



# Universidad Nacional Autónoma de Chota

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Unidad de Investigación

RESOLUCIÓN DE COORDINACIÓN N° 153-2023-FCA/UNACH

“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”



## CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

La que suscribe, Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Autónoma de Chota, **hace constar** que el Informe Final de Tesis Titulado. “Aislamiento de *Staphylococcus* coagulasas positivos y determinación de coliformes totales y termotolerantes en quesos frescos artesanales en Chota-Cajamarca”; desarrollado por el Bach. Faustino Ruiz Díaz de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, asesorado por Dra. Melina Luz Mary Cruzado Bravo; presenta un **ÍNDICE DE SIMILITUD DEL 25%** sin incluir bibliografía; por lo tanto, cumple con el criterio de evaluación de originalidad establecido en el **REGLAMENTO DE GRADOS Y TÍTULOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE CHOTA** aprobado mediante **RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA N° 120-2022-UNACH**.

Se expide la presente, a petición de la parte interesada para los fines que estime conveniente.

Chota, 26 de setiembre de 2023.

Atentamente

Dra. Doris Elena Delgado Tapia  
Directora de la Unidad de Investigación  
de la Facultad de Ciencias Agrarias

# IT-CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD-UIFCA 2 FRD: AISLAMIENTO DE Staphylococcus COAGULASAS POSITIVOS Y DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES EN CHOTA-CAJAMARCA

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://repositorio.unach.edu.pe">repositorio.unach.edu.pe</a> Fuente de Internet	1 %
2	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1 %
3	<a href="https://1library.co">1library.co</a> Fuente de Internet	1 %
4	<a href="https://repositorio.uta.edu.ec">repositorio.uta.edu.ec</a> Fuente de Internet	1 %
5	<a href="https://zavantag.com">zavantag.com</a> Fuente de Internet	1 %
6	<a href="https://www.scribd.com">www.scribd.com</a> Fuente de Internet	1 %
7	<a href="https://respyn.uanl.mx">respyn.uanl.mx</a> Fuente de Internet	1 %

[repositorio.unp.edu.pe](https://repositorio.unp.edu.pe)

135 [zonasegura.seace.gob.pe](http://zonasegura.seace.gob.pe) Fuente de Internet <1 %

136 C.S. Lorenzon, P Gatti Junior, A.P. Nunes, F.R. Pinto, C. Scholten, S.N. Honda, L.A. do Amaral. "PERFIL MICROBIOLÓGICO DE PEIXES E ÁGUA DE CULTIVO EM PESQUE-PAGUES SITUADOS NA REGIÃO NORDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO", Arquivos do Instituto Biológico, 2010  
Publicación <1 %

137 Juan Carlos Cárdenas Valverde, Irina Giovanna Flores Poma, Ana María Goyas Baldoce da, Walter Ausberto Aguilar Torres et al. "APLICACIÓN DEL COACHING PARA EL APRENDIZAJE DE ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA", Editora Científica Digital, 2023  
Publicación <1 %

138 [livrosdeamor.com.br](http://livrosdeamor.com.br) Fuente de Internet <1 %

139 [revistas.utm.edu.ec](http://revistas.utm.edu.ec) Fuente de Internet <1 %

140 [www.medrxiv.org](http://www.medrxiv.org) Fuente de Internet <1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

Índice de similitud

25%

Similitud según fuente

Internet Sources:	23%
Publicaciones:	6%
Trabajos del estudiante:	9%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE CHOTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**AISLAMIENTO DE *Staphylococcus* COAGULASAS POSITIVOS Y DETERMINACIÓN  
DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES EN QUESOS FRESCOS  
ARTESANALES EN CHOTA-CAJAMARCA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**PRESENTADO POR:**

Bachiller. Faustino Ruiz Díaz

Dra. Melina Luz Mary Cruzado Bravo  
CIP 137514  
Docente UNACH

**ASESOR:** Dra. Melina Luz Mary Cruzado Bravo

**CHOTA - PERÚ**

**2023**

### ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA N° 024-2023/EPIA - FCA/UNACH

Siendo las 16:00 horas, del día 18 de diciembre de 2023, los miembros del

Jurado evaluador de Informe Final Tesis titulada:  
Aislamiento de Staphylococcus coagulans positivos y determinación  
de coliformes totales y termotolerantes en quesos frescos artesanales  
en Chota - Cajamarca, integrado por:

1. Mg. Martín Díaz Torres ..... Presidente
2. Ms. Augusto Antonio Mechato Anastasio ..... Secretario
3. Mg. Flor De María Valqui Pérez ..... Vocal

Sustentada por Faustino Ruiz Díaz, con la finalidad de  
obtener título profesional en Ingeniería Agroindustrial.

Terminada la sustentación, con las preguntas formuladas por los integrantes del Jurado y las  
respuestas otorgadas por el graduando, luego de deliberar, acuerda... (Aprobar, no aprobar)...  
la tesis, calificándola con la nota de: (17 en letras diecisiete), se eleva la presente Acta  
al Coordinador de la Facultad de Ciencias Agrarias, a fin de que se le declare EXPEDITO  
para conferirle el título profesional en Ingeniería Agroindustrial.

Firmado en: Colpa Matara, 18 de diciembre del 2023

.....  
Presidente  
Martín Díaz Torres

.....  
Secretario  
Augusto Antonio Mechato Anastasio

.....  
Vocal  
Flor de María Valqui Pérez

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios por acompañarme y guiarme.  
A mis padres, por su amor, paciencia y sacrificio constante,  
siempre creyendo en mí y motivándome a  
dar lo mejor de mí mismo. A mi hijo por ser mi  
inspiración y fortaleza.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de Chota por acogerme durante mi formación profesional.

A mis profesores de la Universidad Nacional Autónoma de Chota por Compartir sus conocimientos, consejos, y por compartir sus experiencias de vida.

Agradezco a mi asesor de tesis,  
Melina Luz Mary Cruzado Bravo, por su dedicación,  
paciencia y valiosos aportes a lo largo de todo el proceso.  
Su experiencia y orientación fueron fundamentales para la culminación exitosa de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes durante la realización de esta tesis.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ACTA DE SUSTENTACIÓN .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
RESUMEN .....	8
ABSTRACT.....	9
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN .....	10
1.1. Planteamiento del problema .....	10
1.2. Formulación del problema .....	11
1.3. Justificación.....	11
1.4. Objetivos .....	12
1.4.1. <i>Objetivo General</i> .....	12
1.4.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	13
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO .....	14
2.1. Antecedentes .....	14
2.2. Bases Teórico - Científicas .....	16
2.2.1. <i>Sistemas de control alimentario</i> .....	16
2.2.2. <i>Enfermedades transmitidas por alimentos</i> .....	17
2.2.3. <i>Queso</i> .....	17
2.2.3.1. Queso fresco .....	17
2.2.3.2. Microorganismos patógenos asociados a quesos.....	20
2.2.3.3. Métodos de recuento de microorganismos .....	23
2.2.3.4. Método del Número Más Probable (NMP) .....	24
2.3. Marco conceptual .....	25
2.4. Hipótesis.....	27
2.5. Operacionalización de variables.....	27
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO .....	28
3.1. Tipo y nivel de investigación .....	28
3.2. Diseño de investigación .....	28

3.3.	Métodos de investigación.....	28
3.4.	Población, muestra y muestreo.....	28
3.5.	Técnicas de procesamiento y recolección de datos .....	29
3.5.1.	<i>Recolección de quesos frescos</i> .....	29
3.5.2.	<i>Aislamiento de Staphylococcus Coagulasas Positivos (COPS)</i> .....	29
3.5.3.	<i>Recuento de colonias presuntivas de Staphylococcus Coagulasas positivos</i> .....	29
3.5.4.	<i>Prueba de catalasa a los aislados de Staphylococcus</i> .....	30
3.5.5.	<i>Prueba de coagulasa a los aislados de Staphylococcus</i> .....	30
3.5.6.	<i>Determinación de coliformes totales en los quesos frescos artesanales</i> .....	30
3.5.7.	<i>Determinación de coliformes termotolerantes en los quesos frescos artesanales</i> .....	31
3.5.8.	<i>Determinación de humedad en los quesos frescos</i> .....	31
3.5.9.	<i>Determinación acidez en los quesos frescos artesanales</i> .....	31
3.5.10.	<i>Determinación de pH en los quesos frescos artesanales</i> .....	32
3.6.	Técnicas de procesamiento y análisis de datos .....	32
3.7.	Aspectos éticos .....	32
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		34
4.1.	Descripción de resultados.....	34
4.1.1.	<i>Resultados del análisis microbiológico a los quesos frescos analizados</i> .....	34
4.1.2.	<i>Resultado del análisis fisicoquímico a los quesos frescos analizados</i> .....	40
4.2.	Discusiones.....	43
4.2.1.	<i>Análisis microbiológico del queso fresco artesanal</i> .....	43
4.2.2.	<i>Análisis fisicoquímico</i> .....	44
4.2.3.	<i>Correlación entre la población microbiana y las características fisicoquímicas</i> .....	45
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		47
5.1.	Conclusiones .....	47
5.2.	Recomendaciones.....	47
CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		49
CAPITULO VII. ANEXOS .....		56

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1 <i>Composición química del queso fresco (100 g)</i> .....	18
Tabla 2 <i>Requisitos microbiológicos del queso fresco</i> .....	20
Tabla 3 <i>Operacionalización de variables</i> .....	27
Tabla 4 <i>Resultados del análisis microbiológico- M1</i> .....	34
Tabla 5 <i>Resultados del análisis microbiológico Mercado 2</i> .....	36
Tabla 6 <i>Valores microbiológicos promedios de los Mercados 1 y 2 del distrito de Chota</i> .....	39
Tabla 7 <i>Resultados comparativos en función del Decreto Supremo 007-2017 MINAGRI</i> .....	39
Tabla 8 <i>Humedad (%), pH y acidez de las muestras de queso fresco artesanal M1</i> .....	40
Tabla 9 <i>Resultados del análisis físico químico M2</i> .....	42
Tabla 10 <i>Datos generales de las muestras</i> .....	64
Tabla 11 <i>Registro de resultado de las pruebas catalasa, coagulasa y tinción gram de los quesos analizados</i> .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Resultados de la prueba de catalasa aplicados a los aislados de Staphylococcus</i> .....	37
Figura 2 <i>Resultados de la prueba de coagulasa aplicados a los aislados de Staphylococcus</i> .....	38
Figura 3 <i>Decreto Supremo 017-2017-MINAGRI. Especificaciones técnicas y sanitarias para el queso fresco</i> .....	59
Figura 4 <i>Primera dilución de la muestra de queso fresco en agua peptonada</i> .....	57
Figura 5 <i>Crecimiento de Staphylococcus en Agar Baird Parker</i> .....	57
Figura 6 <i>Crecimiento de del asilado de Staphylococcu COPS en caldo BHI</i> .....	58
Figura 7 <i>Cocos gram positivos- Tinsión de gram visto en el microscopio de luz (100X)</i> .....	58
Figura 8 <i>Prueba de catalasa de los asilados de Staphylococcu COPS</i> .....	59
Figura 9 <i>Prueba de coagulasa en plasma de conejo de los asilados de Staphylococcus COPS</i> ..	59
Figura 10 <i>Lectura de coliformes totales en caldo verde brillante</i> .....	60
Figura 11 <i>Lectura de coliformes termotolerantes en caldo EC</i> .....	60
Figura 12 <i>Pesado de las muestras de queso fresco para las pruebas fisicoquímicas</i> .....	61
Figura 13 <i>Muestras secas de la prueba de humedad</i> .....	61
Figura 14 <i>Determinación de la acidez mediante titulación</i> .....	62
Figura 15 <i>Medición de pH</i> .....	62
Figura 16 <i>Tabla del NMP según da Silva et al. (2010)</i> .....	63

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar *Staphylococcus coagulasa* positiva (COPS) y determinar la población de coliformes totales y termotolerantes en quesos frescos comprados en el Mercado Central (M1) y Mercado Mayorista Julio Vásquez Acuña (M2) del distrito de Chota, Cajamarca-Perú. Además, se analizaron características como: humedad, pH y acidez. Se adquirieron n=66 muestras de ~200 g (aprox.), para determinar la presencia de COPS, se realizó la siembra en agar Baird Parker, se llevaron a cabo pruebas de catalasa, coagulasa y observación morfológica (tinción de Gram) de los aislados. Asimismo, para determinar la población microbiana de coliformes totales y termotolerantes se aplicó el método de Número Más Probable (NMP). Los recuentos promedio de COPS encontrados en las muestras de queso del M1 fue de  $4,13 \times 10^4$  UFC/g y  $2,77 \times 10^4$  UFC/g en el M2, confirmando que el 96% de muestras analizadas superaron a los límites permitidos por el DS N°007-2017-MINAGRI (Reglamento de la Leche y Productos Lácteos), mientras que para Coliformes Totales y Termotolerantes el 100 % de las muestras analizadas sobrepasaron los límites permitidos por la misma legislación. La humedad de los quesos frescos artesanales fue  $> 45$  %, cumpliendo con los requisitos de la norma peruana. El pH se encontraba entre 4,31 y 6,42, y la acidez oscilaba entre 0,14% y 0,81% (ácido láctico). Por lo tanto, en base a los resultados, podemos concluir que el 100 % de las muestras analizadas representan un riesgo para la salud de los consumidores, es importante abordar este problema ya que involucra a una de las cadenas de valor más importantes de la región Cajamarca, específicamente de la Provincia de Chota, que son los lácteos, siendo este trabajo una fuente importante de información, que muestra la necesidad de mejorar las condiciones de producción y venta de derivados lácteos.

