transmisión Alimentaria.

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos pueden provocarse a partir de un alimento o de agua contaminada con agentes infecciosos. Se llaman de esta manera porque el alimento o agua por supuesto actúa como vehículo o vector de transmisión de microorganismos dañinos e infecciosos y sustancias tóxicas.

“Las Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son causadas o provocadas por la ingestión de alimentos o agua que contienen cantidades considerables de bacterias infecciosas patógenas

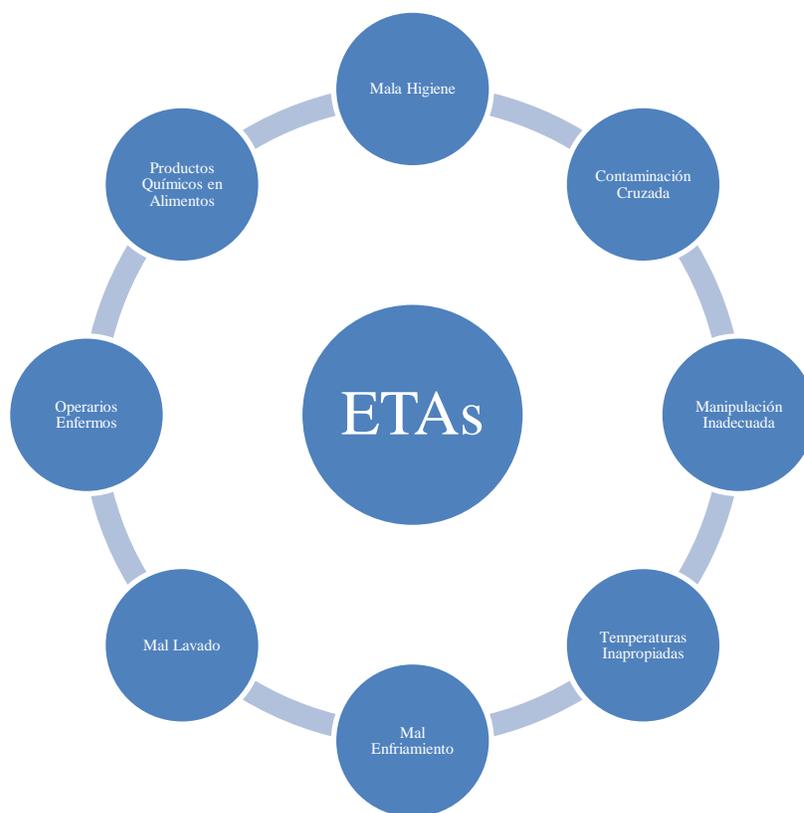
(nocivas al organismo) o de productos tóxicos (venenos o sustancias químicas) que se generan por el crecimiento o duplicación de éstas o los residuos de contaminantes de los envases. ” (Battro, 2010, p 54)

Los síntomas provocados por las Enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) varían entre las diversas patologías que pueden incidir de acuerdo al tipo de contaminación, así como también según la cantidad del alimento contaminado consumido o la virulencia de los microorganismos. Los signos más comunes son:

- Diarreas
- Vómitos
- Dolores abdominales
- Dolor de cabeza
- Fiebre
- Síntomas neurológicos
- Visión doble
- Ojos hinchados
- Dificultades renales
- Retención de líquidos.

Algunas de estas enfermedades transmitidas por alimentos pueden llevar a generar una enfermedad de largo plazo. Un claro ejemplo de esto es la *Escherichia coli* que puede provocar fallas en el riñón en niños y bebés, la *Salmonella* puede provocar artritis y serias infecciones incuyendo en personas adultas, y la *Listeria monocytogenes* puede generar meningitis comprometiendo hasta el cerebro, o un aborto en las mujeres embarazadas. (Estrella, 2013, p 52)

**Gráfico N° 4-1:** Factores que provocan las ETAs



**Fuente:** Battro, 2010

**Todos estos factores se pueden dividir en tres categorías:**

- a) Abuso del tiempo de exposición y manejo equivocado de la temperatura de pasteurización en los alimentos.
- b) Errónea manipulación de los alimentos y equipo mal lavado y procesado en ambientes contaminados.
- c) Contaminación cruzada entre los alimentos. (Battro, 2010)

### ***1.7.1 Tipos de Enfermedades de Transmisión Alimentaria***

Las Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) pueden ocasionar:

**Infección:**

Es la entrada, crecimiento y desarrollo de bacterias y/o virus patógenos u otros parásitos en un organismo vivo, y la consecuente alteración que éstos producen en la bioquímica del cuerpo humano. Son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales. (Rosario, 2005,p 45) Por ejemplo: salmonelosis, hepatitis viral tipo A y toxoplasmosis, entre otros.

**Intoxicación:**

Es un estado de envenenamiento producido por sustancias de origen endógeno o exógeno al ser humano. Son las Enfermedades transmitidas por alimentos producidas por la ingestión de toxinas formadas y segregadas en los tejidos de plantas, así como también de animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos procesados, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o de forma intencional al momento de su producción las cuales por ende generalmente llegan al consumidor de forma directa y provocan un daño directo o colateral. (Rosario, 2005,p 45)

Las intoxicaciones ocurren cuando las toxinas o el caso de venenos de bacterias o mohos están directamente en el alimento ingerido. Toxinas que generalmente no poseen olor ni sabor y son capaces de causar enfermedades o daños incluso irreversibles después que el microorganismo es eliminado del cuerpo. Algunas de estas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como en algunas variedades de hongos y animales raros como el caso del pez globo. (López, 2011, pp 198-203)

Ejemplos: botulismo, intoxicación estafilocócica o por toxinas producidas por hongos.

**Toxiinfección:**

Las toxiinfecciones son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad suficiente de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Ejemplo: cólera

La toxiinfección es el resultado del consumo de alimentos que contenía una gran cantidad de microorganismos que, después de ingeridos o consumidos, producen toxinas dañinas en el intestino causando una enfermedad o infección. (López, 2011, pp 198-203)

Los agentes exógenos o externos son los tóxicos o venenos químicos y los agentes endógenos o internos son aquellas que generan el propio organismo por la reacción de otras sustancias y que pueden producir reacciones alérgicas o intoxicaciones por su alta concentración que presentan en el organismo (Rosario, 2005,p 45)

Las enfermedades transmitidas por alimentos de origen infeccioso pueden estar vinculadas con agentes virales, parasitarios y bacterianos. Entre las bacterias asociadas a ETAs se pueden indicar las siguientes *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* (López, 2011, pp 198-203)

### **1.7.2 Contaminantes en los alimentos.**

Los principales peligros potenciales que pueden ocasionar los agentes contaminantes que se encuentran en los alimentos corresponden a:

- Contaminación microbiana
- Los residuos de plaguicidas utilizados en cosechas agrícolas y de medicamentos veterinarios usados en bovinos.
- Los aditivos alimentarios.
- Los contaminantes ambientales usados en procesos industriales como el cadmio, plomo, mercurio, etc.
- Otros factores (micotoxinas, biotoxinas marinas, inmundicias, etc) (Bravo, 2004, p 35)

### **1.8. Indicadores biológicos de los quesos**

La leche destinada para la elaboración de quesos frescos contiene normalmente no solo su flora microbiana normal, sino los provenientes de contaminaciones distintas por la manipulación a la que debe ser objeto durante su obtención, transporte, procesamiento, embalaje y posterior comercialización.

Los productos frescos como el queso elaborados a partir de leche y que no son sometidos a rigurosos tratamientos como la pasteurización antes de ser comercializado y consumido, son los principales focos de transmisión y contaminación con microorganismos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria como la salmonelosis, enfermedades entéricas, y en general enfermedades graves caracterizadas por fiebres altas, vómito, gastroenteritis y cuadros de diarrea generalizada. (Portero, 2001, p 46)

La calidad microbiológica de los alimentos y del queso fresco, es evaluada normalmente por los microorganismos que están presentes en ellos. La calidad microbiológica de un alimento como el queso hace referencia a dos aspectos fundamentales: la calidad higiénico-sanitaria y la calidad comercial.

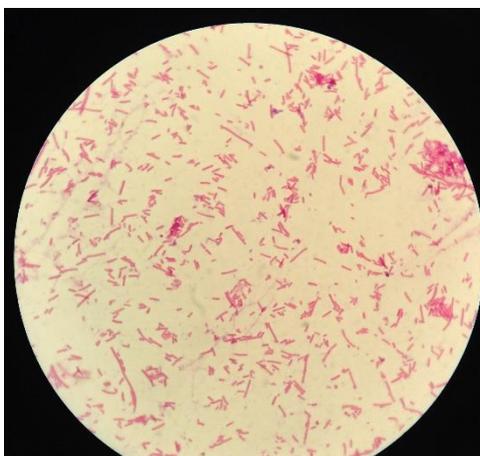
De la misma manera como la leche es un alimento muy completo puede ser el medio de crecimiento de otros microorganismos que pueden ser perjudiciales para la salud humana, la FDA (2014) informa que la información proporcionada por el Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), entre 1993 y 2006 se enfermaron más de 1500 personas en los Estados Unidos por haber consumido productos como la leche cruda o queso elaborado con ésta ya que puede contener bacterias peligrosas como Salmonella, *E. coli* y Listeria (Portero, 2001, p 46)

### ***1.8.1 Coliformes totales y fecales:***

Es un grupo de bacterias que tienen ciertas características bioquímicas en común y son de gran importancia como indicadores de contaminación del agua y por supuesto de los alimentos. Su presencia en los alimentos puede corresponder a:

- Elaboración inadecuada
- Contaminación del alimento ya preparado
- Crecimiento en el alimento.

Coliformes fecales y *E. coli* pueden ser indicativo de contaminación fecal del alimento, aunque estas bacterias pueden vivir en ambientes no intestinales como los alimentos y el agua, incluyendo las instalaciones industriales (Bravo, 2004, p 35)



**Figura 4-1:** *Escherichia coli* lente de inmersión 100X

Fuente: Trujillo A. 2016

“Los microorganismos coliformes son bacterias facultativas aerobias y anaerobias, Gram negativas y que fermentan la lactosa produciendo ácido y gas dentro de las 48 horas a 35 °C y para productos lácteos a 32 °C” (Portero, 2001, p 46)

### **1.8.2 *Escherichia coli*:**

Ésta es una bacteria que se la puede encontrar normalmente en el intestino del ser humano y de otros animales. A pesar de que no parece que su presencia tenga una función especialmente relevante, se ha descrito que dicha bacteria *E. coli* contribuye la absorción de algunas vitaminas liposolubles, especialmente la vitamina K, esta bacteria es capaz de producir enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal entérico. (Pierce, 2009, p 216)

“La bacteria *E.coli* es la especie predominante de la flora anaeróbica facultativa del colon humano. Las infecciones producidas por cepas de *E.coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse gravemente. Cuatro síndromes clínicos pueden producirse de la infección por cepas patogénicas:

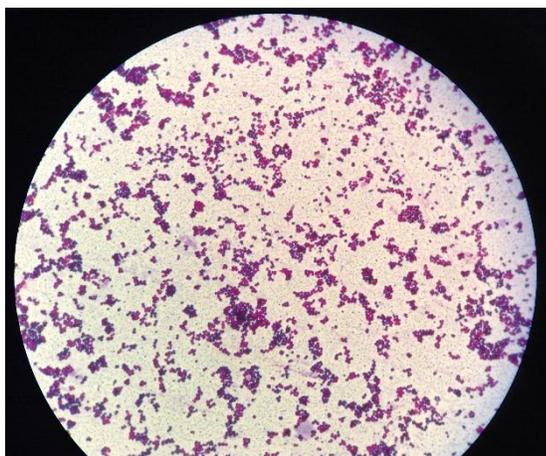
- Infección de vías urinarias
- Sepsis
- Meningitis
- Enfermedad diarreica” (Romero, 2007, p 753)

El ser humano se infecta o contagia a través del consumo de alimentos y agua contaminada con esta bacteria e incluso mediante la carne y la leche de animales rumiantes, que no suelen enfermarse o tener síntomas de enfermedad. Si el bovino es portador de la cepa patógena puede contaminar todos los productos y el ambiente en el que habita, a través del derramamiento de las heces, es decir a través de aguas y prados que los rodean. (Romero, 2007, p 753)

En el caso de los vegetales, éstos se contaminan por la tierra en la que se cultivan (a su vez contaminada por las heces de los animales infectados que se encuentran generalmente cerca al área de cultivo) o por el agua con que estos son regados, tomando en cuenta de que son bacterias sumamente resistentes y pueden viajar en los sistemas de riego o a la interperie y contaminar los alimentos. (Pierce, 2009, p 216)

### ***1.8.3 Staphylococcus aureus:***

Esta bacteria es un microorganismo que coloniza principalmente la piel, las mucosas y la nasofaringe de humanos y animales. Su presencia en los alimentos procesados o industrializados se debe a la contaminación introducida por los operadores que manipulan tanto los alimentos como los sistemas adherentes al mismo, debido a prácticas de manufactura inadecuadas, ineficientes o bien a la utilización de materia prima contaminada como la misma leche de vacas enfermas o infectadas con mastitis, siendo ésta una enfermedad bastante común en las ubres de los bovinos productores de leche. (López, 2011, pp 198-203)



**Figura 3-1:** *Staphylococcus aureus*, lente de inmersión 100X

Fuente: Trujillo A. 2016

La contaminación puede generarse también por contacto del producto alimenticio como es el queso con superficies expuestas a materia prima contaminada, como son los tanques de cuajado, los mesones, hormas y los sistemas de embalaje. Entre los alimentos implicados en brotes de enfermedades de transmisión alimentaria asociados a *S. aureus* se encuentran la leche y sus derivados, como queso, crema, yogur y helados. (Romero, 2007, p 753)

También la carne de los vacunos, la carne cocida cortada en rebanadas, las aves, pescados, la mayonesa, los productos de pastelería, sándwiches, las ensaladas y los flanes, entre otros productos de repostería. La multiplicación, crecimiento y desarrollo de *S. aureus* en el alimento está favorecida por determinadas condiciones, como es la temperatura de almacenamiento  $>10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la actividad acuosa  $> 0,86$  y  $\text{pH} > 5$  y los nutrientes propios que se encuentran en el alimento consumido. (López, 2011, pp 198-203)

### **1.9. Resistencia a antimicrobianos**

La resistencia a los antimicrobianos, es la presentada por un microorganismo a un determinado medicamento antimicrobiano al que originalmente era sensible, lo cual alcanza en una generación y tiempo determinado.

Los microorganismos resistentes (bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) pueden tolerar ataques de medicamentos antimicrobianos o sustancias químicas tales como antibióticos, fungicidas, antivirales y antipalúdicos, de tal manera que los tratamientos convencionales resultan ineficientes y las infecciones persisten, éstos son mas difíciles de tratar, más costosas (Bravo, 2004, p 35) y además incrementa el riesgo de propagación de la enfermedad y dicho microorganismo que ya dispone de esta resistencia.

La aparición de cepas resistentes a determinados antibióticos es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos intercambian características de resistencia (plásmidos), o se reproducen en presencia de restos de antibióticos pero no presentan la cantidad suficiente para destruirlos, pero la utilización y el uso indebido de antimicrobianos también acelera su aparición, por dosis insuficientes, mal administradas o terapéuticas erróneas para una determinada infección. (Bravo, 2004, p 35) Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, las inadecuadas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de alimentos propician la propagación de los microorganismos resistentes.

