

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Escherichia coli* COMO
INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL RECIENTE EN EL
QUESO FRESCO ARTESANAL EXPEDIDO EN LOS MERCADILLOS
DE HUÁNUCO**

Presentado por

Irwin Aldo PALPA CHÁVEZ

Para Optar el Título Profesional de

MÉDICO VETERINARIO

HUÁNUCO, PERÚ

2015

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia por su apoyo

incondicional

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi padre Pedro Palpa Abal, a mi madre Raquel Chávez Robles y a mis hermanos por estar siempre a mi lado, dándome ánimos, tenerme paciencia, por creer en mí y por apoyarme en todo durante estos años de aprendizaje.

En memoria de mi abuela Asencia Abal Dávila que me enseñó que aun en la ignorancia se puede llegar muy lejos sin hacer mal, a mi abuela Fabiliana Robles Jaimes que me enseñó que siempre hay que ayudar a quien lo necesite y a mi tía Allica que me enseñó que siempre habrá un plato de comida para quien visite nuestra casa.

A mi asesor Mg. M.V. Juan Marco Vásquez Ampuero por su apoyo con el proyecto de tesis y a la M. V. Nerky Luz Martínez Ramírez, por ser mi guía durante la realización del presente trabajo, además de los docentes que formaron parte de mi vida académica en todos estos años de estudio.

A todos mis amigos que conocí y formaron parte de mi aprendizaje: Cecilia, Kateryn, Dante, Gian, Henry, Karina, Wilson, Eddyson, Maryoli, Anyela y todos los demás.

Gracias.....

“Siempre hay que enfrentarse a los desafíos con una gran sonrisa”.

INDICE

	Pág.
RESUMEN.	x
SUMMARY.	xi
INTRODUCCIÓN.	1
I. MARCO TEORICO.	3
1.1. Revisión de estudios realizados.	3
1.2. Conceptos fundamentales.	8
1.2.1. Queso fresco.	8
1.2.2. Coliforme.	15
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	16
1.2.4. Aerobios mesófilos.	18
1.3. Definición de términos básicos.	20
1.4. Hipótesis.	21
II. MARCO METODOLOGICO.	22
2.1. Lugar de estudio.	22
2.2. Materiales.	23
2.3. Metodología.	25
2.4. Determinación de la población.	26
2.5. Procesamiento de las muestras.	27
III. RESULTADOS.	36
IV. DISCUSION.	59
V. CONCLUSIONES.	63
VI. RECOMENDACIONES.	65
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS.	66
ANEXO.	68
NOTA BIOGRÁFICA.	89

LISTA DE TABLAS

TABLA	Pág.
1. Criterios microbiológicos para Quesos frescos (queso fresco tradicional, matecoso, ricotta, cabaña, petit suisse, mozzarella, ucayalino, otros)	14
2. Distribución de los mercadillos.	22
3. Lugares de muestreo y número de muestras de queso fresco recolectadas al azar.	26
4. Frecuencia y porcentaje de contaminación por <i>E. coli</i> en quesos frescos artesanales expendidos en mercadillos de Huánuco mediante pruebas bioquímicas.	36
5. Recuento de <i>E. coli</i> , coliformes totales y aerobios mesófilos en las placas de Petrifilm. UFC/ g de queso.	38
6. Frecuencia y porcentaje de los resultados de recuento de <i>E. coli</i> en Placa Petrifilm.	38
7. Recuento de UFC en medio Mac Conkey.	40
8. Procedencia de la muestra de estudio.	41
9. Procedencia del total de muestras.	42
10. Resultado significativo del método de expendio.	43
11. Uso de mandil para la manipulación del queso fresco artesanal.	43
12. Uso de guantes para manipular el queso fresco artesanal.	44
13. Uso de gorro para el expendio del queso fresco artesanal.	45
14. Uso de mascarilla al momento de la venta de queso fresco artesanal.	46
15. Presencia de personal de cobranza en el puesto de venta de queso fresco artesanal.	47
16. Resultado significativo de la exposición del queso fresco artesanal.	49
17. Tipo de material del que está hecho la fuente o bandeja.	49
18. Tipo de material del cobertor de los puestos que los usan.	50
19. Tipo de exhibidor para el queso fresco artesanal.	51
20. Almacenamiento del queso fresco artesanal en el mismo puesto.	52

21. Resultado significativo de los utensilios.	54
22. Material de la tabla de picar.	54
23. Estado de los trapos para la limpieza.	55
24. Resultado significativo de la infraestructura.	56
25. Manera de disponer al agua en cada puesto muestreado.	57
26. Venta del queso fresco con otros productos.	58
27. Base de datos en SPSS de la encuesta a los comerciantes de los mercadillos.	68
28. Distribución de las encuestas de los puestos de los mercadillos que venden queso fresco artesanal.	69
29. Clave de identificación de enterobacterias.	70
30. Resultado de las pruebas bioquímicas.	71

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO	Pág.
1. Frecuencia y porcentaje de contaminación por <i>E. coli</i> en quesos frescos artesanales expendidos en mercadillos de Huánuco mediante pruebas bioquímicas.	36
2. Resultado pruebas bioquímicas.	39
3. Procedencia de la muestra de estudio.	41
4. Uso de mandil para la manipulación del queso fresco artesanal.	44
5. Uso de guantes para manipular el queso fresco artesanal.	45
6. Uso de gorro para el expendio del queso fresco artesanal.	46
7. Uso de mascarilla al momento de la venta de queso fresco artesanal.	47
8. Presencia de personal de cobranza en el puesto de venta de queso fresco artesanal.	48
9. Tipo de material del que está hecho la fuente o bandeja.	50
10. Tipo de material del cobertor de los puestos que los usan	51
11. Tipo de exhibidor para el queso fresco artesanal.	52
12. Almacenamiento del queso fresco artesanal en el mismo puesto.	53
13. Material de la tabla de picar.	54
14. Estado de los trapos para la limpieza.	55
15. Acceso al agua en cada puesto muestreado.	57
16. Venta del queso fresco con otros productos.	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
1. Fotografía de los Medios de cultivo preparados para esterilizarlas. . .	72
2. Fotografía de Placas Petri con medios de cultivo en la incubadora para pasar su prueba de control de calidad.	72
3. Fotografía de la recolección de 100g de queso fresco artesanal, el queso está expuesto en la parte posterior y en la refrigeradora, en la mesa solo lo cubre una tela de gasa.	73
4. Fotografía de comerciante realiza el corte del queso cubriéndose solo con una bolsa la mano sin gorra ni mascarilla.	73
5. Fotografía de un puesto donde el queso fresco está expuesto en una vitrina de vidrio sin cobertor.	74
6. Fotografía de un puesto donde se observa que el queso fresco está solo en una bandeja de plástico, junto a huevos y carne de pollo. . .	74
7. Fotografía de uno de los puestos que contaba con refrigerador, pero el comerciante no usaba mandil, ni gorro.	75
8. Fotografía del puesto de expendio donde se ve al queso fresco sin cobertor.	75
9. Fotografía de otro puesto se observa que el queso fresco está en bandejas de metal junto a otros productos lácteos.	76
10. Fotografía de un puesto el queso está expuesto junto a carne de ave	76
11. Fotografía de un puesto el queso fresco está en un plato dentro de una bolsa plástica, sin cobertor, y junto a otros productos.	77
12. Fotografía de un puesto el queso fresco está sin cobertor y junto a carne de ave.	77
13. Fotografía del rotulado de las muestras de queso fresco artesanal. . .	78
14. Fotografía de las muestras trituradas con caldo nutritivo.	78
15. Fotografía de muestras en la incubadora.	79
16. Fotografía del procedimiento para las diluciones del UFC.	79
17. Fotografía del cultivo de las diluciones en agar Mac Conkey.	80
18. Fotografía del recuento para hallar las UFC por gramo de muestra. . .	80
19. Fotografía del cultivo de la muestra en agar EMB.	81

20. Fotografía del desarrollo de las colonias, nótese el brillo verde metálico característico de <i>E. coli</i>	81
21. Fotografía de la inoculación de las colonias en los diferentes medios para las pruebas bioquímicas.	82
22. Fotografía de los tubos inoculados para las pruebas bioquímicas.	82
23. Fotografía de la lectura de los tubos de las pruebas bioquímicas.	83
24. Fotografía de los materiales en la cabina de flujo laminar para el cultivo en las Placas Petrifilm.	83
25. Fotografía de la inoculación de 1 ml de muestra en la Placa Petrifilm.	84
26. Fotografía de la distribución uniforme por todo el campo de la Placa Petrifilm.	84
27. Fotografía de la incubación por 24 a 48 horas.	85
28. Fotografía del recuento de las Placas Petrifilm en un contador de colonias convencional.	85
29. Fotografía del recuento de las Placas Petrifilm para <i>E. coli</i> , nótese la cantidad de colonias azules con gas características de dicha bacteria.	86
30. Fotografía del recuento de las Placas Petrifilm para aerobios mesófilos, nótese el gran desarrollo de colonias rojas.	86

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Escherichia coli* COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL RECIENTE EN EL QUESO FRESCO ARTESANAL EXPEDIDO EN LOS MERCADILLOS DE HUÁNUCO

Irwin Aldo PALPA CHÁVEZ

RESUMEN

Se evaluó la presencia de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal reciente en quesos frescos artesanales expedidos en mercadillos de la ciudad de Huánuco. El objetivo fue de evaluar las condiciones higiénico-sanitarias del expendio de queso fresco que presenta una mayor contaminación con *E. Coli* y así mismo conocer la cantidad de coliformes totales y la presencia de aerobios mesófilos, también evaluar el modo de expendio de los quesos frescos relacionándose con la contaminación. De las 17 muestras analizadas de queso fresco artesanal, 10 (58,8%) muestras dieron positivo a *E. coli* con las Placas Petrifilm, se halló valores de 10 ufc/g hasta $2,8 \times 10^2$ ufc/ de queso. En relación a Coliformes totales en el recuento se obtuvo los valores de 98 ufc/ g hasta $6,9 \times 10^2$ ufc/g de queso, y en el recuento de aerobios mesófilos mediante la placa Petrifilm se obtuvo valores de $1,0 \times 10^2$ ufc/ g hasta $5,7 \times 10^2$ ufc/ g de queso, y en el recuento por diluciones se obtuvo los valores de $1,0 \times 10^2$ hasta $6,3 \times 10^7$. De acuerdo a la encuesta aplicada se tiene que el 94.1% de puestos se encuentran con niveles de manipulación, utensilios e infraestructura deficientes. Mediante los resultados se considera marginalmente aceptable de manera general por estar dentro de los límites máximos recomendados según la Norma Técnica Peruana 202.087. Sin embargo, los valores de *E. coli* están por encima de los valores permitidos, lo que indica deficiencias higiénicas en la manipulación del queso fresco artesanal.

Palabras claves: Queso, *Escherichia coli*, coliformes, aerobios mesófilos.

EVALUATION OF THE PRESENCE OF *Escherichia coli* AS AN INDICATOR OF CONTAMINATION IN RECENT FECAL ARTISAN CHEESE MARKETS ISSUED IN HUÁNUCO

Irwin Aldo PALPA CHÁVEZ

SUMMARY

Was evaluated the presence of *Escherichia coli* as an indicator of recent fecal contamination in fresh artisan cheeses issued on markets of the city of Huánuco. The objective was to evaluate the sanitary conditions of the sale of fresh cheese that has a higher contamination with *E. coli* and likewise know the amount of total coliforms and the presence of aerobic mesophilic bacteria also assess the mode of sale of fresh cheeses relating to contamination. Of the 17 samples analyzed artisanal cheese, 10 (58.8%) samples were positive for *E. coli* with Petrifilm values, values of 10 cfu/ g was found to $2,8 \times 10^2$ cfu / cheese. In relation to total coliforms in the count values of 98 cfu / g to $6,9 \times 10^2$ cfu/ g cheese was obtained, and the mesophilic aerobic plate by Petrifilm values $1,0 \times 10^2$ cfu / g it was obtained up to $5,7 \times 10^2$ cfu/ g cheese and at dilutions counting values obtained until $6,3 \times 10^7$ $1,0 \times 10^2$. According to the survey has applied the 94.1% of posts are handling levels, utensils and poor infrastructure. By the results are considered marginally acceptable generally to be within the maximum limits recommended by the Peruvian Technical Regulations 202 087. However, *E. coli* values are above the allowed values, indicating deficiencies in the hygienic handling of the fresh artisan cheese.

Keywords: Cheese, *Escherichia coli*, coliforms, aerobic mesophilic.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen, según la Organización Mundial de la Salud, uno de los problemas de salud más extendidos en el mundo actual, y una causa importante de reducción de la productividad económica, debido a una alta tasa de morbilidad afectando la salud y calidad de vida. La morbilidad por infecciones intestinal se sitúa en tercer lugar a nivel mundial, la misma que es ocasionada por contaminación de los alimentos, siendo ésta una de las principales causas de enfermedades diarreicas y de mal nutrición. **(Quevedo y col, 1990).**

La leche constituye un excelente sustrato para la proliferación de microorganismos debido a su alto contenido de nutrientes. Es de importancia fundamental determinar la calidad higiénica y sanitaria de la leche y sus derivados, entre ellos el queso por ser uno de los de mayor consumo popular **(Trigueiro y Euthier, 1998).**

La presencia de microorganismos patógenos en el queso depende de la calidad y del tratamiento térmico de la leche, la limpieza general de la quesería, la calidad de los cultivos, del manejo de la cuajada durante el procesamiento, de la temperatura de almacenamiento, transporte y distribución del queso **(Farkye, 2002).**

Las condiciones de comercialización y mantenimiento del queso fresco están establecidos por la Norma Sanitaria de Funcionamiento de Mercados de Abasto y Ferias (**MINSA, 1999**), Así como por el Reglamento sobre Vigilancia y control Sanitario de los Alimentos y Bebidas (**MINSA, 1998**).

Actualmente el expendio de “queso fresco” en la ciudad de Huánuco, está ampliamente difundido, este hecho hace que, la forma de elaboración y venta constituyan una constante preocupación para la salud del consumidor, desde el momento que se inicia el proceso con el ordeño de la vaca, la elaboración propiamente dicha, la distribución y el expendio, se observa que las condiciones de infraestructura, materiales y manipulación en muchos casos no son las adecuadas y no cumplen con las normas sanitarias establecidas (**MINSA, 2003**).

Más aún, cuando la elaboración de queso fresco en las zonas periféricas de la ciudad de Huánuco muchas veces se omite la pasteurización. Este dato es importante ya que la mayor parte de quesos que se expenden son procedentes de estas zonas. Por otro lado, las condiciones de transporte que utiliza para llevar los productos hasta los puntos de venta no son adecuadas debido a que se utilizan cajas de madera, cartón, plástico, baldes y otros para el embalaje. Igualmente, la exhibición se realiza sin ninguna protección y no se tiene en cuenta la temperatura requerida para la conservación y la vida útil.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de *E. coli* como indicador de contaminación en el queso fresco artesanal expendidos en los mercadillos de la ciudad de Huánuco.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Revisión de estudios realizados

En el estudio “Análisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de Corrientes – Argentina” en el que determinó la calidad higiénico-sanitaria de materia prima y quesos elaborados artesanalmente y evaluó el riesgo para la salud que implica el consumo de. Analizó veinte muestras de leche y veinte de agente coagulante usualmente utilizados en la elaboración de queso artesanal (preparado con leche cruda, cuajo artesanal, fermentación espontánea y poca o ninguna maduración) al igual que cien muestras de quesos. En todas ellas, se cuantificaron los microorganismos contaminantes y bacterias lácticas.

Los hallazgos en leche, fueron que los recuentos más altos correspondieron a bacterias aerobios mesófilos (2.9×10^6 ufc/ ml), Los valores medios de coliformes totales y fecales se encontraban en el rango de 10^3 - 10^6 NMP/g. y *E. coli* se detectó en la mayoría de las muestras (90.00%), en niveles comprendidos entre 10^3 y 10^6 NMP ml/g. Estos resultados indican serias fallas sanitarias durante la recolección de la leche, presentando una fuerte asociación entre estos tres grupos de microorganismos indicadores de calidad higiénica. En quesos; la distribución en rangos de frecuencia de coliformes totales y fecales, indicó que el 80.00 % y 72.00% de los mismos, respectivamente, estuvieron comprendidos en el rango de 10^3 - 10^6 NMP/g.

E. coli se detectó en el 80.00% de los quesos y el 61.00% presentó recuentos entre 10^2 y 10^3 NMP/ g. Si bien no se identificaron serológicamente las especies

de *E. coli* aisladas, considerando que el producto se comercializa generalmente con poca o ninguna maduración, lo cual implica un riesgo para la salud de los consumidores (Vasek, 2004).

En el trabajo "microorganismos indicadores de interés sanitario en queso artesanal tipo "telita". Upata, Municipio Piar, Estado Bolívar. Septiembre - octubre 2008". El objetivo de este trabajo fue investigar los microorganismos indicadores de interés sanitario en queso artesanal tipo "telita" de Upata, Municipio Piar, Estado Bolívar. Septiembre-Octubre 2008. Se analizaron 30 muestras de quesos artesanales tipo "telita" y se determinaron el recuento de estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus*) según la Norma Venezolana COVENIN 1292-89 como indicador de manipulación, el número más probable (NMP) de bacterias coliformes según la Norma Venezolana COVENIN 1104-96 y la presencia de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal. Como resultado se obtuvo que no hubo presencia de *S. aureus*, todos los crecimientos bacterianos correspondieron a *Staphylococcus coagulasa* negativo y los recuentos más elevados estuvieron en el orden de hasta 10^4 diluciones decimales; los Coliformes Totales mostraron recuentos elevados (desde 10^3 hasta $\leq 10^5$) y los Coliformes Fecales desde 10 hasta $\leq 10^4$ NMP/g. *Escherichia coli* estuvo presente en el 43,3% de los quesos analizados.

Se concluye que el queso artesanal tipo "telita" que se expende en los alrededores de Upata, estado Bolívar, evidencia fallas en la manipulación e higiene posterior a su elaboración; y por no cumplir con la norma sanitaria, se

considera un producto de alto riesgo microbiológico para el consumidor (**Caldas, 2008**).

En el trabajo "Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela". Con el fin de evaluar y conocer las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso, en el estado Lara, Venezuela se tomaron muestras de quesos elaborados artesanales provenientes de seis distribuidores seleccionados aleatoriamente, determinándose a cada muestra de queso fresco elaborado con leche de vaca, las características fisicoquímicas (humedad, pH, actividad de agua) y microbiológicas (aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) mediante el método de Petrifilm. Estos quesos mostraron una gran variabilidad en su composición fisicoquímica con una humedad entre 36,99% - 46,37%, lo cual permite clasificarlos como quesos duros (HMSG < 50%) COVENIN 1813-2000, pH entre $5,5 \pm 0,24$ y $5,8 \pm 0,23$ y a alta entre 0,92 y 0,94 (valores que favorecen el desarrollo de microorganismos). La calidad microbiológica fue deficiente evidenciada por la cuantificación elevada de aerobios mesófilos ($3,02 \times 10^5 - 2,8 \times 10^5$ UFC/g), coliformes totales ($1,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^2$ UFC /g), fecales ($4,60 \times 10^3 - < 1,01$ UFC/g), *E. coli* ($1,3 \times 10^4 - 40$ UFC/g), y *S. aureus* ($1,19 \times 10^2 - > 10$ UFC/g), cuyos valores no cumplen con los niveles establecidos por la norma COVENIN-3821-2003.

Los resultados fisicoquímicos obtenidos, indican que existe poco control en cuanto a higiene.

Es importante decir que la calidad de los quesos provenientes de los distribuidores del estado Lara en base a sus características fisicoquímicas y microbiológicas es deficiente, pudiendo representar un riesgo a la salud de los consumidores **(Vásquez, 2012)**.

En el trabajo “Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp*”. Con el objetivo de evaluar la calidad bacteriológica de quesos frescos artesanales y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp*. Se hallaron los siguientes valores promedio de carga microbiana: bacterias aerobias mesófilas, $7,1 \times 10^6$ UFC/g; coliformes totales, $9,3 \times 10^2$ NMP/g; coliformes fecales, $8,3 \times 10^2$ NMP/g; *E. coli* $2,6 \times 10^2$ NMP/g; *S. aureus*, $3,1 \times 10^5$ UFC/g; *E. faecalis*, $4,6 \times 10^2$ NMP/g; y *Lactobacillus spp*, $1,63 \times 10^5$ UFC/g. En general, la carga microbiana de 97,4% de las muestras estuvo por encima de los valores máximos permitidos por la Norma Técnica Peruana 202.087 para los diferentes microorganismos o grupos de microorganismos: coliformes totales (74,2% de las muestras), coliformes fecales (58,6%), *E. coli* (28,1%) y *S. aureus* (87,2%). La presencia de *Lactobacillus spp* no impidió la presencia de *S. aureus* y *E. faecalis*.

La elevada carga microbiana en las muestras de queso analizadas refleja deficiencias higiénicas en la manipulación del queso fresco artesanal que se comercializa en los mercados estudiados, lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor. No se observó que la presencia de *Lactobacillus spp* impidiera el crecimiento de los otros microorganismos estudiados en los quesos **(Cristóbal, 2003)**.