**Palabras clave:** queso fresco, aislados, población microbiana.

## ABSTRACT

The objective of this study was to isolate Coagulase-Positive Staphylococcus (COPS) and determine the population of total and thermotolerant coliforms in fresh cheeses purchased at the Central Market (M1) and Julio Vásquez Acuña Wholesale Market (M2) in the Chota district, Cajamarca, Peru. Additionally, characteristics such as moisture, pH, and acidity were analyzed. A total of n=66 samples of approximately 200 g each were obtained. To determine the presence of COPS, they were cultured on Baird Parker agar, and catalase, coagulase, and morphological observations (Gram staining) of the isolates were performed. Likewise, the Most Probable Number (MPN) method was applied to determine the microbial population of total and thermotolerant coliforms. The average counts of COPS found in the cheese samples from M1 were  $4.13 \times 10^4$  CFU/g and  $2.77 \times 10^4$  CFU/g in M2, confirming that 96% of the analyzed samples exceeded the limits allowed by DS No. 007-2017-MINAGRI (Regulation of Milk and Dairy Products). Furthermore, for Total and Thermotolerant Coliforms, 100% of the analyzed samples exceeded the limits allowed by the same legislation. The moisture content of the artisanal fresh cheeses was  $> 45\%$ , complying with Peruvian standards. The pH ranged from 4.31 to 6.42, and acidity ranged from 0.14% to 0.81% (lactic acid). Therefore, based on the results, we can conclude that 100% of the analyzed samples represent a health risk for consumers. It is important to address this issue as it involves one of the most important value chains in the Cajamarca region, specifically in the Province of Chota, which is dairy products. This study provides essential information highlighting the need to improve the production and sale conditions of dairy derivatives.

**Keywords:** fresh cheese, isolates, microbial population.

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Planteamiento del problema

El sistema de producción de alimentos en el Perú presenta deficiencias en la vigilancia y control sanitario; generando riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). Lo que causa un efecto negativo en el comercio y la salud, por lo que se disminuye el potencial de producción segura de alimentos. Esto se debe en gran medida a las deficientes condiciones higiénico sanitarias en las que se elaboran los productos (Política Nacional de Inocuidad Alimentaria (PNIA), 2016).

Entre ellos, se encuentran los quesos artesanales, generalmente elaborados con leche sin tratamiento térmico, es decir, solamente con leche calentada y en muchos casos con elevados recuentos microbianos (Espinoza et al., 2004). A esto se suma las condiciones inadecuadas de procesamiento, almacenamiento y transporte; así mismo, influye la tecnología, indumentaria, limpieza en los equipos y materiales (Vásquez et al., 2018).

Los quesos frescos artesanales producidos a pequeña escala, con evidentes deficiencias en el procesamiento, sugieren un riesgo potencial de contaminación con patógenos (Pasquali et al., 2022), como, *Listeria monocytogenes* (Espinoza et al., 2004), *Salmomonella spp.*, coliformes totales, *E. coli* (Aguirre, 2016) y *Staphylococcus aureus*, que es una bacteria patógena causante de intoxicación alimentaria (Gebremedhin et al., 2022).

Los quesos frescos, son quesos de textura blanda con humedad elevada, lo que genera alta susceptibilidad a contaminación microbiana, se ha verificado que la humedad tiene correlación con la presencia de coliformes totales (Cruzado-Bravo et al., 2020) debido a que en estas condiciones los microorganismos pueden realizar sus procesos metabólicos de manera satisfactoria.

## 1.2. Formulación del problema

¿Cuál será la población de *Staphylococcus* coagulasa positivos y de coliformes totales y termotolerantes en queso fresco artesanal obtenido en mercados del distrito Chota, Cajamarca?

## 1.3. Justificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021) indica que al año se reportan 600 millones de personas enfermas por consumir alimentos contaminados, en el año 2010 se reportaron 420 000 personas fallecidas por ETAS, siendo un tercio de ellas, niños menores de cinco años. Mientras que, en el Perú, el año 2019 se notificaron 22 brotes de ETA en 12 departamentos a nivel nacional; con un total de 729 personas afectadas, 214 fueron hospitalizadas y 03 fallecieron (Ministerio de Salud (MINSA), 2019).

Los alimentos involucrados como causantes de ETAS son principalmente agua, carne bovina, huevos, carne porcina, carne de aves, pescados, crustáceos, moluscos, o productos lácteos (Rojas-Herrera & González-Flores, 2006).

Los derivados lácteos elaborados con leche cruda son susceptibles a contaminación y proliferación de patógenos como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *E. coli* O157, entre otros (Oliver et al., 2005). Principalmente los quesos frescos artesanales son vulnerables a contaminación por *S. aureus*; este patógeno es causante de mastitis subclínica, siendo esta una causa de contaminación de la leche (Borena et al., 2022). En el Sur de Italia se evidenció que *S. aureus* se encontraba por encima del 17,5% de los límites establecidos por la legislación europea, en quesos frescos (Dambrosio et al., 2018). Así también se sabe que más del 30% de manipuladores de alimentos son portadores de este patógeno que causa intoxicaciones alimentarias (Pasquali et al., 2022).

Mientras que, en queso fresco artesanal comercializado en tres distritos de Lima, según Luján & Valentín (2006) evidenciaron la presencia de Coliformes, *S. aureus* y *E. coli* por encima de los niveles permitidos por la Norma Técnica Peruana. Del mismo modo, (Aguirre, 2016) reporta en Trujillo – Perú la presencia de estos patógenos en niveles no permitidos. Por otro lado, en Cajamarca, de seis muestras de queso fresco, solo una cumplía con los requisitos establecidos en la R.M. N° 591-2008-MINSA (Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano) (Vásquez et al., 2018).

Por otro lado, Martínez et al. (2013); García-Corredor et al. (2015); Guzmán et al. (2015) mostraron que las características fisicoquímicas, especialmente la humedad tiene una relación importante con el desarrollo y crecimiento de los microorganismos en los quesos frescos artesanales.

Por lo tanto, con la información presentada en los párrafos anteriores, indica que existe la necesidad de evaluar de forma cuantitativa los riesgos microbiológicos en productos lácteos, aislando patógenos como *Staphylococcus* coagulasas positivos y determinando la población de coliformes totales y termotolerantes en quesos frescos obtenidos de los mercados del distrito de Chota – Cajamarca. Con el fin de sensibilizar la vigilancia sanitaria y, de esta manera, poder prevenir y controlar las ETAS.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo General**

Aislar *Staphylococcus* coagulasas positivos y determinar la población de coliformes totales y termotolerantes en quesos frescos obtenidos en los mercados del distrito Chota, Cajamarca.

#### **1.4.2. Objetivos Específicos**

Aislar *Staphylococcus* coagulasas positivos presentes en queso fresco artesanal de los mercados del distrito de Chota, Cajamarca.

Determinar la población de coliformes totales presentes en queso fresco artesanal de los mercados del distrito de Chota, Cajamarca, mediante la técnica del Número más probable.

Determinar la población de coliformes termotolerantes presentes en queso fresco artesanal de los mercados del distrito de Chota, Cajamarca, mediante la técnica del Número más probable.

Determinar la humedad, acidez y pH del queso fresco artesanal obtenido de los mercados del distrito de Chota.

Establecer la relación que existe entre la población microbiana de *Staphylococcus* coagulasas positivos, coliformes totales y termotolerantes con la humedad, acidez y pH del queso fresco artesanal obtenido en mercados del distrito de Chota.

## CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Studentica et al. (2022) realizaron análisis microbiológicos en muestras de queso artesanal de 116 plantas, los mismos que son vendidos en mercados informales de Kosovo. Los resultados muestran incidencia en 64,7% *E. coli*, 39,7% *S. aureus* y 3,4% *L. monocytogenes*. Estos datos sugieren que las instituciones de la salud pública deben de implementar sistemas que permitan mejorar la seguridad de los alimentos que se venden en los mercados informales, particularmente en productos artesanales como el queso.

Por otro lado, Pasquali et al. (2022), mediante el análisis microbiológico de 720 muestras de queso blando artesanal italiano, encontraron elevadas concentraciones de bacterias de *Salmonella*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *H. alvei* y *C. freundii*. Por lo que sugieren la necesidad de centrar la atención en la estandarización del proceso desde el ordeño hasta el producto final. Además, de prestar atención a la identificación de las especies del género Enterobacteriaceae. Así mismo, instan a realizar estudios para investigar la patogenicidad potencial y la resistencia antimicrobiana de la especie en mención aislada de quesos artesanales.

Mientras que en Colombia Merchán et al. (2019) analizó 31 muestras de queso artesanal, determinando en promedio  $6 \times 10^6$  UFC/g aerobios mesófilos,  $6,29 \times 10^5$  UFC/g coliformes totales;  $3,99 \times 10^5$  UFC/g de coliformes termotolerantes,  $1,6 \times 10^5$  UFC/g *S. aureus*. Corroborando la presencia de *S. aureus* y elevados recuentos de coliformes totales y termotolerantes.

Así también, Idarraga-Molina et al. (2018) analizaron quesos frescos provenientes de diferentes municipios del departamento del Quindío (Colombia), obteniendo poblaciones de  $7,4 \pm 0,74$  Log<sub>10</sub> UFC/g en coliformes totales y  $6,45 \pm 0,43$  Log<sub>10</sub> UFC/g para *S. aureus*. Además, se

confirmó la presencia de *E. coli* en todas las muestras analizadas. Los valores reportados nos indican deficiencias higiénico sanitario en el proceso de elaboración.

En Perú Aguirre (2016) evaluó la calidad microbiológica en quesos frescos y la relación con su vida útil. El estudio se realizó en quince puestos de venta de los mercados: Mayorista, Hermelinda y Central, pertenecientes a Trujillo; se recolectaron 25 g de muestra por triplicado. Los resultados reportan que las Coliformes totales, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* superan los límites establecidos por la Norma Técnica Peruana 2008, con la presencia de *Salmonella*. Los quesos frescos de estos centros de abastos representan un riesgo para la salud del consumidor, así mismo, el autor indica que existe una relación significativa entre la carga microbiana y la vida útil de los quesos frescos, concluyendo que, si la concentración microbiana aumenta el tiempo de vida útil disminuye.

Luján & Valentín (2006) evaluaron la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales comercializados en tres distritos de Lima-Perú, con el fin de obtener información que permita evaluar el riesgo que este alimento puede representar en la salud de sus consumidores. Para esto, se evaluaron 30 muestras de queso fresco artesanal aislando e identificando *Staphylococcus aureus* mediante siembra directa en placa baird parker y aplicando pruebas de producción de coagulasa y nucleasa termoestable. Los resultados muestran que los valores en *Staphylococcus aureus* de 24 muestras (80 %), se encontraban en  $10^5$  UFC/g superando el límite superan los límites máximos permitido por la Norma Técnica Peruana 202.087 lo que demuestra que existen carencias sanitarias en la comercialización del producto generando la sospecha de la existencia de enterotoxinas, responsables de la intoxicación estafilocócica lo que representa un riesgo para la salud pública.

Vásquez et al. (2018) realizaron un estudio en queso fresco industrial proveniente de las principales empresas de la ciudad de Cajamarca, con el objetivo de determinar la carga microbiana. Se analizaron las 30 muestras provenientes de 6 empresas productoras. Los resultados mostraron que la población bacteriana fue de  $1,06 \times 10^5$  UFC/g en mesófilos aerobios viables,  $6,32 \times 10^3$  NMP/g coliformes totales;  $4,75 \times 10^3$  NMP/g coliformes termotolerantes; 33,3% de muestras positivas para *E. Coli* y  $4,02 \times 10^3$  UFC/g *S. aureus*. Demostrando que solo una de las seis empresas se encuentra dentro de los límites máximos establecidos por la norma nacional peruana R.M. N° 591-2008-MINSA.

## **2.2. Bases Teórico - Científicas**

### **2.2.1. Sistemas de control alimentario**

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) establece que los sistemas nacionales de control alimentario velan por que los alimentos disponibles en un país sean inocuos, sanos y aptos para el consumo humano. Las empresas alimentarias de todo el mundo son las encargadas de implementar sistemas de calidad y seguridad alimentaria (FSS) para mejorar la calidad y la seguridad de sus productos (Kafetzopoulos & Gotzamani, 2014).

Así mismo, las legislaciones de cada país, son un pilar fundamental dentro de los sistemas de control de alimentos. Establecidas con el objetivo de proteger al consumidor de las enfermedades transmitidas por los alimentos (Shukla et al., 2018). Estas se definen como “el acervo completo de textos jurídicos (leyes, reglamentos y normas) que establecen principios generales para el control de los alimentos en un país y que regulan todos los aspectos de la producción, manipulación y comercialización de los alimentos como medio de proteger a los consumidores frente a prácticas peligrosas y fraudulentas (FAO, 2007).

### **2.2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos**

Las ETAS son un conjunto de enfermedades que se producen cuando se ingiere un alimento contaminado incluido el agua; los principales contaminantes son bacterias, agentes químicos, parásitos (Díaz et al., 2016), factores físicos o por factores tecnológicos (Garcinuño-Martínez, 2017). Al ser un tema recurrente, se considera un problema de salud pública, que afecta de manera individual y colectiva a la población (Marín et al., 2020).

Entre los principales microorganismos patógenos involucrados en ETAS se encuentran *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* y *Toxoplasma gondii* (Reuben et al., 2003).

### **2.2.3. Queso**

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, que puede estar recubierto; la proporción entre las proteínas de suero y la caseína, no deben de ser superior a la de la leche. Se obtienen mediante la coagulación total o parcial de la proteína de la leche por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos (Norma General para Queso CXS 283-1978, 2018).

Los tipos de queso son: los maduros, que se consume después de ser sometido a periodos de maduración por tiempos prolongados bajo condiciones controladas, entre estos se encuentra el queso madurado por mohos; los sin madurar, se consumen poco después de su fabricación (CXS 283-1978, 2018).

#### **2.2.3.1. Queso fresco**

El queso fresco es un producto que no ha sido sometido a ningún tipo de maduración y que está listo para ser consumido poco después de su elaboración (CXS 283-1978, 2018).

En la Tabla 1 se describe la composición química del queso fresco en el Perú los valores se expresan por cada 100 g.