El fenómeno de resistencia a los antimicrobianos (o farmacorresistencia) se produce cuando los microorganismos, sean éstos bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios o modificación en el ADN que hacen que los medicamentos utilizados en el tratamiento de las infecciones dejen de ser eficaces o incluso útiles de alguna manera. (Portero, 2001, p 46)

El fenómeno es muy preocupante ya que las infecciones por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, contagiarse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad misma ya que se requiere de nuevas investigaciones para la generación de nuevos medicamentos para el tratamiento de dichas infecciones. (OMS, 2015)

### ***1.9.1. Antecedentes de la resistencia a antimicrobianos***

En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud anunció que se estaba registrando un aumento a gran escala de la resistencia a los fármacos para el tratamiento del VIH, aunque sin alcanzar niveles críticos. Desde aquel entonces, varias fuentes y centros de investigación han informado de nuevos aumentos de la resistencia a fármacos de primera elección, y es posible que en un futuro cercano sea necesario emplear medicamentos más caros y de mayor espectro de acción en la terapéutica.

En el año 2013 hubo alrededor de 480.000 casos de tuberculosis multirresistente registrados en el mundo. La tuberculosis ultrarresistente se ha detectado en más de 100 países alrededor del mundo ésta requiere de terapéuticas que son mucho más largas y menos eficaces que los utilizados en la tuberculosis no resistente. (OMS, 2015)

Investigaciones de la Organización Mundial de la Salud ha comprobado que en 10 países las cefalosporinas de tercera generación, último recurso para la terapéutica de la gonorrea, pueden ser ineficaces a causa de las resistencias bacterianas a la misma. Puesto que no se están desarrollando vacunas o nuevos fármacos, es posible que en poco tiempo no podamos tratar esta infección de transmisión sexual. (Bravo, 2004, p 35)

### ***1.9.2. Mecanismos de resistencia de las bacterias:***

Las bacterias o cualquier otro microorganismo, por su gran capacidad de adaptación genética, pueden desarrollar mecanismos de resistencia a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca propia del organismo en las bacterias si carecen de diana para la captación de un antibiótico (como la falta de pared en el *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos). (Bravo, 2004, p 35)

La resistencia adquirida es la que realmente tiene una importancia relativa desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética del ADN de la bacteria y puede generarse por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética.

**Inactivación del antibiótico por enzimas:** La bacteria adquiere la capacidad de producir enzimas que inactivan o bloquean al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas que muchas bacterias son capaces de producirlas y desactivar la acción de los antibióticos betalactámicos como la penicilina. (OMS, 2015)

**Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana:** Las bacterias tienen la capacidad de producir mutaciones en las porinas de la pared bacteriana que impiden la entrada de determinados antibióticos como los betalactámicos o alteran los sistemas de transporte como el de los aminoglucósidos en los anaerobios.

**Alteración por parte de la bacteria en su punto diana:** Impidiendo o dificultando la acción o mecanismo del antibiótico. (OMS, 2015)

### **1.10. 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. (DANIVAL, 2012) 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. (DANIVAL, 2012)

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. (DANIVAL, 2012) 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 cultivo. (Torrico, 2012)

### ***1.10.1 Placas Petrifilm***

Es un método microbiológico que consiste en un conjunto de placas listas para usarse diseñadas con prestaciones para ahorrar tiempo, incremento de productividad, fiabilidad y eficiencia de los procesos de detección, cuantificación o análisis. Su diseño dispone de una película rehidratable cubierta con nutrientes y agentes gelificantes. (Nore, 2008)

Proporciona resultados en tres pasos: inoculación, incubación y recuento, siendo uno de los métodos más rápidos eficaces y validados por normas tanto nacionales como internacionales para su uso y aplicación en investigación ya sea en la industria o a nivel científico.

Las Placas Petrifilm™ están disponibles para la mayoría de las necesidades y de pruebas microbiológicas incluyendo:

- Recuento de aerobios

- Recuento de coliformes
- Recuento de *E.coli* / coliformes
- Recuento de Enterobacterias
- Recuento de alta sensibilidad de coliformes
- Recuento rápido de coliformes
- Recuento de *Staphylococcus aureus*
- Recuento de mohos y levaduras y Listeria en ambientes. (Nore, 2008)



**Figura 5-1:** Placas Petrifilm

**Fuente:** Trujillo A. 2016

### ***1.10.2 Agar nutritivo***

Es un medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento de microorganismos poco exigentes en lo que se refiere a requerimientos de nutrientes. Su aplicación está descrita para procedimientos de análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria por su inocuidad.

**Tabla N° 4-1:** Composición y preparación del Agar Nutritivo.

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
Pluripeptona	5.0	
Extracto de carne	3.0	
Cloruro de sodio	8.0	
Agar	15.0	
pH final: 7.3 ± 0.2		

Fuente: Britanialab, 2016

### ***1.10.3 Agar Eosina Azul de Metileno.***

Este medio de cultivo (también denominado E.A.M. por su abreviatura) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales como la *E. coli*. Permite el crecimiento y desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

**Tabla N° 4-1:** Composición y preparación del Eosina Azul de Metileno.

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
Peptona	10.0	
Lactosa	5.0	
Sacarosa	5.0	
Fosfato dipotásico	2.0	
Agar	13.5	
Eosina	0.4	
Azul de metileno	0.065	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Fuente: Britanialab, 2016

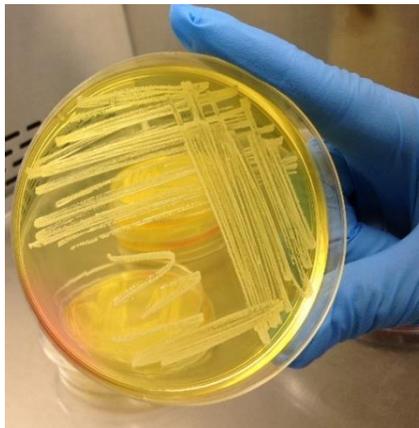
#### 1.10.4 Agar Manitol Salado

Es un medio de cultivo específico, selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos obtenidos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria. (Britanialab, 2016)

**Tabla N° 5-1:** Composición y preparación del Agar manitol Salado.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de carne	1.0	Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	10.0	
d-Manitol	10.0	
Cloruro de sodio	75.0	
Agar	15.0	
Rojo de fenol	0.025	
pH final: 7.4 ± 0.2		

Fuente: Britanialab, 2016



**Figura 6-1:** Cultivo de *S. aureus* en Agar Manitol Salado

Fuente: Trujillo A. 2016

### 1.10.5 Agar Muller Hinton

El agar Muller Hinton es un medio de cultivo que ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por diversos métodos. Además es usado con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes en el laboratorio de análisis microbiológico. (Britanialab, 2016)

**Tabla N° 6-1:** Composición y preparación del Agar Muller Hinton.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Infusión de carne	300.0	Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas de Petri (o agregar los suplementos que se desee) hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).
Peptona ácida de caseína	17.5	
Almidón	1.5	
Agar	15.0	
pH final: 7.3 ± 0.1		

Fuente: Britanialab, 2016

### 1.10.6 Caldo Verde Bilis Brillante.

El Caldo Verde Bilis Brillante es un medio que está recomendado para el recuento de coliformes totales y fecales, por la técnica del número más probable (NMP). En el medio de cultivo, la peptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado crecimiento y desarrollo bacteriano, la bilis y el verde brillante son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas a excepción de coliformes, y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable que influye en el cambio de color del medio. Es una propiedad del grupo coliforme, la fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas. (Britanialab, 2016)

**Tabla N° 7-1:** Composición y preparación del Agar Muller Hinton.

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
Bilis de buey deshidratada	20.0	Suspender 40 g del polvo deshidratado por litro de agua destilada. Disolver y distribuir 10 ml por tubo con campanita de Durham. Preparar además, el medio a doble concentración. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Lactosa	10.0	
Peptona	10.0	
Verde brillante	0.0133	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Fuente: Britanialab, 2016

### *1.10.7 Agua de peptona*

Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos o agua y otros materiales de interés sanitario. Es un medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para reactivar células de enterobacterias degradadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento o bebida. (Britanialab, 2016)

**Tabla N° 8-1:** Composición y preparación del Agua de peptona.

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
Peptona de carne	10.0	Suspender 15 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Cloruro de sodio	5.0	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Fuente: Britanialab, 2016

### **1.11 Técnica del Número Más Probable.**

Ya que un gran número de enfermedades infecciosas son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos, bebidas y el agua, es necesario contar con microorganismos que funcione como indicador de contaminación fecal como el caso de las coliformes. Estos microorganismos deben de ser constantes, abundantes y exclusivos de la materia fecal o heces, deberán tener una sobrevivencia similar a la flora intestinal y deberán de ser capaces de presentar crecimiento y desarrollo extra intestinalmente. (UNAM, 2009)

En el caso de que las coliformes lleguen a los alimentos, no sólo que sobreviven, sino que se multiplican y desarrollan, por lo que en los alimentos el grupo coliforme adquiere un significado distinto al que recibe en el agua, ya que en el primero tiene mayores facultades para su crecimiento. (UNAM, 2009) En el caso de productos alimenticios que han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.), los indicadores de las malas prácticas sanitarias e higiénicas.

Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente, y generan una producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- *Enterobacter*,
- *Escherichia*,
- *Citrobacter*
- *Klebsiella*.

Y en nuestro caso la *Escherichia coli* es el organismo de interés en la investigación.

### **1.12 Mercado Víctor Proaño de la ciudad de Riobamba.**

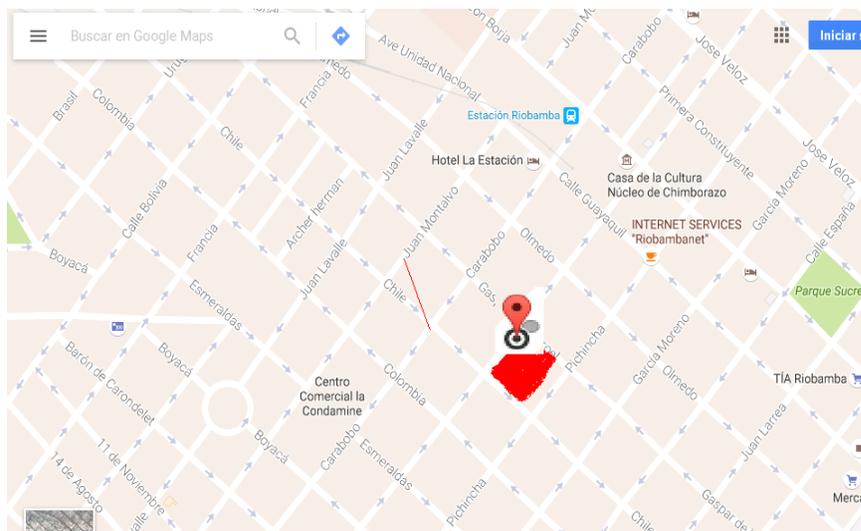
El barrio Santa Rosa, que empieza en la calle Carabobo hasta la Pichincha y desde la Villarroel hasta la Guayaquil, de la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, fue la cuna de artesanos, obreros y campesinos de los pueblos cercanos, que por su forma de vestir fueron conocidos como los 'cutos'. En ese sitio se originaron las mayores fiestas y procesiones urbanas que se mantienen hasta el día de hoy. Es el caso de la celebración del Niño Rey de Reyes. (El Telégrafo, 2016)

En este barrio se encuentra el mercado Víctor Proaño y es uno de los más concurridos por la gente riobambeña, siendo aquí en donde se expenden gran variedad de productos principalmente de origen agrícola.



**Figura 7-1:** Mercado Víctor Proaño.

**Fuente:** Trujillo A. 2016



**Figura 8-1:** Ubicación del Mercado Víctor Proaño.

**Fuente:** Google maps. 2016

## CAPÍTULO II

### **2. MARCO METODOLÓGICO.**

#### **2.1 Lugar de la investigación.**

El mercado Víctor Proaño mejor conocido como Santa Rosa, ubicado en la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo, lugar en el cual se tomaron las muestras de queso fresco para el análisis microbiológico, el mismo que fue realizado en los laboratorios de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### **2.2 Período de la investigación**

Las muestras de queso fresco del mercado Víctor Proaño fueron tomadas durante los días sábados 14, 21 y 28 de mayo de 2016, de la misma manera los análisis tanto de recuento de la microbiota, como de la resistencia a antimicrobianos fueron llevados a cabo de manera inmediata tras la toma de muestra para evitar cualquier alteración en el material biológico.

#### **2.3 Materiales, Equipos y Reactivos**

##### **Materiales**

- ❖ Alcohol Industrial
- ❖ Alcohol Potable
- ❖ Algodón
- ❖ Asa y aguja de inoculación
- ❖ Balones aforados
- ❖ Cajas Petri
- ❖ Cinta indicadora de esterilización
- ❖ Cooler
- ❖ Discos de antibióticos
- ❖ Dispensor para placas Petrifilm

- ❖ Estándar Mac Farland
- ❖ Franela
- ❖ Frascos de vidrio estériles
- ❖ Gel refrigerante
- ❖ Gradillas
- ❖ Hisopos estériles
- ❖ Lámpara de alcohol
- ❖ Marcador permanente
- ❖ Matraces Erlenmeyer
- ❖ Parafilm
- ❖ Pinza para discos
- ❖ Pipeta automática de 1000 µL
- ❖ Placas portaobjetos
- ❖ Probeta
- ❖ Puntas azules estériles
- ❖ Regla
- ❖ Reverbero
- ❖ Solución salina estéril
- ❖ Tego al 2%
- ❖ Toallas absorbentes
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Tubos Durhan

**Medios de cultivo bacteriano:**

- ❖ Agar Eosina Azul de Metileno (EAM)
- ❖ Agar Estándar Métodos
- ❖ Agar Manitol Salado
- ❖ Agar Mueller Hinton
- ❖ Agua peptonada
- ❖ Placas Petrifilm 3M: *E. coli*/Coliformes y Staph Express.

## **Equipos**

- ❖ Autoclave
- ❖ Balanza
- ❖ Cámara de flujo laminar
- ❖ Estufa
- ❖ Microscopio
- ❖ Refrigerador
- ❖ Cámara fotográfica

## **Reactivos**

- ❖ Aceite de inmersión
- ❖ Agua destilada
- ❖ Kit para tinción Gram: cristal violeta, lugol, acetona y safranina.
- ❖ Disco de confirmación para *Staphylococcus aureus*.