En el trabajo "Evaluación de la carga microbiana patógena en la elaboración del queso fresco en el distrito de Tacna". Tuvo como objetivo determinación de la carga microbiana patógena en las operaciones de elaboración de quesos frescos en 4 plantas queseras, realizó el análisis en 20 muestras de queso fresco, hallando que el 50% (10 muestras) eran aptas para el consumo y el 50% (10 muestras) no aptas, determinándose que fase del proceso constituye punto de mayor contaminación. Encontró niveles de coliformes totales $1,1 \times 10^3/g$ que son marginalmente aceptable; *Escherichia coli* $2,1 \times 10^2/g$ marginalmente aceptable, *Staphylococcus coagulasa* positiva $4,7 \times 10^4/g$ inaceptable y Aerobios mesófilos viables $3,0 \times 10^5/g$ lo que indica presencia de contaminación

El queso fresco se consideró como "apto para el consumo" cuando la muestra analizada cumplía con todos los Requisitos Microbiológicos especificados en la NTN 202.087. Así, bastaba que uno de los tres tipos de microorganismos presentes (coliformes *E. coli* y *S aureus*) sobrepase sus límites en la muestra, para llamarla "no apta". En ninguno de los casos se detectó Salmonella, pero definitivamente, como en cualquier tipo de alimento, su sola presencia no hubiera sido permitida. Concluye que según Normas, presenta deficiencia en proceso de elaboración aunque se considera marginalmente aceptable en general (**Lanchipa, 2003**).

1.2. Conceptos fundamentales.

1.2.1. QUESO FRESCO.

1.2.1.1. Características Generales.

Según la definición legal de la Norma Técnica Peruana (NTP) 202.195, define al queso fresco (tradicional), como el queso blando, no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, sin cultivos lácteos, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche pasteurizada, entera, descremada o parcialmente descremada, o una mezcla de algunos de estos productos.

Los quesos frescos tienen un alto contenido de humedad y no han sufrido proceso de maduración, por lo que pueden tener sabor a leche fresca o leche acidificada. Su consistencia suele ser pastosa y su color blanco. Por tener un alto contenido de humedad en la pasta (45-80%), su tiempo de vida útil resulta corto, debiendo ser consumidos en pocos días. Su transporte y conservación se debe hacer a temperaturas de 4-10 °C; aun manteniendo la cadena de frío son altamente perecederos **(Madrid, 1996)**.

En el Perú, el consumo de Queso Fresco, se ha incrementado, llegando al 75% en relación al consumo de quesos madurados; esto debido a su bajo costo, a sus características nutricionales y usos variados **(Calle y Solano, 2004)**.

1.2.1.2. Alteración del queso fresco

Por su alto contenido proteico, el queso fresco se constituye en el sustrato adecuado para el crecimiento bacteriano. Las características del queso fresco (pH, humedad y nutrientes) permiten el desarrollo de muchos

microorganismos propios de la leche, de contaminación ambiental y del manipuleo del producto terminado y/o durante la producción del mismo. La flora microbiana varía con los distintos tipos de quesos e inclusive entre varios quesos del mismo tipo, dependiendo siempre de la carga microbiana inicial de la leche y la eficiencia de la pasteurización. Entre los microorganismos que pueden generar un riesgo para el consumidor y que puede presentar el queso fresco son: Coliformes, *Escherichia coli*, hongos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Lactobacillus sp* y *Listeria monocytogenes*.

La alteración de los quesos es principalmente de dos tipos, el crecimiento superficial de microorganismos, normalmente mohos, y la producción de gas, alteración del sabor y aroma, debida al crecimiento de microorganismos en el interior de la masa del queso. Los quesos muy ácidos se alteran normalmente por acción de levaduras y mohos, pero la alteración bacteriana es importante en las variedades de pH más alto, como el queso fresco blanco o el queso cottage. Las bacterias más comunes son gram negativas, como las *Pseudomonas* y *enterobacterias*, aunque también *Enterococcus* puede producir alteración. En cuanto al crecimiento de mohos produce una alteración visible, muchas veces acompañada de una lipólisis y proteólisis intensa, siendo los responsables más frecuentes de esta alteración los *Penicillium* en un 60-80% de los casos y *Aspergillus* (Varnam y Sutherland, 1994).

1.2.1.3. Elaboración del queso fresco:

1.2.1.3.1. Insumos

- **Leche:** La leche es la materia prima principal en la elaboración del queso fresco, es fuente importante de lactosa y caseína. La caseína ocupa el 80% aproximadamente de la fracción nitrogenada de la leche.
- **Cuajo:** El cuajo es una enzima específica llamada quimosina, la cual es secretada en el abomaso (cuarto estómago) de los rumiantes y tradicionalmente la principal fuente de suministro son los terneros (**Varnam y Sutherland, 1994**).

Frecuentemente utilizada en la fabricación de queso cuya función es separar el agua de la leche, llamado suero. El accionar de la quimosina es que actúa directamente en un punto delimitado de la caseína. Al romper dicha molécula se inicia la formación de un gel que atrapa la mayoría de los componentes sólidos de la leche; este gel se contrae poco a poco y al contraerse va expulsando suero. Al cortarse el gel en cubitos, se logra separar entre un 50-90 % del contenido inicial del agua de la leche.

- **Sal común:** El cloruro de sodio (NaCl) da forma y constriñe las características del queso. La sal tiene influencia en el desuerado, el cual a su vez incide en el contenido de humedad del queso terminado. La sal afecta la forma y características de la corteza del

queso, influye en el sabor así como en el desarrollo y supervivencia de bacterias iniciadoras o no iniciadoras (**Jonson y Paulus, 2005**).

1.2.1.3.2. Etapas de la elaboración de queso fresco

- **Recepción de la Leche:** La leche debe ser de buena calidad, tanto químico como microbiológico. Debe de tener la acidez requerida y debe estar libre de impurezas, siendo necesaria su filtración para eliminar cuerpos extraños en la misma. (**Madrid, 1996**).
- **Pasteurizado:** La pasteurización puede definirse como “un proceso higienizante destinado a eliminar completamente la microflora patógena de la leche y destruir un alto porcentaje de enzimas deterioradoras.

La pasteurización es fundamental en la elaboración de quesos frescos de corta maduración y en los curados de no más de 2 meses. Para quesos frescos existen dos métodos para pasteurizar la leche; el primero consiste en calentar la leche a 63-65 °C, durante 30 minutos (pasteurización lenta) y el otro en calentarla durante 15 segundos, a 72 °C (pasteurización rápida, HTST). Los tratamientos son equivalentes en cuanto a su capacidad de destrucción total de microorganismos patógenos. (**Varnam y Sutherland, 1994**).

- **Enfriado:** El objetivo de esta etapa es acondicionar la leche que permita mejorar el rendimiento, la actividad y formación del cuajo. **(Zambrano, 2010).**
- **Coagulado:** Es consecuencia de la desestabilización proteica y puede llevarse a cabo mediante la acción de proteínasas ácidas como la quimosina (coagulación enzimática) o por acidificación a un valor de pH próximo al punto isoeléctrico de las proteínas **(Varnam y Sutherland, 1994; Zambrano, 2010).**

La coagulación enzimática se da en dos fases distintas, una fase proteolítica en la que las micelas de caseína se desestabilizan por hidrólisis de la k-caseína, formándose micelas de para- k-caseína y una fase secundaria, mediada por el calcio, en la que las micelas de paracaseína se agregan y precipitan. Con el tiempo van formando una red con poros, dentro de la cual se van acomodando los glóbulos grasos y el coágulo se va haciendo más firme por la continua formación de enlaces entre las micelas **(Zambrano, 2010)**. Esta última fase requiere condiciones de reposo y una temperatura por encima de 20 °C **(Varnam y Sutherland, 1994)**. Para **Zambrano (2010)**, la temperatura óptima de acción del cuajo está alrededor de los 40°C pero se utiliza menores para evitar la dureza del coagulo.

- **Cortado y Batido:** Durante el corte debe evitarse la ruptura del coagulo y la correspondiente pérdida de materia grasa y un deficiente sinéresis **(Varnam y Sutherland, 1994)**. Para los

quesos frescos se debe cortar en cubos de 1 a 2 cm de arista, en lo posible de forma homogénea que permita la salida de la mayor cantidad de suero posible por aumento de la superficie **(Zambrano, 2010)**. La agitación o batido de la cuajada, manteniendo la temperatura entre 38-40 °C, favorece a la sinéresis y la eliminación del suero.

- **Desuerado:** Consiste en la separación del suero de la cuajada, ya sea por filtración o decantación. Pudiéndose separar hasta el 90% del lactosuero. Tecnológicamente se puede realizar dos desuerados, en el primer desuerado se elimina el 35-50% del lactosuero, el suero restante permite la homogenización de la sal añadida de manera directa. **(Zambrano, 2010)**.
- **Salado:** El salado debe realizarse para lograr el sabor adecuado del queso, además facilita el desuerado de la cuajada y tiene un papel conservante al inhibir el crecimiento de bacterias no deseables cuando este se encuentra en concentraciones elevadas. **(Zambrano, 2010)**.
- **Moldeado:** El moldeado permite que los coágulos se unan y formen una masa continua, determinando así la textura del queso y la forma definitiva **(Zambrano, 2010)**.
- **Almacenado:** La refrigeración permite que el queso alcance su punto final de textura y presentación. La refrigeración se debe realizar a una temperatura de 4 - 7°C, para impedir que los microorganismos crezcan, sin afectar a las características

sensoriales del producto. La durabilidad del queso fresco es variable y depende de que tan riguroso se fuera con la elaboración, sobre todo en la pasteurización, enfriamiento de la leche, y almacenamiento del producto final. (Zambrano, 2010).

1.2.1.4. Criterios Microbiológicos según norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.

Principios para el establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos del Codex Alimentarius y con la clasificación y planes de muestreo de la **International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF, 1984)**.

Tabla 1. Criterios microbiológicos para Quesos frescos (queso fresco tradicional, matecoso, ricotta, cabaña, petit suisse, mozzarella, ucayalino, otros).

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	C	Limite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos	3	3	5	1	5×10^5	10^6
Coliformes	5	3	5	2	5×10^2	10^3
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	5	2	10	10^2
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia/25g	---
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25g	---

Fuente: NTS MINSA 2003/DIGESA-V.01.

n = Número de muestras que deben analizarse.

c = Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor que m pero no mayor que M.

m = Recuento máximo recomendado

M = Recuento máximo permitido

1.2.2. Coliformes.

Coliforme significa con forma de coli, refiriéndose a la bacteria, la *Escherichia coli*, descubierta por el bacteriólogo alemán Theodor Von Escherich en 1860.

Al grupo de los coliformes pertenecen todas las bacterias que tienen forma de bastoncillos, que no forman esporas, que son gram negativas, aeróbicas y aeróbicas facultativas, y que fermentan la lactosa, con formación de gases al cabo de 48 horas a la temperatura de 35 °C. A este grupo también pertenecen ciertas especies que habitan en el intestino o en medios no intestinales, como el suelo, agua, y el grano **(Frazier y Westhoff, 2000)**.

Su presencia en gran número en un alimento elaborado indica que pueda haber existido una oportunidad de proliferación que podía haber permitido la multiplicación de dichas enterobacterias.

Cuando los coliformes llegan a los alimentos, no sólo sobreviven, sino que se multiplican, por lo que en los alimentos el grupo Coliforme adquiere un significado distinto al que recibe en el agua. En productos alimenticios que han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.), se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias.

Los microorganismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra. El grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gram-negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a 35°C ± 1°C. Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: Enterobacter, Escherichia, Citrobacter y Klebsiella. **(Frazier y Westhoff, 2000)**.

1.2.3. *Escherichia coli*

1.2.3.1. Generalidades

Taxonómicamente las bacterias de la especie *Escherichia coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos, gram negativo, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobios facultativos. Produce ácido y gas a partir de la glucosa, lactosa, fructosa, galactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y manitol. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. Nunca fermenta la dextrina, almidón, glucógeno e inositol **(Dos Santos, 2007)**.

La mayoría de las cepas pertenecientes a la especie *Escherichia coli*, forman parte de la microflora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose habitualmente en las heces. Es por ello que su presencia en los alimentos es índice de contaminación fecal y señala un peligro potencial de posibles patógenos entéricos. **(Dos Santos, 2007)**.

1.2.3.2. *Escherichia coli* como indicador de higiene.

En 1920, se introdujo la utilización del grupo total de las bacterias del grupo coliformes como marcadores en el análisis microbiológico de la leche pasteurizada y de los helados, basándose en el principio de que un tratamiento térmico adecuado habría de eliminar todas las bacterias presentes de este grupo y de que el envasado debería impedir la recontaminación del producto **(Dos Santos, 2007)**. En la actualidad se distinguen dos grupos de microorganismos indicadores:

- Aquellos cuya presencia en los alimentos señala la posible presencia de gérmenes patógenos ecológicamente relacionados. Tales microorganismos

podrían ser denominados “índices”. El microorganismo clásico es *Escherichia coli*.

- Aquellos cuya presencia en los alimentos indica deficiencias en su calidad higiénica. El término “microorganismos indicadores” se usa para este grupo de bacterias. Los microorganismos indicadores más conocidos son los coliformes. En la leche pasteurizada, por ejemplo, la existencia de bacterias en un número que exceda a un valor de referencia establecido puede poner de manifiesto diversas deficiencias de este producto, un tratamiento térmico insuficiente, contaminación posterior al tratamiento, o un almacenamiento del producto final a una temperatura demasiado elevada (**Dos Santos, 2007**).

Escherichia coli puede actuar como índice o como indicador, incluso en un mismo alimento. Por ejemplo, su presencia en número significativo en camarones precocidas y congeladas pone de manifiesto o un tratamiento de inocuidad inadecuado (función indicadora), o la posible presencia de microorganismos patógenos de procedencia entérica (función de índice) (**Dos Santos, 2007**).

El *Escherichia coli* es el indicador representativo de las contaminaciones de origen fecal, relativamente reciente. Su hábitat natural es la parte baja de los intestinos de los animales vertebrados y el hombre (**Frazier y Westhoff, 2000**).

1.2.3.3. Condiciones de crecimiento del *E. coli*.

La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, con un intervalo de 10-40 °C (**Frazier y Westhoff, 2000**). Algunas cepas de *Escherichia coli* patógeno son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 7 °C y tan altas como 46 °C. Sin embargo, *Escherichia coli* O157:H7 tiene un intervalo de crecimiento ligeramente más limitado, con una temperatura mínima de crecimiento de 8 °C,

una máxima de aproximadamente 44 – 45 °C y una óptima de 37 °C (**Dos Santos, 2007**). Este microorganismo es relativamente termosensible y puede ser destruido con facilidad a temperaturas de pasteurización, mediante la cocción del alimento y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a la temperatura de congelación.

Su pH óptimo de crecimiento es de 7.0 a 7.5, con un pH mínimo de crecimiento de valor 4.0 y un pH máximo de crecimiento de valor 8.5 (**Frazier y Westhoff, 2000**). El crecimiento del *Escherichia coli* puede detenerse ajustando el pH de un medio de cultivo a 4,5 mediante la adición de ácido láctico o clorhídrico. Este mismo autor administró leche fermentada por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* a lechones destetados, observando cómo descendía el recuento de *Escherichia coli* en estómago y duodeno, afirmando que el efecto originado por el yogurt podía ser reproducido por leche acidificada con ácido láctico a un pH de 4,2.

Se ha determinado que el *Escherichia coli* puede crecer en un 6 % de NaCl y toleran mejor el cloruro sódico y nitrito sódico que las cepas típicas de *Salmonella* spp. La cepa *Escherichia coli* O157:H7 es capaz de crecer, aunque lentamente, en un caldo que contenga 6.5 % de NaCl, pero no al 8.5 % (**ICMSF 2006, citado por Dos Santos, 2007**).

1.2.4. Aerobios mesófilos

Este indicador es conocido también como Microorganismos a 30°C. Los microorganismos que forman parte de este grupo son muy heterogéneos, cualidad derivada de la propia definición del grupo. Se incluyen en él todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30°C, bajo las

condiciones en las cuales se ejecuta el ensayo con crecimiento a temperatura óptima para los mesófilos. Es evidente que en una situación particular podrían quedar incluidos microorganismos patógenos.

Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados **(Frazier y Westhoff, 2000)**.

La mayoría de los alimentos industrializados y/o listos para el consumo (excepto, los productos fermentados) deben ser considerados como indeseables para el consumo, cuando tienen gran número de microorganismos, aun cuando estos microorganismos no sean conocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento.

La interpretación de los recuentos elevados según el tipo de alimento es la siguiente:

- En productos estables: indica materia prima contaminada. Tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario.
 - En productos perecederos: indica además condiciones inadecuadas de tiempo y temperatura durante el almacenamiento.
 - Significa que pueden haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos de origen humano o animal.
- (Frazier y Westhoff, 2000)**.

1.3. Definiciones de términos básicos.

Queso: El queso es un alimento sólido elaborado a partir de la leche cuajada de vaca, cabra, oveja, búfala, camello u otros mamíferos rumiantes. La leche es inducida a cuajarse usando una combinación de cuajo (o algún sustituto) y acidificación. Las bacterias se encargan de acidificar la leche, jugando también un papel importante en la definición de la textura y el sabor de la mayoría de los quesos. Algunos también contienen mohos, tanto en la superficie exterior como en el interior. **(Madrid, 1996).**

Bacteria: Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son células procariotas, por lo que a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y ésta se compone de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles. Del estudio de las bacterias se encarga la bacteriología, una rama de la microbiología. **(Alvarez Y, 2011).**

***Escherichia coli*:**) bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de los animales y los seres humanos. Aunque generalmente son inofensivas, algunas *E.coli* son patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua y

el medioambiente. Cientos de miles de personas se enferman cada año a causa de la *E. coli* y se producen cientos de muertes. (Alvarez Y, 2011)

1.4. Hipótesis:

Hi: Existe la presencia de *Escherichia coli* en el queso fresco artesanal expedido en los mercadillos de Huánuco.

Ho: No existe la presencia de *Escherichia coli* en el queso fresco artesanal expedido en los mercadillos de Huánuco.

II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de Estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Huánuco, situada en la parte Nor-central del Perú, capital del Departamento de Huánuco, situada aproximadamente a 1.900 m.s.n.m y con una latitud sur de 8° 21´ 47" en la vertiente oriental de la Cordillera de los Andes, en un valle formado por el río Huallaga; sus límites son:

- Por el Norte : con los departamentos de La Libertad, San Martín, Loreto.
- Por el Este : con el departamento de Ucayali.
- Por el Sur : con el departamento de Pasco.
- Por el Oeste : con los departamentos de Lima y Ancash.

Dentro de la ciudad de Huánuco, las muestras de queso fresco artesanal se recolectaron de los siguientes mercadillos y puestos:

Tabla 2 Distribución de los mercadillos en la ciudad de Huánuco.

DIRECCIÓN	DISTRITO
MERCADILLO, JR HUÁNUCO N° 304 "GALERIA DON PEDRITO"	Huánuco
MERCADILLO, JR HUÁNUCO N° 321 "GALERIA COMERCIAL HUÁNUCO"	Huánuco
MERCADILLO, JR HUÁNUCO CUADRA 3	Huánuco
MERCADILLO, JR SAN MARTÍN CUADRA 9	Huánuco
MERCADILLO, JR HUÁNUCO CUADRA 4	Huánuco
MERCADILLO "EL MOLLECITO"	Pillco marca

2.2. Materiales

2.2.1. Potencial humano

- El presente trabajo fue realizado por el tesista.

2.2.2. Recursos materiales

- Material biológico
 - Muestras de 100 gr de queso fresco artesanal.
- Material de laboratorio
 - Instrumentos:
 - Mechero de Bunsen
 - Jeringas descartables de 20 mL
 - Asa de kolle
 - Micro pipeta
 - Tips de 1 mL
 - Medios de cultivo y reactivos.
 - Caldo nutritivo
 - Agar eosina azul de metileno (EMB)
 - Agar Mac Conkey
 - Placas Petrifilm EC/coliformes
 - Placas Petrifilm Aerobios
 - Equipos:
 - Estufa incubadora
 - Balanza analítica en gm
 - Olla a presión
 - Cabina de flujo laminar

- Material de vidrio:
 - Placas Petri.
 - Tubos de ensayo de 20 mL
 - Caja de láminas porta objeto.
 - Pipetas.
 - Probeta de 200 mL
 - Matraz de 250 mL
- Material de bioseguridad:
 - Guardapolvo.
 - Caja de guantes de látex.
 - Mascarilla de tela.
 - Pliegos de papel Craft.
- Material de campo:
 - Encuestas.
 - Lapicero.
 - Plumones permanentes
 - Bolsas Ziploc (bolsas herméticas).
 - Cámara fotográfica.
 - Cooler

2.2.3. Recursos financieros

- La totalidad del costo del trabajo de investigación fue financiado por el tesista.

2.3. Metodología

2.3.1. Fuentes, técnicas e instrumentos de recolección de datos

- Origen de las muestras: queso fresco artesanal procedentes de los distritos de Baños, Queropalca, y de la Región Junín fueron recolectadas de seis lugares de expendio de quesos artesanales de diferentes mercadillos
- Técnica: cultivos microbiológicos y pruebas bioquímicas.
- Instrumentos: Encuestas, observación, reactivos.

2.3.2. Tipo y nivel de investigación

El tipo de Investigación fue cuantitativa y de acuerdo al nivel es descriptiva/transversal. Es descriptiva porque tiene como objetivo la descripción de los fenómenos a investigar tal como es y cómo se manifiesta en el momento de realizarse el estudio y utiliza la observación como método descriptivo, buscando especificar las propiedades importantes para medir o evaluar aspectos, dimensiones o componentes y Fue transversal porque se realizó en un solo espacio y tiempo para realizar las pruebas.

2.3.3. Diseño de la Investigación

La muestra fue no probabilística, debido a que fueron seleccionados a al azar, la muestra se obtuvo de una manera aleatoria de todos quesos frescos que se expenden en cada puesto de los mercadillos.