**Tabla 1**

*Composición química del queso fresco (100 g)*

<b>Propiedad</b>	<b>Unidades</b>	<b>Cantidad</b>
Energía	(Kcal)	264
Agua	g	55,0
Proteínas	g	17,5
Grasa total	g	20,1
Carbohidratos totales	g	3,3
Carbohidratos disponibles	g	3,0
Cenizas	g	4,1

*Nota:* datos tomados de Tablas Peruanas de Composición de Alimentos por García- Reyes et al. (2017).

**a) *Proceso de elaboración de queso fresco artesanal en Chota-Cajamarca***

Para describir el proceso de la elaboración del queso fresco artesanal en Chota, nos basamos en la información de los productores artesanales locales (comunicación personal, 10 marzo de 2023), por ello, se consideró la descripción de las siguientes operaciones de recepción, termización, coagulación, moldeo y desuerado; así mismo, los procesos de producción no están estandarizados. A continuación, se describe el proceso de elaboración de queso fresco artesanal.

**Recepción.** En esta operación se realiza el filtrado en coladores domésticos de plástico, con el fin de eliminar las impurezas que contenga la leche.

**Termización de la leche.** Si la leche llega fría después del ordeño se procede a calentar, el tiempo no se tiene en cuenta, se considera la experiencia del productor.

**Coagulación.** En esta operación se adiciona el cuajo de origen natural o industrial en dosis establecidas por el fabricante.

**Moldeo y desuerado.** El moldeo se realiza manualmente, introduciendo las manos en el balde, aplastando los coágulos hasta el fondo del recipiente, una vez que se ha logrado cohesionar todos los coágulos visibles, se retira la masa formada y se deposita en una panera para dejar desuerar. Este producto se denomina quesillo.

**Molienda.** Antes de introducir al molino, el quesillo es cortado en trozos medianos. Luego cada trozo es molido, siendo esta operación manual o mecánica.

**Salado y prensado.** Una vez que se ha obtenido el quesillo molido se adiciona sal y se mezcla. Seguido se deposita en telas de tocuyo dispuestas en moldes de corteza de eucalipto. Finalmente se coloca peso sobre los moldes hasta obtener un desuerado parcial. Esta también es la presentación del producto final, sin usar ningún empaque adicional.

#### **b) *Requisitos microbiológicos para queso fresco en Perú***

Los requisitos microbiológicos para el queso fresco, dentro de la legislación de Perú se rigen bajo el Decreto Supremo N° 007-2017- MINAGRI (MINAGRI, 2017) tal como se muestra en la tabla 2. En esta se indican los límites mínimos y máximo en Coliformes, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*

**Tabla 2***Requisitos microbiológicos del queso fresco*

Agente microbiano	Unidad	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
						m	M
<i>Coliformes</i>	UFC/g	5	3	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$
<i>Salmonella sp.</i>	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	-
<i>Escherichia coli</i>	NMP/g	6	3	5	1	3	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/g	7	3	5	2	10	$10^2$
<i>Listeria Monocytogenes</i>	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	-

*Nota:* Tomado del Decreto Supremo N° 007-2017- MINAGRI por MINAGRI (2017). La letra “**n**” indica: Número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis, que se eligen separada e independientemente; “**c**”: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o unidades de muestra provisionalmente aceptables en un plan de muestreo de 3 clases; “**m**”: Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a “m”, representa un producto aceptable y los valores superiores a "m" indican lotes rechazables en un plan de muestreo de 2 clases; “**M**”: Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

### 2.2.3.2. Microorganismos patógenos asociados a quesos

Los quesos son productos tradicionales ampliamente consumidos en todo el mundo y que con frecuencia se han visto implicados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Possas, et al, 2021).

Los microorganismos presentes dependen de diversos factores como: la alimentación de los animales, condiciones de producción, calidad del agua, la temperatura y el tiempo de

almacenamiento del queso. Siendo: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* los más recurrentes. Por otro lado, encontramos a *Yersinia enterocolitica* y *Brucella spp.*, *Coxiella burnetii*, entre otros (Yoon et al., 2016) como microorganismos medianamente asociados. Así también, *Bacillus spp.* y *Clostridium spp.* son géneros bacterianos formadores de esporas que representan un problema en toda la cadena láctea, afectando tanto la seguridad microbiológica como la calidad físico química de los quesos (Oliveira et al., 2016).

### **c) Staphylococcus como indicador de contaminación**

*S. aureus* es una bacteria gran positiva que con frecuencia puede causar mastitis en animales lecheros a nivel mundial. Es un patógeno oportunista importante de la leche cruda y la enterotoxina causa una intoxicación alimentaria importante (Kou et al., 2021). Para inactivar este microorganismo se realiza la pasteurización, sin embargo, este procedimiento no es efectivo con las enterotoxinas que han sido previamente sintetizadas (Johler et al., 2015).

Se dividen en estafilococos coagulasa positivos (COPS) y estafilococos coagulasa negativos (CNS). Entre los COPS, *S. aureus* es considerado como un patógeno transmitido por los alimentos (Leroy et al., 2016).

El agar usado a menudo para determinar COPS es Baird-Parker, con incubación a 37 °C durante 48 horas. El medio contiene un suplemento de yema de huevo y telurito. Presentando colonias de color negro grisáceo y brillantes, con presencia de halo (a menudo descrita como colonias de "ojo de conejo"). Sin embargo, las cepas bovinas, en particular, no siempre producen esta zona y se necesitan pruebas de confirmación (Rigarlsford, 2007).

**d) Coliformes como indicador de contaminación.** La presencia de coliformes en el queso es un indicio de mala higiene, porque la pasteurización mata las bacterias coliformes presentes en la leche cruda. Los coliformes crecen rápidamente en el queso durante los primeros días de almacenamiento. Los metabolitos de los coliformes incluyen ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico, etanol, 2,3-butilenglicol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Fakye, 1999).

**Coliformes totales:** Es un indicador de contaminación cuando se detecta su presencia en alimentos como el queso fresco, constituyendo un riesgo para la salud del consumidor (Idarraga-Molina et al., 2018). Este es un indicador de deficientes condiciones higiénicas en la elaboración, transporte o comercialización (Vásquez et al., 2018). Los coliformes totales son capaces de crecer a 37°C en presencia de sales biliares (utilizadas para inhibir bacterias no intestinales) y capaces de producir ácido y gas a partir de la lactosa (Horan, 2003).

**Coliformes termotolerantes.** Son un subgrupo de los coliformes totales, se encuentran en los intestinos de los animales de sangre caliente, como mamíferos incluyendo al ser humano. Son capaces de crecer y fermentar lactosa a 44,5°C, y de producir indol a partir de triptófano (Horan, 2003).

***E. coli.*** La *E. coli* productor de la toxina Shiga (STEC), es un patógeno generalizado asociado con enfermedades graves transmitidas por los alimentos. A través de la materia fecal podría contaminar la leche, si durante el proceso de ordeño no se cuenta con las medidas adecuadas; además, puede sobrevivir o crecer durante la elaboración del queso si no se ha aplicado un tratamiento de pasteurización (Condoleo et al., 2022).

**e) *Salmonella spp.*** *Salmonella* es un patógeno zoonótico de importancia mundial en el hombre y los animales. Los quesos blandos elaborados con leche no pasteurizada o con el tratamiento térmico insuficiente, pueden estar contaminado con esta bacteria, provocando grandes

brotos de salmonelosis en humanos. La leche puede estar contaminada con Salmonella a través de materia fecal, equipos contaminados, polvo y otras fuentes ambientales (Poppe, 2011). El patógeno se transmite por vía fecal-oral y se ve facilitado por malas condiciones higiénicas, falta de agua potable y saneamiento deficiente (Graziani et al., 2017).

f) ***Listeria monocytogenes***. Es un patógeno transmitido por los alimentos que causa un grupo de enfermedades humanas llamadas colectivamente listeriosis. La listeriosis humana se adquiere principalmente por la ingestión de alimentos listos para el consumo (RTE) contaminados con este patógeno (Magalhães et al., 2014). El microorganismo está ampliamente distribuido en el medio ambiente, los animales y los humanos tienen frecuente contacto (Rodríguez-Lázaro & M. Hernández, 2014). Sin embargo, no resiste al calor, siendo eliminado mediante pasteurización convencional de la leche (Holley & Cordeiro, 2014).

### **2.2.3.3. Métodos de recuento de microorganismos**

El recuento de crecimiento de microorganismos permite tener una estimación muy precisa de la población microbiana, diferenciando la presencia de desechos o células muertas. Una de las formas más precisas de determinar el número microbiano en la población clonal, es contar un subconjunto de la población microbiana y escalar ese número para dar una concentración para toda la población. Por lo general, este procedimiento se realiza produciendo una serie de diluciones (las diluciones en serie suelen ser logarítmicas, es decir, 10 veces). Luego, las diluciones se agregan a un agar y se incuban en condiciones de crecimiento óptimas para permitir el crecimiento microbiano y la formación de colonias (Brown, 2022).

Existen dos métodos principales para el conteo y cuantificación de microorganismos, uno de los métodos es el conteo manual, el otro es el conteo de análisis de imágenes por computadora (Rajapaksha et al., 2019). El conteo manual incluye principalmente el método de conteo en placa,

hemocitometría y turbidimetría. En el método de conteo en placa, las bacterias se colocan en un medio adecuado y luego se espera que se conviertan en colonias. Después de eso, se cuenta el número de colonias. La ventaja del método de conteo en placa es que se puede estimar el número de bacterias vivas (Zhang et al., 2022).

Los métodos de conteo de colonias expresan las concentraciones como el número de unidades formadoras de colonias en cada ml del cultivo microbiano inicial o "UFC/ml". El término "unidad formadora de colonias" se usa con preferencia a un valor de células/ml ya que, aunque se supone que cada colonia en la placa se deriva de una sola célula, esto no se conoce directamente (Brown, 2022).

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de siembra}}$$

#### **2.2.3.4. Método del Número Más Probable (NMP)**

El número más probable (NMP) es un método estadístico utilizado para estimar el número viable de bacterias en una muestra, mediante la inoculación de caldo en diluciones de 10 y se basa en el principio de dilución de extinción. A menudo se usa para estimar las células bacterianas en el agua y los alimentos. Sin embargo, el método solo es capaz de enumerar organismos viables (Karunasagar et al., 2018).

Para entender los resultados de NMP se considera el período de incubación debe ser el adecuado. En este momento, se examina cada porción de la muestra original para detectar la presencia de crecimiento bacteriano visible o subproductos metabólicos, según el método de detección utilizado en el procedimiento. El volumen total de la muestra que demuestra el crecimiento bacteriano es proporcional al número de bacterias por mililitro en las muestras originales (Chandrapati & Williams, 2014).

$$NMP\ g^{-1} = \frac{P}{(N \times T)^2}$$

Donde: “P” es el número de submuestras positivas (p. ej., tubos o micropocillos), N es la cantidad de inóculos (g) en los tubos negativos y T es la cantidad total de inóculos (g) en todos los tubos. Los resultados se informan como MPN g<sup>-1</sup>.

## **2.3. Marco conceptual**

### **2.3.1. *Bacteria***

Las bacterias son los organismos vivos más numerosos en la tierra en términos de número de especies, número de organismos y masa total de organismos. Cada célula es pequeña, normalmente de 1 a 2 μm de diámetro (Schroeder & Wuertz, 2003).

### **2.3.2. *Coliformes***

Los coliformes son bacterias gram negativas oxidasa negativas, no formadoras de esporas, aerobias o anaerobias facultativas con forma de bastoncillo (Eden, 2014).

### **2.3.3. *Queso fresco artesanal***

Es un tipo de queso usando quesillo de leche no pasteurizada, con posterior molienda, salado y prensado en telas de tocuyo en moldes de corteza de Eucalipto. El queso de color blanco y con elevada humedad.

### **2.3.4. *NMP***

La técnica del número más probable (NMP) se utiliza para detectar el número de microorganismos de los alimentos, especialmente cuando el número de microorganismos es inferior a 10 g o ml de muestra (Erkmen, 2021).

### **2.3.5. *Unidad Formadora de Colonias (UFC)***

Es una medida del número de células colonogénicas viables en UFC/ml. Estos son una indicación del número de células que permanecen lo suficientemente viables como para proliferar y formar pequeñas colonias (Sundararajan, 2014).

### **2.3.6. Recuento en placa**

El conteo de platos aeróbicos también se conoce como recuento estándar en placa, recuento aerobio mesófilo, recuento total en placa o recuento de colonias aerobias. Se utiliza para estimar la población bacteriana en una muestra de alimentos (Mendonca et al., 2020).

### **2.3.7. Patógeno**

Un patógeno generalmente se define como un microorganismo que causa o puede causar una enfermedad (Pirofski & Casadevall, 2012)

### **2.3.8. Humedad**

La humedad relativa de equilibrio (ERH) de un producto alimenticio se define como la humedad relativa del aire que rodea al alimento que está en equilibrio con su entorno (Kong & Singh, 2011).

### **2.3.9. Acidez titulable**

Es la concentración total de ácido contenida en un alimento. Se determina mediante titulación exhaustiva de ácidos intrínsecos con una base estándar (Sadler & Murphy, 2010).

### **2.3.10. pH**

Se define como el logaritmo negativo de la actividad del ion hidrógeno:  $[H^+]$ :(14.5)  $pH = -\log[H^+]$ . En la práctica, se mide con un medidor de pH, este se calibra en diferentes puntos por medio de las soluciones (Vallero, 2008).

## 2.4. Hipótesis

El tipo de investigación no se ajusta a generar hipótesis por ser un estudio no experimental descriptivo y cuantitativo, los datos se reportaron tal y como fueron encontrados.

## 2.5. Operacionalización de variables

En el estudio no se manipularon las variables, es por ello que no se cuentan con variables independientes ni dependientes. Además, al ser no experimental de nivel descriptivo solo se tuvo en cuenta dos variables de estudio tal como se observa en la tabla 3.