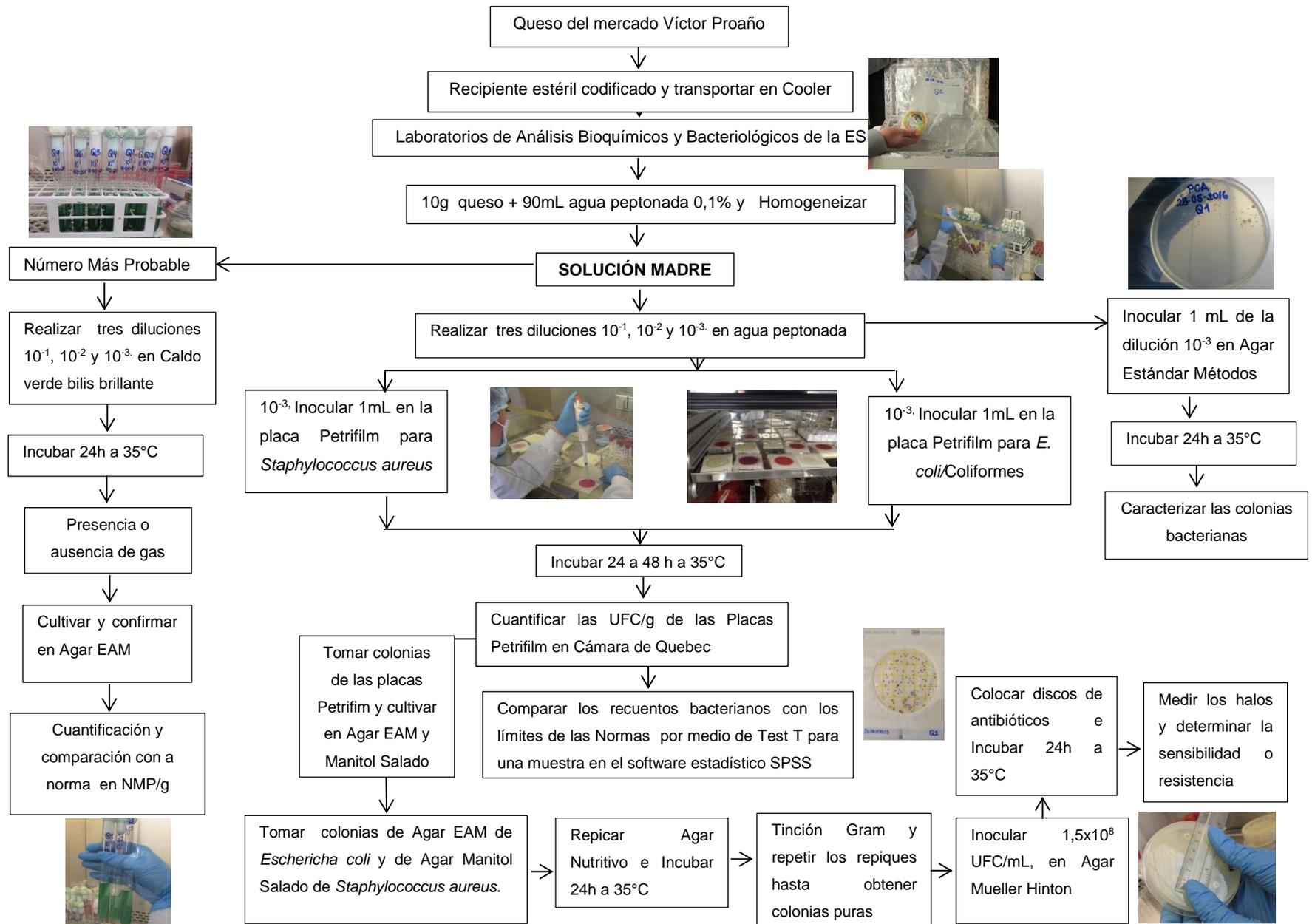


Gráfico N° 1-2: Metodología para el Análisis Microbiológico de queso fresco

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Recolección y transporte de muestras

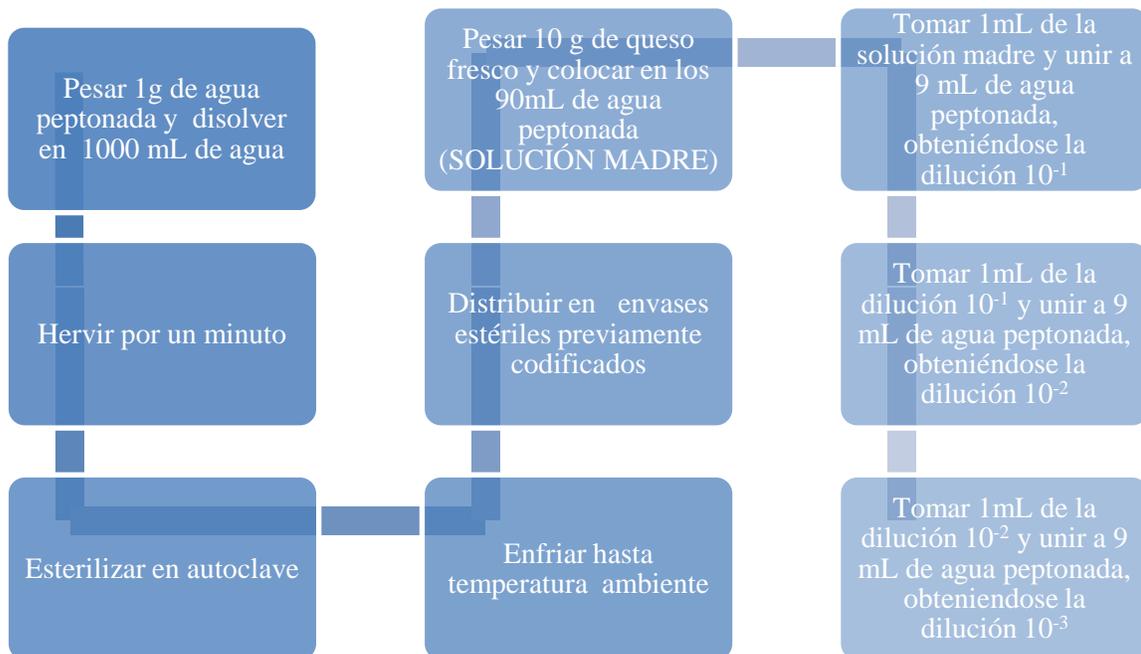
El proceso de recolección de muestras o muestreo se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 4 para Leche y productos lácteos. Muestreo, todo esto tomando en cuenta las normas de asepsia para no influir en la microbiota del producto lácteo.

Los quesos frescos, una vez realizada su adquisición se los colocó en una funda Zíloc la cual ya estuvo previamente codificada con la fecha y el número asignado al punto de expendio, posteriormente se los ubicó en el Cooler con Frío Gel para su transporte a los Laboratorios de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

### 2.4.2 Preparación de la solución madre y diluciones

#### Preparación de agua peptonada

Gráfico N° 1-2: Preparación de agua peptonada y diluciones de la muestra.



Elaborado por: Trujillo A. 2016

La solución diluyente siendo ésta el agua de peptona, se la llevó a cabo bajo la Norma NTE INEN 1529-2, y la NORMA NTE 734 para LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS, las cuales para uso general indican que el diluyente tendrá una concentración de 0,1% p/v.

$$0,1g \text{ --- } 100mL$$

$$Xg \text{ --- } 1000mL$$

$$Xg = \frac{1000mL \times 0,1g}{100mL}$$

$$Xg = 1g$$

1. Se pesó 1g y se mezcló con los 1000 mL de agua destilada.
2. Hervir por tres veces agitando constantemente.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C por 30 minutos.
4. Confirmar la esterilización por medio de la cinta indicadora.
5. Esperar que enfríe hasta aproximadamente los 45°C.
6. En un medio estéril colocar 9mL para las diluciones y 90mL para las soluciones madre en los respectivos envases, con precaución de que no se formen burbujas en el medio.
7. Una vez terminado la preparación en caso de no requerirlo en ese momento guardarlo en refrigeración en condiciones de asepsia.

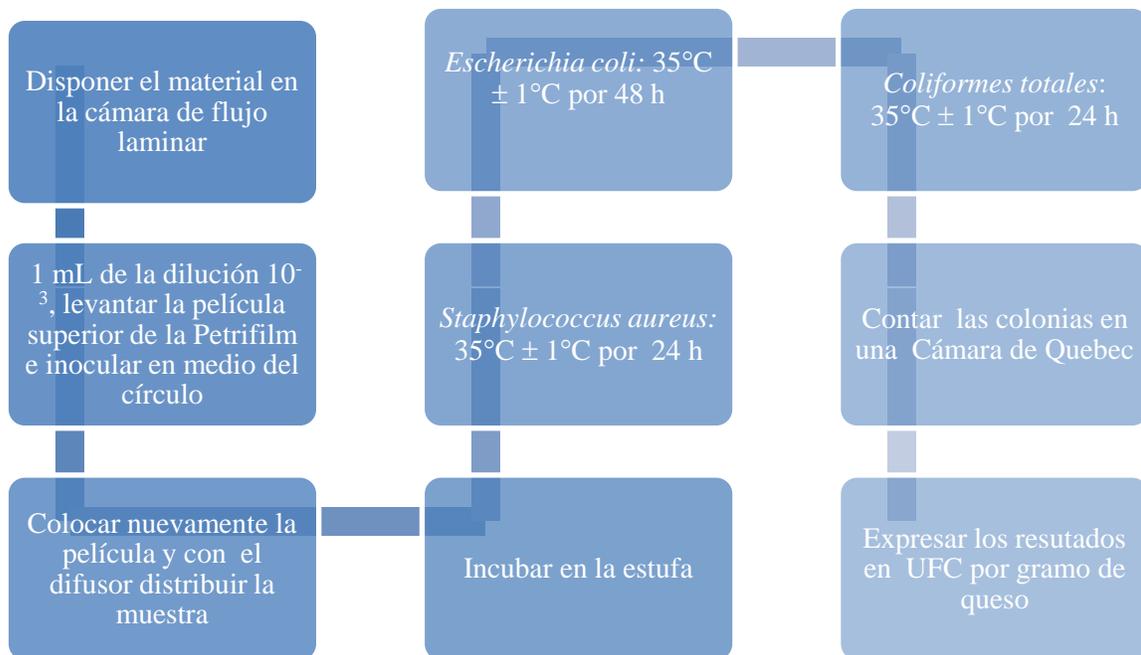
Posterior al muestreo, en el laboratorio se procedió a preparar las soluciones madres y sus respectivas diluciones.

1. Designar el área de trabajo y desinfectarla con solución de Tego.
2. Encender los mecheros de alcohol para evitar cualquier tipo de contaminación microbiana.
3. Codificar los envases estériles con fecha y número de punto de expendio, en los cuales se prepara la solución madre, así como también los respectivos tubos para las diluciones.
4. Con un baja lenguas o espátula estéril tomar 10 g de queso fresco y colocar en el envase para la muestra madre, la cual debe contener los 90mL de agua peptonada.
5. Homogeneizar (agitar) el diluyente con la muestra de queso, siendo esta la solución madre.

6. Con una pipeta automática y punta estéril azul tomar 1mL de la solución madre y transferir a un tubo de ensayo que debe contener 9 mL de agua peptonada, homogeneizar, dejar reposar y es la dilución  $10^{-1}$ .
7. Tomar 1 mL con la pipeta automática y con una punta estéril diferente de la dilución  $10^{-1}$ , y colocar en otro tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, homogeneizar, obteniéndose la dilución  $10^{-2}$ .
8. De igual manera tomar 1 mL con la pipeta automática y punta estéril de la dilución  $10^{-2}$ , y colocar en otro tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, homogeneizar, y finalmente se obtiene la dilución  $10^{-3}$ , la cual será utilizada en los análisis microbiológicos de recuento y resistencia de la microbiota. (NTE INEN 1529-2, 1999).

### 2.4.3 Inoculación, incubación y recuento en placas Petrifilm 3M

**Gráfico N° 2-2:** Inoculación, incubación y recuento en Placas Petrifilm.



**Elaborado por:** Trujillo A. 2016

1. Dentro de la cámara de flujo laminar colocar todas las placas en orden ascendente, previamente codificadas en base de las muestras a sembrar.

2. Tomar 1 mL con la pipeta automática de la dilución  $10^{-3}$ , levantar la película superior de la Petrifilm 3M y con la pipeta en posición perpendicular, inocular en medio del círculo de la base en el cual se encuentra el medio deshidratado.
3. Colocar nuevamente la película superior en su posición original, de manera que no se formen burbujas en la base.
4. Colocar el difusor 3M sobre la placa inoculada y presionar suavemente con la finalidad de que se distribuya uniformemente la muestra.
5. Dejar en reposo la placa Petrifilm 3M durante 5 minutos, con la finalidad de que el agente gelificante se solidifique.
6. Calibrar la estufa a  $35^{\circ}\text{C}$  e incubar las placas con la película transparente hacia arriba, en base a las siguientes condiciones:

Coliformes totales:  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas  $\pm$  2 horas

*Escherichia coli*:  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas  $\pm$  2 horas

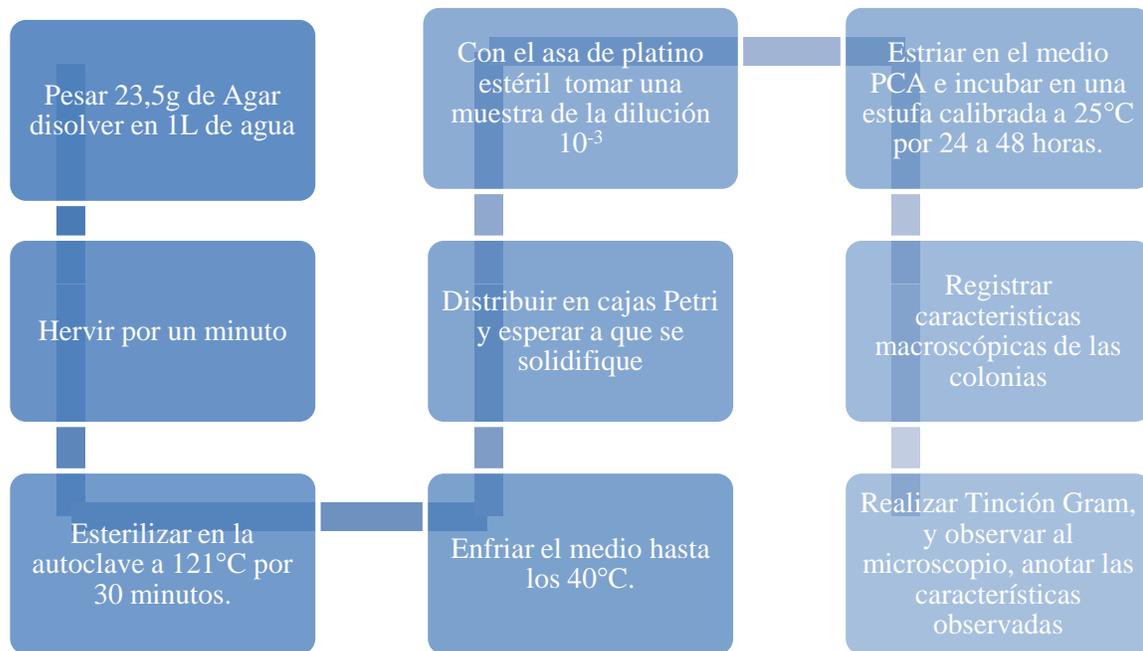
*Staphylococcus aureus*:  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas

7. Sacar las placas de la estufa y realizar el recuento de las UFC en base a la Guía de interpretación.
8. Expresar las UFC por gramo de queso y registrar los resultados para su posterior tabulación.
9. Posterior al recuento bacteriano de la Placa Staph Express para *Staphylococcus aureus*, en caso de la presencia de colonias bacterianas de un color diferente al patrón normal (rojo o violeta) o si sobrepasan el valor contable (50 UFC) colocar el disco de confirmación, incubar en la estufa por 3 horas más y realizar el recuento nuevamente de las UFC.

#### **2.4.4 Evaluación de la microbiota de queso en Agar PCA.**

El Agar de Recuento en Placa, es un medio de cultivo general que permite el crecimiento bacteriano, el mismo nos proporciona las características de la microbiota existente en el alimento, la misma que puede ser identificada posteriormente en medios de cultivo de crecimiento específico o por su visualización al microscopio.

**Gráfico N° 3-2:** Cultivo en Agar PCA.



**Elaborado por:** Trujillo A. 2016

### **Preparación del medio de cultivo:**

1. Realizar el cálculo del volumen requerido en base al número de cajas necesarias, y pesar el Agar tomando en cuenta que 23,5g de Agar se deben disolver en 1 L de agua destilada.
2. Calentar en un reverbero hasta ebullición y hervir por un minuto.
3. Esterilizar en el autoclave a 121°C por 30 minutos.
4. Enfriar el medio de cultivo hasta aproximadamente los 40°C.
5. Colocar el medio en las cajas Petri estériles.
6. Esperar a que se solidifique el Agar y estará listo para usarse.