1  X1

2.4. Determinación de la población

La población estuvo conformada por todos los mercadillos del distrito de Huánuco y Pillco Marca donde se expenden quesos frescos artesanales.

En cuanto a la muestra se recolectaron 17 muestras al azar, se tomó solo una muestra de cada tipo de queso que se exhibía en ese momento, estando distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 3. Lugares de muestreo y número de muestras de queso fresco recolectadas al azar.

N°	DIRECCIÓN	NÚMERO DE PUESTO	CANTIDAD DE MUESTRA DE QUESO		
			Baños	Huancayo	Pasco
1	JR HUÁNUCO N° 304 "GALERIA DON PEDRITO"	"EL FUNDO"	1	1	-
2	JR HUÁNUCO N° 304 "GALERIA DON PEDRITO"	S/N	1	1	-
3	JR HUÁNUCO N° 321 "GALERIA COMERCIAL HUÁNUCO	"CARLITOS" – PUESTO 11	-	1	-
4	JR HUÁNUCO CUADRA 3	S/N	1	-	-
5	JR SAN MARTÍN CUADRA 9	"DON QUESO"	2	-	-
6	JR HUÁNUCO CUADRA 4	S/N	1	1	-
7	JR HUÁNUCO CUADRA 4	S/N	1	1	-
8	MERCADILLO "EL MOLLECITO"	18	1	-	-
9	MERCADILLO "EL MOLLECITO"	59	1	1	-
10	MERCADILLO "EL MOLLECITO"	60	1	-	1
TOTAL DE PUESTOS		10	10	6	1
TOTAL DE MUESTRAS			17		

2.5. Procesamiento de las muestras.

a) Método de recolección de muestra:

1. Se aplicó una encuesta a los vendedores de los puestos en mercadillos que expenden queso fresco artesanal (anexo 5)
2. Se recolectó las 17 muestras al azar, 100 g de queso fresco de cada puesto de los mercadillos antes mencionados, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas Ziploc® para evitar cualquier otro tipo de contaminación. (Imagen 3 hasta imagen 12)
3. Se rotuló las bolsas con el nombre del mercadillo, dirección, número de puesto, hora y fecha, se les asignó un código numérico del 1 al 17. (Imagen 13)
4. Las muestras se almacenaron a 4° C en un cooler; para su traslado al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para su análisis microbiológico respectivo.

b) Método de procesamiento de la muestra

El mismo día de la recolección de muestra se procedió a adicionar en las mismas bolsas Ziploc 25 mL caldo nutritivo. Luego se llevó a incubar por 24 horas a 37°C. (Imagen 14, 15)

c) Método para dilución y hallar las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de queso.

Procesamiento para las diluciones:

1. Para la dilución se utilizó un matraz con 1 litro de suero fisiológico.
2. Se colocaron 9 ml de suero en tubos de ensayo de 20 mL.

3. Se identificó los tubos según el número de muestra de N^{-1} hasta N^{-7}
4. Se procedió a pipetear 1 mL de la muestra y echar al tubo N^{-1} , homogenizar y tapar. Pipetear 1 mL del tubo N^{-1} y echar al tubo N^{-2} , homogenizar y así sucesivamente hasta el tubo N^{-7} , pipetear un mL del tubo N^{-7} y eliminarla. (Imagen 16).
5. Se seleccionó los tubos N^{-1} y N^{-3} para ser cultivados en agar Mac Conkey por estría para saber el Número Más Probable (Imagen 17)
6. Se llevó a incubar por 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
7. Pasado el tiempo se anotaron los resultados.

Procedimiento para la interpretación de las diluciones de unidades formadoras de colonias (UFC):

1. Se procedió a contar las colonias que desarrollaron en las placas con agar Mac Conkey, se anotó los resultados en un cuadro (Imagen 18).
2. Los resultados de las colonias de ambas diluciones se suman, y se multiplican por 10 y se escribe el resultado en notación científica.
3. El resultado se expresa en UFC/g de queso. (tabla N° 06)

d) Método para cultivo microbiológico en placas:

Preparación del agar EBM.

1. Se pesó el medio según la cantidad que se ha requerido, añadir agua destilada. Se esterilizó en autoclave (15 libras de presión por 15 minutos) (Imagen 1).
2. Se procedió a plaquear, aproximadamente 20 mL de contenido por cada placa y se dejó enfriar.

3. Se llevó a la estufa para el control de calidad por un periodo de 24 horas. Pasado el tiempo, se sacó las placas de la estufa y se observó, las placas que resultaron contaminadas se descartaron (Imagen 2).

Procedimiento para el cultivo de microorganismos:

1. Durante el proceso de aislamiento de los microorganismos se aplicaron las medidas de bioseguridad requeridas.
2. Con el asa de Kolle se tomó un inóculo de la muestra y se realizó la siembra por estría en el agar EMB (Imagen 19).
3. Luego se procedió a cubrirlos nuevamente con un film de cocina para evitar contaminación externa.
4. Se llevó a la estufa por un periodo de 24 horas a 37 °C

Procedimiento de lectura de los medios de cultivo

1. Se identificaron las colonias sospechosas de *E. coli*. En este medio las colonias son de un color verde metálico. Descartando las otras colonias que no tenían esa coloración característica (Imagen 20)

e) Método para pruebas bioquímicas:

Procesamiento para pruebas bioquímicas:

1. Se utilizaron los medios diferenciales TSI, LIA, Citrato De Simmons, UREA, SIM, medio RM – VP.
2. Se colocó en un tubo de ensayo de 8 ml cada medio en una cantidad de 3 ml aproximadamente.

3. Con el asa de Kolle en lanceta se tomó una colonia sospechosa para luego inocularla en los medios en el siguiente orden (Imagen 21).
 - a. Medio TSI se colocó el medio en un plano inclinado y la siembra fue por picadura y estría.
 - b. Medio LIA se depositó en un plano inclinado y la siembra fue por 3 picaduras y estrías.
 - c. Medio Citrato de Simmons también se colocó en un plano inclinado y la siembra es por estría.
 - d. Medio UREA se coloca en forma vertical y la siembra es por picadura.
 - e. Medio SIM se coloca en forma vertical y la siembra es por picadura y moviendo el asa en varias direcciones.
 - f. El medio RM-VP para el rojo de metilo se coloca en forma horizontal y se inocula agitando el asa dentro del medio.
 - g. El medio RM-VP para el Vogues-Proskauer se coloca en forma horizontal y se agita el asa dentro del medio.
4. Una vez terminado al último medio se llevan los tubos a la incubadora por 24 horas a 37 °C (Imagen 22).

Procesamiento para la lectura de las pruebas bioquímicas:

1. Para la interpretación y lectura de las pruebas bioquímicas se realiza en el siguiente orden:
 - a. Medio TSI; color original rojo ladrillo (pH 7,4):
 - Hidrogeno sulfurado: es positivo cuando hay un color negro en el medio, intensidad de 1+ a 4+.

- Gas de glucosa: Positivo; resquebrajamiento del medio, burbujas, intensidad de 1+ a 4+.
 - La acidez se manifiesta por el color amarillo del medio y se representa por A.
 - La alcalinidad se pone de manifiesto por el cambio de color al rojo intenso y se representa por K.
 - Lactosa y/o sacarosa se manifiesta por el cambio del medio a color amarillo.
- b. Medio LIA; color inicial ligeramente morado o azulado (pH 6,7), en este medio diferencial se puede leer lo siguiente:
- Positivo: K/K plano inclinado y fondo del tubo alcalino, el color se intensifica, hay descarboxilación de la lisina.
 - Negativo: K/A plano inclinado alcalino y fondo ácido.
 A/A plano inclinado y fondo del tubo ácido.
 R/A plano inclinado rojo y fondo amarillo.
- c. Medio Citrato De Simmons; color inicial verde
- Positivo el medio vira a color azul, la bacteria ha tomado el citrato como un sustrato.
- d. Medio UREA, color inicial melón,
- Positivo el medio vira a color grosella, indica que la bacteria ha hidrolizado la urea.
 - Negativo el medio se mantiene o adquiere un color amarillo, no hubo reacción.
- e. Medio SIM; color amarillo, se lectura lo siguiente:

- Positivo se forma un anillo rojo en la superficie al adicionar 3 a 5 gotas de reactivo de Kovacs y la movilidad cuando en el medio hay turbidez.

Liberación de indol por la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa.

- Negativo el anillo es transparente al adicionarle el reactivo de Kovacs y no hay movilidad cuando el medio es transparente.

f. Prueba De Rojo De Metilo; se le añade al medio 3 a 5 gotas del indicador rojo de metilo y se lectura de la siguiente manera.

- Positivo cambia el color del medio a rojo intenso al añadir el indicador, por la fermentación ácido mixta, el pH baja hasta 4 – 5.
- Negativo el medio se vuelve amarillo, no hay fermentación.

g. Prueba de Voges Proskauer; se le añade 2 – 3 gotas de KOH y luego 2 – 3 gotas de α – naftol, se lectura de la siguiente manera.

- Positivo el medio vira a rojo al reaccionar con la acetoina por la fermentación de la butilen glicolico de la glucosa.
- Negativo no hay cambio en el medio ya que no hay reacción, la bacteria no produce acetoina.

2. Todos los resultados se anotan en un cuadro (anexo 3, imagen 23)

f) Método para cultivo microbiológico en Placa PETRIFILM:

Cultivo en Placa Petrifilm para el recuento de *E. coli* /coliformes totales.

1. Se colocaron todos los materiales dentro de la cabina de flujo laminar para evitar contaminación externa (Imagen 24).
2. Se rotuló las láminas Petrifilm *E. coli* con el número de muestra.
3. Se colocó la placa Petrifilm en la superficie plana de la cabina de flujo laminar y se levantó el film superior.
4. Se pipeteo 1 mL de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Se bajó con cuidado el film superior para evitar que atrape burbujas de aire, no se debe dejar caer (Imagen 25)
5. Se colocó el dispersor sobre el film superior con el lado liso sobre el inóculo. Se presionó suavemente para distribuir el inóculo sobre el área circular (Imagen 26)
6. Una vez inoculado todas las placas se llevaron a incubar por 24 horas a 37 °C (Imagen 27)

Cultivo en Placa Petrifilm para recuento de Aerobios mesófilos.

1. Se rotuló las Placas Petrifilm Aerobios con el número de muestra.
2. Se colocó la Placa Petrifilm en la superficie plana de la cabina de flujo laminar y se levantó el film superior.
3. Se pipeteo 1 mL de muestra al centro aproximadamente del film inferior. se deja caer el film superior sin deslizar el film hacia abajo.

4. Se colocó el dispersor sobre el film superior con el lado cóncavo sobre el inóculo. Se presionó suavemente para distribuir el inóculo sobre el área circular. Sin mover ni girar.
5. Una vez inóculado todas las placas se llevaron a incubar por 24 horas a 37 °C. Pasado el tiempo se procedió a la lectura de ambas Placas Petrifilm (Imagen 28).

Procesamiento para la lectura de las Placas Petrifilm:

1. Para la interpretación y lectura de las Placas Petrifilm en el recuento de *E. coli* /coliformes se necesitó la guía de interpretación.
 - a. La mayoría de *E. coli* (cerca del 97%) producen beta – glucuronidasa, la que produce una precipitación azul asociada con la colonia. El film superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo azules.
 - b. Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen el oscurecimiento del gel por el indicador del pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.
 - c. Contar las colonias con una cuenta colonias, contar las colonias azules o rojo azules para *E. coli*, y todas las colonias rojas y azules para coliformes. Expresar el resultado en UFC/g de queso.

- d. No contar las colonias que aparecen en la barrera de espuma ni fuera del círculo de la placa. Cuando haya un número alto de no – coliformes, como *Pseudomonas*, las placas Petrifilm EC pueden volverse amarillas (Imagen 29)
2. Para la interpretación y lectura de las Placas Petrifilm para el recuento de Aerobios se necesitó la guía de interpretación.
 - a. La interpretación de la placa para Aerobios resulta muy fácil. El indicador rojo presente en la placa colorea todas las colonias.
 - b. Contar todas las colonias rojas independientemente de su tamaño y de la intensidad del color con la ayuda de un contador de colonias.
 - c. Expresar los resultados en UFC/g de queso.
 - d. No contar las colonias que aparecen en la barrera de espuma ni fuera del círculo de la placa (Imagen 30).

g) Método de análisis estadístico:

1. Se utilizó el programa informático o paquete estadístico **SPSS V.21.0** para el procesamiento de datos de la encuesta y también el programa Excel para procesar los resultados de laboratorio.

III. RESULTADOS

3.1. Descripción de resultados

3.1.1. Análisis descriptivo de los resultados de las pruebas bioquímicas.

Los resultados a *E. coli* de los quesos frescos artesanales mediante las pruebas bioquímicas, se obtuvo; que del total de muestras analizadas (N=17), el 23,5% (n=4) dieron resultados positivos a *E. coli*; mientras que el 76,5% (n=13) resultaron negativos a *E. coli* (tabla 4, gráfico 1)

Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de contaminación por *E. coli* en quesos frescos artesanales expendidos en mercadillos de Huánuco mediante pruebas bioquímicas. (Anexo 05)

Resultados a <i>E. coli</i>	Frecuencia	Porcentaje
Positivo a <i>E. coli</i>	4	23.5%
Negativo a <i>E. coli</i>	13	76.5%
Total	17	100,0%

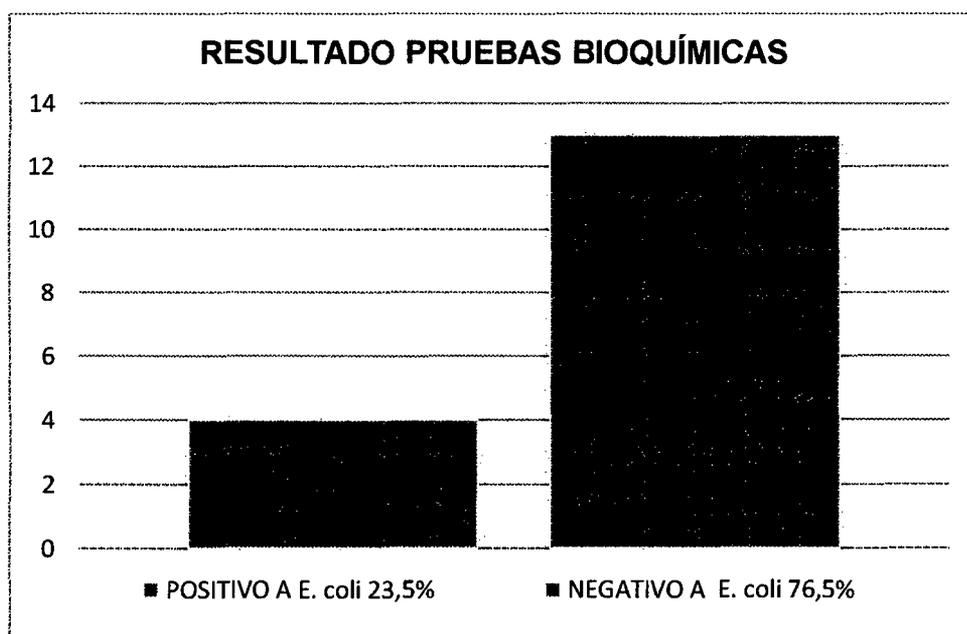


Gráfico 1.-Frecuencia y porcentaje de contaminación por *E. coli* en quesos frescos artesanales expendidos en mercadillos de Huánuco mediante pruebas bioquímicas.

3.1.2. Análisis del recuento de *E. coli*, coliformes totales y aerobios mesófilos.

Del total de muestras que se analizaron (N=17), se observa el recuento de las colonias en las Placas Petrifilm de *E. coli*, Coliforme y aerobios mesófilos, donde se observó lo siguiente:

En el recuento de *E. coli* como rangos superiores en la muestra 13 se encontró la mayor cantidad de colonias que equivalen a $2,8 \times 10^2$ ufc/g de queso, similarmente en la muestra 15 se encontró $1,2 \times 10^2$ ufc/g de queso; y como rango inferior la muestra 17 se contabilizó 10 colonias (10 ufc/g de queso). En las muestras 2, 6, 7, 9, 10, 11 y 12 no hubo desarrollo de colonias de *E. coli*.

En el recuento de coliformes totales se encontró que en la muestra 13 hubo un mayor desarrollo de colonias equivalente a $6,9 \times 10^2$ ufc/g de queso, en la muestra 5 hubo también un mayor desarrollo de colonias $5,8 \times 10^2$ ufc/g de queso. Y en la muestra 8 hubo un menor crecimiento de colonias 98 ufc/ g queso.

En el recuento de aerobios mesófilos se encontró que en la muestra 6 el crecimiento bacteriano fue de $5,7 \times 10^2$ ufc/g de queso, en la muestra 13 hubo un recuento de $5,5 \times 10^2$ ufc/ g de queso. En la muestra 9 y 17 el recuento fue de $3,0 \times 10^2$ ufc/g de queso. Y en la muestra 3 el recuento fue menor, equivalente a $1,0 \times 10^2$ ufc/g de queso (Tabla 5).

Tabla 5: Recuento de *E. coli*, coliformes totales y aerobios mesófilos en las placas de Petrifilm. UFC/ g de queso.

Número de muestra	Recuento <i>E. coli</i>	Recuento coliformes totales	Recuento Aerobios mesófilos
1	1,0x10 ² ufc/g	3,8 x10 ² ufc/g	3,5 x10 ² ufc/g
2	-----	3,2 x10 ² ufc/g	2,1 x10 ² ufc/g
3	54 ufc/g	1,5 x10 ² ufc/g	1,0 x10 ² ufc/g
4	95 ufc/g	2,8 x10 ² ufc/g	1,3 x10 ² ufc/g
5	1,1 x10 ² ufc/g	5,8 x10 ² ufc/g	3,9 x10 ² ufc/g
6	-----	3,0 x10 ² ufc/g	5,7 x10 ² ufc/g
7	-----	1,0 x10 ² ufc/g	1,7 x10 ² ufc/g
8	-----	98 ufc/g	1,4 x10 ² ufc/g
9	88 ufc/g	2,0 x10 ² ufc/g	3,0 x10 ² ufc/g
10	-----	1,3 x10 ² ufc/g	1,6 x10 ² ufc/g
11	-----	1,1 x10 ² ufc/g	2,7 x10 ² ufc/g
12	-----	1,9 x10 ² ufc/g	1,6 x10 ² ufc/g
13	2,8 x10 ² ufc/g	6,9 x10 ² ufc/g	5,5 x10 ² ufc/g
14	79 ufc/g	2,0 x10 ² ufc/g	4,2 x10 ² ufc/g
15	1,2x10 ² ufc/g	3,6 x10 ² ufc/g	5,0 x10 ² ufc/g
16	90 ufc/g	1,8 x10 ² ufc/g	4,4 x10 ² ufc/g
17	10 ufc/g	3,8 x10 ² ufc/g	3,0 x10 ² ufc/g

Acerca de los resultados del recuento de *E. coli*, se obtuvo; del total de muestras analizadas (N=17), el 58,8% (n=10) dieron resultados positivos a *E. coli*, mientras que el 41,2% (n=7) resultaron negativos a *E. coli* (Tabla 6, gráfico 2).

Tabla 6: Frecuencia y porcentaje de los resultados de recuento de *E. coli* en Placa Petrifilm.

Resultados a <i>E. coli</i>	Frecuencia	Porcentaje
Positivo a <i>E. coli</i>	10	58,8%
Negativo a <i>E. coli</i>	7	41,2%
Total	17	100,0%

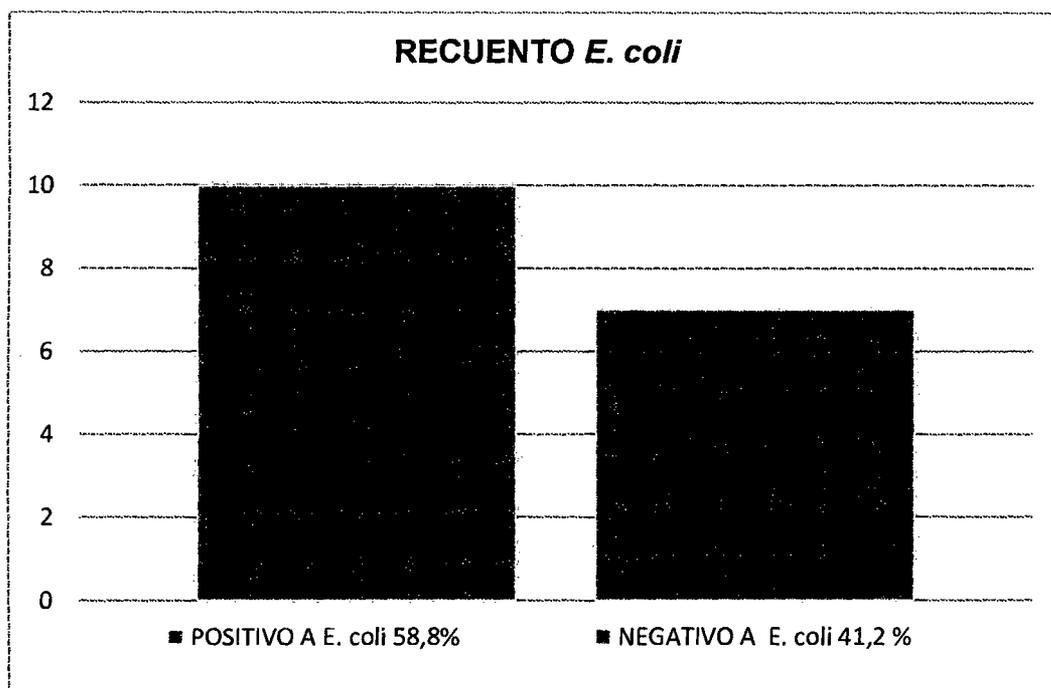


Gráfico 2: Resultado del recuento de *E. coli* en Placa Petrifilm.