**Tabla 3**

*Operacionalización de variables*

<b>Variable independiente</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Indicador</b>	<b>Método</b>
V <sup>1</sup> =Análisis microbiológico de queso fresco artesanal	Procedimientos usados para determinar la población microbiana presente en el queso fresco	Población de Coliformes totales	UFC/g	NMP
		Población de coliformes termotolerantes	UFC/g	NMP
		Población de <i>Staphylococcus coagulasa</i> positivas	UFC/g	Recuento en placa
V <sup>2</sup> =Análisis fisicoquímico de queso fresco artesanal	Protocolos usados para determinar las características físicas y químicas de los quesos frescos	Humedad	%	Secado en estufa
		pH	-----	Lectura con pH-metro
		Acidez	% ácido láctico	Titulación

### CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Tipo y nivel de investigación

Según su finalidad la investigación fue de tipo básica porque busca crear conocimiento.

El nivel de la investigación fue descriptivo ya que se ha obtenido información cuantitativa que respalda el objetivo de la investigación, además, permitió especificar los agentes patógenos y las características fisicoquímicas que están presentes en el queso fresco artesanal.

#### 3.2. Diseño de investigación

La investigación se realizó siguiendo un diseño no experimental transeccional, así mismo las variables no fueron manipuladas.

En un diseño fue no experimental no se realizó la manipulación de variables, solo se observó y se analizó en un momento dado; el propósito principal fue la descripción de las variables (Hernández et al., 2016).

#### 3.3. Métodos de investigación

En el presente estudio se aplicó el método cuantitativo porque los análisis microbiológicos y fisicoquímicos permitieron determinar la población microbiana de patógenos presentes en el queso fresco artesanal de ambos mercados del distrito e Chota.

#### 3.4. Población, muestra y muestreo

**Población:** La población estuvo representada por los puestos de venta de queso fresco artesanal de dos mercados: “Mercado 1- Mercado Central” (n=17) y “Mercado 2” (Mercado Mayorista Julio Vásquez Acuña) (n=5), ubicados en el distrito de Chota, Cajamarca-Perú.

**Muestra:** Se compró 01 queso fresco artesanal (~200 g) por cada puesto de venta en los mercados: “Mercado 1” y “Mercado 2”, del distrito de Chota, Cajamarca. Este proceso se realizó

3 veces, en semanas diferentes, las muestras fueron compradas por la mañana. En total se compraron n=66 muestras de queso fresco completos sin ser fraccionados.

**Muestreo:** Se aplicó un muestreo convencional no probabilístico de muestras representativas. Al ser un estudio de ocurrencia se buscó solo determinar la población microbiana y las características fisicoquímicas de los quesos frescos ofrecidos en los distintos puestos de venta de los dos mercados de la ciudad de Chota, Cajamarca-Perú.

### **3.5. Técnicas de procesamiento y recolección de datos**

#### **3.5.1. *Recolección de quesos frescos***

Durante la compra se registró la fecha, la hora, temperatura y la procedencia. Las muestras fueron colocadas en bolsas herméticas esterilizadas y se transportaron en cajas térmicas manteniendo 4 °C hasta el análisis respectivo, estos se efectuaron en el laboratorio de Microbiología y biotecnología Agroindustrial, Campus Colpa Huacaris, Universidad Nacional Autónoma de Chota.

#### **3.5.2. *Aislamiento de Staphylococcus Coagulasas Positivos (COPS)***

Se pesó 25 g de muestra de queso fresco y se diluyó en 225 ml de agua peptonada 0,1 % esterilizada (APE), siendo esta la dilución  $10^{-1}$  homogenizada durante 1 min. A partir de esta se hicieron diluciones decimales sucesivas, mezclando 1 ml de la dilución anterior en 9 ml APE 0,1% (García Fontán et al., 2006) hasta alcanzar 5 diluciones. De cada dilución se tomó 0,1 ml y se transfirió a placas con agar Baird Parker (por duplicado), dejando incubar a 35°C por 48 h (Vásquez et al., 2018).

#### **3.5.3. *Recuento de colonias presuntivas de Staphylococcus Coagulasas positivos***

La lectura se realizó en las placas que contenían de 20 a 250 colonias, se contaron las típicas para *S. aureus* (colonias negras con halo transparente). Dos colonias típicas se seleccionaron y se

inocularon en 5 ml en caldo infusión cerebro corazón (BHI) dejando incubar a 35°C durante por 18 h para posterior verificación bioquímica y morfológica (Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización (INEN), 2013).

#### **3.5.4. Prueba de catalasa a los aislados de *Staphylococcus***

Se tomó una alícuota (~20 µL(aprox.)) de los tubos con crecimiento microbiano y se depositó en una lámina portaobjetos, en seguida se añadió una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%). Pasado 30s se procedió a realizar la lectura, se tomó como muestras positivas a las que formaron burbujas (Hidalgo-García et al., 2011) .

#### **3.5.5. Prueba de coagulasa a los aislados de *Staphylococcus***

Esta prueba se realizó añadiendo 40 µL del caldo de BHI con crecimiento en 100 µL de plasma de conejo, se agitó suavemente para homogenizar y se incubó a 37°C por 6h. Las muestras positivas CPS 3 + y +4 presentaron un coágulo bien diferenciado, ocupando más de los ¾ del volumen original del líquido (da Silva et al., 2010).

#### **3.5.6. Determinación de coliformes totales en los quesos frescos artesanales**

Se diluyeron 25 g de queso fresco en 225 ml en APP al 0,1 % esterilizada (APE) y posterior dilución hasta 10<sup>-5</sup>. Se sembró 1ml de las 3 últimas diluciones en tubos con 7 ml de caldo lactosado verde brillante bilis 2% y se incubaron a 35 °C por 48 h (COVENIN 1104:1996, 1996). Pasado este tiempo se procedió a dar lectura, para esto se verificó la presencia de gas y turbidez, siendo indicador de un tubo positivo. Los valores obtenidos fueron comparados con tabla NMP (3 series de 3 tubos) (da Silva et al., 2010), estos resultados se expresaron en NMP/g, para su posterior comparación con el DS N°007-2017 MINAGRI.

### 3.5.7. *Determinación de coliformes termotolerantes en los quesos frescos artesanales*

Esta prueba se realizó de acuerdo a la metodología establecidas por (COVENIN 1104:1996, 1996) con algunas modificaciones, con los tubos positivos obtenidos de la prueba anterior (tubos de caldo lactosado verde brillante bilis 2%), se tomó una alícuota (~20 µL) y se sembró en tubos con 7 ml de Caldo *E. Coli* (E.C) y se incubó a 44,5°C por 24 h.

Los tubos con producción de gas y turbidez, fueron considerados como positivos y con los valores obtenidos se siguió la metodología del ítem anterior (3.5.6).

### 3.5.8. *Determinación de humedad en los quesos frescos*

Esta característica física de los quesos frescos artesanales se determinó aplicando el método 926.08 de la A.O.A.C. (1995). Para esto se pesó 5 g de muestra en cajas de Petri, haciendo uso de una balanza analítica y se secaron en estufa a 105 °C hasta humedad constante, finalmente se dejó en el desecador por 30 min y se procedió a realizar el cálculo correspondiente. Esta prueba se realizó por triplicado.

$$\text{Humedad} = \frac{M_H - M_s}{M_H}$$

$M_H$ = Peso en gramos de masa húmeda

$M_s$ = Peso en gramos de masa seca

### 3.5.9. *Determinación acidez en los quesos frescos artesanales*

Se determinó mediante el método 16.267 de la A.O.A.C. (2000). Para ello se usó de 2-3 gotas de fenolftaleína y luego se tituló con NaOH 0,1 N. Los valores obtenidos fueron expresados en ácido láctico/100g (%). La determinación se realizó por triplicado.

0,1 ml NaOH 0,1 N=0,090 g ácido láctico

### **3.5.10. Determinación de pH en los quesos frescos artesanales**

En este procedimiento se aplicó lo descrito en la NMX-F-317-S-1978 (1978), para esto se tomó 10 g de la muestra de queso fresco artesanal, luego se homogenizó con 100 ml agua a 40°C, se filtró y se tomó 25 ml del líquido filtrado para dar lectura con el potenciómetro. El análisis se realizó por triplicado.

### **3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

Los datos obtenidos del análisis microbiológico como recuento en placa y NMP se obtuvieron de acuerdo a las metodologías expuestas en los ítems (3.5.3, 3.5.6 y 3.5.7), así también los datos de los análisis fisicoquímicos (3.5.8 al 3.5.10), fueron obtenidos siguiendo las respectivas metodologías.

Con los resultados se procedió a realizar una base de datos, para su análisis correspondiente, ordenando en tablas y figuras, teniendo en cuenta los objetivos planteados en la investigación. Para el análisis microbiológico se calcularon los valores promedios solo de los *Staphylococcus* COPS y de los coliformes termotolerantes, para el caso de los Coliformes totales, por superar los valores de la NMP/g, no se realizó el cálculo. En cuanto al análisis fisicoquímico como las lecturas se tomaron por triplicado se procedió a calcular los valores promedios junto con la desviación estándar. Los datos fueron procesados en Microsoft Excel 2016.

Finalmente, tanto los datos microbiológicos como físicos químicos fueron comparados con el DS-007-2017 MINAGRI para determinar si los quesos expandidos estaban aptos para el consumo humano.

### **3.7. Aspectos éticos**

Se aplicaron las recomendaciones en buenas prácticas de laboratorio de microbiología, establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2013). Entre los aspectos que se

tuvieron en cuenta fueron los siguientes: personal de laboratorio, seguridad biológica, manipulación e identificación de muestras, manejo de equipos, reporte de los resultados, entre otros.

## CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Descripción de resultados

#### 4.1.1. Resultados del análisis microbiológico a los quesos frescos analizados

Los resultados del análisis microbiológico (*Staphylococcus* COPS, Coliformes totales y Coliformes termotolerantes) del Mercado Central (M1) se muestran en la tabla 4, los valores reportados corresponden a 51 muestras de quesos frescos artesanales analizados.

**Tabla 4**

*Resultados del análisis microbiológico- M1*

<i>Código de muestra</i>	<i>Staphylococcus COPS</i>	<i>Coliformes totales</i>	<i>Coliformes termotolerantes</i>
	UFC/g	NMP/g	NMP/g
Q1	$2,60 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^3$
Q2	$1,15 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3$
Q3	$6,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$
Q4	$2,50 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$
Q5	$1,50 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
Q6	$1,00 \times 10^3$	$>1,50 \times 10^4$	$7,4 \times 10^2$
Q7	$9,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$
Q8	$2,35 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^5$
Q9	$2,05 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$
Q10	$8,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$7,4 \times 10^2$
Q11	$2,05 \times 10^4$	$>2,90 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$
Q12	$1,70 \times 10^4$	$>2,90 \times 10^4$	$9,2 \times 10^2$
Q13	$3,55 \times 10^4$	$>2,30 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$
Q14	$1,30 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$2,3 \times 10^2$
Q15	$4,90 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$
Q16	$4,00 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$

Q17	$1,65 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$2,9 \times 10^2$
Q18	$1,50 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3$
Q19	$2,30 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^5$
Q20	$7,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$
Q21	$2,50 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q26	$9,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q27	$3,25 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q28	$6,10 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q29	$6,15 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$9,2 \times 10^2$
Q30	$2,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
Q31	$2,50 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q32	$5,35 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
Q33	$5,25 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^4$
Q34	$1,55 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
Q35	$1,05 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
Q36	$2,40 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
Q43	$1,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q44	$1,45 \times 10^3$	$2,40 \times 10^4$	$<300$
Q45	$1,50 \times 10^3$	$2,90 \times 10^4$	$<300$
Q46	$2,40 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$7,5 \times 10^3$
Q47	$1,85 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$9,2 \times 10^2$
Q48	$2,70 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$
Q51	$1,85 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$9,3 \times 10^3$
Q52	$5,50 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3$
Q53	$2,10 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$9,2 \times 10^2$
Q54	$6,85 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q55	$6,30 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q56	$1,70 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$
Q57	$2,10 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$
Q61	$3,60 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$9,20 \times 10^2$
Q62	$1,50 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$

Q63	$1,53 \times 10^5$	$>1,10 \times 10^5$	$2,30 \times 10^3$
Q64	$1,35 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$9,20 \times 10^2$
Q65	$1,40 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$
Q66	$<10$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$

Mientras que los resultados del análisis microbiológico (*Staphylococcus* COPS, Coliformes totales y Coliformes termotolerantes) del Mercado Julio Vásquez Acuña (M2) se muestran en la tabla 5, siendo analizados 15 muestras de quesos frescos artesanales.

**Tabla 5**

*Resultados del análisis microbiológico-M2*

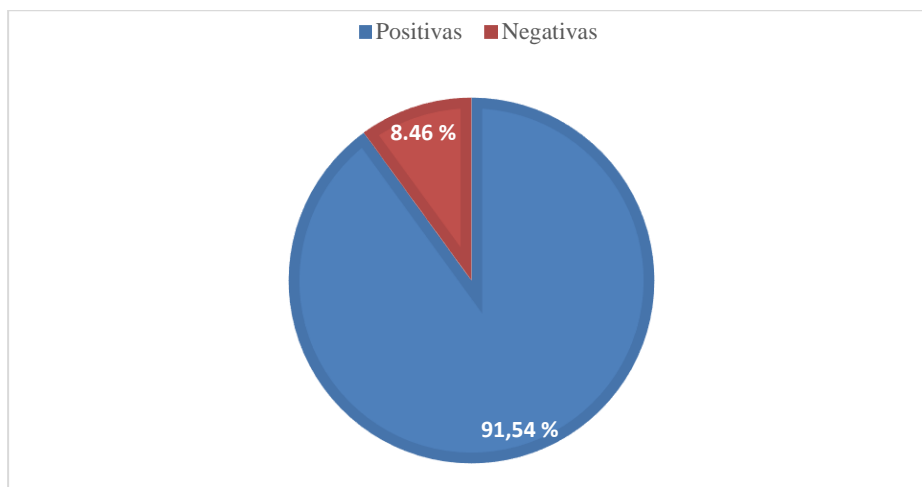
Código de muestra	<i>Staphylococcus</i>	Coliformes	Coliformes
	COPS	totales	termotolerantes
	UFC/g	NMP/g	NMP/g
Q22	$3,00 \times 10^4$	$>1,60 \times 10^4$	$3,80 \times 10^3$
Q23	$1,70 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$
Q24	$4,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^6$	$<300$
Q25	$9,00 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^6$	$3,60 \times 10^2$
Q37	$4,05 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$
Q38	$5,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$
Q39	$4,50 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q40	$1,80 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$
Q41	$3,50 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$2,30 \times 10^3$
Q42	$4,00 \times 10^2$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q49	$2,35 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$2,30 \times 10^3$

Q50	$9,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q58	$9,00 \times 10^3$	$>1,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$
Q59	$4,40 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$	$<300$
Q60	$6,50 \times 10^4$	$>2,40 \times 10^4$	$<300$

La figura 1 muestra los resultados de la prueba de catalasa realizada a 130 aislados de *Staphylococcus*. Del total de colonias de aislados analizadas el 8,46 % resultaron negativos a la prueba, mientras que el 91,54% dieron positivo. Esta prueba se utilizó como filtro para realizar la prueba de coagulasa, siendo llevadas a la prueba antes mencionada los aislados positivos a catalasa.