### **Inoculación e incubación**

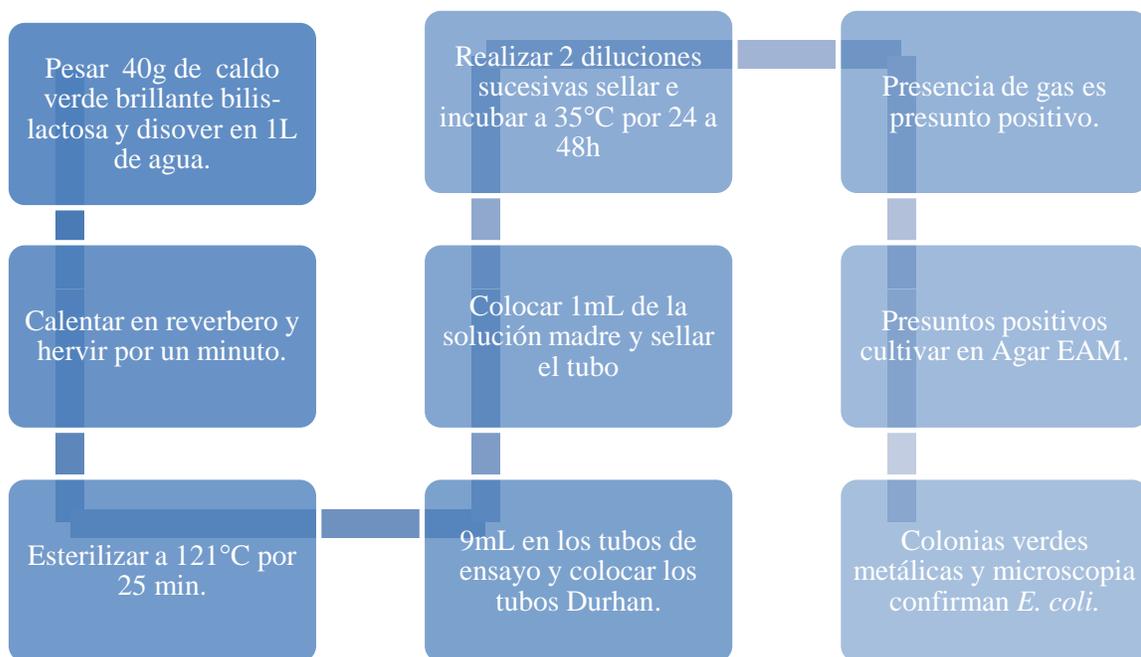
Esterilizar el asa de platino en el fuego y tomar una muestra de la dilución 10<sup>-3</sup>, estriar en el medio de cultivo PCA e incubarlo en una estufa calibrada a 25°C por 24 a 48 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de la incubación, anotar las características macroscópicas de las colonias y realizar la Tinción Gram, para su observación microscópica.

#### **2.4.5 Determinación de Coliformes totales por la Técnica del Número Más Probable.**

El método se basa en la determinación del número más probable (NMP) por la técnica de dilución en tubos, utilizando el medio líquido selectivo caldo verde brillante bilis-lactosa o similar para el ensayo presuntivo y los tubos que presentan gas son confirmados en agar Eosina azul de metileno (E M B). La temperatura de incubación para el ensayo presuntivo y confirmativo es  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , para productos refrigerados y  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  para productos que se mantienen a temperatura ambiente. (NTE INEN 1529-6, 1990)

**Gráfico N° 4-2:** Técnica del Número Más Probable.



**Elaborado por:** Trujillo A. 2016

#### **Preparación del medio de cultivo Caldo Verde Bilis Brillante.**

Tras la verificación de las instrucciones en la etiqueta de manufactura del recipiente del medio en donde indica que se necesita disolver 40g del caldo por 1L de agua destilada. Se preparó 200mL del medio para aproximadamente unos 21 tubos de ensayo que deberán contener 9mL cada uno.

$$40g \text{ --- } 1000mL$$

$$Xg \text{ --- } 200mL$$

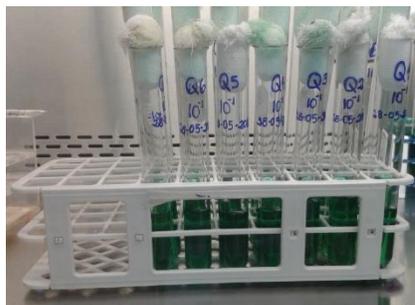
$$Xg = \frac{200mL \times 40g}{1000mL}$$

$$Xg = 8g$$

1. Pesar y disolver 8g de Caldo Verde Bilis Brillante en 200mL de agua destilada.
2. Calentar en un reverbero y hacer hervir por 1 minuto.
3. Esterilizar en autoclave por 30 minutos a 121°C.
4. Con pipeta estéril colocar 9 mL del caldo en los tubos de ensayo.
5. Colocar los Tubos Durhan de manera invertida con la finalidad, también de tener precaución de que no quede aire retenido en el Tubo al momento de colocarlo en el tubo de ensayo.
6. Colocar tapones con la finalidad que no permitan el paso del aire en el medio de cultivo, lo que puede alterar la actividad microbiana.

#### **Procedimiento:**

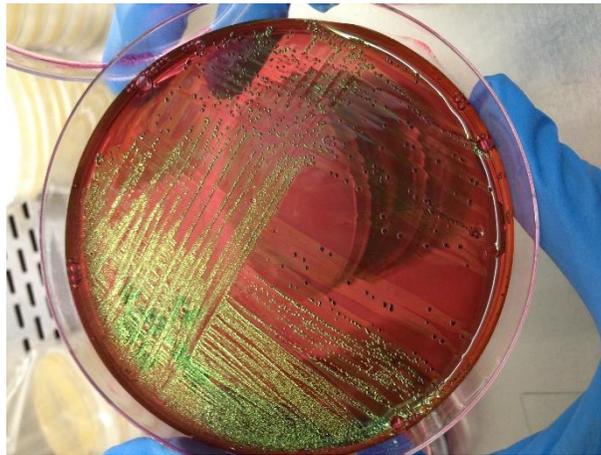
1. Inmediatamente después de realizadas las diluciones con una pipeta automática con punta estéril, transferir 1 cm<sup>3</sup> de la solución madre a un tubo que contengan 9mL de caldo verde bilis brillante, el cual será la dilución 10<sup>-1</sup>
2. Con una pipeta y punta estéril transferir 1mL de la dilución 10<sup>-1</sup> a un tubo con 9mL de caldo verde bilis brillante, siendo esta la dilución 10<sup>-2</sup>, homogeneizar y de igual manera proceder para la dilución 10<sup>-3</sup>.



**Figura 1-2:** Medio de cultivo Caldo Verde bilis brillante

**Fuente:** Trujillo A. 2016

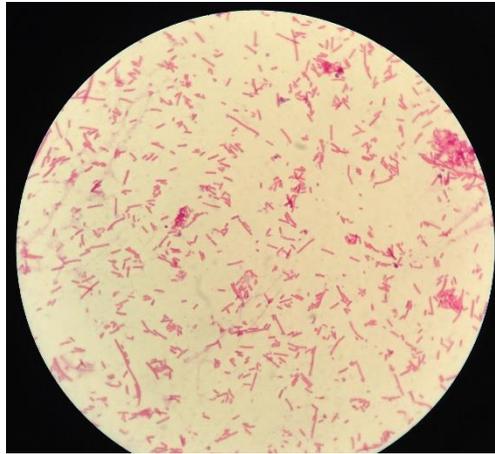
3. Incubar los tubos a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.
4. Transcurridas las 48 horas anotar en cada dilución como **PRESUNTOS POSITIVOS** todos los tubos que presenten crecimiento con producción suficiente de gas como para llenar el fondo cóncavo del tubo Durhan es decir, el menisco llegaría hasta donde las paredes del tubo se hacen paralelas. También se considera como presunto positivo si el tubo Durhan contiene menos gas del indicado, pero al golpear delicadamente al tubo de cultivo hay desprendimiento de burbujas. Solo la turbidez no es indicativo de una prueba positiva. (NTE INEN 1529-6, 1990)
5. Agitar cada uno de los tubos presuntamente positivos y con un asa de inoculación a partir de cada uno de ellos sembrar por estría en la superficie de placas individuales secas de Agar Eosina Azul de Metileno, placas que deberán estar codificadas previamente.
6. Invertir las placas e incubarlas a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  para productos que se mantienen a temperatura ambiente por  $24 \pm 2$  horas.
7. Si al término del período de incubación hay desarrollo de colonias lactosa positivas las cuales son negras o poseen centro oscuro con periferias transparentes incoloras o bien colonias mucoides de color rosa naranja, confirman la presencia de coliformes.



**Figura 6-1:** Colonias de *E. coli* en Agar Eosina Azul de Metileno

Fuente: Trujillo A. 2016

8. De cada dilución anotar el número de tubos positivos confirmados de coliformes.
9. Realizar Tinción Gram de las colonias cultivadas en Agar Eosina Azul de Metileno, para su confirmación microscópica, sabiendo que la *E. coli* es una bacteria bacilo Gram negativo, vista al microscopio de color bastón rosa.



**Figura 7-1:** *Escherichia coli* lente de inmersión 100X

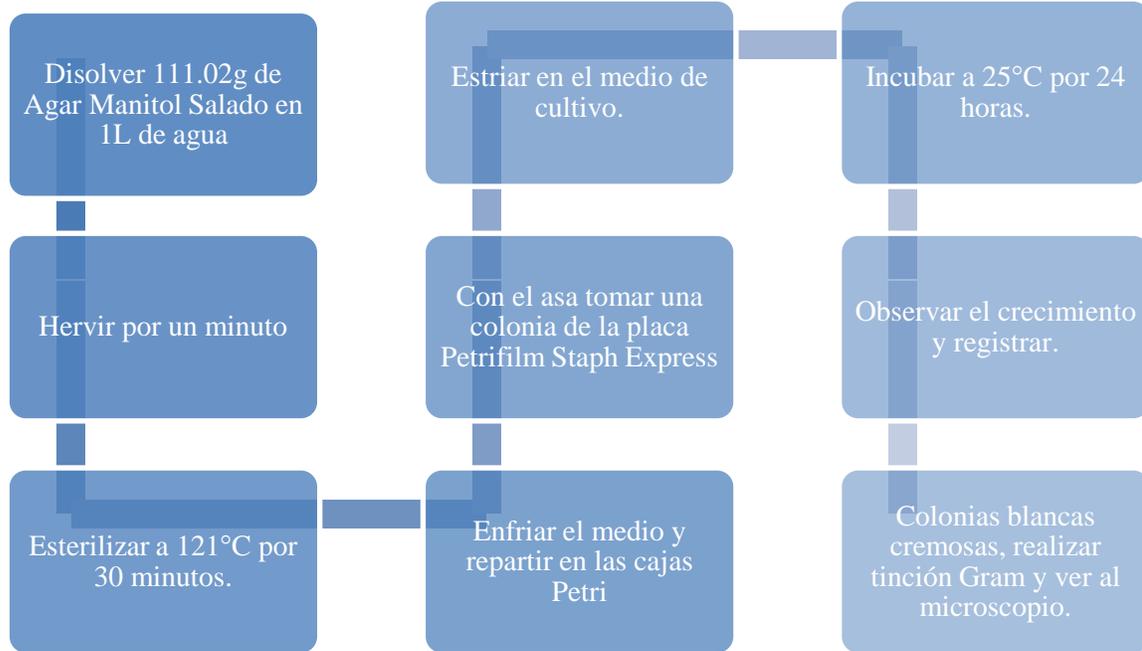
Fuente: Trujillo A. 2016

#### ***2.4.6 Determinación de Staphylococcus aureus en Agar Manitol Salado***

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura.

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

**Gráfico N° 5-2:** Cultivo de *Staphylococcus aureus*



**Elaborado por:** Trujillo A. 2016

### **Preparación del medio de cultivo Agar Manitol Salado**

- 1) Determinar la cantidad de cajas Petri que se desea preparar y por ende el volumen total del medio de cultivo.
- 2) Realizar los cálculos respectivos tomando en cuenta que se debe disolver 111.02g/L de agua.
- 3) Pesar la cantidad necesaria y disolverlo en agua en un Erlenmeyer.
- 4) Dejar hervir la mezcla por un minuto.
- 5) Esterilizar en autoclave a 121°C por 30 minutos.
- 6) Extraer el medio desde el autoclave e inmediatamente llevarlo a una zona estéril (Cámara de Flujo Laminar).
- 7) Esperar a que el medio de cultivo alcance alrededor de los 45°C y verterlo en las cajas Petri, alrededor de 15 a 20 mL del medio.
- 8) Esperar a que se solidifique.
- 9) Etiquetarlo.

### **Inoculación en el medio e incubación**

- 1) Etiquetar las placas a usarse en base al código de la muestra.

- 2) Con un Asa de Platino estéril tomar una colonia desde la Petrifilm Staph Express, de la película superior que contiene el gel.
- 3) Estriar en la caja Petri.
- 4) Incubar las placas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.
- 5) Observar el crecimiento y registrarlo.

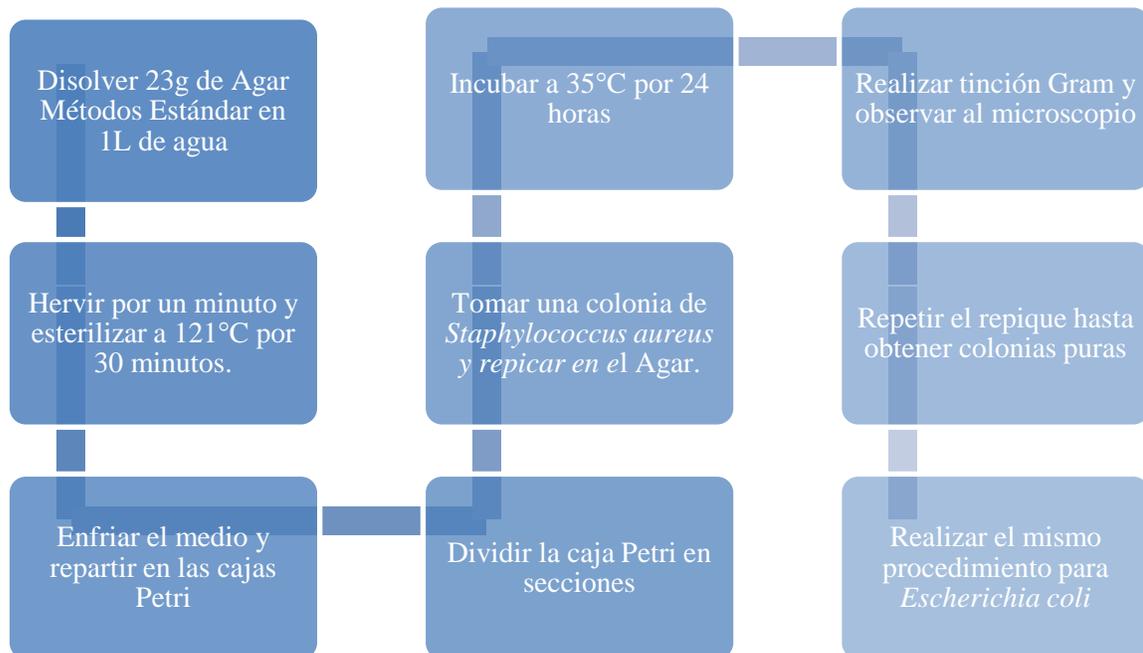
### Lectura de resultados

Se definen como positivo a las cajas de Petri que presenten crecimiento bacteriano con colonias blancas cremosas superiores a 1 mm de diámetro y que presenten fermentación del manitol de rojo a color amarillo.

#### 2.4.7 Aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* para antibiograma.

El aislamiento de las mencionadas bacterias se realizan en Agar para Métodos Estándar, un medio de cultivo general que permite el crecimiento enriquecido de las bacterias a aislarse.