3.1.3. Análisis de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Con el objetivo de saber el número de colonias por gramo de queso, del total de muestras que se analizaron (N=17), se describe el desarrollo de las colonias en el medio de cultivo, se observó que en la muestra 10 se encontró la mayor cantidad de colonias que equivalen a $6,3 \times 10^7$ ufc/g de queso; en la muestra 11 se contabilizó 1 colonia ($1,0 \times 10^2$ bact/g de queso) y en las muestras 2, 7, 8, 15 y 17 no desarrollaron colonias (Tabla 7)

Tabla 7: Recuento de UFC en medio Mac Conkey

Número de muestra	UFC en placas por dilución		UFC por gramo de queso
	N ⁻¹	N ⁻²	
1	120	29	1,5 x10 ⁷ ufc/g de queso
2	-----	-----	-----
3	26	-----	2,6 x10 ³ ufc/g de queso
4	50	7	5,7 x10 ⁶ ufc/g de queso
5	37	18	5,5 x10 ⁶ ufc/g de queso
6	48	-----	4,8 x10 ³ ufc/g de queso
7	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----
9	10	-----	1,0 x10 ³ ufc/g de queso
10	572	54	6,3 x10 ⁷ ufc/g de queso
11	1	-----	1,0 x10 ² ufc/g de queso
12	121	71	1,9 x10 ⁷ ufc/g de queso
13	19	2	2,1 x10 ⁶ ufc/g de queso
14	17	1	1,8 x10 ⁶ ufc/g de queso
15	-----	-----	-----
16	-----	3	3,0 x10 ⁴ ufc/g de queso
17	-----	-----	-----

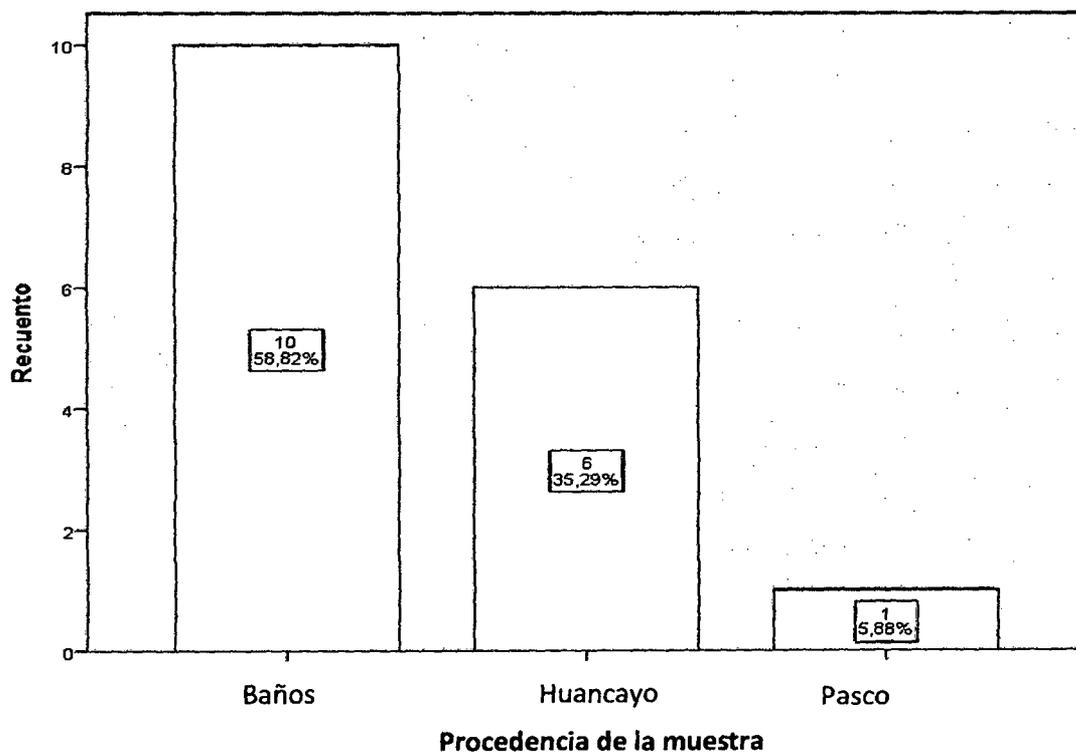
3.1.4. Presentación de los resultados de la encuesta aplicada a los comerciantes de queso fresco artesanal en los mercadillos de Huánuco.

Del total de muestras (N=17) que se expenden en los diferentes mercadillos, el 58,8 % corresponde a los quesos provenientes de Baños (n=10), seguido de Huancayo con 35,3% (n=6), y de otro lugar de procedencia (Pasco) 5,9% (n=1) (tabla 8, gráfico 3). Con respecto al lugar de toma de muestra, el número asignado a cada muestra para la investigación y el lugar de procedencia de la muestra se observa en la tabla 9.

Tabla 8: Procedencia de la muestra de estudio.

Lugar de procedencia de la muestra	Frecuencia	Porcentaje
Baños	10	58,8%
Huancayo	6	35,3%
Pasco	1	5,9%
Total	17	100,0%

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercadillos.



Fuente: Encuesta a los comerciantes del mercado.

Grafico 3: Procedencia de la muestra de estudio.

Tabla 9: Procedencia del total de muestras.

Mercadillo	Número de muestra	Procedencia
Galería Don Pedrito “El Fundo”	1	Baños
	2	Huancayo
Galería Don Pedrito S/N	3	Baños
	4	Huancayo
Galería Comercial “Huánuco “ puesto 11	5	Huancayo
La Calera S/N	6	Baños
“Don Queso”	7	Baños
	8	Baños
Jr. Huánuco cuadra 4	9	Huancayo
	10	Baños
Jr. Huánuco cuadra 4	11	Baños
	12	Huancayo
“El Mollecito” puesto 18	13	Baños
“El Mollecito” puesto 59	14	Baños
	15	Huancayo
“El Mollecito” puesto 60	16	Pasco
	17	Baños

3.1.5. Análisis de los resultados significativos de la encuesta aplicada a los comerciantes de queso fresco artesanal en los mercadillos de Huánuco. (Tabla N°27)

3.1.5.1. Análisis descriptivo del método de expendio del queso fresco artesanal.

Del total de los puestos (N=10), se observa la forma que expenden los quesos, en los diferentes mercadillos se encuentra el 100% que no cuenta con guantes ni mascarilla; expenden con mandil el 60% (n=6) y el uso de gorro se encontró un 80% (n=8), un total del 70% (n=7) no cuenta con personal de cobranza (Tabla 10).

Tabla 10: Resultado significativo del método de expendio.

CATEGORIA MERCADILLO		MANDIL		GUANTES	GORRO		MASCARILLA	PERSONAL DE COBRANZA	
		SI	NO	NO	SI	NO	NO	SI	NO
DON PEDRITO	N	2		2	1	1	2		2
	%	100		100	50	50	100		100
GALERIA HUÁNUCO	N		1	1		1	1	1	
	%		100	100		100	100	100	
JR HCO CD 3	N		1	1		1	1		1
	%		100	100		100	100		100
JR HCO CD 4	N	2		2	1	1	2	2	
	%	100		100	50	50	100	100	
SAN MARTIN CD 9	N		1	1		1	1		1
	%		100	100		100	100		100
EL MOLLECITO	N	2	1	3		3	3		3
	%	66,7	33,3	100		100	100		100
TOTAL %		60 %	40 %	100 %	20 %	80 %	100 %	30 %	70 %

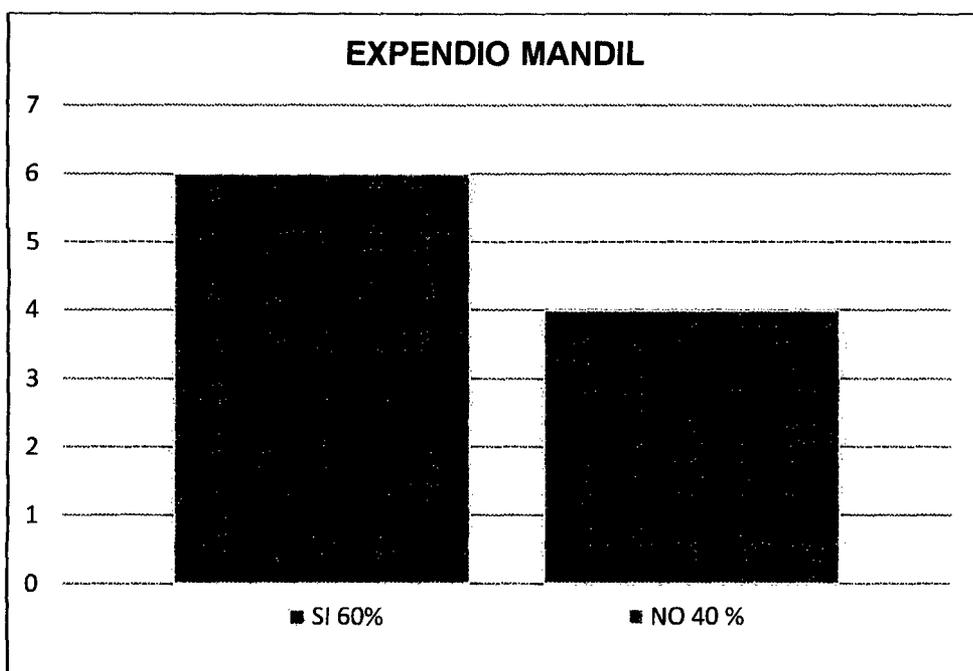
a. MANDIL.

Del uso del mandil para la venta del queso fresco artesanal, podemos observar lo siguiente; del total de puestos (N=10), el 60,0% (n=6) presentaba un mandil en regular condición higiénico – sanitaria; y el 40,0% (n=4) de los comerciantes de queso fresco artesanal no contaban con mandiles (tabla 11, gráfico 4).

Tabla 11: Uso de mandil para la manipulación del queso fresco artesanal.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
SI	6	60,0 %
NO	4	40,0 %
Total	10	100,0 %

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 4: Uso de mandil para la manipulación del queso fresco artesanal.

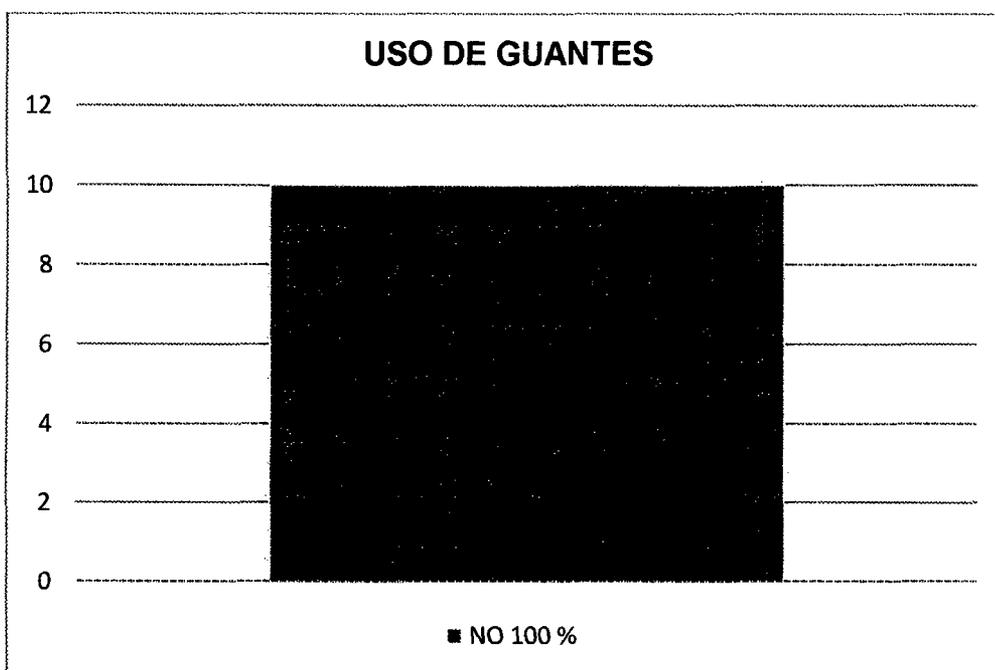
b. GUANTES.

De los puestos que usan guantes para la correcta manipulación del queso fresco artesanal, así por ejemplo se observa que el 100,0 % de los puestos muestreados (N=10) no utiliza guantes de ningún tipo para la manipulación y comercialización del queso fresco artesanal, esto nos lleva a la conclusión que él no usar guantes para manipular el queso fresco va a favorecer considerablemente la contaminación (tabla 12, gráfico 5).

Tabla 12: Uso de guantes para manipular el queso fresco artesanal.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
NO	10	100,0 %
SI	0	0.0 %
Total	10	100.0 %

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 5: Uso de guantes para manipular el queso fresco artesanal.

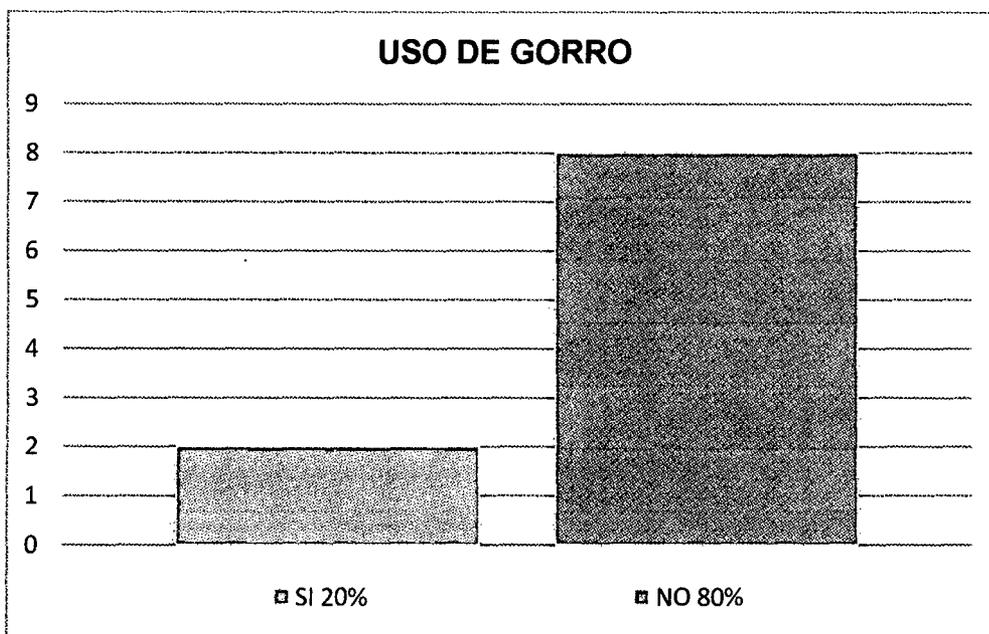
c. GORRO.

Con relación al uso de gorro para disminuir la contaminación del queso fresco artesanal, se observa que del total de puestos (N=10), el 80,0% (n=8) no presentaban este implemento, necesario para expender queso fresco; mientras que el 20,0% (n=2) contaba con gorro al momento de realizar la recolección de la muestra (tabla 13, gráfico 6).

Tabla 13: Uso de gorro para el expendio del queso fresco artesanal.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
SI	2	20,0 %
NO	8	80,0 %
Total	10	100,0 %

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 6: Uso de gorro para el expendio del queso fresco artesanal.

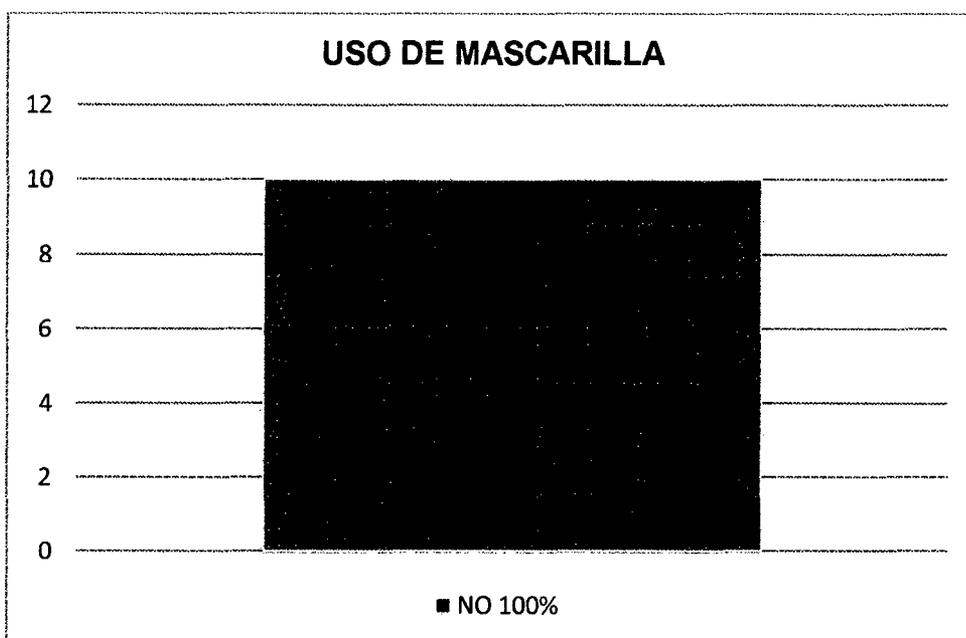
d. MASCARILLA.

De los 10 puestos muestreados, no se observaron la utilización de mascarilla por el personal que vendía el queso fresco artesanal, el 100,0 % de comerciantes no usa este tipo de implemento.

Tabla 14: Uso de mascarilla al momento de la venta de queso fresco artesanal.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
NO	10	100,0 %
SI	0	0.0 %
Total	10	100.0 %

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 7: Uso de mascarilla al momento de la venta de queso fresco artesanal.

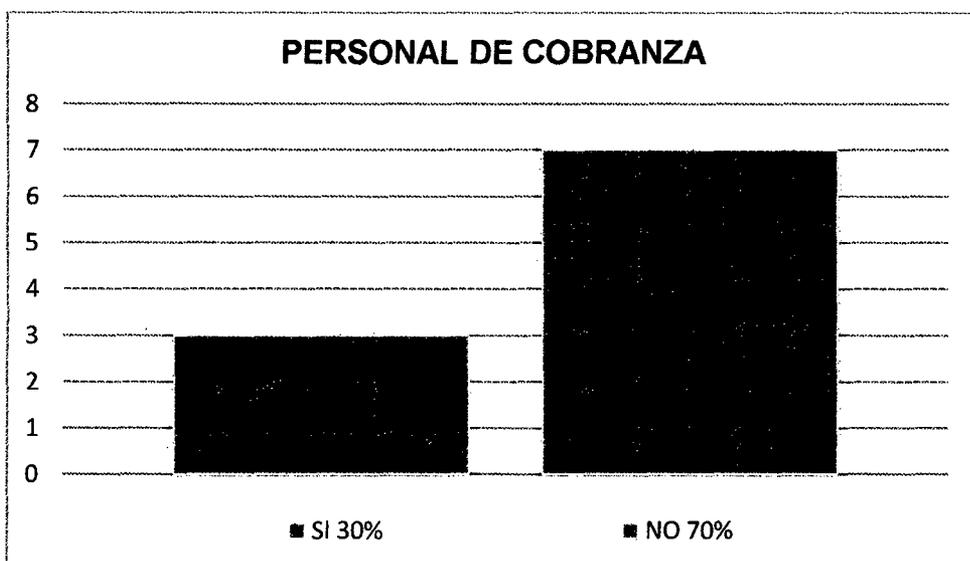
e. PERSONAL DE COBRANZA.

Respecto al personal de cobranza que no manipule el queso fresco artesanal, se observa; que el 70,0% (n=7) no cuentan con este tipo de personal, es decir, que la persona que manipula el queso es la misma que cobra el dinero de las ventas; mientras que solo el 30,0% (n=3) cuentan con personal adecuado para la cobranza (tabla 15, gráfico 8).

Tabla 15: Presencia de personal de cobranza en el puesto de venta de queso fresco artesanal.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
SI	3	30,0 %
NO	7	70,0 %
Total	10	100,0 %

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 8: Presencia de personal de cobranza en el puesto de venta de queso fresco artesanal.

3.1.5.2. Análisis descriptivo la exposición del queso fresco artesanal.

En cuanto a la exposición del producto se encontró un 10% (n=1) que no cuenta con una fuente para exhibir el producto, teniéndolo solo en una bolsa plástica, llevando así a encontrarse que el 70 % (n=7) no hace uso de un cobertor para poder cubrir el queso del medio ambiente, un 20% (n=2) no cuenta con exhibidor y solo el 30% (n=3) hace uso del refrigerador conservador, llevando consigo al 70% (n=7) de los puestos almacenan sus quesos en malas condiciones, teniendo que llevarse a sus casa para poder guardarlos para volverlos a llevar al día siguiente al mercadillo (tabla 16).

Tabla 16: Resultado significativo de la exposición del queso fresco artesanal.