### Figura 1

*Resultados de la prueba de catalasa aplicados a los aislados de Staphylococcus*



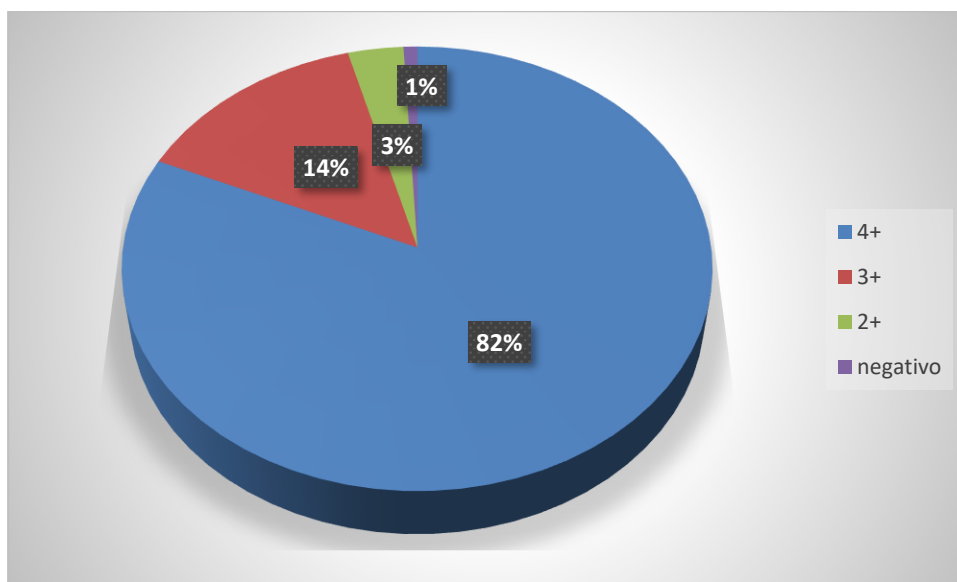
*Nota.* La figura muestra el porcentaje de los aislados de *Staphylococcus* que dieron positivo a la prueba de catalasa. Tomando como base a las 65 muestras de queso fresco que presentaron crecimiento de colonias.

En la figura 2 se muestran los resultados de las pruebas coagulasa realizados a los 120 aislados de *Staphylococcus* que dieron positivo a la prueba de la catalasa. Del total de aislados

sometidos a la prueba, el 82% presentó la calificación 4+ y 14% de 3+, por lo tanto, el 96% de los aislados analizados fueron *Staphylococcus* COPS.

## Figura 2

*Resultados de la prueba de coagulasa aplicados a los aislados de Staphylococcus*



*Nota.* La figura muestra el porcentaje de los aislados de *Staphylococcus* que dieron positivo a la prueba de coagulasa. 2+, 3+ y 4+ indican como estuvo constituido el coágulo; solo los tubos con coágulo 3+ y 4+ se consideran positivas.

En la tabla 6 muestra los valores promedios por cada microorganismo encontrados en los mercados del distrito de Chota.

**Tabla 6**

*Valores microbiológicos promedios de los Mercados 1 y 2 del distrito de Chota*

Mercado	N° Muestras	Staphylococcus	Coliformes	Coliformes
		COPS	totales	termotolerantes
		UFC/g	NMP/g*	NMP/g
		(Promedio)	(Promedio)	(Promedio)
Mercado 1	n = 51	4,13 x 10 <sup>4</sup>	-----	4,71 x 10 <sup>2</sup>
Mercado 2	n = 15	2,77 x 10 <sup>4</sup>	-----	8,24 x 10 <sup>2</sup>
Total	<b>n = 66</b>			

*Nota.* \*No se muestran los valores promedios de coliformes totales porque superan el número más probable indicado en la tabla (Anexo 4) y no se puede realizar el cálculo correspondiente.

En la tabla 7 se encuentra la comparación de valores obtenidos en las muestras de queso fresco analizadas y los valores permitidos en el Decreto Supremo 007-2017 MINAGRI, encontrando que las muestras de queso fresco artesanal analizadas presentaron recuentos de *Staphylococcus* COPS mayores a los indicados por la norma antes mencionada, así mismo el 100% de muestras de queso analizadas presentaron recuentos de coliformes totales y coliformes termotolerantes superiores a los establecidos por la normativa peruana vigente.

**Tabla 7**

*Resultados comparativos en función del Decreto Supremo N°007-2017 MINAGRI*

Mercado	N° Muestras	Staphylococcus		Coliformes totales		Coliformes termotolerantes	
		COPS		Aceptable	Inaceptable	Aceptable	Inaceptable
		Aceptable*	Inaceptable**				
Mercado 1	n = 51	1,96	98,04	0	100	0	100
Mercado 2	n = 15	0	100	0	100	0	100
Total	n = 66	1,51	98,49	0	100	0	100

Nota: \* Indica producto aceptable de acuerdo con el DS N°007 - 2017 MINAGRI

\*\* Indica producto inaceptable de acuerdo con el DS N°007 - 2017 MINAGRI

#### 4.1.2. Resultado del análisis fisicoquímico a los quesos frescos analizados

En la tabla 8 se reportan los resultados de humedad, pH y acidez de las 51 muestras de queso fresco artesanal recogidas del Mercado 1 del distrito de Chota. Teniendo como resultados que el 100 % de muestras presentaron humedad > 46%, el pH estaba entre 4,64 y 5,94 y la acidez 0,20 y 0,81 % de ácido láctico.

**Tabla 8**

*Humedad (%), pH y acidez de las muestras de queso fresco artesanal MI*

Código de muestra	Características fisicoquímicas		
	Humedad (%)	pH	Acidez (% ácido láctico)
	Promedio ± S	Promedio ± S	Promedio ± S
Q1	57 ± 1,25	5,34 ± 0,31	0,54± 0,09
Q2	58 ± 1,38	5,19 ± 0,02	0,72± 0,09
Q3	63 ± 1,14	5,32 ± 0,01	0,63 ± 0,02
Q4	54 ± 0,31	5,30 ± 0,03	0,81 ± 0,10
Q5	63 ± 3,53	5,54 ± 0,02	0,63 ± 0,10
Q6	61 ± 2,63	5,43 ± 0,01	0,39 ± 0,05
Q7	56 ± 1,74	5,44 ± 0,03	0,42 ± 0,05
Q8	63 ± 0,98	5,19 ± 0,01	0,48 ± 0,05
Q9	61 ± 0,70	5,57 ± 0,01	0,48 ± 0,05
Q10	57 ± 2,25	5,24 ± 0,01	0,57 ± 0,02
Q11	58 ± 0,88	5,03 ± 0,02	0,72 ± 0,05
Q12	57 ± 1,40	5,77 ± 0,02	0,30 ± 0,05
Q13	57 ± 0,86	5,39 ± 0,04	0,57 ± 0,02
Q14	56 ± 0,49	5,67 ± 0,05	0,36 ± 0,01
Q15	54 ± 2,93	5,94 ± 0,04	0,27 ± 0,05
Q16	60 ± 4,06	5,56± 0,01	0,24 ± 0,09

Q17	$49 \pm 1,32$	$4,87 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,05$
Q18	$59 \pm 3,93$	$5,24 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,16$
Q19	$60 \pm 0,96$	$5,16 \pm 0,14$	$0,45 \pm 0,10$
Q20	$58 \pm 0,16$	$4,97 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,09$
Q21	$59 \pm 0,69$	$4,86 \pm 0,12$	$0,45 \pm 0,03$
Q26	$59 \pm 0,21$	$5,11 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,03$
Q27	$58 \pm 0,53$	$5,26 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,03$
Q28	$57 \pm 0,97$	$5,44 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,07$
Q29	$58 \pm 0,60$	$5,10 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,03$
Q30	$53 \pm 2,22$	$5,03 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,09$
Q31	$56 \pm 1,49$	$5,45 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,03$
Q32	$58 \pm 0,86$	$5,15 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,08$
Q33	$57 \pm 2,35$	$5,13 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,09$
Q34	$57 \pm 2,63$	$5,11 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,05$
Q35	$54 \pm 1,69$	$5,55 \pm 0,05$	$0,36 \pm 0,09$
Q36	$56 \pm 2,35$	$5,11 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,07$
Q43	$58 \pm 2,70$	$4,88 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,12$
Q44	$51 \pm 1,40$	$4,93 \pm 0,06$	$0,77 \pm 0,12$
Q45	$53 \pm 2,14$	$5,19 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,03$
Q46	$50 \pm 2,26$	$4,91 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,08$
Q47	$52 \pm 0,97$	$5,34 \pm 0,05$	$0,36 \pm 0,02$
Q48	$49 \pm 0,94$	$5,52 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,09$
Q51	$56 \pm 2,22$	$5,47 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,13$
Q52	$53 \pm 2,35$	$5,08 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,03$
Q53	$57 \pm 2,92$	$5,62 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,03$
Q54	$56 \pm 0,81$	$5,04 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,09$
Q55	$51 \pm 0,83$	$5,29 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,03$
Q56	$57 \pm 0,93$	$5,81 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,07$
Q57	$56 \pm 2,13$	$5,64 \pm 0,12$	$0,20 \pm 0,05$
Q61	$56 \pm 1,73$	$5,37 \pm 0,17$	$0,27 \pm 0,05$
Q62	$57 \pm 3,50$	$5,68 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,12$
Q63	$53 \pm 1,89$	$5,45 \pm 0,16$	$0,29 \pm 0,03$
Q64	$55 \pm 3,12$	$4,71 \pm 0,06$	$0,56 \pm 0,03$
Q65	$55 \pm 4,04$	$4,64 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,03$

Q66	$50 \pm 2,75$	$4,90 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,03$
-----	---------------	-----------------	-----------------

Así también, en la tabla 9 se reportan los resultados de humedad, pH y acidez de las 15 muestras de queso fresco artesanal analizadas en el M2, del distrito de Chota. Los análisis fisicoquímicos indican que la humedad obtenida del 100% de muestras analizadas fueron  $> 46\%$ , el pH estaba entre 4,31 y 6,42 y la acidez 0,14 y 0,57 % de ácido láctico.

**Tabla 9**

*Resultados del análisis físico químico M2*

Código de muestra	Análisis físico químico		
	Humedad (%)	pH	Acidez (% ácido láctico)
	Promedio $\pm$ S	Promedio $\pm$ S	Promedio $\pm$ S
Q22	$56 \pm 0,47$	$5,24 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,01$
Q23	$58 \pm 1,11$	$4,92 \pm 0,11$	$0,57 \pm 0,05$
Q24	$56 \pm 0,65$	$4,42 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,09$
Q25	$55 \pm 1,01$	$5,20 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,05$
Q37	$56 \pm 0,25$	$6,42 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,03$
Q38	$55 \pm 0,49$	$5,40 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,07$
Q39	$54 \pm 1,57$	$5,27 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,05$
Q40	$53 \pm 0,48$	$5,23 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,03$
Q41	$52 \pm 1,55$	$5,05 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,09$
Q42	$56 \pm 1,01$	$5,44 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,05$
Q49	$52 \pm 0,63$	$5,38 \pm 0,45$	$0,47 \pm 0,07$
Q50	$48 \pm 3,37$	$5,08 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,11$
Q58	$55 \pm 1,73$	$4,31 \pm 0,12$	$0,21 \pm 0,05$
Q59	$54 \pm 1,32$	$5,56 \pm 0,78$	$0,21 \pm 0,05$
Q60	$55 \pm 1,04$	$5,71 \pm 0,26$	$0,36 \pm 0,19$

## 4.2. Discusiones

### 4.2.1. Análisis microbiológico del queso fresco artesanal

Los recuentos de *Staphylococcus* COPS, aislados de queso fresco artesanal, superan límites permitidos en el DS N° 017-2017-MINAGRI, teniendo que el 98,49% de las muestras analizadas mostraron recuentos superiores a  $10^4$  UFC/g, reporte que concuerda con los resultados de Luján y Valentín (2006) en un estudio sobre quesos frescos artesanales comercializados en tres distritos de Lima, Perú, donde muestran que el 80% de las muestras analizadas presentaron recuentos superiores a  $10^5$  UFC/g, sobrepasando también a la normativa vigente. La presencia de *S. aureus* en quesos puede ser explicada de acuerdo con las investigaciones de Jørgensen et al. (2005) y Johler et al. (2018) quienes indican que, al tratarse de un microorganismo ubicuo, podría ingresar como contaminación durante la obtención de la leche, proceso de elaboración o comercialización del queso, mientras que Calahorrano-Moreno et al. (2022) y Ouamba et al. (2022) sugieren que la presencia de *S. aureus* está relacionada con problemas de mastitis bovina.