**Gráfico N° 6-2:** Aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*



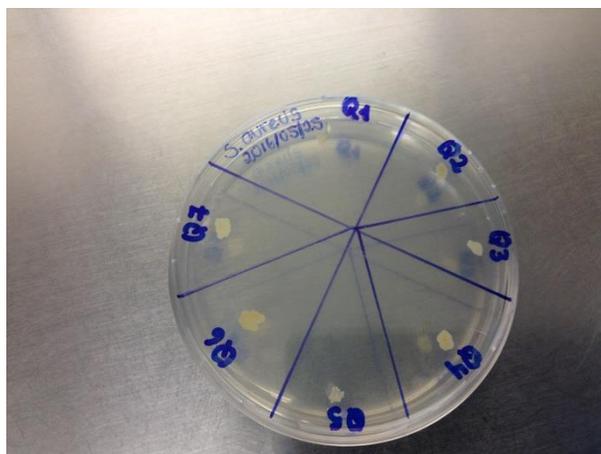
**Elaborado por:** Trujillo A. 2016

### **Preparación del medio de cultivo**

- 1) Determinar el volumen necesario a preparar
- 2) Realizar los cálculos tomando en cuenta que se debe disolver 23 g por litro de agua.
- 3) Pesarse el Agar Métodos Estándar y colocarlo en un Erlenmeyer, conjuntamente con agua destilada y disolverlo por agitación.
- 4) En un reverbero hacer hervir por un minuto.
- 5) Esterilizar en un autoclave a 121°C por 30 min.
- 6) Esperar que alcance una temperatura de alrededor de los 45°C.
- 7) Colocar en las cajas de Petri alrededor de los 15 a 20 mL.
- 8) Esperar a que se solidifiquen y etiquetar.

### **Siembra y repiques**

- 1) Seleccionar las cajas de Agar Manitol Salado que hayan presentado crecimiento bacteriano y fermentación.
- 2) Seccionar y codificar la caja Petri en base al número de placas que hayan presentado el crecimiento.
- 3) Con la aguja de platino estéril tomar una colonia característica de *Staphylococcus aureus*, y realizar repiques en el agar.
- 4) Invertir la caja Petri e incubarla a 35°C por 24 horas.
- 5) Una vez que las colonias han crecido tomar una muestra de éstas, realizar tinción Gram y verificarlas al microscopio, si se presentan solamente cocos Gram positivos, las colonias están aisladas, caso contrario realizar un nuevo repique hasta que estas se presenten puras.
- 6) Para el aislamiento de *E. coli* proceder de la misma manera como se muestra en el paso 1, 2, 3, 4 y 5, excepto que se tomarán las colonias de las placas de Agar Eosina Azul de Metileno.

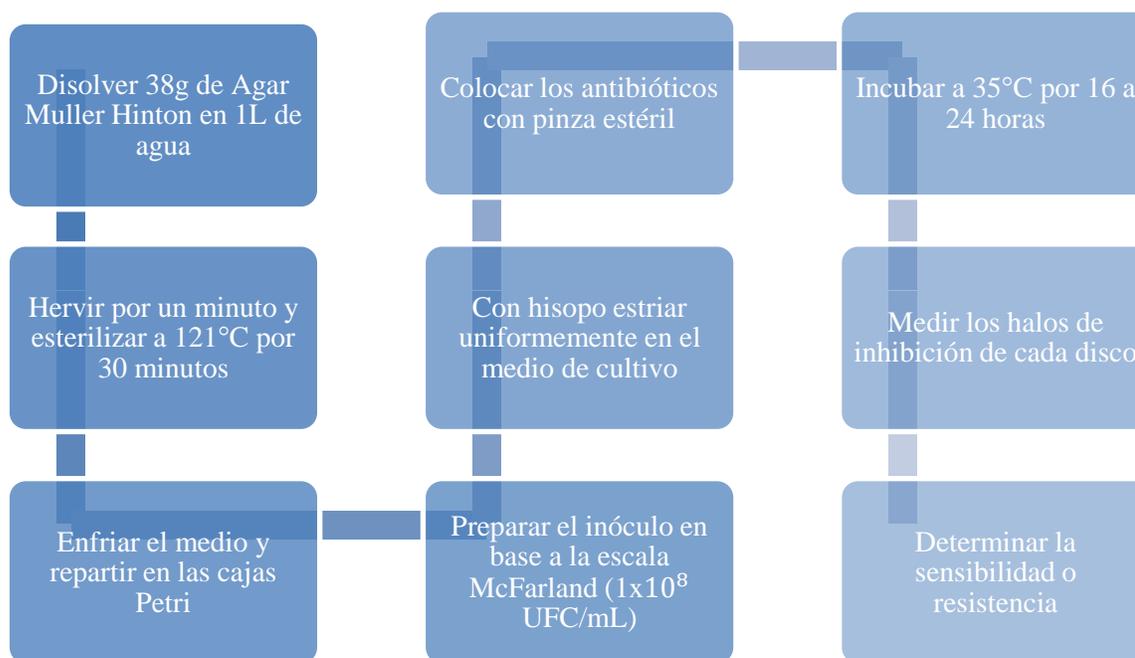


**Figura 8-1:** Repiques de muestras de quesos

Fuente: Trujillo A. 2016

#### 2.4.8 Antibiograma

**Gráfico N° 7-2:** Antibiograma



**Elaborado por:** Trujillo A. 2016

#### **Preparación del medio de cultivo**

- 1) Determinar el volumen que se desea preparar y calcular los gramos de agar tomando en cuenta que se debe disolver 38g/L de agua.

- 2) Pesar la cantidad establecida de Agar Muller Hinton y trasvasarlo a un Erlenmeyer con el volumen de agua determinado.
- 3) Agitar el Erlenmeyer hasta que el agar se disuelva.
- 4) Calentar el medio y hervir por un minuto.
- 5) Esterilizar en autoclave por 30 minutos a 121°C.
- 6) Esperar hasta que alcance los 45°C.
- 7) Verter el medio en las cajas de Petri.
- 8) Esperar a que el medio esté solidificado y codificarlo.

### **Preparación del inóculo**

- 1) En un tubo de ensayo estéril colocar 4 mL de agua destilada y codificarlo.
- 2) Con un hisopo de algodón esterilizado tomar de 3 a 5 colonias y sumergirlo en el tubo.
- 3) Homogeneizar y comparando con la Escala estándar McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) , hasta que alcancen la misma turbidez, ambos tubos (Inóculo y Estándar).

### **Inoculación en el medio de cultivo**

- 1) Con un hisopo estéril sumergir en el tubo que contiene el inóculo, eliminar el exceso presionando en las paredes del tubo.
- 2) Estriar en el Agar Muller Hinton de manera homogénea en tres direcciones, una luego de la otra.
- 3) Esperar que se seque el agar.

### **Colocación de discos de antibióticos e incubación**

- 1) Previo a tomar el disco realizar tres toques de la pinza en el fuego, para que ésta se esterilice.
- 2) Tomar el disco de antibiótico con la pinza y colocar en el Agar.
- 3) Presionar el disco suavemente contra el medio de cultivo.
- 4) Colocar los distintos discos utilizando el mismo método, ubicando cada uno de los discos a una cierta distancia, que facilite la lectura.
- 5) Invertir la caja e incubarla a 35°C durante 16 a 24 horas.

### **Lectura de resultados**

- 1) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, leer los halos formados por cada disco.
- 2) Registrar e identificar como sensible o resistente.

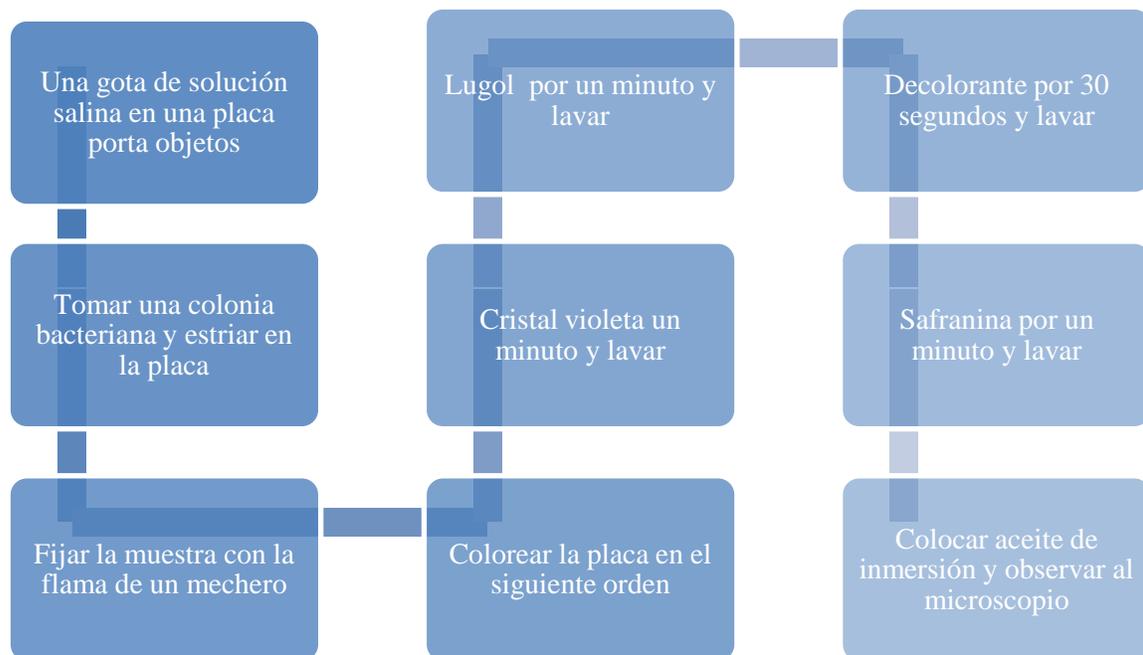


**Figura 9-1:** Antibiograma.

Fuente: Trujillo A. 2016

#### 2.4.9 Tinción Gram

**Gráfico N° 8-2:** Tinción Gram



**Elaborado por:** Trujillo A. 2016

- 1) Codificar el porta objetos en base a la muestra que se va a visualizar.
- 2) Colocar una gota de solución salina.
- 3) Con la aguja de platino estéril tomar una muestra de la una colonia de la caja Petri.
- 4) Estriar en la placa diluyendo en la solución salina.

- 5) Fijar la muestra en el mechero flameando tres veces para que la muestra se seque.
- 6) Colocar las placas a colorear en una base fija en un lava manos.
- 7) Verter cristal violeta sobre la placa y dejar por un minuto.
- 8) Lavar con agua de la llave.
- 9) Verter lugol, dejar que actúe por un minuto, y lavar con agua.
- 10) Verter decolorante y dejar que actúe por 30 segundos, posteriormente lavar con agua de la llave.
- 11) Colocar safranina, dejar por un minuto y lavar.
- 12) Esperar que las placas estén secas.
- 13) Con aceite de inmersión, observar al microscopio con el lente de 100X.



**Figura 10-1:** Tinción Gram.

Fuente: Trujillo A. 2016

## CAPÍTULO III

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

Tras la tabulación de los datos obtenidos del recuento de la microbiota del queso fresco, se determinó la media de los muestreos de cada punto de expendio para su posterior comparación con los valores establecidos en la Norma NTE INEN 1528 2012 Norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos, esto por medio de un análisis estadístico como es Test T-Student para una muestra, tomando en cuenta que se compara con el valor referencial de la mencionada norma, el mismo que nos permite visualizar si es significativamente mayor, lo cual es corroborado con la observación ya que en todos los recuentos se encuentra muy por encima del valor establecido.

También se puede observar los resultados del antibiograma, el mismo que fue llevado a cabo por el método de Kirby Bauer, siendo un método seguro, eficaz y estandarizado para la obtención de resultados que muestren las características de resistencia bacteriana tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Escherichia coli*.

#### 3.1 Análisis Microbiológico del queso fresco.

Los resultados que se exponen a continuación son el recuento total de los microorganismos analizados en el queso fresco, siendo estos *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales y *Escherichia coli*, todos ellos expresados en UFC por gramo de queso.

**Tabla N° 1-3:** Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm.

<b>Punto de expendio</b>	<b>Repetición</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <b>x10<sup>4</sup> UFC/g</b>	<b>Coliformes totales</b> <b>x10<sup>4</sup> UFC/g</b>	<i>Escherichia coli</i> <b>x10<sup>4</sup></b> <b>UFC/g</b>
Q1	R1	160	60	20
	R2	200	160	120
	R3	180	160	140
Q2	R1	60	80	60
	R2	120	5	4
	R3	220	180	160
Q3	R1	220	160	140
	R2	300	120	100
	R3	60	20	18
Q4	R1	140	5	3
	R2	240	50	40
	R3	160	100	80
Q5	R1	240	140	120
	R2	160	160	140
	R3	17	5	4
Q6	R1	33	18	16
	R2	18	3	3
	R3	21	53	48
Q7	R1	100	140	120
	R2	46	160	140
	R3	43	8	6

Realizado por: Alexandra Trujillo.

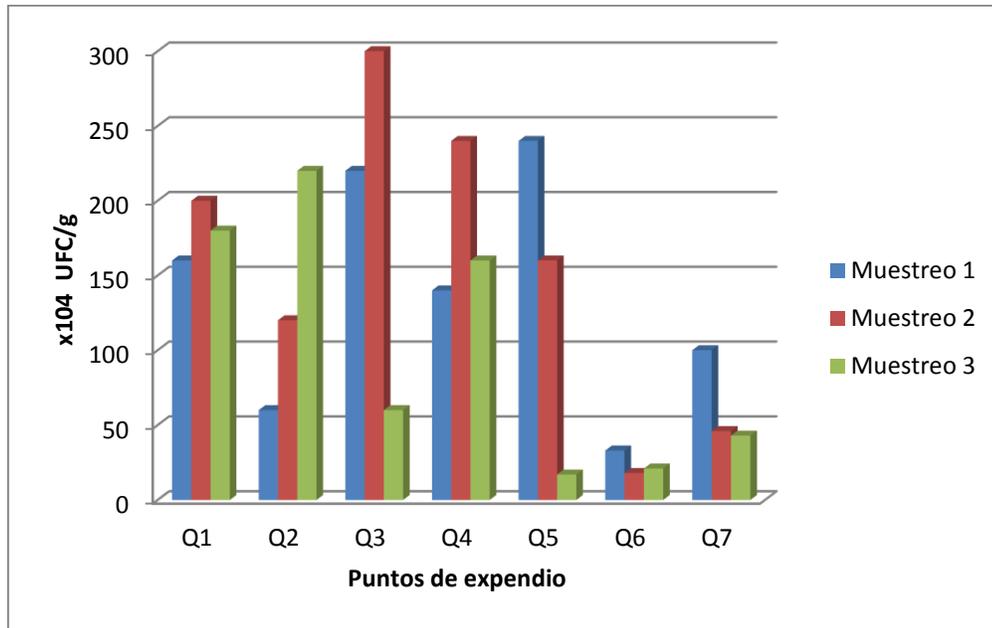
### 3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Se exponen los datos obtenidos del recuento microbiano de las cajas Petrifilm, para posteriormente compararlos con la norma NTE INEN 1528 de 2012 para quesos frescos no madurados, la cual se utilizó como referencia.

**Tabla N° 2-3:** Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm 3M Staph Express para *Staphylococcus aureus*

Punto de expendio	Reptición	<i>Staphylococcus aureus</i> x10 <sup>4</sup> UFC/g	Media x10 <sup>4</sup> UFC/g
Q1	R1	160	180
	R2	200	
	R3	180	
Q2	R1	60	133
	R2	120	
	R3	220	
Q3	R1	220	246
	R2	300	
	R3	60	
Q4	R1	140	180
	R2	240	
	R3	160	
Q5	R1	240	139
	R2	160	
	R3	17	
Q6	R1	33	24
	R2	18	
	R3	21	
Q7	R1	100	63
	R2	46	
	R3	43	

Realizado por: Alexandra Trujillo.