CATEGORIA MERCADILLO		Tipo material de la fuente			Tipo material del cobertor			Tipo de exhibidor				Almacena en puesto	
		Metal	plástico	No usa	gasa	Plástico	No usa	Refrig conserv	Vitrina vidrio	Vitrina madera	Sin exh	SI	NO
DON PEDRITO	N	2			2			1		1		2	
	%	100			100			50		50		100	
GALERIA HUÁNUCO	N		1				1		1			1	
	%		100				100		100			100	
JR HCO CD 3	N		1				1				1		1
	%		100				100				100		100
JR HCO CD 4	N	1	1				2	2				2	
	%	50	50				100	100				100	
SAN MARTIN CD 9	N	1					1		1			1	
	%	100					100		100			100	
EL MOLLECITO	N		2	1		1	2		2		1		3
	%		66,7	33,3		33,3	66,7		66,7		33,3		100
TOTAL %		40 %	50 %	10%	20 %	10%	70%	30%	40%	10%	20%	60%	40%

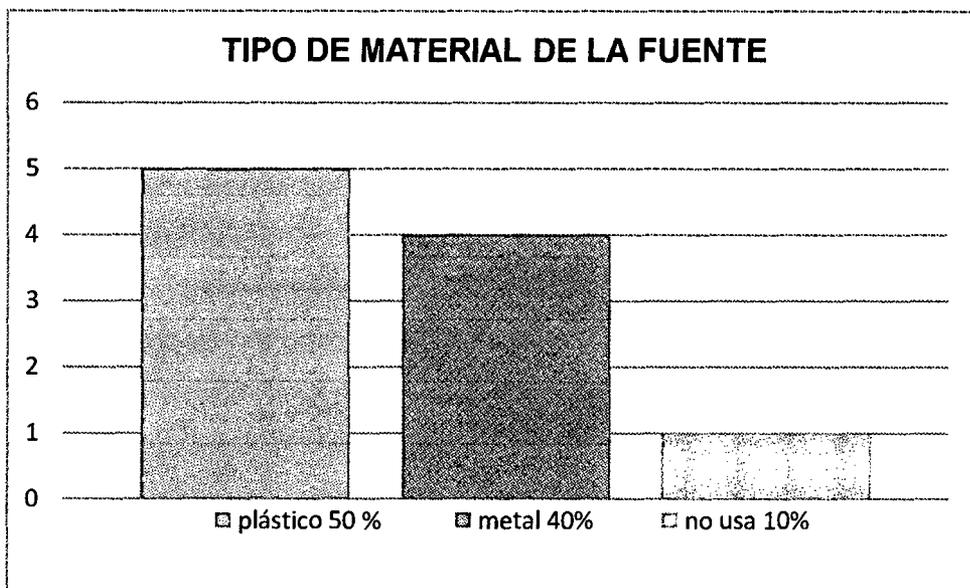
a. TIPO DE MATERIAL DE FUENTE

Se considera el material de la fuentes donde se exhibe el queso fresco artesanal, del total de puestos (N= 10), el 50% (n=5) de los puestos usa fuentes de plástico para exponer su producto; el 40% (n=4) usa fuentes de metal, y solo un 10% (n=1) no usa fuente (tabla 17, gráfico 9).

Tabla 17: Tipo de material del que está hecho la fuente o bandeja.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
Plástico	5	50.0 %
Metal	4	40.0 %
No usa	1	10.0 %
Total	10	100,0 %

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 9: Tipo de material del que está hecho la fuente o bandeja.

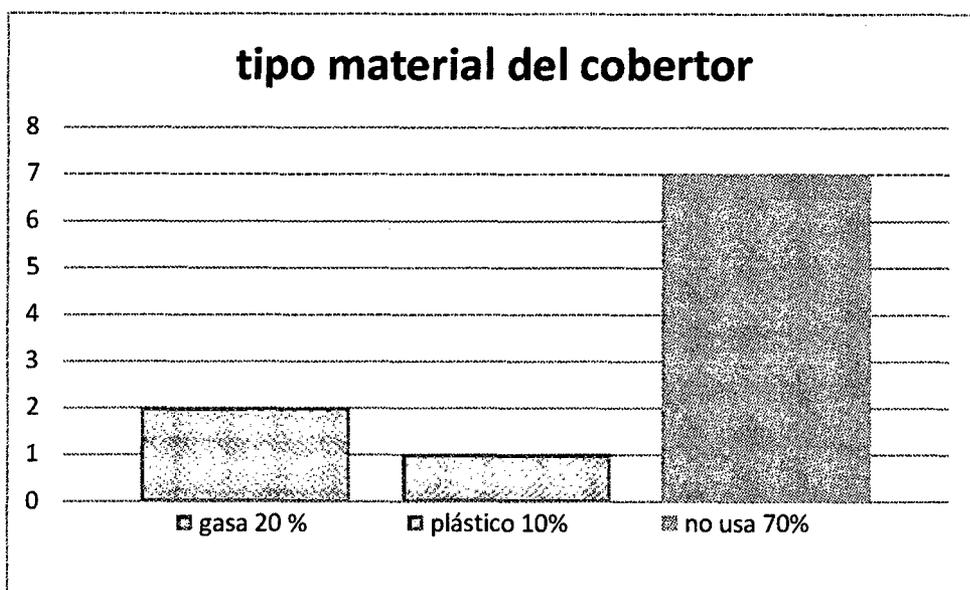
b. TIPO DE MATERIAL DEL COBERTOR

Respecto al material de los cobertores de los puestos que los usan (N=3), se observa que el 20% (n=2) usa un cobertor hecho de tela de gasa, mientras que solo el 10% (n=1) cuenta con una bolsa plástica para cubrir el queso fresco. El 70% (n=7) no tienen cobertores (tabla 18, gráfico 10)

Tabla 18: Tipo de material del cobertor de los puestos que los usan.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
GASA	2	20.0 %
PLÁSTICO	1	10.0 %
No usa	7	70.0 %
Total	10	100,0

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 10: Tipo de material del cobertor de los puestos que los usan.

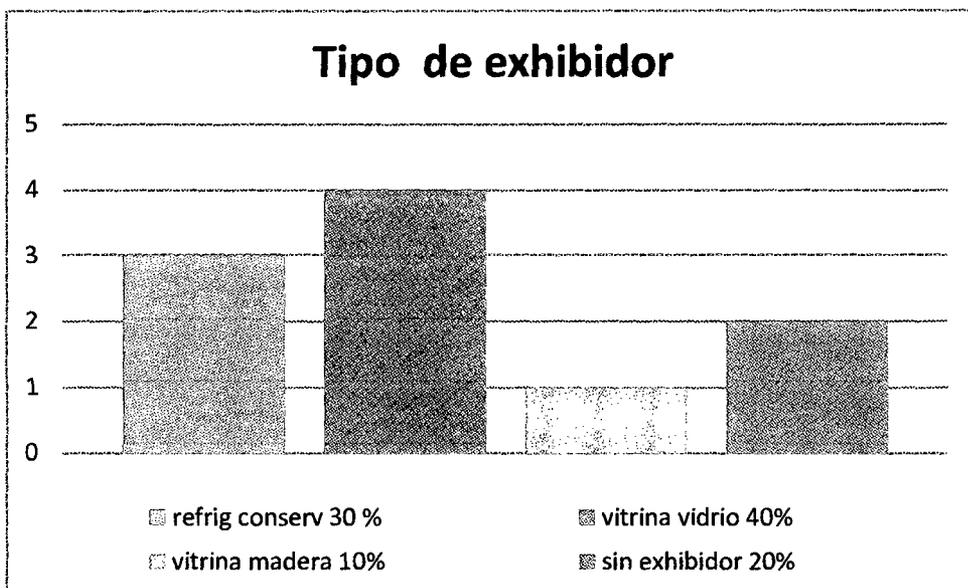
c. TIPO DE EXHIBIDOR.

Con relación al tipo de exhibidor, del total de puestos con este mueble (N=10), el 30% (n=3) presentaban un exhibidor refrigerador conservador en su puesto de venta; mientras que el 40% (n=4) presenta un una vitrina de vidrio, el 10% (n=1) tiene una vitrina de madera y el 20% (n=2) no presenta exhibidor para el queso fresco artesanal (tabla 19, gráfico 11).

Tabla 19: Tipo de exhibidor para el queso fresco artesanal.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
REFRIGERADOR CONSERVADOR	3	30.0%
VITRINA DE VIDRIO	4	40.0%
VITRINA DE MADERA	1	10.0%
Sin exhibidor	2	20.0%
Total	10	100,0%

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 11: Tipo de exhibidor para el queso fresco artesanal.

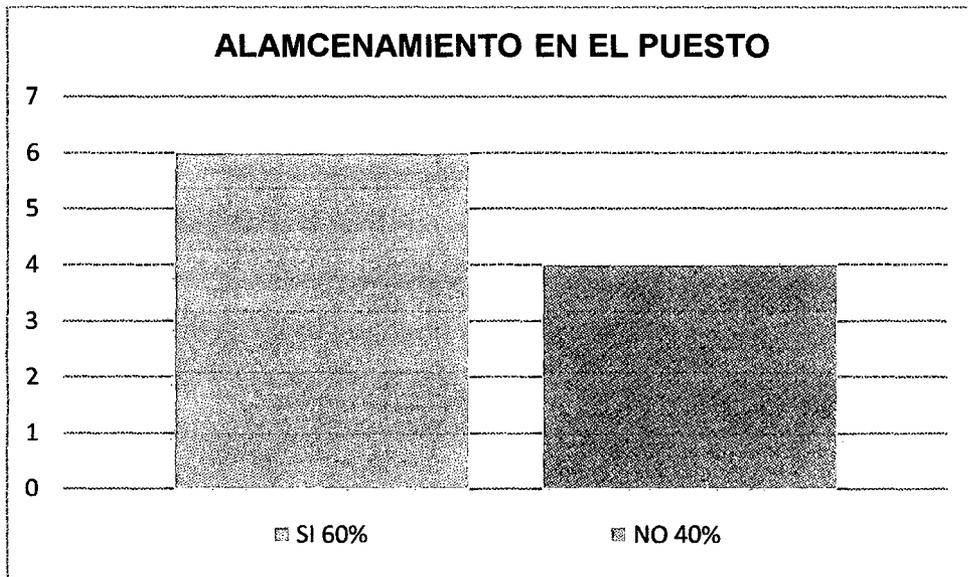
d. ALMACENAMIENTO DEL QUESO FRESCO EN EL PUESTO.

Con relación al almacenamiento, se observa que del total de puestos (N=10), el 60,0% (n=6) presentan un congelador o refrigeradora donde pueden guardar sus quesos, mientras que el 40,0% (n=4) no cuentan con un artefacto para guardar el queso fresco artesanal, llevándose a sus casas para regresarlos al día siguiente (tabla 20, gráfico 12).

Tabla 20: Almacenamiento del queso fresco artesanal en el mismo puesto

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
SI	6	60,0%
NO	4	40,0%
Total	10	100,0%

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 12: Almacenamiento del queso fresco artesanal en el mismo puesto.

3.1.5.3. Análisis descriptivo de los utensilios usados para el expendio del queso fresco artesanal.

En la tabla N° 20 con respecto a los utensilios se observó que el 80% (n=8) no cuenta con tabla de picar, cortan el queso en el mismo lugar donde esta exhibido. De los trapos para limpiar los moldes de queso o los materiales se encontró que solo un 20% (n=2) lo mantiene limpio, usando varios trapos para limpiar y lavándolos en todo el día, un 50% (n=5) tiene el estado de sus trapos ya usados, solo tiene un trapo y los lavan dos veces al día, un 20 % (n=2) mantiene sus trapos en un pobre estado higiénico, ya que usan el mismo trapo para limpiar el queso y otros productos con los que se expende, y no los lavan en todo el día. Solo un 10 % (n=1) no tiene trapos.

Tabla 21: Resultado significativo de los utensilios.

CATEGORÍA		Tabla de picar		Estado de los trapos			
		Plástico	No usa	Limpio	Usado	Sucio	No usa
MERCADILLO							
DON PEDRITO	N		2		2		
	%		100		100		
GALERIA HUÁNUCO	N		1		1		
	%		100		100		
JR HCO CD 3	N		1				1
	%		100				100
JR HCO CD 4	N	2		1	1		
	%	100		50	50		
SAN MARTIN CD 9	N		1	1			
	%		100	100			
EL MOLLECITO	N		3		1	2	
	%		100		33,3	66,7	
TOTAL %		20 %	80 %	20 %	50 %	20 %	10 %

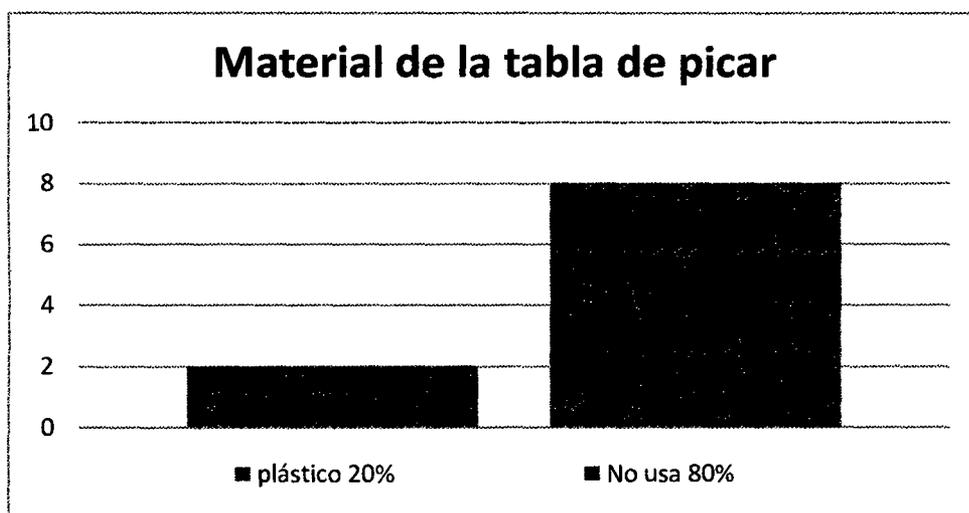
a. MATERIAL DE LA TABLA DE PICAR

Del total de puestos encuestados solo el 20% (n=2) usan tabla de picar de plástico y el 80% no usa una tabla de picar (tabla 22, gráfico 13).

Tabla 22: Material de la tabla de picar.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
Plástico	2	20,0%
No usa	8	80,0%
Total	10	100,0%

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 13: Material de la tabla de picar.

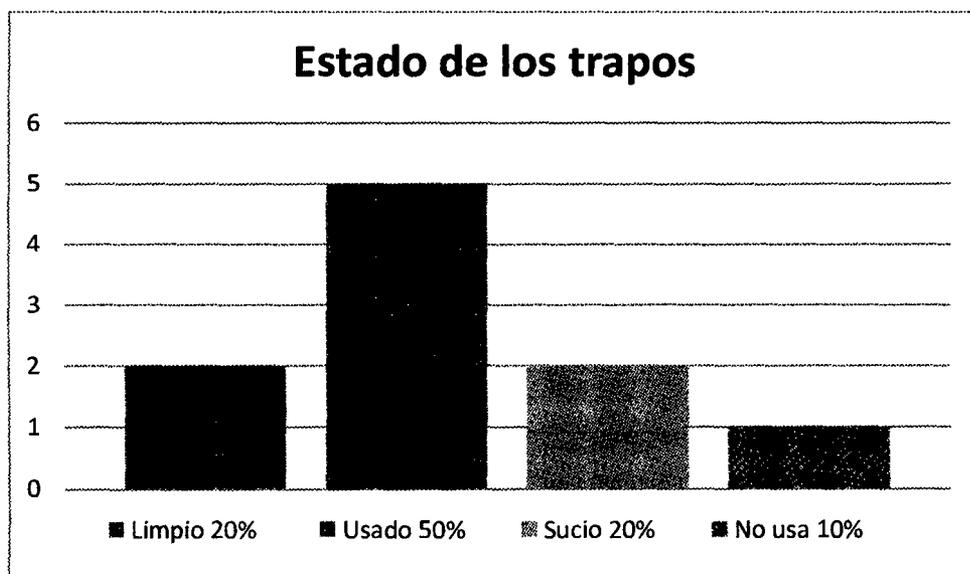
b. ESTADO DE LOS TRAJOS

Solo el 20% de los puestos (n=2) cuentan con uno o más trapos en buen estado y que los usan solo para los quesos, están limpios y los lavan en todo el día, mientras que el 50% de puestos (n=5) cuentan con uno o más trapos que están siendo usados solo para los quesos pero que los lavan dos a tres veces al día, el 20% de puestos (n=2) presentaban uno o dos trapos pero que durante todo el día no los lavan y los usan para limpiar otros utensilios y otros productos en venta. Solo el 10% (n=1) no tiene trapo u otro material para limpiar (Tabla 23, gráfico 14).

Tabla 23: Estado de los trapos para la limpieza.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
LIMPIO	2	20.0%
USADO	5	50.0%
SUCIO	2	20.0%
No usa	1	10.0%
Total	10	100,0

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 14: Estado de los trapos para la limpieza.

3.1.5.4. Análisis descriptivo de la infraestructura del puesto de expendio del queso fresco artesanal.

El 10% (n=1) cuenta con agua potable y el 80% (n=8) solo cuenta con el uso limitado del agua potable, almacenándolo en baldes o galones y un 10% (n=1) no cuenta con agua potable. Del total de puestos el 90% (n=9) expenden con otros productos, como carne de pollo, pavita, abarrotes, y otros productos lácteos, solo un 10 % (n=1) se dedica a vender el queso fresco artesanal.

Tabla 24: Resultado significativo de la infraestructura.

CATEGORIA		Disposición de agua				Venta con otros productos	
		Llave	Balde	Galón	No cuenta con agua	SI	NO
MERCADILLO							
DON PEDRITO	N		2			1	1
	%		100			50	50
GALERIA HUÁNUCO	N			1		1	
	%			100		100	
JR HCO CD 3	N				1	1	
	%				100	100	
JR HCO CD 4	N		2			2	
	%		100			100	
SAN MARTIN CD 9	N	1				1	
	%	100				100	
EL MOLLECITO	N		3			3	
	%		100			100	
TOTAL %		10 %	70 %	10 %	10 %	90 %	10 %

a. DISPOSICIÓN DEL AGUA

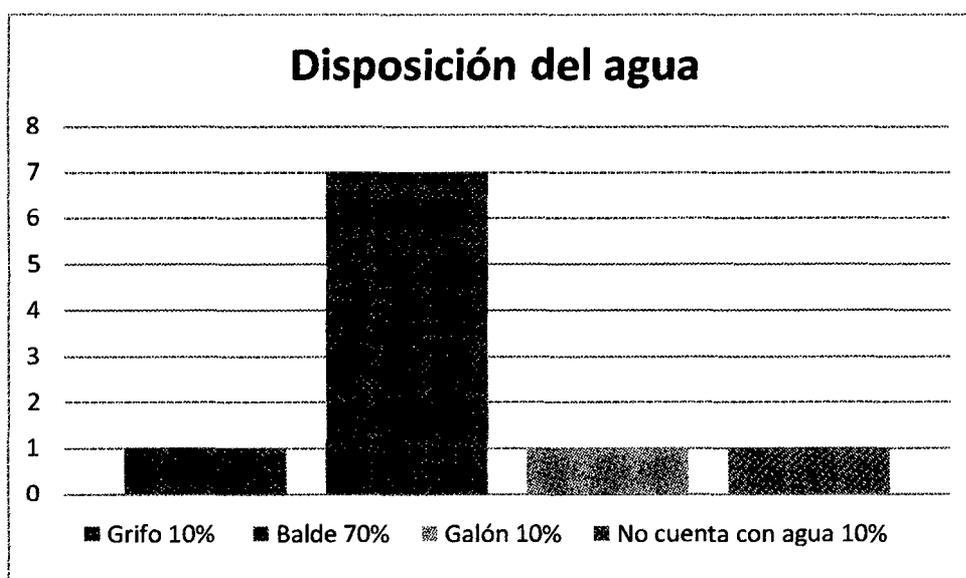
De todos los puestos con acceso al agua potable, solo el 10% (n=1) tiene acceso al agua potable directamente del grifo, el mayor porcentaje 70% de los puestos (n=7) presentan acceso al agua de manera deficiente, ya que solo pueden recolectar el agua en baldes, y de ahí racionar durante todo el día o hasta que lo vuelvan a necesitar; mientras que el 10% de puestos (n=1) presenta acceso a este servicio de manera regular, pero lo recolectan en galones ya que la llave se

encuentra alejado del puesto de venta. Solo un 10% (n=1) no cuenta con agua potable (tabla 25, gráfico 15).

Tabla 25: Manera de disponer al agua en cada puesto muestreado.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
GRIFO	1	10.0%
BALDE	7	70.0%
GALON	1	10.0%
NO CUENTA CON AGUA	1	10.0%
Total	10	100,0%

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 15: Acceso al agua en cada puesto muestreado.

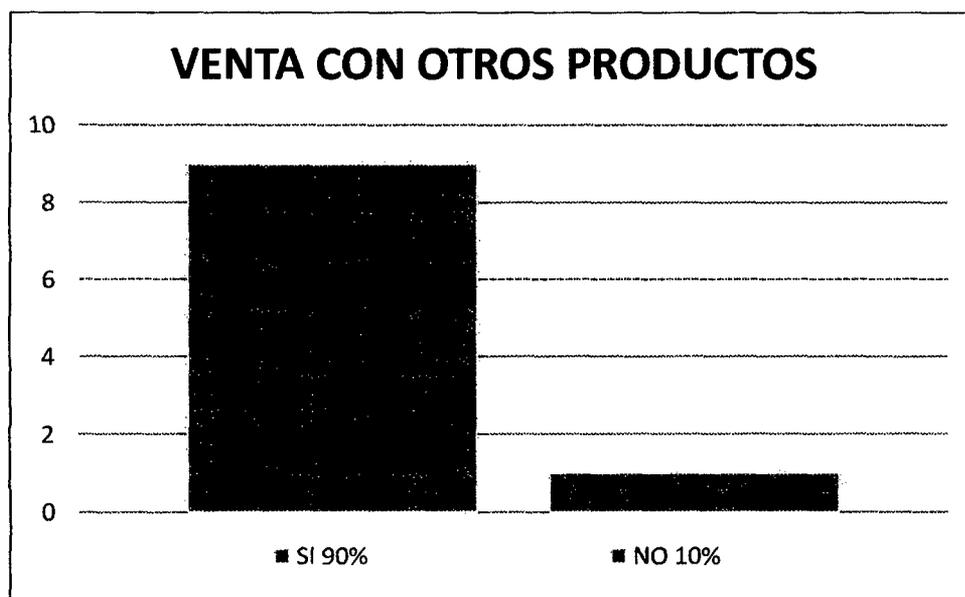
b. VENTA CON OTROS PRODUCTOS

Acerca de la venta con otros productos de cada puesto, obtuvimos los siguientes resultados; que el 90,0% (n=9) venden los quesos frescos con otros productos, ya sean abarrotos, cereales molidos, carne de pollo, carne de pavita, hierbas, enlatados, embutidos, bebidas embotelladas, derivados lácteos; mientras que el 10,0% (n=1) solo venden el queso fresco artesanal (tabla 26, gráfico 16).