Los recuentos de coliformes totales en el M1 y M2 mostrados en las tablas 4 y 5 el 100% de muestras analizadas superaron el límite establecido en el DS 017-2017-MINAGRI ( $10^3$  UFC/g). Los resultados obtenidos son similares con los reportados por Vásquez et al. (2018) que, mediante un estudio de análisis microbiológica de quesos frescos en Cajamarca, encontraron una población microbiana de  $6,32 \times 10^3$  NMP/g en las muestras analizadas. Calahorrano-Moreno et al. (2022) indican que los recuentos elevados de coliformes totales están relacionados con la materia prima y el lugar de ordeño. Además, Hammad et al. (2022) señala que las deficiencias en la salubridad durante la fabricación de queso con leche cruda pueden reflejarse con altos recuentos en los productos finales.

Por otro lado, considerando que los coliformes termotolerantes mayoritariamente están representados por *E. coli* (Larrea-Murrell, 2013), se utilizó este criterio con fines de comparación. En ese sentido, el 100 % de las muestras de quesos analizados se encontraron sobre el límite permitido en la normativa peruana vigente. La presencia de coliformes termotolerantes puede indicar contaminación fecal es decir la existencia de condiciones insalubres en el entorno donde se realiza el proceso (Prates et al., 2017), asimismo, Chávez-Martínez et al. (2019) refuerza lo antes mencionado, ya que sugiere que los valores elevados pueden deberse a una posible contaminación fecal durante todo el proceso de la producción de queso.

#### **4.2.2. Análisis fisicoquímico**

##### **a) Humedad**

Con respecto a la humedad, las n=66 muestras de queso analizadas estaban en un rango de 48% a 69%, lo cual se encuentra dentro de la categoría de queso fresco según lo establecido por el Decreto Supremo 07-2017-MINAGRI, que exige un valor igual o mayor a 46%. Mientras que de acuerdo a la clasificación según el estándar CXS 283-1978 (FAO/OMS, 2021), el 45% de las muestras analizadas estarían clasificadas como quesos semiduros y el 55% como duros.

De acuerdo con reportes verbales, los consumidores de queso fresco artesanal en Chota indican que el producto se deteriora a partir del segundo o tercer día de almacenamiento a temperatura ambiente (12 a 26°C), mostrando cambios en el olor, sabor, color y textura, estos cambios reportados fueron abordados por Leclercq-Perlat et al. (2015), quien indica que la alta humedad puede acelerar la descomposición y el deterioro del queso, afectando sus características sensoriales. Además, Nájera et al. (2021) mencionan que la humedad proporciona un entorno propicio para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos no deseados, lo que puede resultar en un queso de menor calidad y con un tiempo de conservación reducido.

**b) pH**

La legislación actual en Perú no establece valores de referencia para el pH en queso fresco. Sin embargo, este parámetro podría ser indicador para evaluar las condiciones de procesamiento y la calidad de los quesos ya que Según Lorenzo et al. (2018), es importante controlar el valor del pH en alimentos como el queso fresco, ya que este factor influye en el crecimiento de microorganismos patógenos. Los valores de pH encontrados en la presente investigación oscilaron entre 4,31 y 6,42, siendo similares a los encontrados por Calampa et al. (2018) quienes analizaron quesos frescos en la Región Amazonas, mostrando un pH entre 5,35 y 6,52.

**c) Acidez**

Los resultados obtenidos en el M1 muestran valores de ácido láctico de 0,20 % a 0,81%, mientras que en el M2 los valores estaban entre 0,14% y 0,57%, siendo los quesos del M2 quienes presentaron los valores más bajos, estos valores están relacionados con la frescura del producto. Según Portilla et al. (2009), la concentración de ácido láctico está determinada por la temperatura y el tiempo de almacenamiento, ya que las bacterias responsables de la degradación de la lactosa en ácido láctico se multiplican a medida que transcurre el tiempo. Además, Pinho et al. (2004) mencionan que la acidez no solo afecta el sabor, sino que también tiene un impacto directo en la red de proteínas del queso, la cual es responsable de los fenómenos de sinéresis y otras características relacionadas con la reología final del producto.

**4.2.3. *Correlación entre la población microbiana y las características fisicoquímicas***

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación no fue posible realizar un análisis estadístico de correlación ya que las 66 muestras de queso fresco artesanal sobrepasaron los límites establecidos por el Decreto Supremo 07-2017-MINAGRI.

Por otro lado, la variable análisis microbiológico con la dimensión población microbiana no fue posible estimar, debido a elevados recuentos de coliformes totales no cuantificados por la técnica NMP. En tal sentido, con los datos obtenidos no se puede aplicar el análisis estadístico de correlación en el presente estudio ya que puede producir estimaciones sesgadas, lo que llevaría a conclusiones no válidas (Kang, 2013; Bennett, 2001).

## CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Se realizaron 132 aislamientos de COPS en las 66 muestras de queso fresco artesanal analizadas, así mismo se realizó la caracterización bioquímica y morfológica de los aislados.

Se logró determinar la población microbiana cuyos recuentos elevados de COPS, coliformes totales y termotolerantes encontrados en las n=66 muestras de queso analizadas, indican claras deficiencias en todo el proceso, evidenciando que no se habría realizado tratamiento térmico (pasteurización), ya que los microorganismos encontrados son sensibles a la pasteurización.

Se determinó la humedad, pH y acidez de las 66 muestras de queso fresco artesanal, estando la humedad por encima del 46% cumpliendo con lo establecido en la norma vigente para este tipo de queso, mientras que el pH osciló entre 4,31 y 6,42 y la acidez entre 0,14 – 0,81 %.

El 100 % de las muestras analizadas representan un riesgo para la salud de los consumidores y es importante abordar el problema en la cadena láctea ya que es un producto de importancia regional.

### 5.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios para determinar la presencia de otros indicadores microbianos como *salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella melitensis* en quesos frescos artesanales de Chota-Cajamarca.

Sería importante realizar un análisis microbiológico de los locales de producción donde se elabora el queso fresco artesanal para poder identificar qué factores son los que influyen en el contenido microbiológico.

Además, sería importante Analizar el origen y manejo de la leche utilizada en la producción de queso fresco artesanal además de determinar la presencia de antibióticos y o mastitis en las vacas.

EL análisis bioquímico completo y el análisis molecular de los aislados de *Staphylococcus* es importante de realizar.

## CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, A. D. I. (2016). Calidad microbiológica y su relación con la vida útil en quesos frescos expendidos en tres mercados de Trujillo. Agosto – Octubre, 2014. *Cientifi-k*, 4(1), 11–17.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official Method 926.08. Moisture in cheese. AOAC Int., WA, USA.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemistry). 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry, Washington D.C. Capitulo 33:844.
- Borena, B. M., Gurmessa, T. F., Gebremedhin, Z. E., Sarba, J. E., & Marami, M. L. (2022). *Staphylococcus aureus* in cow milk and milk products in Ambo and Bako towns, Oromia, Ethiopia: Prevalence, associated risk factors, hygienic quality, and antibiogram. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1978638/v2>
- Brown, H. L. (2022). Microbial Growth. In *Encyclopedia of Infection and Immunity* (pp. 324–335). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00190-7>
- Bennett, D. A. (2001). How can I deal with missing data in my study?. *Australian and New Zealand journal of public health*, 25(5), 464-469. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1326020023036488/pdf?md5=f7a13f2b55be1372d59f1202df2babf9&pid=1-s2.0-S1326020023036488-main.pdf>
- Calahorrano-Moreno, M. B., Ordoñez-Bailon, J. J., Baquerizo-Crespo, R. J., Dueñas-Rivadeneira, A. A., B. S. M. Montenegro, M. C., & Rodríguez-Díaz, J. M. (2022). Contaminants in the cow's milk we consume? Pasteurization and other technologies in the elimination of contaminants. *F1000Research*, 11, 91. <https://doi.org/10.12688/f1000research.108779.1>
- Calampa, L., Fernández-Jerí, A., & Bernal, W. (2018). Physicochemical and microbiological evaluation quality of fresh cheese in the dairy basins of the Amazon Region, Peru. *Agroindustrial Science*, 8(2), 117–121. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2018.02.06>
- Chandrapati, S., & Williams, M. G. (2014). Total Viable Counts /Most Probable Number (MPN). In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 621–624). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00333-5>
- Chávez-Martínez, A., Paredes-Montoya, P., Rentería-Monterrubio, A. L., Corral-Luna, A., Lechuga-Valles, R., Dominguez-Viveros, J., Sánchez-Vega, R., & Santellano-Estrada, E. (2019). Microbial quality and prevalence of foodborne pathogens of cheeses commercialized at different retail points in Mexico. *Food Science and Technology (Brazil)*, 39, 703–710. <https://doi.org/10.1590/fst.30618>
- Condoleo, R., Palumbo, R., Mezher, Z., Bucchini, L., & Taylor, R. A. (2022). Microbial risk assessment of *Escherichia coli* shiga-toxin producers (STEC) in raw sheep's milk cheeses in Italy. *Food Control*, 137, 108951. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108951>

- COVENIN 1104:1996. (1996). Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli* <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1104-96.pdf>
- Cruzado-Bravo, M. L. M., Barancelli, G. V., Dini Andreote, A. P., Saldaña, E., Vidal-Veuthey, B., Collado, L., & Contreras-Castillo, C. J. (2020). Occurrence of *Arcobacter* spp. in Brazilian Minas frescal cheese and raw cow milk and its association with microbiological and physicochemical parameters. *Food Control*, 109. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106904>
- da Silva, N., Amstalden Junqueira, V. C., de Arruda Silveria, N. F., Hiromi Taniwaki, M., Siqueira dos Santos, R. F., & Romeiro Gomes Renato Abeilar. (2010). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água* (Livraria Varela, Ed.; 4th ed.).
- Dambrosio, A., Loanna, F., Storelli, M. M., Castiglia, D., Giannico, F., Colonna, M. A., Rosa, M. De., & Quaglia, N. C. (2018). Microbiological quality and safety of cheeses belonging to “Traditional Agri-Food Products” (T. A. P.) produced in Southern Italy. *J Food Saf.*, 38, e12539. <https://doi.org/10.1111/jfs.12539>
- Díaz, R. I., Obispo, R., & Camilo, J. (2016). Casos de enfermedad transmitida por alimentos en los liceos Rodolfo Rodríguez Ricart Y José Antonio castillo de la provincia de Moca, República Dominicana. *Revista Utesiana de La Facultad Ciencias de La Salud*, 1(1), 20–29.
- Eden, R. (2014). Enterobacteriaceae, coliforms and *E. Coli*. Classical and Modern Methods for Detection and Enumeration. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 667–673). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00097-5>
- Erkmen, O. (2021). Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments. In *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91651-6.00061-6>
- Espinoza, M. A., De La Torre, B. M., Salinas, F. M., & Sánchez, P. V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 21(2), 71–75.
- FAO/OMS. (2021). *Norma General Para el Queso CXS 283-1978*.
- Farkye, N. Y. (1999). CHEESE | Microbiology of Cheese-making and Maturation. En Richard K. Robinson (Ed.). *Encyclopedia of food microbiology* (1era ed., pp. 381-387). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0300>.
- García Fontán, M. C., Martínez, S., Franco, I., & Carballo, J. (2006). Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows’ milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 16(7), 762–767. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.004>
- García Reyes, M., Gómez-Sánchez, P. I., & Espinoza Barrientos, C. (2017). Tablas de composición de alimentos. In *Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud* (Vol. 10).

- García-Corredor, D., Pulido-Medellín, M., & Rodríguez-Pacheco, J. (2015). Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja, Colombia. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 53, 47–56.
- Garcinuño-Martínez, R. M. (2017). Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Aldaba: Revista Del Centro Asociado a La UNED de Melilla*, 36, 51–64. <https://doi.org/10.5944/aldaba.36.2012.20530>
- Gebremedhin, E. Z., Ararso, A. B., Borana, B. M., Kelbesa, K. A., Tadese, N. D., Megersa Marami, L., & Sarba, E. J. (2022). Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from Milk and Milk Products, Associated Factors for Contamination, and Their Antibioqram in Holeta, Central Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2022/6544705>
- Guzmán, L., Mayorga, N., & Mejía, C. (2015). Evaluación de parámetros físicos, químicos y microbiológicos del queso fresco prensado producido en la región Junín, Perú. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 5(2), 280–286. <https://doi.org/10.18259/ACS.2015039>
- Graziani, C., Losasso, C., Luzzi, I.A. Ricci, Scavia, G. & Pasquali, P. (2017). Chapter 5 – Salmonella. En Christine E.R. Dodd, Tim Aldsworth, Richard A. Stein, Dean O. Cliver, Hans P. Riemann (Ed.), *Foodborne Diseases* (3 era., pp. 133-169). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00005-X>
- Hammad, A. M., Eltahan, A., Hassan, H. A., Abbas, N. H., Hussien, H., & Shimamoto, T. (2022). Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant *Escherichia coli* in Fresh Raw Milk Cheese. *Foods*, 11(3), 332. <https://doi.org/10.3390/foods11030332>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2016). *Metodología de la Investigación* (McGraw-Hill, Ed.).
- Hidalgo-García, F. I., Galarraga-Gay, M. del C., Gómez-Fontanil, M., & Sáez-Nieto, J. A. (2011). *Staphylococcus aureus* subespecie aureus catalasa negativa: un nuevo caso en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(9), 708–709. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.05.018>
- Holley, A. & Cordeiro, R.P. (2014). MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MEAT | *Listeria monocytogenes*. En Michael Dikeman, Carrick Devine (Ed.), *Encyclopedia of Meat Sciences* (2a Ed., pp. 348-356). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00039-8>
- Horan, N. J. (2003). Faecal indicator organisms. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, 105–112. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50008-X>
- Idarraga-Molina, M., Delgado-Núñez, V., León- Alférez, A. M., & Osorio-García, J. A. (2018). Análisis Microbiológico de Queso cuajada en Municipios del Departamento del Quindío. *Revista ION*, 31(1), 49–54. <https://doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018008>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2013). *Control microbiológico de los alimentos Staphylococcus aureus. Recuento en placa de siembra por extensión de superficie NTE INEN1529-14:2013*.
- Johler, S., Macori, G., Bellio, A., Acutis, P. L., Gallina, S., & Decastelli, L. (2018). Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk

- cheese production process in artisan dairies in Italy. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2915–2920. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13815>
- Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M. C., Robert, L., Hummerjohann, J., & Stephan, R. (2015). Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of dairy science*, 98(5), 2944–2948. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9123>
- Jørgensen, H. J., Mørk, T., & Rørvik, L. M. (2005). The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3810–3817. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73066-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73066-6)
- Kafetzopoulos, D. P., & Gotzamani, K. D. (2014). Critical factors, food quality management and organizational performance. *Food Control*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.11.029>
- Kang, H. (2013). The prevention and handling of the missing data. *Korean journal of anesthesiology*, 64(5), 402–406. <https://doi.org/10.4097/kjae.2013.64.5.402>
- Karunasagar, I., Maiti, B., & Kumar, B. K. (2018). *Molecular Methods to Study Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus From Atypical Environments* (pp. 387–417). <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2018.09.001>
- Kong, F., & Singh, R. P. (2011). Chemical deterioration and physical instability of foods and beverages. In *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (pp. 29–62). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092540.1.29>
- Kou, X., Cai, H., Huang, S., Ni, Y., Luo, B., Qian, H., ... & Wang, X. (2021). Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw milk in Northern Xinjiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 705947. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705947>
- Larrea-Murrell, J. A., Rojas-Badía, M.M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernandez, N. M., & Heydrich-Pérez, M. (2013). Bacterias como indicador de contaminación fecal en la evaluación de calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(3), 24–34.
- Leclercq-Perlat, M.N., Sicard, M., Perrot, N., Trelea, I. C., Picque, D., & Corrieu, G. (2015). Temperature and relative humidity influence the ripening descriptors of Camembert-type cheeses throughout ripening. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 1325–1335. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8916>
- Leroy, S., Vermassen, A., & Talon, R. (2016). *Staphylococcus*: Occurrence and Properties. *Encyclopedia of Food and Health*, 140–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00656-5>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018). Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability. In *Innovative Technologies for Food Preservation* (pp. 53–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>
- Luján, D., & Valentin, M. (2006). Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima-Perú. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(2).

- Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2014). Bacteria: *Listeria monocytogenes*. En Yasmine Motarjemi (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety* (1a ed., pp. 450-461). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00101-3>.
- Marin, M., Rodríguez, J., Minier, P., Ekaterine, Z., & Raxsy, S. (2020). Caracterización de agentes bacterianos aislados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *MEDISAN*, 24(2), 235–251.
- Martínez, A., Villoch, A., & Ribot, A. (2013). Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba Evaluation of quality and safety of fresh artisan cheeses from three regions of a Cuban province. *Rev. Salud Anim*, 35(3), 210–213. [www.who.int/whr/2007/es/](http://www.who.int/whr/2007/es/).
- Mendonca, A., Thomas-Popo, E., & Gordon, A. (2020). Microbiological considerations in food safety and quality systems implementation. In *Food Safety and Quality Systems in Developing Countries* (pp. 185–260). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814272-1.00005-X>
- Merchán, N., Zurymar T, S., Niño, L., & Urbano, E. (2019). Determinación de la inocuidad microbiológica de quesos artesanales según las normas técnicas colombianas. *Revista Chilena de Nutrición*, 46(3), 288–294. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182019000300288>
- MINAGRI. (2017). Reglamento de la leche y productos lácteos. Decreto Supremo N° 007-2017-MINAGRI. In *Ministerio de Agricultura y Riego* (pp. 1–34).
- Ministerio de Salud (MINSA). (2019). *Boletín Epidemiológico del Perú* (Vol. 28, Issue ISSN 2415-076 2, pp. 372–393).
- Nájera, A. I., Nieto, S., Barron, L. J. R., & Albisu, M. (2021). A Review of the Preservation of Hard and Semi-Hard Cheeses: Quality and Safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9789. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189789>
- Norma Mexicana NMX-F-317-S-1978. (1978) Determinación de pH. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978#gsc.tab=0)
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), 115–129. <https://doi.org/10.1089/FPD.2005.2.115>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2007). Fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos Directrices para evaluar las necesidades de fortalecimiento de la capacidad. In *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*.
- Oliveira, R. B., Margalho, L. P., Nascimento, J. S., Costa, L. E., Portela, J. B., Cruz, A. G., & Sant'Ana, A. S. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.008>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *La OMS intensifica sus esfuerzos para mejorar la salubridad de los alimentos y proteger a la población de las enfermedades*.

<https://www.who.int/es/news/item/07-06-2021-who-steps-up-action-to-improve-food-safety-and-protect-people-from-disease>

- Organización Mundial de la Salud. (2013). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica para laboratorios de microbiología, Pub. L. No. Red PARF Documento Técnico N° 11.
- Ouamba, A. J. K., Gagnon, M., LaPointe, G., Chouinard, P. Y., & Roy, D. (2022). Graduate Student Literature Review: Farm management practices: Potential microbial sources that determine the microbiota of raw bovine milk. *Journal of Dairy Science*, *105*(9), 7276–7287. <https://doi.org/10.3168/JDS.2021-21758>
- Pasquali, F., Valero, A., Possas, A., Lucchi, A., Crippa, C., Gambi, L., Manfreda, G., & De Cesare, A. (2022). Occurrence of foodborne pathogens in Italian soft artisanal cheeses displaying different intra- and inter-batch variability of physicochemical and microbiological parameters. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.959648>
- Pinho, O., Mendes, E., Alves, M. M., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2004). Chemical, Physical, and Sensorial Characteristics of “Terrincho” Ewe Cheese: Changes During Ripening and Intravarietal Comparison. *Journal of Dairy Science*, *87*(2), 249–257. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(04\)73163-X](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(04)73163-X)
- Pirofski, L., & Casadevall, A. (2012). Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biology*, *10*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-6>
- Política Nacional de Inocuidad Alimentaria (PNIA). (2016). Proyecto Política Nacional De Inocuidad Alimentaria. [http://www.digesa.minsa.gob.pe/compial/archivos/Politica\\_Nacional\\_Inocuidad\\_Alimentos.pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/compial/archivos/Politica_Nacional_Inocuidad_Alimentos.pdf)
- Poppe, C. (2011). Pathogens in Milk | *Salmonella spp.* En John W. Fuquay (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2 ed., pp. 93-98). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00395-2>
- Portilla, M. C., & Caballero, P. A. (2009). Influencia de la materia grasa y acidez de la leche sobre las características físico-químicas del queso pera tipo Chitaga Bistua: *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas Universidad de Pamplona Ciencias Básicas*, *7*(2). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90312180002>
- Possas, A., Bonilla-Luque, O. M., & Valero, A. (2021). From cheese-making to consumption: Exploring the microbial safety of cheeses through predictive microbiology models. *Foods*, *10*(2), 355. <https://doi.org/10.3390/foods10020355>
- Prates, D. da F., Würfel, S. R., Goldbeck, J. C., de Lima, A. S., Lopes, G. V., & da Silva, W. P. (2017). Qualidade microbiológica e avaliação da segurança na produção de queijos de média e alta umidade. *Ciencia Rural*, *47*(11). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170363>
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., & Chapman, J. (2019). A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *The Analyst*, *144*(2), 396–411. <https://doi.org/10.1039/C8AN01488D>

- Reuben, A., Treminio, H., Arias, M. L., & Chaves, C. (2003). Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 53(4), 389–392.
- Rigarlsford, J. F. (2007). Microbiological monitoring of cleaning and disinfection in food plants. In *Microbiological Analysis of Red Meat, Poultry and Eggs* (pp. 165–182). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845692513.165>
- Rodríguez-Lázaro, D. & Hernández, M. (2014). LISTERIA | Detection by Classical Cultural Techniques. En Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello (Ed), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2a ed., pp. 470-476). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00187-7>.
- Rojas-Herrera, R. A., & González-Flores, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 31(2), 69–76.
- Sadler, G.D., Murphy, P.A. (2010). pH y Acidez Titulable. En: *Análisis de alimentos. Análisis de alimentos*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_13)
- Schroeder, E., & Wuertz, S. (2003). Bacteria. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, 57–68. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50004-2>
- Shukla, S., Singh, S. P., & Shankar, R. (2018). Evaluating elements of national food control system: Indian context. *Food Control*, 90, 121–130. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.02.046>
- Studentica, A., Märtilbauer, E., & Mulliqi-Osmani, G. (2022). The prevalence of bacterial contaminants in artisanal cheese sold in informal markets. The case of Kosovo. *Food Science and Applied Biotechnology*, 5(1). <https://doi.org/10.30721/fsab2022.v5.i1>
- Sundararajan, R. (2014). *Electroporation-based therapies for cancer: from basics to clinical applications*. Woodhead Publishing.
- Vallero, D. A. (2008). Effects on the Atmosphere, Soil, and Water Bodies. En *Fundamentals of Air Pollution* (pp. 423–441). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373615-4/50015-7>
- Vásquez, V., Salhuana, G., Jiménez, L., & Abanto, L. (2018). Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos fresco en Cajamarca. *Ecología Aplicada*, 17(1), 7. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>
- Yoon, Y., Lee, S., & Choi, K. H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>
- Zhang, J., Li, C., Rahaman, M. M., Yao, Y., Ma, P., Zhang, J., Zhao, X., Jiang, T., & Grzegorzec, M. (2022). A comprehensive review of image analysis methods for microorganism counting: from classical image processing to deep learning approaches. *Artificial Intelligence Review*, 55(4), 2875–2944. <https://doi.org/10.1007/s10462-021-10082-4>

## CAPITULO VII. ANEXOS

### Anexo 1.

### Figura 3

*Decreto Supremo 017-2017-MINAGRI. Especificaciones técnicas y sanitarias para el queso fresco*

#### CAPÍTULO VI QUESO FRESCO

##### Artículo 18.- Especificaciones técnicas

Físicoquímicas

Característica	Unidad	Elaborado a base de leche entera	Elaborado a base de leche parcialmente descremada	Elaborado a base de leche descremada
Materia grasa láctea en el extracto seco	g/100g	≥ 40	≥ 15	< 15
Humedad	g/100g	≥ 46	≥ 46	≥ 46

##### Artículo 19.- Especificaciones sanitarias

El queso fresco debe cumplir con las especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad que establece el Ministerio de Salud, según lo siguiente:

##### 19.1 Microbiológicos

Agente Microbiano	Unidad	Categoría	Clase	n	c	Límite	
						m	M
Coliformes	UFC/g	5	3	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$
<i>Salmonella sp.</i>	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	---
<i>Escherichia coli</i>	NMP/g	6	3	5	1	3	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/g	7	3	5	2	10	$10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	---

Notas: Categoría: Grado de riesgo que representa los microorganismos en relación a las condiciones previsibles de manipulación y consumo del alimento.

Clase: Es la clasificación que se da a los planes de muestreo por atributos, que pueden ser de dos o tres.