**Gráfico N° 1-3:** Recuento de *Staphylococcus aureus* en UFC/g.

Las medias de los recuentos de *Staphylococcus aureus* van desde  $24 \times 10^4$  hasta los  $246 \times 10^4$  UFC/g, mientras que la Norma NTE INEN 1528 de 2012 establece que el Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad es de 1000 UFC/g lo cual indica claramente que el 100% de las muestras al sobrepasar este valor no son aptas para el consumo humano, ya que representan un peligro potencial de infecciones de transmisión alimentaria.

**Tabla N° 3-3:** Test T de Student para una muestra para *Staphylococcus aureus*.

Prueba de muestra única						
	Valor de prueba = 1000 UFC/g					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.859	20	0,00	1302809.524	906600.7150	1699018.333

Fuente: Software SPSS Statistics, IBM

El Test T de Student para una muestra nos permite comparar la media de nuestro grupo de recuentos de la microbiota de cada uno de los puntos de expendio analizados con el valor de referencia que es 1000 UFC/g de queso siendo el Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad, los resultados del test muestran una Significancia de 0,000 lo cual es menor a 0,05, esto nos permite rechazar la hipótesis nula, por ende aceptamos la hipótesis alternativa y en conclusión podemos decir

con un 95% de confianza que la cantidad de microorganismos son significativamente mayor al valor de referencia por lo que no es apto para el consumo humano.

El nivel de contaminación registrada indica claramente un manejo inadecuado de los vacunos, al proceso de obtención, transporte y procesamiento del queso, así como también a heridas en los pezones, desde donde por la manipulación del ordeñador o el contacto con las pezoneras de los extractores mecanizados presentan contaminación cruzada para posteriormente unirse con la leche de otras vacas y en el medio rico en nutrientes crecer a nivel logarítmico, contaminando en su totalidad el producto.

El *S. aureus* se encuentran en la piel y mucosas de los humanos, Según Figueroa, et al., (2002) éstos pueden llegar a los alimentos de muchas fuentes, la presencia en los alimentos se asocia a una inadecuada manipulación o al empleo de materias primas contaminadas ya que este microorganismo es resistente, pudiendo sobrevivir a condiciones ambientales adversas. Son relativamente tolerantes al calor, a la desecación y a los medios con elevadas concentraciones de sal, lo que correlaciona con la realidad de las queseras muestreadas donde se evidenció las condiciones antes descritas.

Un estudio similar en la ciudad de Loja demostró que el queso fresco expendido en sus mercados presenta un nivel de contaminación del 65.8% por *Staphylococcus aureus* siendo éste el microorganismo predominante en la mayoría de muestras. Las Levaduras se encuentran en 28.3% y la *Listeria s.p.p* en un 15.8%. El elevado porcentaje de muestras con presencia de *S. aureus* fuera de los límites, de acuerdo con el estándar microbiológico adoptado, indica que el consumo de quesillo constituye un elevado riesgo para la salud.

Las medias obtenidas en esta investigación fueron mayores que los encontrados en Mérida Venezuela por parte de Díaz-Rivero y González (2001) donde encontraron *S. aureus* en 50 (69,44%) de las 72 muestras estudiadas.

Luján et al., (2006), realizaron la evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima – Perú, en la cual se reportó que el 80 % de muestras estaban por encima del límite máximo permitido, además señalan que el alto grado de contaminación alcanzado por este alimento proveniente del contacto con la piel, boca y fosas nasales de quienes manipularon el alimento, así como fue observada la falta de higiene en las superficies de contacto sobre las cuales se depositaba el mismo, lo que concuerda con esta investigación, específicamente con el análisis de superficies.

Tomando en cuenta que ninguno de los quesos se encuentran con una carga microbiana permitida por la norma INEN 1528, no se consideran aptos para el consumo humano, ya que su presencia pone en alerta la sanidad alimentaria por la producción de toxinas que contribuyen a su patogenicidad al aumentar su capacidad de invadir y dañar tejidos, al ser anaerobios facultativos, provocan fermentación de la glucosa disminuyendo rotundamente el pH, estos microorganismos son muy tolerantes a una actividad de agua reducida y resisten a altas concentraciones de sal, causan toxiinfecciones alimentarias ocupando el segundo lugar en importancia, en los productos industrializados de los derivados lácteos.

**Tabla N° 4-3:** Muestras de Queso Fresco que fermentan el Agar Manitol Salado

Punto de expendio	Repetición	Resultado
Q1	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q2	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q3	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q4	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q5	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q6	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q7	R1	+
	R2	+
	R3	+

Realizado por: Alexandra Trujillo.

Se llevó a cabo también una prueba confirmatoria de la presencia de *Staphylococcus aureus* por medio de la fermentación del manitol en la cual todos dieron positivos en mayor y menor medida cambiando la coloración del agar de rojo a amarillo, lo que corrobora con el crecimiento para el recuento del

microorganismo en las placas Petrifilm 3M Staph Express, en donde todas las muestras presentaron crecimiento de colonias rojo violeta.

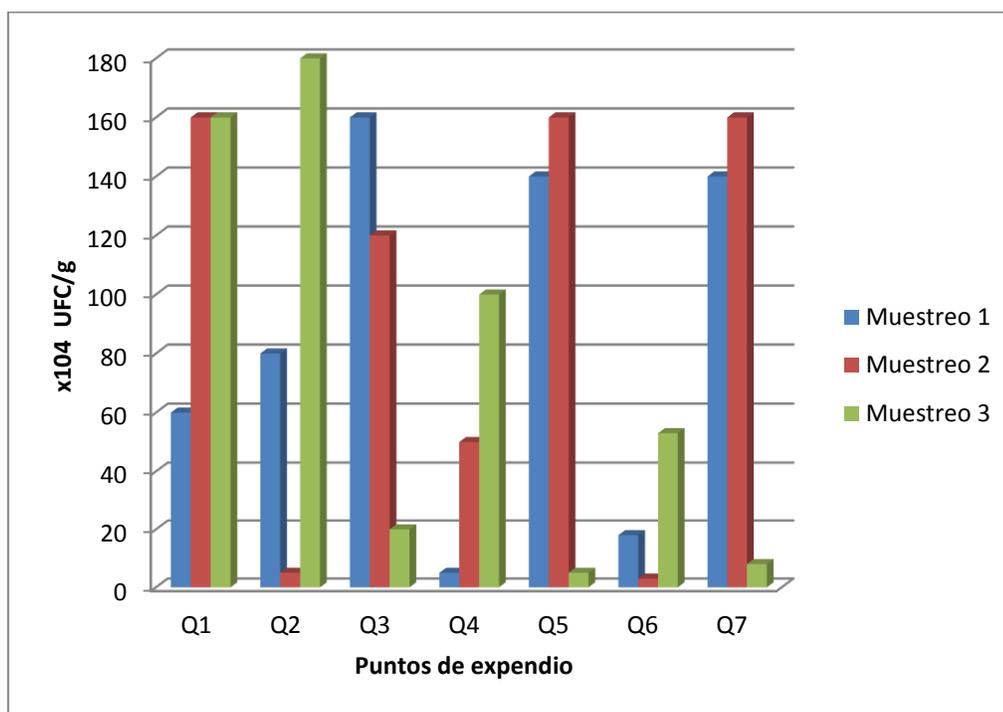
### 3.1.2 Coliformes totales.

Se expone a continuación los recuentos obtenidos de los cultivos de Coliformes totales en Placas Petrifilm, sabiendo son aquellas colonias rojas y azules con presencia de gas, siendo así la suma total de estas.

**Tabla N° 5-3:** Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm 3M para Coliformes Totales

Punto de expendio	Repetición	Coliformes totales $\times 10^4$ UFC/g	Media $\times 10^4$ UFC/g
Q1	R1	60	126
	R2	160	
	R3	160	
Q2	R1	80	88
	R2	5	
	R3	180	
Q3	R1	160	100
	R2	120	
	R3	20	
Q4	R1	5	51
	R2	50	
	R3	100	
Q5	R1	140	101
	R2	160	
	R3	5	
Q6	R1	18	24
	R2	3	
	R3	53	
Q7	R1	140	102
	R2	160	
	R3	8	

Realizado por: Alexandra Trujillo.



**Gráfico N° 2-3:** Recuento de Coliformes totales en UFC/g.

La Norma NTE INEN 1528 de 2012 no dispone de un límite para Coliformes totales por lo cual se tomó como referencia la Norma Nicaragüense NTON 03 022 - 99 Norma de Quesos Frescos no Madurados en donde el límite para coliformes totales es 500 UFC/g, los resultados de los recuentos en esta investigación van desde  $24 \times 10^4$  hasta los  $126 \times 10^4$  UFC/g lo cual supera por mucho lo establecido en la norma en el 100% de los 7 puntos de expendio.

**Tabla N° 6-3:** Test de Student para Coliformes totales.

Prueba de muestra única						
	Valor de prueba = 500 UFC/g					
	t	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
Coliformes totales	5.871	20	0,000	850452.3810	548311.8650	1152592.897

Fuente: Software SPSS Statistics, IBM

El valor de significancia para la prueba de comparación de la media de recuentos de Coliformes totales contra el límite máximo establecido por la Norma fue de 0,000, lo cual indica que nuestros

valores son significativamente mayores al valor de 500 UFC/g de queso, lo que muestra que el nivel de contaminación en los quesos por parte de este microorganismo es inaceptable para el consumo humano.

Por lo expuesto anteriormente podemos decir que los quesos que se expenden en el Mercado Víctor Proaño no son aptos para el consumo ya que las coliformes son perjudiciales para los alimentos, su presencia se considera un signo de contaminación por desperdicios cloacales y por tanto posiblemente por bacterias entéricas patógenas.

Se obtuvieron resultados similares de recuentos altos de bacterias en quesos no madurados fueron encontrados en estudios realizados en Venezuela por Díaz y González en 2001, en donde el *Staphylococcus aureus* en los quesos evaluados excedían el criterio microbiológico para Coliformes Totales y Fecales en 97,22% y 98,61 %, respectivamente.

Márquez y García en el año 2007 señalaron recuentos de Coliformes Totales mayores a  $1 \times 10^8$  UFC/g en 44% de queso “telita” del estado Bolívar y en 64% de quesos de Guárico.

Los resultados obtenidos Heidi Xiomara Barrios Centeno en trabajo llevado a cabo en la UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA mostraron un análisis microbiológico de los quesos con los siguientes resultados, un producto final  $>10$  UFC/gr de coliformes fecales,  $>1$  UFC/gr de *E. coli* y  $>1,000$  UFC/gr de *S. aureus*, por lo que el queso fresco fue reportado como no apto para el consumo humano según los parámetros sugeridos por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) para coliformes fecales ( $<10$  UFC/gr) y *E. coli* ( $<1$  UFC/gr) y por la norma COGUANOR-NGO-34-197 para *S. aureus* ( $<100$  UFC/gr) y *Salmonella* sp. (ausente).

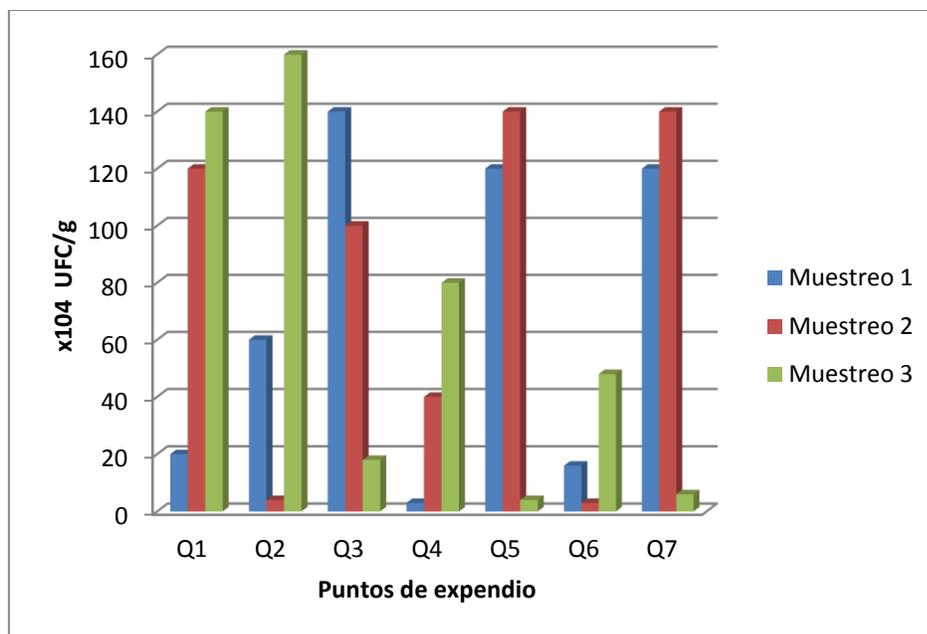
### 3.1.3 *Escherichia coli*

Tras el análisis microbiológico y el recuento de las UFC/g se tabularon los datos conseguidos de *Escherichia coli*, sabiendo que son las colonias azules con presencia de gas, obteniendo los siguientes resultados.

**Tabla N° 7-3:** Recuento de la microbiota analizada en Placas Petrifilm 3M para *Escherichia coli*.

Punto de expendio	Repetición	<i>Escherichia coli</i> x10 <sup>4</sup> UFC/g	Media x10 <sup>4</sup> UFC/g
Q1	R1	20	93
	R2	120	
	R3	140	
Q2	R1	60	74
	R2	4	
	R3	160	
Q3	R1	140	86
	R2	100	
	R3	18	
Q4	R1	3	41
	R2	40	
	R3	80	
Q5	R1	120	88
	R2	140	
	R3	4	
Q6	R1	16	22
	R2	3	
	R3	48	
Q7	R1	120	88
	R2	140	
	R3	6	

Realizado por: Alexandra Trujillo.



**Gráfico 3-3:** Recuento de *Escherichia coli* totales en UFC/g.

En base a la Norma NTE INEN, en la cual enuncia que el Índice Máximo Permissible para identificar nivel aceptable de calidad en el caso de *Escherichia coli* es de 10 UFC/g, valor que ha sido sobrepasado por todas las muestras de queso fresco analizado recolectadas en el Mercado Víctor Proaño, esto es un claro indicio de la calidad del queso fresco expendido y el peligro biológico que representa para la población que lo consume.

**Tabla N° 8-3:** Test T de Student para una muestra para *Escherichia coli*

Prueba de muestra única						
	Valor de prueba = 10 UFC/g					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
<i>Escherichia coli</i>	5.563	20	0,000	705704.2857	441097.3394	970311.2320

Fuente: Software SPSS Statistics, IBM

Tras la realización del Test T para una muestra y la obtención de un nivel de significancia de 0,000 el cual es menor a 0,05 podemos decir que los valores de los recuentos de *Escherichia coli* son significativamente mayores al valor de la Norma NTE INEN 1528, por ende no son aptos para el consumo de dicho alimento.

*Escherichia coli* en muestras alimenticias y en este caso lácteas es un indicativo de contaminación fecal especialmente por las condiciones anti higiénicas en las que se elaboran los quesos además de

las técnicas de ordeño, la limpieza de la piel de los pezones, manos del ordeñador y pezoneras así como la exposición de la leche y por ende el queso a material fecal, de los mismos bovinos.

Nuestro estudio concuerda con investigaciones realizadas en Bolivia en donde Mariscal P, et al., 2013, reportaron que el 100% de las muestras de queso fresco que se expenden en los mercados de abasto de Trinidad en donde todas presentaron valores mayores al nivel aceptado para *Escherichia coli*.