Tabla 26: Venta del queso fresco con otros productos.

Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
SI	9	90,05
NO	1	10,0%
Total	10	100,0%

Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.



Fuente: Encuesta a comerciantes del mercado.

Gráfico 16: Venta del queso fresco con otros productos.

IV. DISCUSIÓN

El queso al ser un alimento obtenido por la fermentación de la leche, alcanza normalmente recuentos de bacterias fermentadoras de hasta 10^9 UFC/g, necesarias para la transformación en queso (ICMSF, 1984). Y los requisitos microbiológicos para el queso fresco están presentes en la NTP 202.087.

Los recuentos encontrados de *E. coli* en las Placas Petrifilm en el presente estudio presentan valores de 10 ufc/g hasta $2,8 \times 10^2$ ufc/g de queso fresco artesanal, Al respecto, diversos autores como (Cristóbal Ruth, 2003) halló valores menores en el recuento de *E. coli* $2,6 \times 10^2$ NMP/g. Así como (Lanchipa B Liliana, 2003) obtuvo resultados de *E. coli* de $2,1 \times 10^2$ /g, en todos los estudios anteriores indica deficiencias higiénicas en la manipulación del queso fresco artesanal y no cumplen con los requisitos microbiológicos según la NTP 202.087. Por otro lado (Vasek Olga M, 2004) en Argentina, obtuvo un recuento de 10^2 y 10^3 de igual manera estos resultados incumplen las normas microbiológicas de dicho alimento en ese país; al igual (Caldas I liz, 2008) en Venezuela obtuvo un recuento de *E. coli* de 10^4 que estuvo presente en el 43,3% de los quesos analizados. (Vásquez Nubia, 2012) También en Venezuela, encontró datos de *E. coli* ($1,3 \times 10^4$ UFC/g) usando las Placas Petrifilm, ambos resultados tampoco cumplen con los niveles establecidos respectivamente en sus normas nacionales, interpretando sus resultados como existencia de contaminación fecal.

Si bien es cierto que con el método utilizado no se pueden diferenciar las bacterias patógenas de las que no lo son, la presencia de *E. coli* es un indicador de contaminación fecal directa o indirecta y refleja falta de higiene durante la elaboración o manipulación del producto.

En lo que respecta al recuento de coliformes totales en Placas Petrifilm fue de 98 ufc/g hasta $6,9 \times 10^2$ ufc/g de queso, valores que se encuentran dentro del límite recomendado por la NTP 202.087. En ese sentido (**Cristóbal Ruth, 2003**) en su estudio obtuvo un recuento de $9,3 \times 10^2$ NMP/g y (**Lanchipa B Liliana, 2003**) por su parte halló un resultado de $1,1 \times 10^3$ ufc/g, que consideraron marginalmente aceptable ya que se encuentran en el límite máximo permitido para queso fresco artesanal, de igual forma se consideran un riesgo para el consumidor. Dentro de este mismo orden, los estudios realizados por (**Caldas I liz, 2008**) y (**Vásquez Nubia, 2012**) en Venezuela, obtuvieron recuentos de (10^3 hasta $\leq 10^5$ NMP/g) y ($1,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^2$ UFC /g) respectivamente, siendo valores muy superiores a las normas nacionales venezolanas y las nuestras, se interpreta que estos valores son por una deficiente calidad higiénica por parte del personal de manipuladores de este alimento. Sin duda que la presencia de coliformes totales y *E. coli* es un importante indicador de contaminación fecal que advierte de la posible presencia de otros patógenos, independientemente por los métodos de transporte, almacenamiento, inadecuada manipulación y limpieza.

Nuestros hallazgos en los recuentos en Placas Petrifilm para aerobios mesófilos fueron de hasta $5,7 \times 10^2$ ufc/g, y el recuento de las diluciones de hasta $6,3 \times 10^7$ ufc/g encontrados en algunas muestras de quesos frescos artesanales, ello indica

que durante el proceso de elaboración del queso las medidas higiénico - sanitarias no han sido óptimas. Al respecto **(Cristóbal Ruth, 2003)** también encontró recuentos de aerobios mesófilos $7,1 \times 10^6$ UFC/g, lo que indica presencia de contaminación catalogado por encima de los valores máximos permitidos por la Norma Técnica Peruana 202.087. Por otro lado, **(Lanchipa B Liliana, 2003)** encontró aerobios mesófilos viables $3,0 \times 10^5$ /g, valores que se encuentran en el límite permitido por la Norma Técnica Peruana. En Venezuela **(Vásquez Nubia, 2012)** encontró una elevada cuantificación de aerobios mesófilos $3,0 \times 10^5 - 2,8 \times 10^5$ UFC/g, valores que están por encima de las norma venezolana. Naturalmente la presencia de estas bacterias aerobias mesófilas indica las malas prácticas de manufactura y por consiguiente representan un riesgo para la salud del consumidor.

De hecho, que la manipulación del queso fresco artesanal en los diferentes mercadillos de Huánuco se considera deficiente, ello se puede corroborar al observar la Tabla N° 14, debido a que los comerciantes de estos productos no practican las medidas de bioseguridad correspondientes al momento de manipular y comercializar las mismas. Por lo tanto, estos factores influyen directamente en la contaminación del queso fresco artesanal, citado por **(Cristóbal Ruth, 2003)**: La elevada carga microbiana en las muestras de queso analizadas reflejan deficiencias higiénicas en la manipulación del queso fresco artesanal que se comercializa en los mercadillos estudiados, lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor en esta parte del país.

Del mismo modo, se ha encontrado utensilios, que por el constante uso, exposición al medio ambiente, y la falta de higiene se constituyen como los más influyentes para la proliferación bacteriana. En lo que se refiere al nivel de infraestructura y servicios básicos de los puestos de los mercadillos de Huánuco se ha encontrado que son completamente deficientes en lo que respecta a servicios básicos como el agua, desagüe, luz. De la misma manera en nuestro estudio se da cuenta del hallazgo que en la exposición del queso fresco ofertados para comercializarlos estos están conjuntamente con otros productos perecederos lo que contribuye un riesgo de contaminación cruzada con otros microorganismos lo que es inaceptable. Además la falta de uso de refrigeradoras o congeladoras para la conservación en los mismos puestos evidencian el deterioro de la vida útil del queso, datos que coinciden con los descritos por **(Romero-Castillo y Col, 2009)** en México. Por otra parte, **(Vásquez Nubia, 2012)**. Concuerdan con nuestros resultados de salubridad e higiene, indicando que existe poco control en cuanto a higiene, existen técnicas deficientes de manufactura y almacenamiento inadecuado en los diferentes distribuidores estudiados.

V. CONCLUSIONES

1. Del total de muestra del queso fresco artesanal (N=17), se encontraron la presencia de *E. coli* en 10 muestras. En base al criterio previamente señalado, se puede afirmar que el 58,8% del queso fresco artesanal que se expenden en los puestos contabilizados resultaron contaminadas, por lo que constituye un peligro para la salud pública si no son manipulados de manera adecuada.
2. Estos resultados nos indican que está relacionada la contaminación con las malas condiciones de fabricación, manejo, almacenamiento, transporte y venta. Además, debe tenerse en cuenta que entre las bacterias aerobias mesófilas pueden encontrarse muchas especies patógenas.
3. El nivel de manipulación en los puestos muestreados, es deficiente, esto quiere decir que dan lugar a un constante proceso de contaminación; con lo cual podemos determinar su influencia relativamente significativa en la contaminación por *E. coli*; esto no quiere decir que esté relacionado en su totalidad. La contaminación de los quesos frescos artesanales se debe principalmente a que los comerciantes no practican las medidas higiénico sanitarias oportunas al manipular materiales biológicos que están en contacto directo con la población, poniendo así en constante peligro a la salud pública.
4. Los utensilios utilizados en la comercialización de queso fresco artesanal podemos concluir que sobre todo el no usar un frigorífico en el puesto de venta contribuye enormemente al crecimiento bacteriano, ya que tendrían que

llevarse a sus casa los quesos y regresarlos al día siguiente, esto no excluye al resto de utensilios, que también van a influir en la presencia de Enterobacterias, coliformes y *E coli*.

5. El nivel de infraestructura y servicios básicos del los 17 puestos muestreados se observa que 16 puestos son deficientes, por lo que influye en el crecimiento de las enterobacterias. Todo esto se debe a que los comerciantes de queso fresco artesanal no cuentan con acceso constante al agua; además en los casos del mercadillo de Pillco Marca, no cuentan con la infraestructura correspondiente, ni con acceso al desagüe; además de la venta del queso con otros productos como: Pollo, pavita, huevos, etc.
6. Más de La mitad de los quesos analizados no son aptos para consumo debido a que sobrepasan los estándares nacionales. Los quesos catalogados como aptos son considerados en función al nivel de microorganismos presentes, como marginalmente aceptables y aceptables.
7. En general, la contaminación de los quesos frescos está representada por una elevada carga de los indicadores microbiológicos, es decir, las condiciones higiénicas sanitarias de proceso y de personal son deficientes.

VI. RECOMENDACIONES

1. En base a estos resultados obtenidos, se recomienda a los productores y distribuidores de queso aplicar las buenas prácticas de manufactura (BPM) para mejorar la calidad sanitaria de los quesos, evaluando las condiciones higiénicas sanitarias, de almacenamiento y elaboración.
2. Se deberían realizar programas de formación a aquellas personas involucradas en la elaboración y comercialización de queso orientando al personal en materia de higiene básica, de manera de garantizar un alimento inocuo que no represente riesgo a la salud de los consumidores.
3. Se recomienda a las autoridades competentes, concientizar y capacitar a los comerciantes de productos lácteos en general sobre las Buenas prácticas de Manufactura (BPM); y una mayor supervisión a los puestos que comercialicen estos productos.
4. Por último se recomienda a los consumidores, tener precaución al momento de comprar, debido a que muchas veces las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son por adquirir los productos en lugares de poca higiene y donde se expendan todo tipo de alimentos, ya que la mayoría busca un ahorro en las comprar diarias, lo que pone en riesgo la salud de ellos y sus familias.

VII. BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ Y, E. g. (2011). Efecto del *Lactobacillus casei atcc393* sobre *E. coli* durante la vida comercial del queso fresco. El Callao - Perú.

LANCHIPA B Liliana, Y. S. (2003). Evaluación de la carga microbiana patógena en al elaboración del queso fresco en el distrito de Tacna. Tacna - Perú.

CALDAS Iiz, O. O. (2008). Microorganismos indicadores de interés sanitario en queso artesanal tipo telita. Utapa municipio Piar, Estado Bolivar, Venezuela.

CALLE D, M.; SOLANO C, A. Elaboración de queso fresco. Proyecto: Formación y fortalecimiento de una red de micro productores rurales DETALLAMAC-CAJAMARCA. Ed., Junio 2004. Comisión de promoción de la pequeña y microempresa, PROMPYME. Lima, PERÚ. 83 p

CRISTÓBAL Ruth, M. D. (2003) Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp.* Panam salud pública, 158 - 168.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD. (ICMSF) Microorganismos de los alimentos. Volumen 1. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Editorial Acribia; 1984.

DOS SANTOS Eduardo, A. J. 2007. Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona-España

FARKYE, Y N, 2002. Microbiology of soft cheese, in: (Dairy Microbiology Handbook 3th Richard K Robinson). Inc. NewYork, USA, 479-513

FRAZIER, C.; WESTHOFF, 2000. Microbiología de los Alimentos. Zaragoza – España: Editorial Acribia, 680 p.

JONSON, Mark; PAULUS, Karen. (2005) “La operación de salado del queso”. Revista Mundo Lácteo y Cárnico. Edición Septiembre/octubre. p. 14- 16.

MADRID V, Antonio. (1996) Curso de Industrias Lácteas. 1era Edición. Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa. 604 p.

MINSA. Ministerio de Salud. (1998). Reglamento sobre vigilancia y control sanitario de los alimentos y bebidas. Lima: Ministerio de Salud.

MINSA. Ministerio de Salud. (1999). Norma sanitaria para el funcionamiento de mercados de abasto y ferias. Lima: Ministerio de Salud.

- MINSA. Ministerio de Salud. (2003).** Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano
- QUEVEDO Y COL., (1990).** Actualización de enfermedades transmitidas por alimentos. Washington, D.C.; OPS. 25p.
- ROMERO-CASTILLO Y COL., (2009).** Evaluación de la Calidad Sanitaria de los Quesos Crema Tropical Mexicano de la Región de Tonalá, Chiapas. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol.8, N° 1, 111-119
- TRIGUEIRO L, EUTHIER, R. F. (1998).** Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra “tipo coalho”, artesanal elaborado no Curimataú Paraibano. Ciênc Tecnol Alim; 18(2):176–178.
- VARNAM, A.; SUTHERLAND, J. (1994)** Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Zaragoza – España: editorial Acribia 1994.
- VASEK Olga M, R. C. (2004).** Análisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de Corrientes. Facena - Argentina, 13 - 22.
- VÁSQUEZ, Nubia L. D. (2012).** Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela. Zootecnia trop. , 2017 - 2023.
- ZAMBRANO D, María (2010).** Elaboración de queso fresco con la utilización de un fermento probiótico (*Lactobacillus acidophilus*). Tesis de pre grado. Escuela Politécnica Nacional. Quito – Ecuador.

ANEXOS

Anexo 1: Presentación de la muestra

Tabla 27: Base de datos en SPSS de la encuesta a los comerciantes de los mercadillos.

MERCADILLO	EXPENDIO					EXPOSICION DEL PRODUCTO							UTENSILIOS					INFRAESTRUCTURA						
	MA	GU	GO	MAS	PC	FU	TMF	CO	TMC	EX	TE	ME	AP	CU	MC	TP	MTP	T	ET	AG	DA	LUZ	DE	VOP
GALERIA DON PEDRITO	Si	No	Si	No	No	Si	Metal	Si	Gasa	Si	refrigerador conservador		Si	Si	Metal	No		Si	usado	Si	balde	Si	No	Si
GALERIA DON PEDRITO	Si	No	No	No	No	Si	Metal	Si	Gasa	Si	simple	Madera	Si	Si	Metal	No		Si	usado	Si	balde	Si	No	No
GALERIA COMERCIAL HUÁNUCO	No	No	No	No	No	Si	Plastico	No		Si	simple	Vidrio	Si	Si	Metal	No		Si	usado	Si	galon	Si	No	Si
JR HUÁNUCO CD 3 "LA CALERA"	No	No	No	No	No	Si	Plastico	No		No	no tiene		No	Si	Metal	No		No		No		No	No	Si
JR SAN MARTIN CD 9 "DON QUESO"	No	No	No	No	No	Si	Metal	No		Si	simple	Vidrio	Si	Si	Metal	No		Si	limpio	Si	llave	Si	Si	Si
JR HUÁNUCO CD 4	Si	No	No	No	Si	Si	Metal	No		Si	refrigerador conservador		Si	Si	Metal	Si	plastico	Si	limpio	Si	balde	Si	No	Si
JR HUÁNUCO CD 4	Si	No	Si	No	Si	Si	Plastico	No		Si	refrigerador conservador		Si	Si	Metal	Si	plastico	Si	usado	Si	balde	Si	No	Si
MERCADILLO EL MOLECITO	No	No	No	No	No	No	nada	Si	Plástico	No	no tiene		No	Si	Metal	No		Si	sucio	Si	balde	No	No	Si
MERCADILLO EL MOLECITO	Si	No	No	No	No	Si	Plastico	No		Si	simple	Vidrio	No	Si	Metal	No		Si	sucio	Si	balde	No	No	Si
MERCADILLO EL MOLECITO	Si	No	No	No	No	Si	Plastico	No		Si	simple	Vidrio	No	Si	Metal	No		Si	usado	Si	balde	No	No	Si

Fuente: SPSS V.21.0

LEYENDA:

MA: Mandil

GU: Guantes

GO: Gorro

MAS: Mascarilla

PC: Personal de cobranza

FU: Fuente

TMF: Tipo de material de la fuente

CO: Cobertor

TMC: Tipo de material del cobertor

EX: Exhibidor

TE: Tipo de exhibidor

ME: Material del exhibidor

AP: Almacenamiento en el puesto

CU: Cuchillo

MC: Material del cuchillo

TP: Tabla de picar

MTP: Material de tabla de picar

T: Trapo

ET: Estado del trapo

AG: Agua

DA: Disposición de agua

LUZ: Energía eléctrica

DE: Desagüe

VOP: Venta con otros productos

Anexo 3: Tabla para la identificación de enterobacterias según las pruebas bioquímicas.

Tabla 29: Clave de identificación de enterobacterias.

BACTERIA	TSI	LIA	CITRATO	UREA	HIDROGENO SULFURADO	GAS	MOVILIDAD	INDOL
<i>Escherichia coli</i> (lactosa +)	A/A ⁺	K/K ⁺	-	-	-	++ (V)	V *	+/-
<i>Escherichia coli</i> (variante)	K/A ⁺	K/K ⁺	-	-	-	-+/-	-	+
<i>Klebsiella</i>	K/A ⁺	K/K ⁺	+	-	-	+++	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	K/A ⁺	K/K ⁺	+	+	-	+++	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A ⁺	K/K ⁻	+	+	-	+++	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A/A ⁺	K/K ⁻	+	-	-	+++	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	A/A ⁺	K/K ⁻	+	-	-	+	+	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	A/A ⁺	K/K ⁻	+	+	V	V	V	V
<i>Citrobacter freundii</i>	A/A ⁺	K/K ⁻	+	-	+/- **	++	+	- **
<i>Salmonella</i>	A/A ⁺	K/K ⁻	-	-	+	-++	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	K/A ⁺⁺⁺	K/K ⁻	+	-	+	+	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	K/A ⁺	K/K ⁻	V	-	-	-++	+	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	K/A ⁺	K/K ⁻	+	-	-	-++	+	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	K/A ⁺⁺⁺ ***	K/K ⁻	+	-	+	-++	+	-
<i>Shigella</i>	K/A ⁻	K/A ⁻	-	-	-	-	-	V
<i>Providencia</i>	K/A ⁻	K/A ⁻	+	-	-	-++-	+	+
<i>Providencia rettgerii</i>	K/A ⁻	K/A ⁻	+	+	-	V	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	K/A ⁻	K/A ⁻	+	+	+	-++-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	K/A ⁻	K/A ⁻	+	+	+	-++	+	-
<i>Morganella morganii</i> *	K/A ⁻	K/A ⁻	-	+	-	V	+	+
<i>Serratia</i>	K/A ⁻	K/A ⁻	+	+	-	V	+	-
<i>Vibrio cholerae</i>	K/A ⁻	K/K ⁺	+	-	-	-	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	K/A ⁻	K/K ⁺ ***	+	¿?	-	-	+ *	+

- * Antes conocida como *Proteus morganii*. - ** Hidrogeno sulfurado positivo e indol positivo: *Citrobacter diversus*. - *** solo crece en medio LIA al 1% de NaCl.

Anexo 4: Tabla de los resultados de las pruebas bioquímicas.

Tabla 30: Resultado de las pruebas bioquímicas.

NÚMERO DE MUESTRA	RESULTADOS EN MEDIOS DIFERENCIALES													BACTERIA SOSPECHOSA
	TSI	HIDROGENO SULFURADO	GAS	LACTOSA	LIA	GLUCOSA	CITRATO	UREA	INDOL	MOVILIDAD	SORBITOL	RM	V-P	
1.	A/A	-	(++)	+	K/K	+	+	-	+	-	+	+	-	Negativo
2.	A/A	-	(++)	+	K/K	+	+	-	-	+	+	+	-	Negativo
3.	A/A	-	(++)	+	K/A	-	+	-	+	+	+	+	-	Negativo
4.	A/A	-	(+++)	+	K/K	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
5.	A/A	-	(++++)	+	K/K	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
6.	A/A	-	(+)	+	K/K	+	-	-	-	+	+	+	-	Negativo
7.	A/A	-	(+)	+	K/K	+	-	-	-	+	+	+	-	Negativo
8.	A/A	-	(+)	+	K/A	-	-	+	-	+	+	+	-	Negativo
9.	A/A	-	(++)	+	K/A	-	-	+	+	+	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
10.	A/A	-	(++++)	+	K/A	-	+	-	-	+	+	+	-	Negativo
11.	K/A	-	(+)	-	K/K	+	-	-	-	+	+	+	-	Negativo
12.	A/A	-	(+)	+	K/A	-	+	-	-	+	+	+	-	Negativo
13.	A/A	-	(+++)	+	K/K	+	-	-	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
14.	A/A	-	(++)	+	K/K	+	-	-	+	+	-	+	-	Negativo
15.	A/A	-	---	+	K/K	+	-	-	+	+	-	+	-	Negativo
16.	A/A	-	(++)	+	K/K	+	+	-	+	-	+	+	-	Negativo
17.	A/A	-	(+)	+	K/K	+	-	-	+	+	-	+	-	Negativo

IMÁGENES DE LA INVESTIGACIÓN.