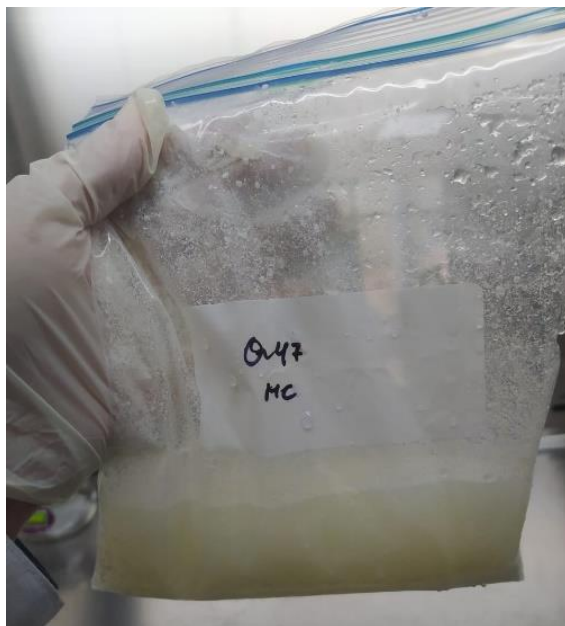
P = Presencia, A = Ausencia



**Anexo 2. Registro fotográfico de los análisis microbiológicos y fisicoquímicos del queso fresco artesanal analizado.**

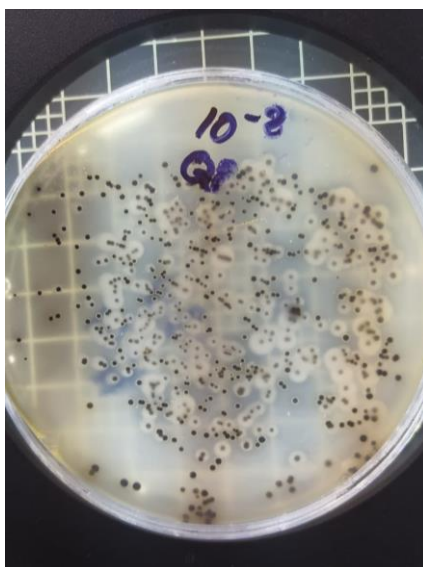
**Figura 4**

*Primera dilución de la muestra de queso fresco en agua peptonada*



**Figura 5**

*Crecimiento de Staphylococcus en Agar Baird Parker*

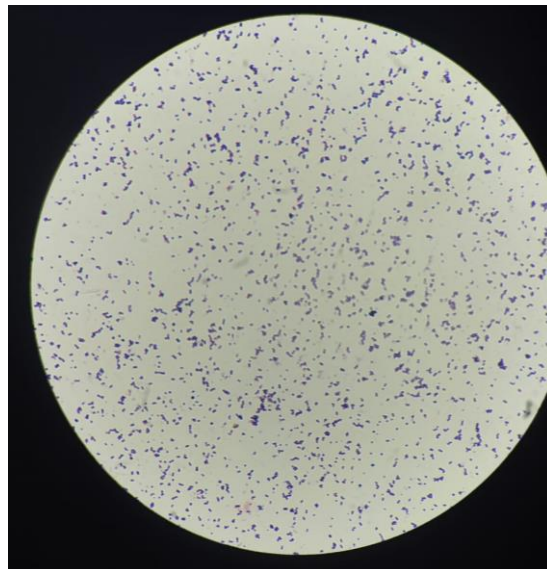


**Figura 6**

*Crecimiento de del asilado de Staphylococcus COPS en caldo BHI*

**Figura 7**

*Cocos gram positivos- Tinción de gram visto en el microscopio de luz (100X)*



**Figura 8**

*Prueba de catalasa de los asilados de Staphylococcus COPS*

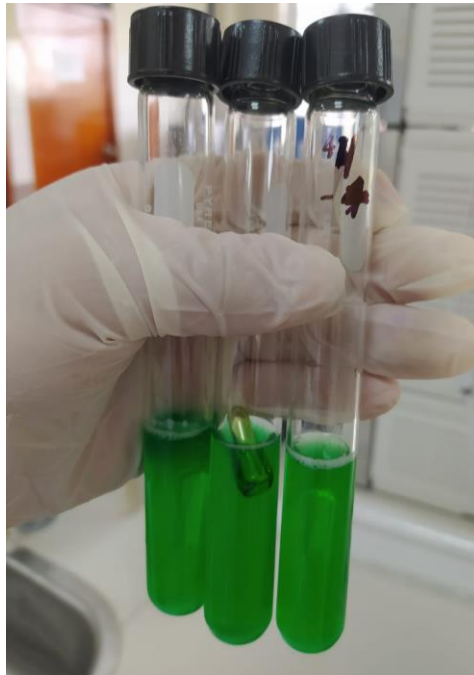
**Figura 9**

*Prueba de coagulasa en plasma de conejo de los asilados de Staphylococcus COPS*



**Figura 10**

*Lectura de coliformes totales en caldo verde brillante*

**Figura 11**

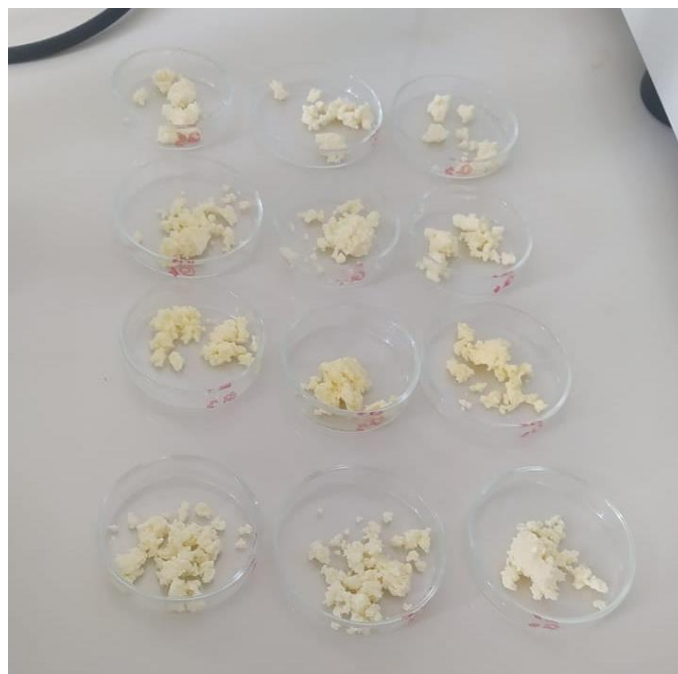
*Lectura de coliformes termotolerantes en caldo EC*



### Anexo 3. Proceso del análisis fisicoquímico del queso fresco artesanal

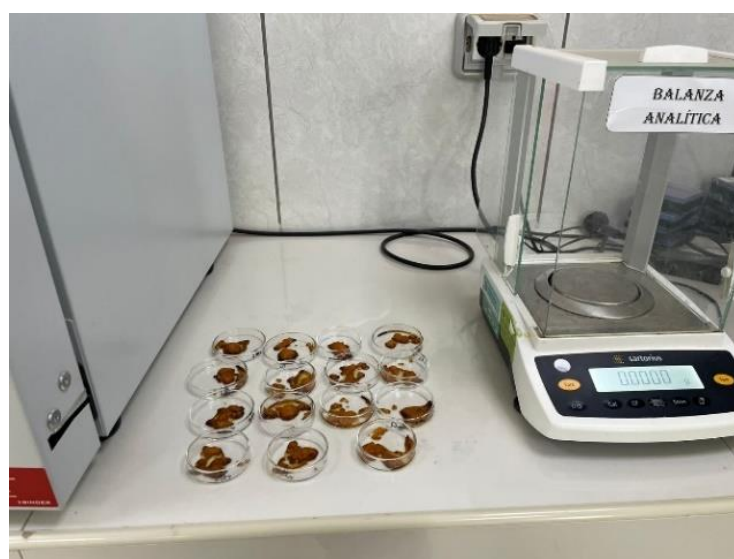
**Figura 12**

*Pesado de las muestras de queso fresco para las pruebas fisicoquímicas*



**Figura 13**

*Muestras secas de la prueba de humedad*



**Figura 14**

*Determinación de la acidez mediante titulación*

**Figura 15**

*Medición de pH*



## Anexo 4.

## Figura 16

Tabla del NMP según da Silva et al. (2010)

## TABELAS DE NMP

**Tabela NMP-1.** Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 0,1 - 0,01 e 0,001g ou ml.

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006).

**Anexo 5****Tabla 10***Datos generales de las muestras*

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura Ambiente</b>	<b>Condición de expendio</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora</b>	<b>Descripción</b>	<b>Lugar</b>
Q1	15 °C	Sin refrigeración	13/02/2023	7:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q2	14 °C	Sin refrigeración	13/02/2023	7:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q3	14 °C	Sin refrigeración	13/02/2023	7:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q4	14 °C	Sin refrigeración	13/02/2023	7:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q5	14 °C	Sin refrigeración	13/02/2023	7:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q6	12 °C	Sin refrigeración	20/02/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q7	12 °C	Sin refrigeración	20/02/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q8	12 °C	Sin refrigeración	20/02/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q9	12 °C	Sin refrigeración	20/02/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q10	12 °C	Sin refrigeración	20/02/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q11	14°C	Sin refrigeración	27/02/2023	7:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q12	14°C	Sin refrigeración	27/02/2023	7:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q13	14°C	Sin refrigeración	27/02/2023	7:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q14	14°C	Sin refrigeración	27/02/2023	7:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1

Q15	14°C	Sin refrigeración	27/02/2023	7:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q16	14°C	Sin refrigeración	27/02/2023	7:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q17	12°C	Sin refrigeración	06/03/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q18	12°C	Sin refrigeración	06/03/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q19	12°C	Sin refrigeración	06/03/2023	7:25 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q20	12°C	Sin refrigeración	06/03/2023	7:30 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q21	12°C	Sin refrigeración	06/03/2023	7:30 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q22	12°C	Sin refrigeración	06/03/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q23	12°C	Sin refrigeración	06/03/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q24	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q25	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q26	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q27	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q28	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q29	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q30	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q31	13°C	Sin refrigeración	13/03/2023	8:10 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q32	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1

Q33	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q34	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q35	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q36	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q37	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:55 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q38	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:55 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q39	16°C	Sin refrigeración	20/03/2023	8:55 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q40	14°C	Sin refrigeración	27/03/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q41	14°C	Sin refrigeración	28/03/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q42	14°C	Sin refrigeración	29/03/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q43	14°C	Sin refrigeración	30/03/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q44	14°C	Sin refrigeración	31/03/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q45	14°C	Sin refrigeración	01/04/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q46	14°C	Sin refrigeración	02/04/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q47	14°C	Sin refrigeración	03/04/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q48	14°C	Sin refrigeración	04/04/2023	7:40 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q49	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q50	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:35 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2

Q51	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q52	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q53	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q54	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:45 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q55	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:50 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q56	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:50 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q57	12° C	Sin refrigeración	10/04/2023	6:50 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q58	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:34 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q59	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:34 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q60	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:34 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M2
Q61	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:42 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q62	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:42 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q63	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:42 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q64	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:55 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q65	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:55 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1
Q66	13 ° C	Sin refrigeración	15/04/2023	6:55 AM	Prensa de corteza de eucalipto con tela tocuyo	M1

---

**Anexo 6****Tabla 11**

*Registro de resultado de las pruebas catalasa, coagulasa y tinción gram de los quesos analizados*

<b>MUESTRAS</b>	<b>AISLADOS</b>	<b>CATALASA</b>	<b>COAGULASA</b>	<b>Gram</b>
Q1	Q1 a	+	4+	+
	Q1 b	+	4+	+
Q2	Q2 a	+	4+	+
	Q2 b	+	4+	+
Q3	Q3 a	+	4+	+
	Q3 b	+	4+	+
Q4	Q4 a	+	4+	+
	Q4 b	+	4+	+
Q5	Q5 a	+	4+	+
	Q5 b	+	4+	+
Q6	Q6 a	+	4+	+
	Q6 b	+	4+	+
Q7	Q7 a	+	4+	+
	Q7 b	+	4+	+
Q8	Q8 a	+	4+	+
	Q8 b	+	4+	+
Q9	Q9 a	+	3+	+
	Q9 b	+	4+	+
Q10	Q10 a	+	4+	+
	Q10 b	+	4+	+
Q11	Q11 a	+	4+	+
	Q11 b	+	4+	+
Q12	Q12 a	+	4+	+
	Q12 b	+	4+	+

---

Q13	Q13 a	+	4+	+
	Q13 b	+	4+	+
Q14	Q14 a	+	4+	+
	Q14 b	+	4+	+
Q15	Q15 a	+	4+	+
	Q15 b	+	4+	+
Q16	Q16 a	+	4+	+
	Q16 b	+	4+	+
Q17	Q17 a	+	4+	+
	Q17 b	+	4+	+
Q18	Q18 a	+	4+	+
	Q18 b	+	3+	+
Q19	Q19 a	+	4+	+
	Q19 b	+	4+	+
Q20	Q20 a	+	4+	+
	Q20 b	+	4+	+
Q21	Q21 a	+	4+	+
	Q21 b	+	4+	+
Q22	Q22 a	+	4+	+
	Q22 b	+	4+	+
Q23	Q23 a	+	4+	+
	Q23 b	+	3+	+
Q24	Q24 a	+	4+	+
	Q24 b	+	4+	+
Q25	Q25 a	+	4+	+
	Q25 b	+	4+	+
Q26	Q26 a	+	4+	+
	Q26 b	+	4+	+
Q27	Q27 a	+	4+	+
	Q27 b	+	4+	+

---

---

Q28	Q28 a	+	4+	+
	Q28 b	+	3+	+
Q29	Q29 a	+	4+	+
	Q29 b	+	4+	+
Q30	Q30 a	+	4+	+
	Q30 b	+	3+	+
Q31	Q31 a	+	4+	+
	Q31 b	Negativo	-----	-----
Q32	Q32 a	+	4+	+
	Q32 b	+	4+	+
Q33	Q33 a	+	4+	+
	Q33 b	+	4+	+
Q34	Q34 a	+	3+	+
	Q34 b	+	4+	+
Q35	Q35 a	+	4+	+
	Q35 b	+	4+	+
Q36	Q36 a	+	4+	+
	Q36 b	+	2+	+
Q37	Q37 a	+	4+	+
	Q37 b	+	4+	+
Q38	Q38 a	+	4+	+
	Q38 b	+	4+	+
Q39	Q39 a	+	4+	+
	Q39 b	Negativo	-----	-----
Q40	Q40 a	+	4+	+
	Q40 b	Negativo	-----	-----
Q41	Q41 a	+	4+	+
	Q41 b	+	4+	+
Q42	Q42 a	+	4+	+
	Q42 b	Negativo	-----	-----

---

---

Q43	Q43 a	+	4+	+
	Q43 b	+	4+	+
Q44	Q44 a	+	4+	+
	Q44 b	Negativo	-----	-----
Q45	Q45 a	+	4+	+
	Q45 b	+	4+	+
Q46	Q46 a	+	4+	+
	Q46 b	Negativo	-----	-----
Q47	Q47 a	+	4+	+
	Q47 b	+	4+	+
Q48	Q48 a	+	4+	+
	Q48 b	+	4+	+
Q49	Q49 a	+	4+	+
	Q49 b	Negativo	-----	-----
Q50	Q50 a	+	4+	+
	Q50 b	Negativo	-----	-----
Q51	Q51 a	+	4+	+
	Q51 b	Negativo	-----	-----
Q52	Q52 a	+	3+	+
	Q52 b	+	3+	+
Q53	Q53 a	+	3+	+
	Q53 b	+	4+	+
Q54	Q54 a	+	4+	+
	Q54 b	+	4+	+
Q55	Q55 a	+	4+	+
	Q55 b	+	4+	+
Q56	Q56 a	+	4+	+
	Q56 b	+	4+	+
Q57	Q57 a	+	4+	+
	Q57 b	Negativo	-----	-----

---

Q58	Q58 a	+	3+	+
	Q58 b	+	4+	+
Q59	Q59 a	+	3+	+
	Q59 b	+	4+	+
Q60	Q60 a	+	2+	+
	Q60 b	+	3+	+
Q61	Q61 a	+	Negativo	-----
	Q61 b	+	4+	+
Q62	Q62 a	+	2+	+
	Q62 b	+	3+	+
Q63	Q63 a	+	4+	+
	Q63 b	+	2+	+
Q64	Q64 a	+	3+	+
	Q64 b	+	3+	+
Q65	Q65 a	+	3+	+
	Q65 b	+	3+	+
Q66	Q66 a	SIN PRUEBA	SIN PRUEBA	SIN PRUEBA
	Q66 b	SIN PRUEBA	SIN PRUEBA	SIN PRUEBA