Esto indica claramente la importancia de la pasteurización de la leche para la elaboración del queso, por cuanto esta técnica es muy recomendable practicarla para proteger la salud del consumidor, ya que en los quesos elaborados con leche cruda pueden sobrevivir o multiplicarse múltiples microorganismos patógenos. (Revilla, 1996)

**Tabla N° 9-3:** Recuento de la microbiota analizada por la Técnica del Número Más Probable.

Punto de expendio	Número de tubos positivos por dilución			NMP por g
	Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dilución 10 <sup>-2</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>	
Q1	3	3	2	1100
Q2	3	3	1	460
Q3	3	3	2	1100
Q4	3	3	2	1100
Q5	3	3	2	1100
Q6	3	3	1	460
Q7	3	3	2	1100

**Realizado por:** Alexandra Trujillo.

La realización de la técnica del Número Más Probable confirma la presencia y recuento del análisis realizado por las placas Petrifilm para Coliformes ya que al igual que éstas en todos los casos dio positivo con recuentos elevados muy por encima de los valores permitidos por la Norma mexicana NOM-243-SSA1-2010 la misma que menciona 10NMP/g, se tomó esta Norma como referencia ya que las Normas NTE INEN de nuestro país nos muestra solamente la Técnica para realizar el recuento de estos microorganismos por medio de la Norma 1529-6 de 1990, pero no dispone de valores máximos permitidos o permisibles para el consumo humano.

Como podemos observar los resultados emitidos por la técnica NMP están desde los 460 a los 1100 NMP/g, superando en todos los casos el máximo permitido por la Norma los 10NMP/g, resultados similares fueron presentados, como los de Dávila, et al, en 2006 en donde se analizó la calidad

microbiológica de la materia prima para la elaboración de queso, pudiendo manifestar que el recuento de Coliformes totales fue elevado, oscilando entre  $4.6 \times 10^4$  NMP/mL y  $2,4 \times 10^5$  NMP/mL, indicativo de posibles malas prácticas de manipulación en el ordeño del ganado vacuno en fincas proveedoras de leche, una inadecuada refrigeración inmediatamente después que se ha obtenido la misma, y procesamiento y expendio del queso en lugares higiénicamente inadecuados.

**Tabla N° 10-3:** Prueba confirmatoria de *Escherichia coli* de NMP en Agar Eosina Azul de Metileno

Punto de expendio	Repetición	Resultado
Q1	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q2	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q3	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q4	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q5	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q6	R1	+
	R2	+
	R3	+
Q7	R1	+
	R2	+
	R3	+

**Realizado por:** Alexandra Trujillo.

Posterior a la Técnica del NMP también se llevó a cabo la confirmación a través de la siembra del inóculo de los tubos en Agar Eosina Azul de Metileno, medio de cultivo específico para el crecimiento de *Escherichia coli*, en donde cómo podemos observar todos dieron positivo al presentar crecimiento de colonias de color verde metálica característico de *E. coli*, lo cual indica que los microorganismos

fermentadores de lactosa y por ende la producción de gas en el Tubo Durhan se trataba de este microorganismo.

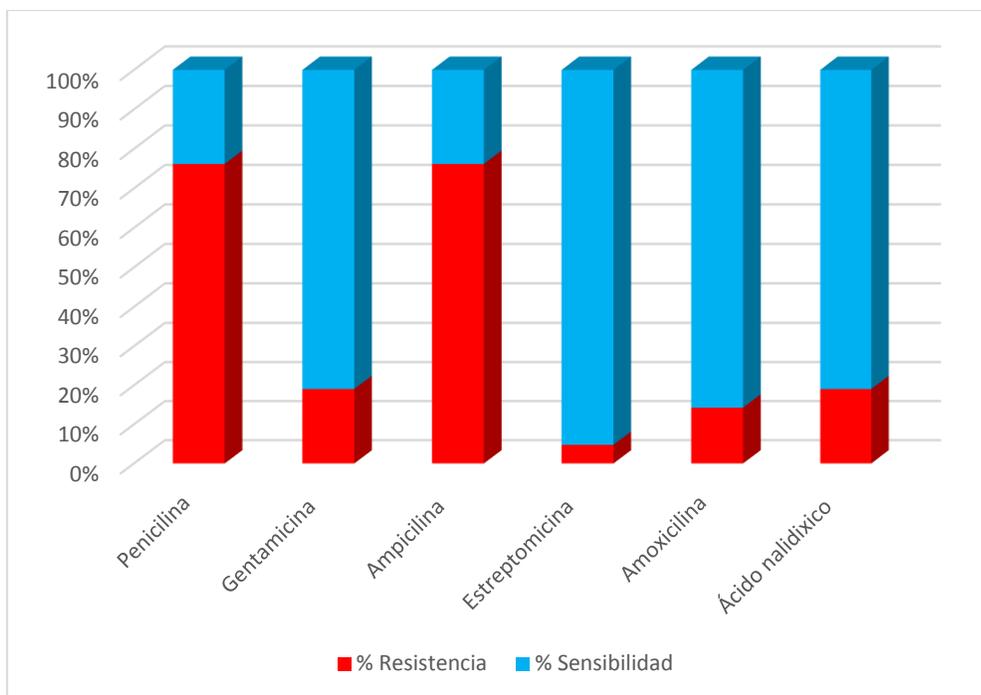
### 3.2 Antibiograma.

#### 3.2.1 Antibiograma de *Staphylococcus aureus*

Tabla N° 11-3: Resultados del Antibiograma de *Staphylococcus aureus*

Punto de expendio	Repetición	Penicilina	Gentamicina	Ampicilina	Estreptomicina	Amoxicilina	Ácido nalidixico
Q1	R1	S	S	R	S	S	R
	R2	S	S	S	S	S	S
	R3	R	S	R	S	S	S
Q2	R1	R	S	R	S	S	S
	R2	R	S	S	S	S	R
	R3	R	S	R	S	S	S
Q3	R1	R	S	R	S	R	S
	R2	R	R	R	S	S	R
	R3	S	S	S	S	S	S
Q4	R1	R	S	R	R	S	R
	R2	R	S	S	S	S	S
	R3	S	S	R	S	R	S
Q5	R1	R	R	R	S	S	S
	R2	R	S	R	S	S	S
	R3	R	S	S	S	S	S
Q6	R1	R	R	R	S	R	S
	R2	R	S	R	S	S	S
	R3	R	S	R	S	S	S
Q7	R1	R	S	R	S	S	S
	R2	R	S	R	S	S	S
	R3	S	R	R	S	S	S
	% Resistencia	76.2	19	76.2	4.8	14.3	19
	% Sensibilidad	23.8	81	23.8	95.2	85.7	81

Realizado por: Alexandra Trujillo.



**Gráfico N° 4-3:** Nivel de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*

Como se puede observar en el Gráfico N° 4-3, *Staphylococcus aureus* presenta resistencia significativa a 2 antibióticos siendo estos penicilina y ampicilina, en ambos casos con un porcentaje de resistencia del 76.2 % de las muestras, es importante notar también que ambos antibióticos pertenecen al grupo de los Antibacterianos Betalactámicos de acuerdo con el Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos, lo cual indica una estructura similar y familiaridad entre estos, facilitando a los microorganismos el desarrollo de resistencias para el mismo grupo.

Para antibióticos como gentamicina, estreptomina, amoxicilina, y ácido nalidixico *Staphylococcus aureus*, presentó un nivel de resistencia mínimo es decir muy pocas muestras alcanzando un promedio del 14% (4/21 muestras), esto nos hace un llamado a mostrar a la población ganadera de la provincia y el país a utilizar dichos medicamentos de forma racional y solo bajo la supervisión de un veterinario, ya que el uso improvisado de éstos trae consecuencias como pérdidas económicas, ineficacia medicamentosa y los que es peor el desarrollo de resistencias por parte de estos microorganismos.

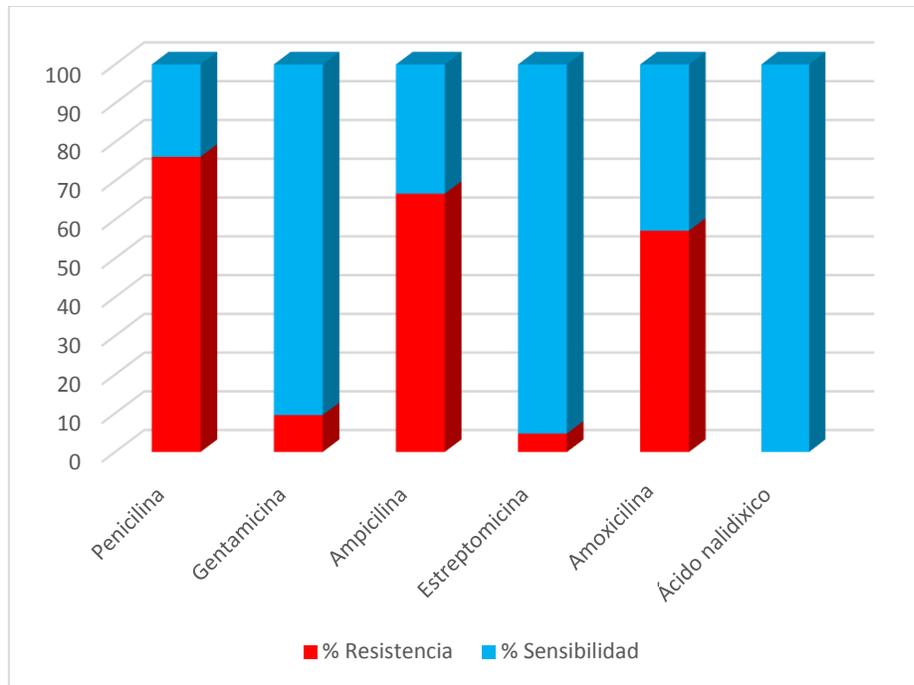
El estudio realizado por Cholca S, et al. En 2012, de los antibióticos empleados en ganado expone que una de las familias de antibióticos empleados con mayor frecuencia corresponde a los betalactámicos (39%) grupo dentro del cual se encuentra la penicilina y ampicilina, manifestándose además que ya existe evidencia de resistencia a este grupo de medicamentos.

### 3.2.2 Antibiograma de *Escherichia coli*

Tabla N° 12-3: Resultados del Antibiograma de *Escherichia coli*

Punto de expendio	Repetición	Penicilina	Gentamicina	Ampicilina	Estreptomicina	Amoxicilina	Ácido nalidíxico
Q1	R1	S	S	R	R	R	S
	R2	R	S	S	S	R	S
	R3	R	S	S	S	S	S
Q2	R1	R	S	S	S	S	S
	R2	S	S	R	S	S	S
	R3	R	S	R	S	R	S
Q3	R1	R	S	S	S	S	S
	R2	R	S	S	S	S	S
	R3	S	S	S	S	S	S
Q4	R1	R	S	R	S	S	S
	R2	R	S	R	S	R	S
	R3	S	S	R	S	S	S
Q5	R1	R	R	R	S	R	S
	R2	R	S	R	S	R	S
	R3	R	R	R	S	R	S
Q6	R1	R	S	S	S	S	S
	R2	R	S	R	S	R	S
	R3	S	S	R	S	R	S
Q7	R1	R	S	R	S	R	S
	R2	R	S	R	S	R	S
	R3	R	S	R	S	R	S
	% Resistencia	76.2	9,5	66.7	4,7	57.1	0
	% Sensibilidad	23.8	90,5	33.3	95,3	42.9	100

Realizado por: Alexandra Trujillo.



**Gráfico N° 5-3** Nivel de sensibilidad y resistencia de *Escherichia coli*

En el Gráfico 5-3 del Nivel de sensibilidad y resistencia de *Escherichia coli* podemos observar, la cantidad de muestras que presentaron resistencia (color rojo), siendo las más significativas para Penicilina, Ampicilina y Amoxicilina todas estas en un promedio del 66.6%, al igual que en caso del *Staphylococcus aureus* todos estos antibióticos pertenecen a grupo de los betalactámicos confirmando que los antibióticos más utilizados y por supuesto mal utilizados son las penicilinas y derivados, razón por la cual en ambos casos presentan la mayor resistencia bacteriana.

La *Escherichia coli* ante la gentamicina, estreptomina y ácido nalidixico, presentó un alto nivel de sensibilidad, cabe recalcar que estos antibacterianos generalmente no son usados por los ganaderos en el caso de infecciones sistémicas, de vías urinarias, respiratorias o del tracto gastrointestinal, lo mismo que puede explicar el no desarrollo de resistencias por parte de estos microorganismos hacia el medicamento.

Trabajos de investigación como los de Aponte. F., et al., en el año 2007, para evaluar la sensibilidad a antibióticos se emplearon 371 muestras de las cuales se aisló *E. coli* en un 3.8%. Los porcentajes de resistencia de *Escherichia coli*, en donde demostraron el 86% de resistencia para ampicilina, 57% a kanamicina, y un 93% para penicilina.

## CONCLUSIONES

- Realizado el análisis microbiológico de los quesos frescos que se expenden en el mercado Víctor Proaño de la ciudad de Riobamba, se determinó que no son aptos para el consumo humano debido a los recuentos de la microbiota encontrada, como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, siendo éstos los principales causantes de las Enfermedades de Transmisión Alimentaria.
- Llevado a cabo el recuento de la microbiota de los quesos frescos se encontró  $1,3 \times 10^6$  UFC/g de *Staphylococcus aureus*,  $7 \times 10^5$  UFC/g de *Escherichia coli* y  $8,5 \times 10^5$  UFC/g de Coliformes totales, valores que indican claramente una cadena agroalimentaria deficiente, en donde existe un gran nivel de contaminación de parte del medio en el cual se procesan, transportan y expenden los quesos frescos, es preciso mencionar que los materiales y métodos utilizados en las determinaciones fueron de Petrifilm 3M, los cuales son acreditados por las Normas Internacionales AOAC, las cuales también elaboran y validan los procedimientos utilizados por las Normas NTE INEN, por lo que se puede mencionar que los resultados son válidos y equivalentes a ser obtenidos por los procedimientos enunciados en las Normas nacionales.
- Se determinó las UFC/g de cada uno de los microorganismos en estudio en el queso fresco, de los cuales el 100% de los quesos 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*  $10^2$  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.
- Se llevó a cabo el antibiograma en donde las cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron resistencia a penicilina y ampicilina en un 76,2% de las muestras y sensibilidad a gentamicina, estreptomycin, amoxicilina y ácido nalidíxico en un promedio del 14%, lo que indica un nivel de resistencia bacteriana pronunciada a antibacterianos Betalactámicos los cuales son los más utilizados en bovinos ante la presencia de infecciones y como no requieren de una prescripción por un veterinario son fáciles de adquirir, por lo que se presta para su uso inadecuado.

- Las cepas *Escherichia coli* encontradas en el queso fresco expendido en el Mercado Santa Rosa presentaron resistencia a penicilina en un 76,2%, ampicilina en un 66,7% y amoxicilina en un 57,1%, mientras que presentaron sensibilidad a gentamicina en 90,5%, estreptomicina en 95,7% y ácido nalidíxico en un 100% de las muestras analizadas.
  
- Se llevó a cabo la capacitación a los expendedores de queso fresco en el mercado Víctor Proaño por medio de la entrega de trípticos y una charla relacionada con temas como Enfermedades de Transmisión Alimentaria, Buenas Prácticas de Higiene, inocuidad alimentaria las cuales permiten a los expendedores tener una noción sobre el manejo adecuado de los alimentos y así mejorar la calidad de los productos que ofrecen y prestar un servicio de calidad con alimentos seguros para el consumo.

## RECOMENDACIONES

- ❖ Las autoridades de salud pública en coordinación con otras entidades como la misma Escuela Superior Politécnica de Chimborazo realizar estudios microbiológicos periódicos validados para evaluar la calidad de los productos y tomar decisiones sobre la administración de los mismos.
- ❖ Entidades públicas ministeriales como el MAGAP, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca realice vinculación con la comunidad ganadera por medio de programas que permitan dar a conocer el correcto uso de antibióticos, el manejo racional de bovinos, así como también normas higiénicas para la obtención, procesamiento, transporte y comercialización de productos lácteos y derivados.
- ❖ Durante los análisis microbiológicos en la prueba de recuento de *Staphylococcus aureus* se recomienda el uso del disco de confirmación para mayor seguridad y confiabilidad en los resultados.