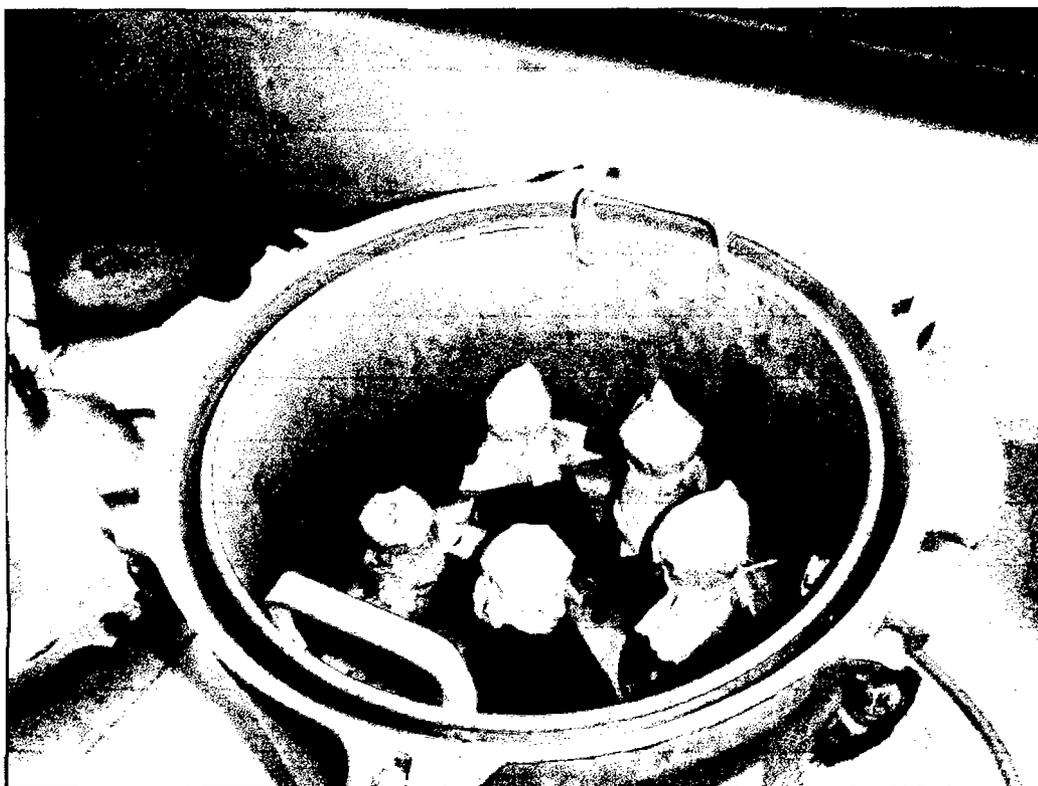


Figura 1. Fotografía de los medios de cultivo preparados para esterilizarlas.



Figura 2. Fotografía de placas Petri con medios de cultivo en la incubadora para pasar su prueba de control de calidad.

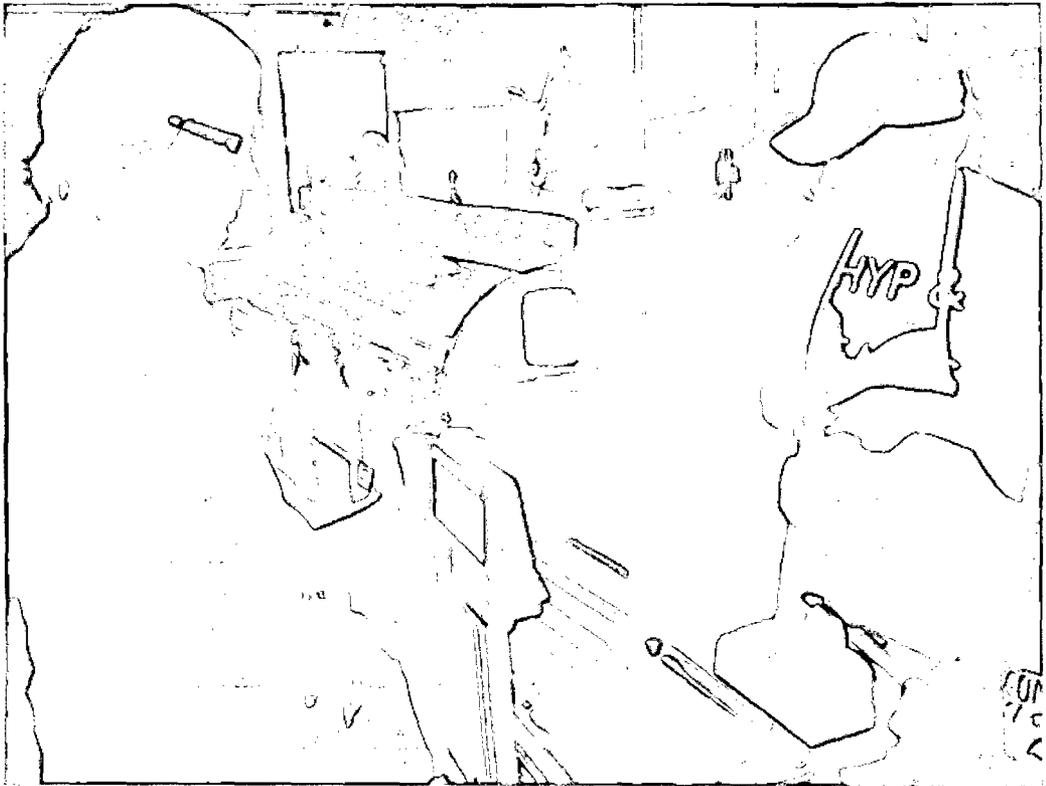


Figura 3. Fotografía de la recolección de 100g de queso fresco artesanal, el queso está expuesto en la parte posterior y en la refrigeradora, en la mesa solo lo cubre una tela de gasa.

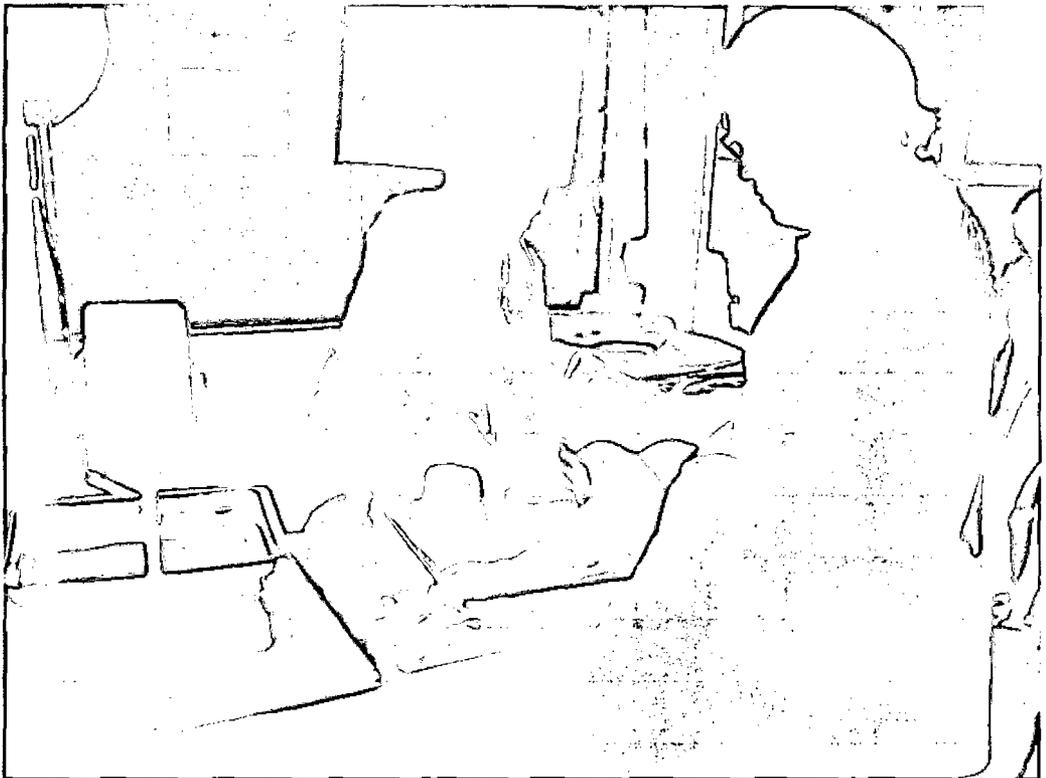


Figura 4. Fotografía de comerciante realiza el corte del queso cubriéndose solo con una bolsa la mano sin gorra ni mascarilla.



Figura 5. Fotografía de un puesto donde el queso fresco está expuesta en una vitrina de vidrio sin cobertor.



Figura 6. Fotografía en este puesto se observa que el queso fresco está solo en una bandeja de plástico, junto a huevos y carne de pollo.



Figura 7. Fotografía de uno de los puestos que contaba con refrigerador, pero el comerciante no usaba mandil, ni gorro.



Figura 8. Fotografía del puesto de expendio donde se ve al queso fresco sin cobertor.

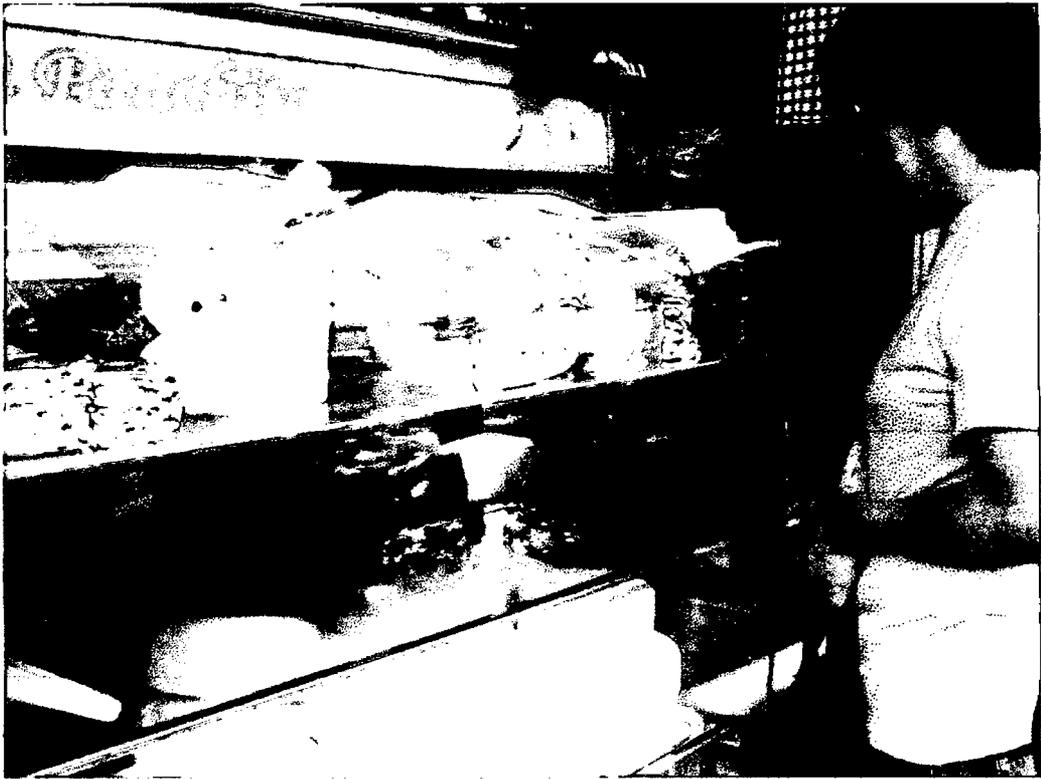


Figura 9. Fotografía de otro puesto se observa que el queso fresco está en bandejas de metal junto a otros productos lácteos.



Figura 10. Fotografía de un puesto el queso está expuesto junto a carne de ave.



Figura 11. Fotografía de un puesto el queso fresco está en un plato dentro de una bolsa plástica, sin cobertor, y junto a otros productos.

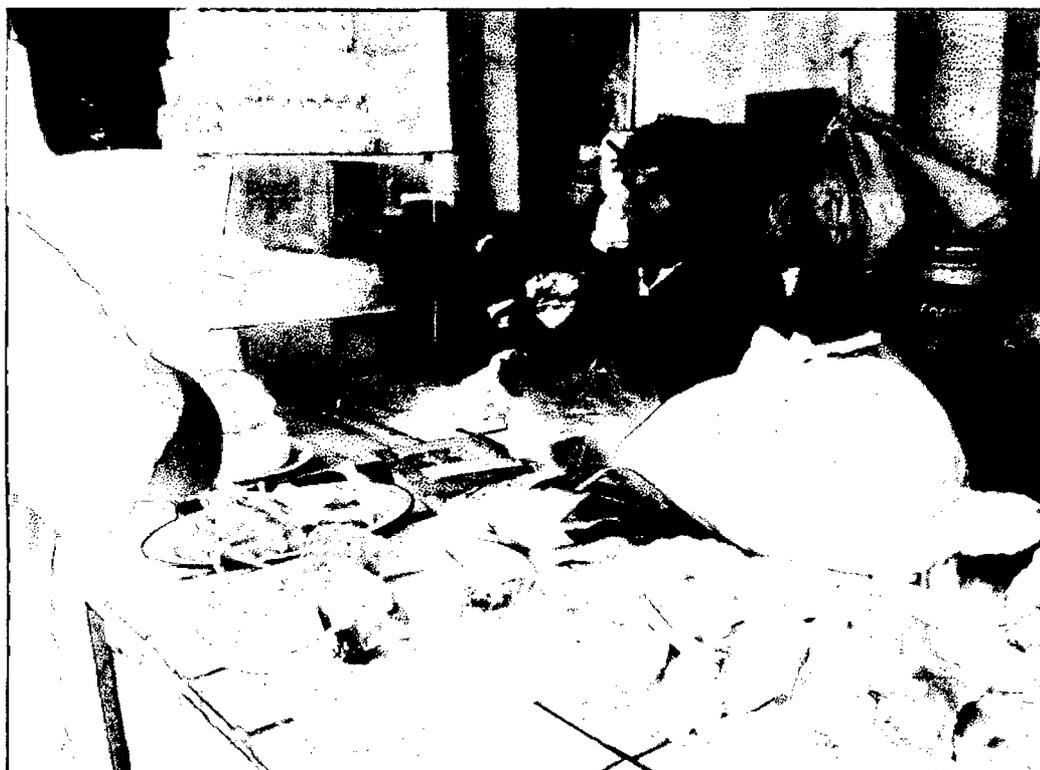


Figura 12. Fotografía de un puesto el queso fresco está sin cobertor y junto a carne de ave.



Figura 13. Fotografía del rotulado de las muestras de queso fresco artesanal.

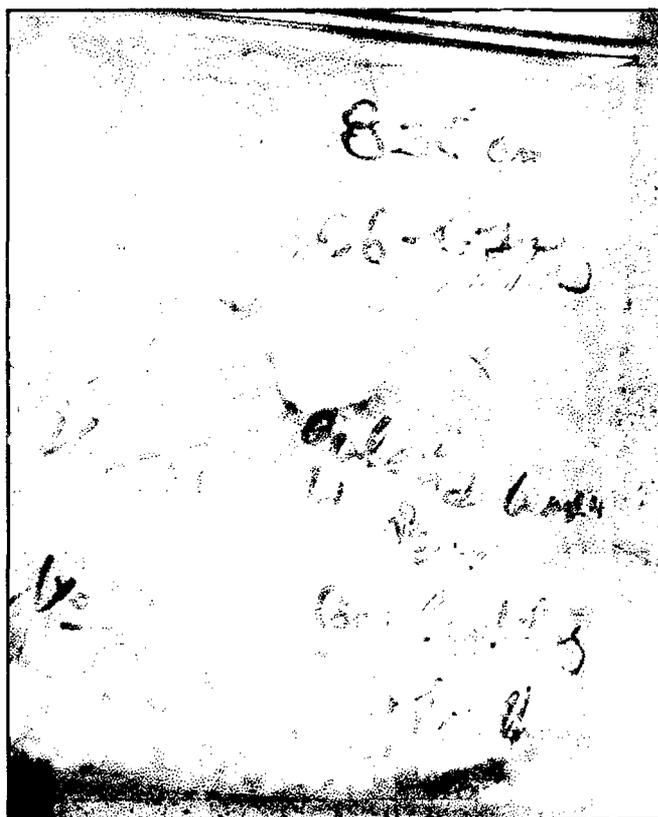


Figura 14. Fotografía de las muestras trituradas con caldo nutritivo.



Figura 15. Fotografía de muestras en la incubadora

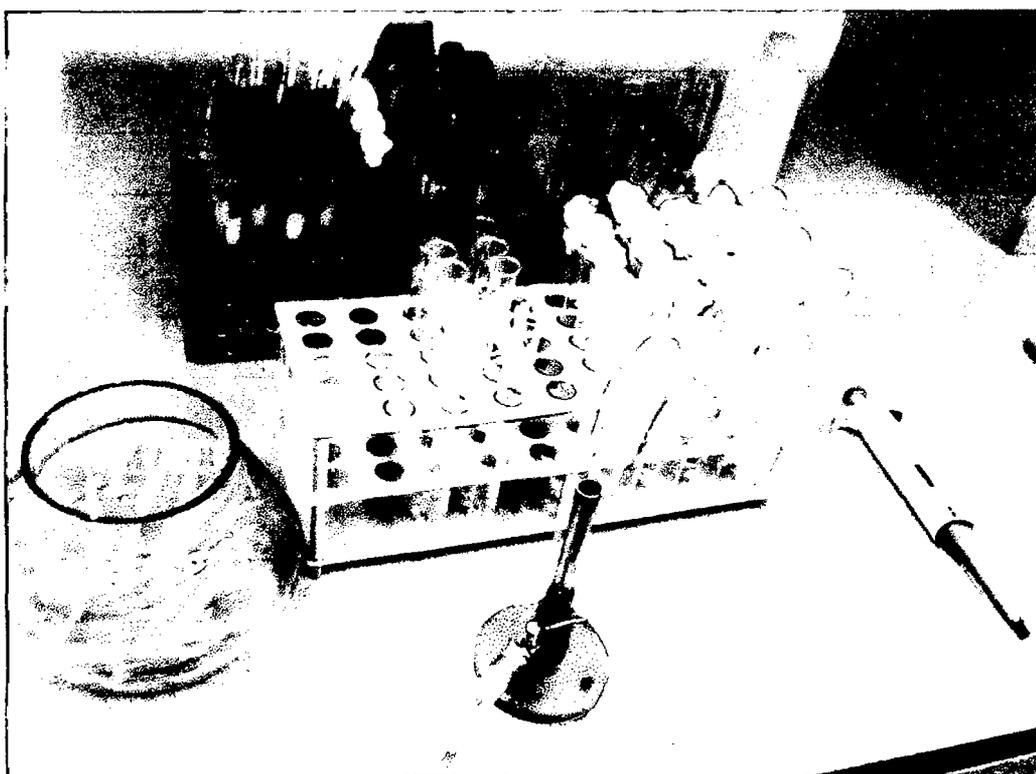


Figura 16. Fotografía del procedimiento para las diluciones del UFC.



Figura 17. Fotografía del cultivo de las diluciones en agar Mac Conkey.



Figura 18. Fotografía del recuento para hallar las UFC por gramo de muestra.

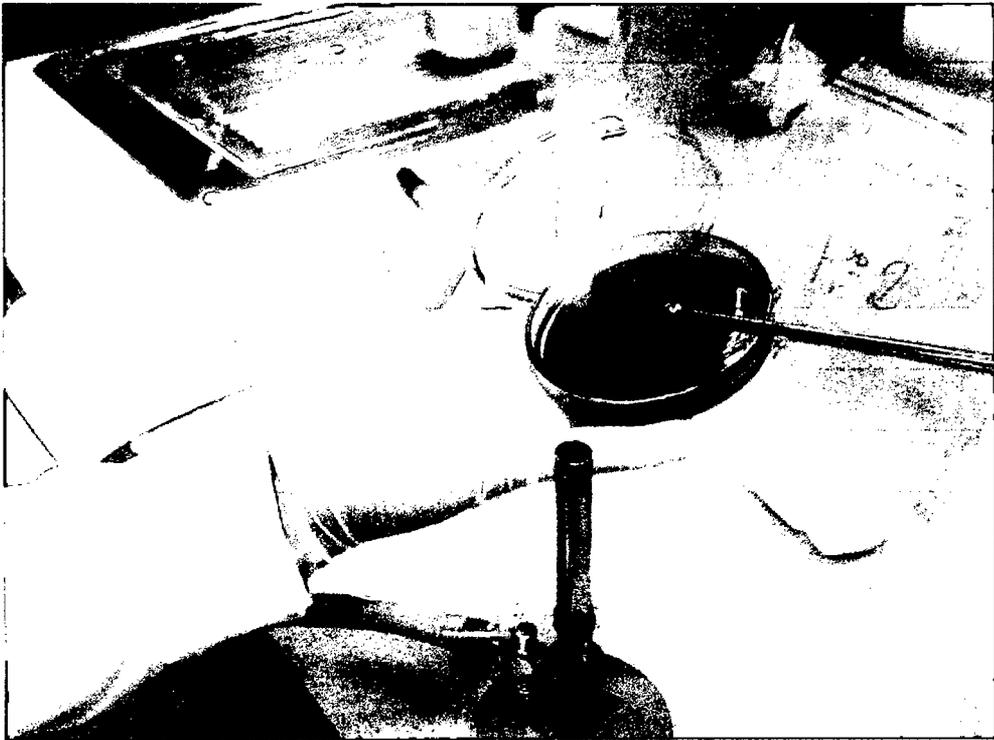


Figura 19. Fotografía del cultivo de la muestra en agar EMB.

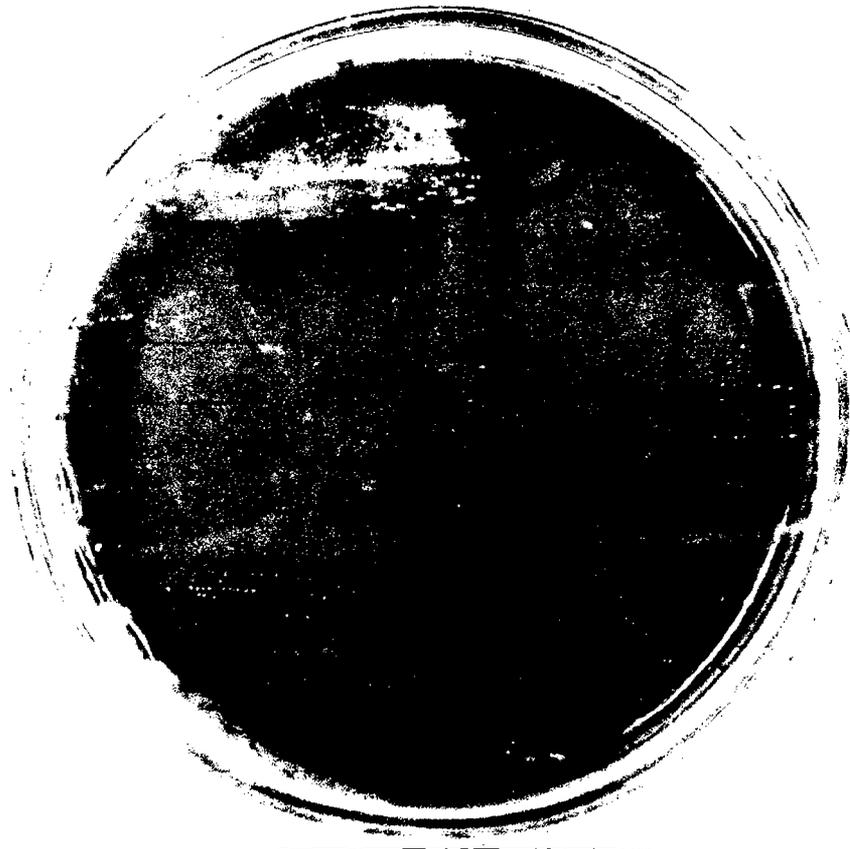


Figura 20. Fotografía del desarrollo de las colonias, nótese el brillo verde metálico característico de *E. coli*.

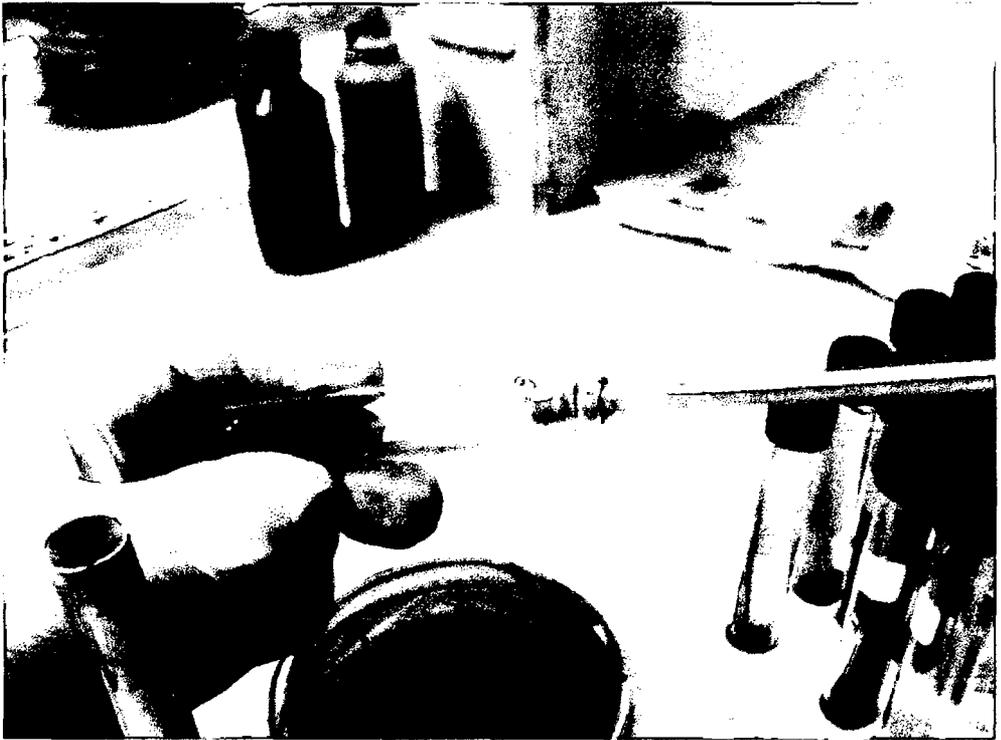


Figura 21. Fotografía de la inoculación de las colonias en los diferentes medios para las pruebas bioquímicas.



Figura 22. Fotografía de los tubos inoculados para las pruebas bioquímicas.

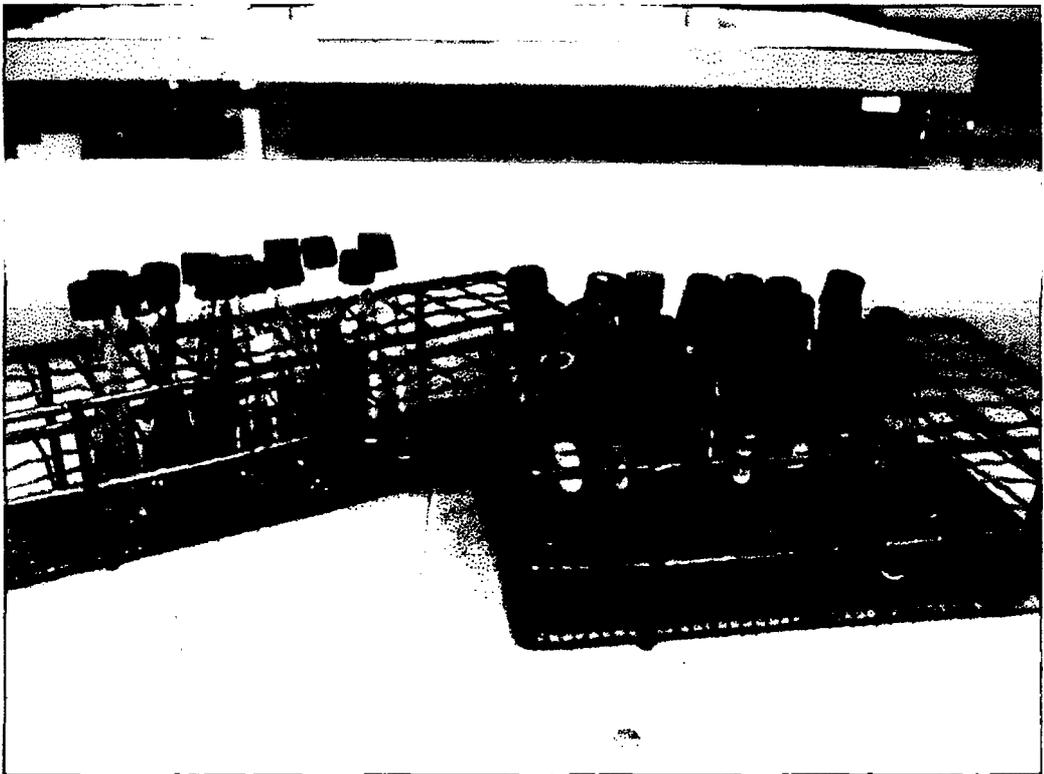


Figura 23. Fotografía de la lectura de los tubos de las pruebas bioquímicas.



Figura 24. Fotografía de los materiales en la cabina de flujo laminar para el cultivo en las Placas Petrifilm.



Figura 25. Fotografía de la inoculación de 1 mL de muestra en la Placa Petrifilm.

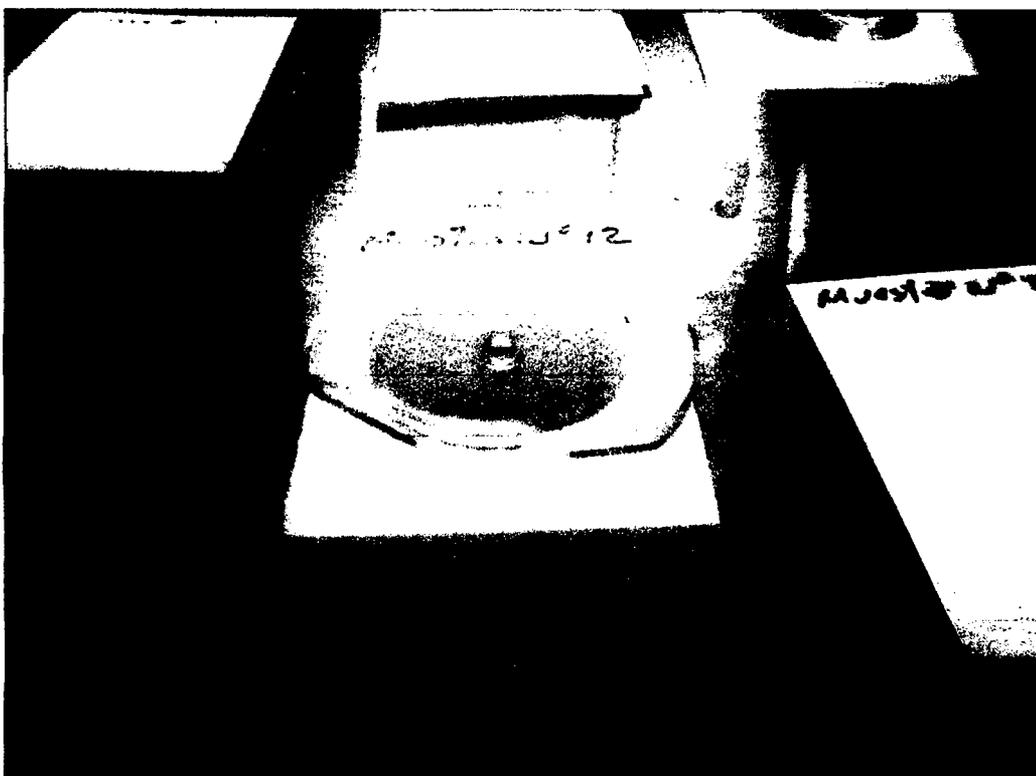


Figura 26. Fotografía de la distribución uniforme por todo el campo de la Placa Petrifilm.



Figura 27. Fotografía de la incubación por 24 a 48 horas.

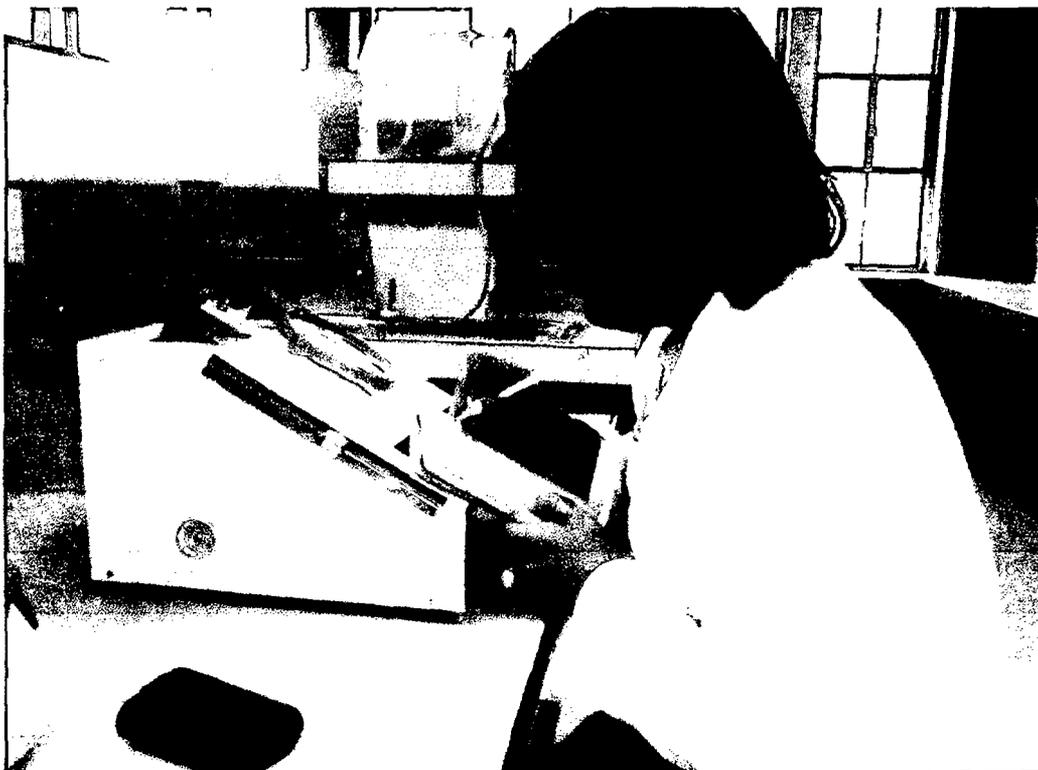


Figura 28. Fotografía del recuento de las Palcas Petrifilm en un contador de colonias convencional.

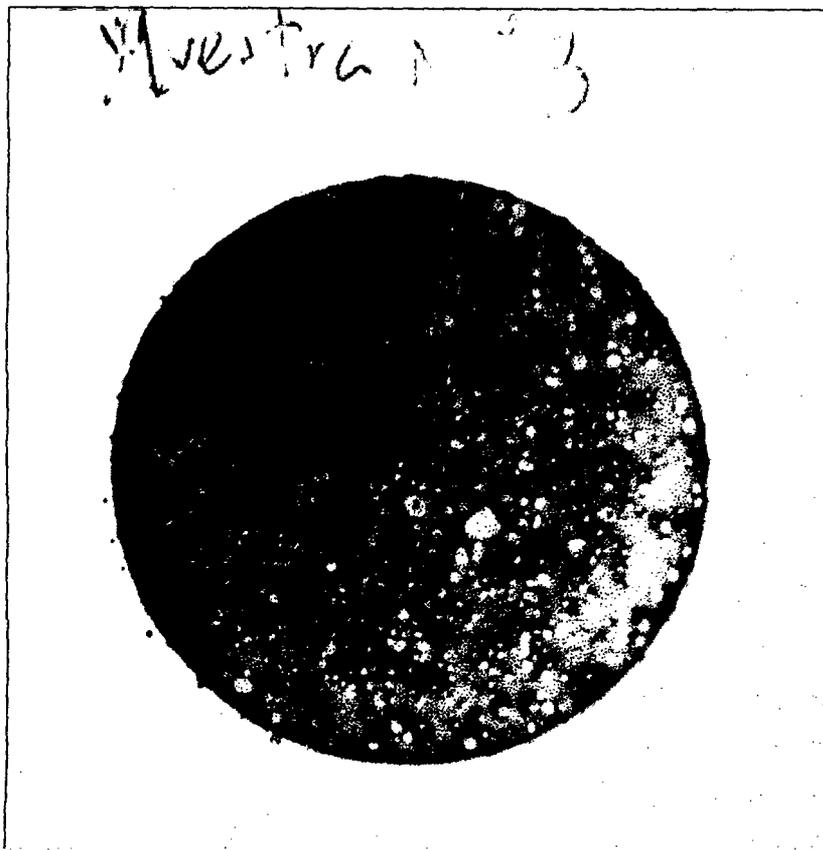


Figura 29. Fotografía del recuento de las Placas Petrifilm para *E. coli*, nótese la cantidad de colonias azules con gas características de dicha bacteria.

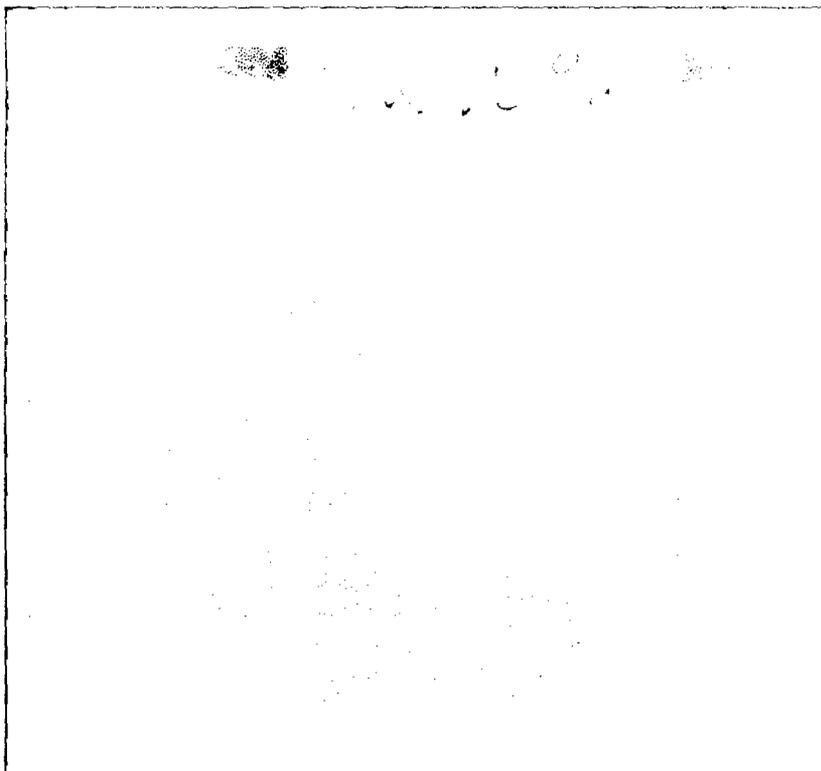


Figura 30. Fotografía del recuento de las Placas Petrifilm para aerobios mesófilos, nótese el gran desarrollo de colonias rojas.

Anexo 5: Instrumentos

ENCUESTA A LOS COMERCIANTES

1. Fecha:

Número de muestra

2. Nombre del mercadillo:

3. Dirección:

4. N° de puesto:

5. Tipo de muestra:

6. Procedencia de la muestra:

Baños

Huancayo

Otro

7. Expendio:

a. Mandil

SI

NO

b. Guantes

SI

NO

c. Gorro

SI

NO

d. Mascarilla

SI

NO

e. Personal de cobranza

SI

NO

8. Exposición del producto:

a. Fuentes

SI

NO

→ pase a la c

b. tipo de material de la fuente

plástico

madera

metal

c. Cobertor

SI

NO

→ pase a la e

d. tipo de material del cobertor

plástico

metal

gasa

e. Exhibidor

SI

NO

→ pase a la h

f. Tipo de exhibidor

simple

refrigerador conservador

g. Material del exhibidor

madera

metal

vidrio

h. Almacenamiento en el puesto

SI

NO

9. Utensilios:

- a. Cuchillo SI NO
- b. Material del cuchillo metal plástico
- c. Tabla de picar Si NO ▶pase a la e
- d. Material de la tabla metal madera plástico
- e. Trapos SI NO
- f. Estado de los trapos. Limpio usado sucio

10. Infraestructura:

- a. Agua SI NO
- b. Disposición del agua llave balde galón
- c. Luz SI NO
- d. Desagüe SI NO
- e. Venta con otros productos SI NO

Descripción de los demás productos.....

.....

.....

NOTA BIOGRÁFICA

- **LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:**

Distrito de Huánuco, provincia de Huánuco, departamento de Huánuco – Perú.

15 de mayo de 1990.

- **Centro educativo de educación secundaria:**

Gran Unidad Escolar “Leoncio Prado Gutiérrez” – Huánuco

- **Universidad.**

Universidad nacional Hermilio Valdizán

Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Escuela Académico Profesional De Medicina Veterinaria.



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MEDICO VETERINARIO

En la ciudad de Huánuco, Cayhuayna - Distrito de Pillco Marca, a los VEINTE Y CINCO días del mes de Noviembre del 2015, siendo las 12 P.M. horas, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos se reunieron en el Auditorio de la Facultad, los Miembros integrantes del Jurado examinador para proceder a la Evaluación de Sustentación de la Tesis Titulada: "EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Escherichia coli* COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL RECIENTE EN EL QUESO FRESCO ARTESANAL EXPEDIDO EN LOS MERCADILLOS DE HUÁNUCO", del Bachiller Irwin Aldo, PALPA CHÁVEZ para OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO, estando integrado por los siguientes miembros:

- Mg. Práxedes CUBAS BAZÁN (PRESIDENTE)
- Mg. Rosel APAESTEGUI LIVAQUE (SECRETARIO)
- Mg. Christian ESCOBEDO BAILÓN (VOCAL)

Finalizado el acto de sustentación, los miembros del Jurado procedieron a la calificación, cuyo resultado fue APROBADO, con la nota de Diecisiete (17), con el calificativo de: Buena.

Con lo que se dio por finalizado el proceso de Evaluación de Sustentación de Tesis. Siendo a horas 1:10 p.m., en fe de la cual firmamos.

Mg. Práxedes CUBAS BAZÁN
PRESIDENTE

Mg. Rosel APAESTEGUI LIVAQUE
SECRETARIO

Dr. Christian M. ESCOBEDO BAILÓN
VOCAL