## GLOSARIO

**Análisis microbiológico:** Son pruebas microbiológicas, o a través de cultivos elaborados con ese fin, se realiza la inspección de un producto o superficie para determinar si presenta o no patógenos y, en caso de ser positivo, su carga (cantidad), grado de patogenicidad.

**Bacterias multiresistentes:** Son aquellas que son capaces de sobrevivir a la presencia de más de un antibiótico.

**Enfermedades de Transmisión Alimentaria:** Enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos (virus, bacterias, parásitos) perjudiciales vivos.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

**Leche cruda:** Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C).

**Leche:** Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**Pasteurización:** Es un proceso al que son sometidos ciertos líquidos como la leche, para eliminar agentes patógenos que podrían enfermar a las personas al consumirlos. Gracias a su uso, las infecciones e intoxicaciones alimentarias cada vez son menores.

**Queso fresco:** Es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácticos. También se designa como queso blanco.

**Queso:** Se entiende por queso el 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.

**Resistencia microbiana:** Es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

**AMINOT, JUAN,** *Ciencia y Tecnología de la leche.*, Zaragoza-España., Acribia, S.A., 1991., pp. 20, 43.

**BARRIOS XIOMARA,** Evaluación y mejoramiento de la calidad microbiológica de queso fresco a base de leche no pasteurizada, elaborado artesanalmente y comercializado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala [en línea] Guatemala-Guatemala. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA 2006, [Consulta: 20 de Enero de 2016.] Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2422.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2422.pdf)

**BATTRO, PABLO.** *Quesos Artesanales.* Cali-Colombia. Albatros, 2010, p 54

**BRAVO, FRANCISCO.** *El manejo higiénico de los alimentos.* Balderas-Perú: Llimusa, 2004, p 18.

**BRAVO, FRANCISCO.** *El manejo higiénico de los alimentos.* México DF-México: Limusa, 2004, p 35.

**BRITANIALAB,** *Manitol salado agar [en línea]* Buenos aires-Argentina: Britania lab. 2016, [Consulta: 20 de Enero de 2016.] Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/manitolsalagar.htm>

**CHOLCA GUATEMAL, SONIA** Análisis de la situación del uso de medicamentos (antibióticos y antiparasitarios) en las unidades productivas de los centros de acopio y enfriamiento de leche Sto. Domingo y Puliza (tesis).

**CODEX ALIMENTARIUS.** *Leche y productos lácteos [En línea]* Madrid-España: FAO. 2011. [Consulta: 20 de Enero de 2016.] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/015/i2085s/i2085s00.pdf>

**DÁVILA, J.** *Evaluación microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda [en línea],* (Venezuela) 2006. [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: [http://www.alanrevista.org/ediciones/2006-1/evaluacion\\_microbiologica\\_queso\\_gouda.asp](http://www.alanrevista.org/ediciones/2006-1/evaluacion_microbiologica_queso_gouda.asp)

**ESTRELLA, ALEXANDRA.** *Monitoreo de la calidad e inocuidad durante el almacenamiento de queso fresco elaborado artesanalmente en las parroquias rurales del cantón Riobamba.* Riobamba-Ecuador. ESPOCH. 2013, p53.

**FABRITZIO, MARÍA.** *Guía de Procesos para la elaboración de productos lácteos.* Bogotá-Colombia: CAB, 2003, pp 67-71

**FIGUEROA, B.** *Portación de Staphylococcus aureus enterotoxigenicos en manipuladores de alimentos,* Santiago de Chile-Chile, 2002, Vol 8, pp 859-864.

**GIL, ÁNGEL.** *Composición y calidad nutritiva de los alimentos.* Madrid-España: Médica Panamericana, 2010, p 8

**GONZÁLEZ, BEDIRVA** *Staphylococcus aureus en queso blanco fresco.* Barcelona-España: Salus cum propositum vitae, 2001, p 13.

**HERNÁNDEZ, ALICIA.** *Microbiología Industrial.* Bogotá-Colombia: Universida Estatal a Distancia, 2006, p 11

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (NTE INEN).** *Norma general para quesos frescos no madurados 1528:2012 [En línea]* Quito-Ecuador. INEN. 2012. [Consulta: 20 de Enero de 2015.] Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf>

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (NTE INEN).** *NTE INEN Lerche cruda 9:2012 [En línea]* Quito-Ecuador. INEN. 2012. [Consulta: 19 de Enero de 2016.]Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0009.2008.pdf>

**LACASA, ANTONIO..** *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera.* Barcelona-España: Reverte, 1985, p 330

**LLANCA, RONALD,** *Estudio de la calidad del queso de mano.* Caracas-Venezuela: Universidad Central de Venezuela. 2007, pp 22-26

**LÓPEZ, CARLOS.** Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de el Huecú. Buenos Aires-Argentina. SCP, 2009, pp 198-203

**LÓPEZ, MARTÍN.** *Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén.* Naquén-Argentina, Revista Argentina de Mmicrobiología, 2011, pp 198-203.

**MORALES ROMO,** *Análisis microbiológico en quesos frescos que se expenden en supermercados en la ciudad de Guayaquil determinando la presencia o ausencia de Listeria y Salmonella.* Guayaquil-Ecuador: Repositorio de la Escuela Superior Politécnica del Litoral. 2011, pp 38-39.

**NORE ALONZO**, *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm<sup>tm</sup> 3M<sup>tm</sup> para el análisis de alimentos [En línea]* Bogotá- Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, 2008. [Consulta: 25 de mayo de 2016.] <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>

**NORMA TÉCNICA MEXICANA**. *Norma oficial mexicana nom-121-ssa1-1994, bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. [En línea]* México DF-México. NORMA TÉCNICA MEXICANA 1994. [Consulta: 20 de Enero de 2016.] Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>

**NTE INEN 1529-2. Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.**

**NTE INEN 1529-5. Control microbiológico de los alimentos.**

**NTE INEN 1529-6. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable.**

**NTE INEN 1529-8. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes totales y E. coli.**

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)**. *¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos?* [En línea] Ginebra-Suecia. OMS. 2014. [Consulta: 02 de febrero de 2016.] Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/75/es/>

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)**. *Resistencia a los antimicrobianos. [En línea]*. Madrid-España. OMS. 2015. [Consulta: 20 de Enero de 2016.] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es>

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)**. *Resistencia a los antimicrobianos. [En línea]* Ginebra-Suecia. OMS. 2015. [Consulta: 02 de febrero de 2016.] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)**. *¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos?* [En línea] Madrid-España. OMS. 2014. [Consulta: 20 de Enero de 2016.] Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/75/es/>

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)**. *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión*

*alimentaria. [En línea]* Ginebra-Suecia. OMS. 2015. [Consulta: 02 de febrero de 2016.] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (OMS).** *Inocuidad de los alimentos. Enfermedades de transmisión alimentaria. [En línea]* Ginebra-Suecia. OMS. 2016. [Consulta: 02 de febrero de 2016.] Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/es/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/es/)

**ORGANIZACION PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. (FAO).** *Proceso de elaboración d eproductos lácteos.* Guatemala-Guatemala: FAO, 2011, pp 5-9

**PÉREZ, CAZA.** *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. [En línea]* Madrid-España. MSSSI. 1998. [Consulta: 20 de Enero de 2016.] Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

**PÉREZ, CAZA.** *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. [En línea]* Madrid-España: MSSSI. 1998. [Consulta: 02 de febrero de 2016.] Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

**PIERCE, BENJAMÍN.** *Genética un enfoque conceptual.* Madrid-España: Médica Panamericana, 2009, p 216.

**PONCE, PASTOR.** *Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales.* Madrid-España: Censa, 2013, pp 210-213.

**PORTERO, RAÚL.** *Manual de Procedimientos para el control microbiológico de alimentos.* Asunción-Paraguay: Biblioteca Orton II CA/CATIE, 2001, p 46.

**REVILLA, A.** *Tecnología de la leche,* Instituto Americano de Cooperación para la Agricultura, Tegucigalpa-Honduras, 1996

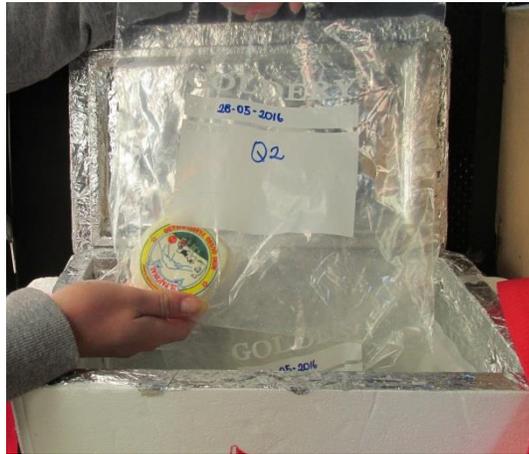
**ROMERO, RAÚL.** *Microbiología y Parasitología Humana.* Madrid-España: Edición Médica Panamericana, 2007, p 753.

**ROSARIO, PASCUAL.** *Enfermedades de origen alimentario.* Lima-Perú: Diaz de Santos, 2005, p 45.

**UNIFEM** *Procesamiento de Lácteos.* Lima-Perú : UNIFEM, 1996, pp 7-10

## ANEXOS

### Anexo A: Toma de muestras y codificación del queso fresco



### Anexo B: Preparación de las soluciones madre



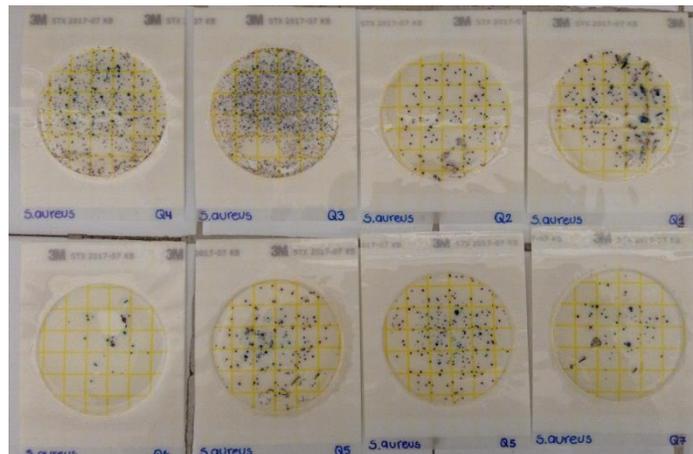
### Anexo C: Inoculación en el Medio Petrifilm



**Anexo D:** Incubación de las cajas Petrifilm



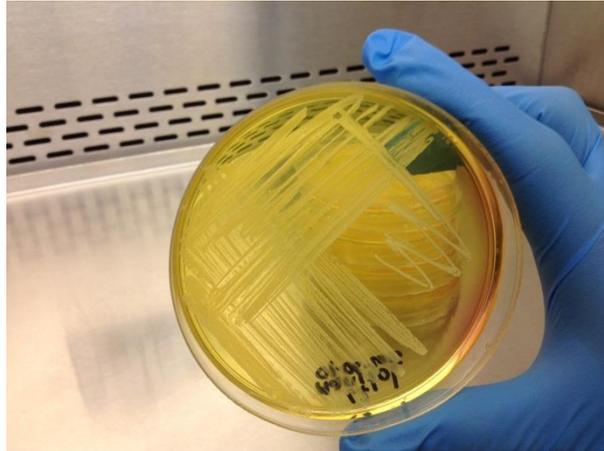
**Anexo E:** Recuento de Cajas Petrifilm



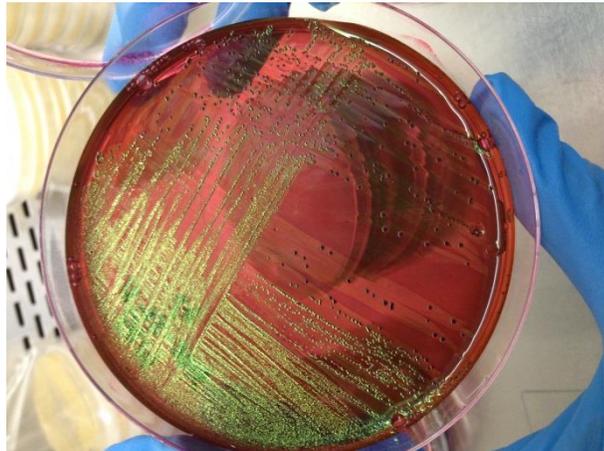
**Anexo F:** Resultados de la Técnica NMP



**Anexo G:** Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado



**Anexo H:** Crecimiento de *Escherichia coli* en Agar Eosina Azul de Metileno



**Anexo I:** Antibiograma



**Anexo J: Repiques sucesivos**



**Anexo K: Tinción Gram**



**Anexo L: Esterilización de materiales**

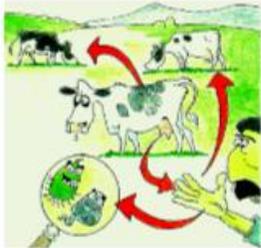


**Anexo M:** Requisitos microbiológicos de la Norma NTE INEN 1528:2012

<b>NORMA NTE INEN 1528-2012. QUESOS FRESCOS NO MADURADOS</b>					
<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>	<b>Método de ensayo</b>
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	$2 \times 10^2$	$10^3$	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus UFC/g	5	10	$10^2$	1	NTE INEN 1529-14

**Anexo N:** Material para expendedores de queso fresco del mercado Santa Rosa

El queso fresco puede contaminarse con agentes biológicos en cualquier punto de la cadena alimentaria, por lo que se debe fomentar las Buenas Prácticas de Manipulación.




**Recuerda:**



Una de cada 10 personas se enferma cada año por ingerir alimentos contaminados especialmente productos lácteos.



NOMBRE:

- Alexandra Trujillo



**QUESOS FRESCOS**



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA  
CAPACITACIÓN A EXPENDEDORES DE QUESOS FRESCOS DEL MERCADO DE SANTA ROSA

### QUESOS FRESCOS

Es un alimento sólido elaborado a partir de la leche cuajada de vaca.

Principal producto de la canasta básica

Producto de gran valor nutritivo lo cual le hace vulnerable al crecimiento de microorganismos



### ALTERACIONES

Múltiples agentes contaminantes:

Físicos	Cabellos, cuerpos extraños, pajilla
Químicos	Recipientes con residuos químicos
Microbiológicos	Contaminación fecal y leche de vacas infectadas

### NORMAS DE HIGIENE

Lavarse las manos



Ropa limpia

Recipientes adecuados e higiénicos



Mantener cadena de frío durante todo el proceso



Limpieza de utensilios, equipos y superficies



No comer, fumar o beber



Buenas prácticas de ordeño y de manufactura



## Anexo O: Aprobación del método estadístico



# ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

Riobamba, 19 de septiembre de 2016.

Dra.

Sandra Escobar.

**DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Presente.-

De mi consideración:

Reciba un atento y cordial saludo, a la vez felicitarle por las funciones desempeñadas en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por medio del presente me permito informar que mi persona PhD. Plácido Moreno Beltrán realizó la revisión del **CAPÍTULO III MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**, especialmente el análisis estadístico del trabajo de titulación denominado **“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DEL QUESO FRESCO QUE SE EXPENDE EN EL MERCADO DE SANTA ROSA, CIUDAD DE RIOBAMBA”** presentado por la Srta. **Alexandra Andrea Trujillo Chávez**, estando correcto el análisis estadístico que permite aseverar que el queso fresco expendido en el Mercado Víctor Proaño no es apto para el consumo humano ya que los microorganismos *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales y *Escherichia coli* sus recuentos realizados en el laboratorio se encuentran por encima de los valores establecidos en las respectivas Normas, en donde para dicha comparación se utiliza el Software estadístico SPSS Statistics de IBM, utilizando la Prueba T para una muestra.

Por la favorable atención expreso mi agradecimiento.

Atentamente,

PhD. Plácido Moreno.

**DOCENTE E INVESTIGADOR FIE**

