



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

INCIDENCIA DE *ENTEROBACTERIACEAE* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
EN QUESOS FRESCOS EN EMPRESAS DEL CANTÓN CAYAMBE

Autora

Belén Nathalie Orozco Tobar

Año  
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

INCIDENCIA DE *ENTEROBACTERIACEAE* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
EN QUESOS FRESCOS EN EMPRESAS DEL CANTÓN CAYAMBE

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesor guía

M. Sc. José Ignacio Ortín Hernández

Autora

Belén Nathalie Orozco Tobar

Año

2018

### **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo, incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos en empresas del cantón Cayambe, a través de reuniones periódicas con la estudiante Belén Nathalie Orozco Tobar, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

José Ignacio Ortín Hernández

Master en Gestión de Seguridad Alimentaria

CI: 1754826517

### **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos en empresas del cantón Cayambe, de Belén Nathalie Orozco Tobar, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

María Raquel Meléndez Jácome  
Master en Protección Vegetal y Fitofarmacia  
CI: 1709384067

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Belén Nathalie Orozco Tobar

CI: 1722337779

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por estar siempre presente en mi vida, guiándome por buen camino y dándome fortaleza. A mi padre, madre, hermana y hermano por el amor y apoyo incondicional que me dan siempre. A la Universidad de las Américas y todos los docentes que me han guiado en todo el proceso, aportándome sus enseñanzas para mi formación profesional.

## **DEDICATORIA**

A mis amados padres, Ruperto y Yolanda por apoyarme siempre en cada etapa de mi vida y brindarme su amor incondicional y con su guía soy la persona que soy ahora. A mis hermanos, Gabriela y Ruperto Adrián por ser mis compañeros y darme felicidad en todo momento. A todas las personas que han estado a mi lado y comparten este logro conmigo.

## RESUMEN

La Industria Alimentaria es una de las más representativas actualmente por la demanda constante de alimentos, donde se exigen productos de calidad para el consumo y así controlar la incidencia de peligros como microorganismos perjudiciales para la salud. El presente estudio tiene como objetivo determinar la Incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos producidos en empresas ubicadas en el Cantón Cayambe. Se planteó también caracterizar el cumplimiento de normas de Buenas Prácticas de Manufactura en el proceso de elaboración del queso, para relacionar ésta evaluación con la incidencia de microorganismos en queso fresco. El estudio se realizó mediante un muestreo de leche pasteurizada con el fin de comprobar de la eficacia de la pasteurización, mediante una prueba de fosfatasa alcalina. Se aplicó también una lista de verificación en cada empresa y se evaluó el porcentaje de cumplimiento de normas de BPM. Las empresas se clasificaron según tratamientos establecidos como T1(Grandes con BPM), T2(Grandes sin BPM), T3(Pequeñas con BPM) Y T4(Pequeñas sin BPM). El método para determinar la incidencia de los microorganismos en los quesos frescos fue mediante conteo en cajas Petri, usando medios de agar MacConkey para *Enterobacterias* y agar Manitol Sal para determinar *S. aureus*. Los resultados determinaron que de 108 muestras tomadas, 95,37% presentaron *Enterobacteriaceae* y 73,14% *Staphylococcus aureus*. Se tuvo una mayor incidencia de los microorganismos en el T4, al presentar datos significativos al resto de tratamientos con 2065,68 Ufc/g de *Enterobacteriaceae* y 1051,38 Ufc/g de *S. aureus*. Al comparar con la norma NTE INEN 1528, los quesos de las empresas no cumplen con el límite establecido de microorganismo al tener más de lo permitido ( $10^3$  Ufc/g en *Enterobacteriaceae* y  $10^2$  Ufc/g en *S. aureus*). Se demostró que existe una alta incidencia de los microorganismos en las empresas de Cayambe dado por incumplimiento de Normas BPM enfocadas en Diseño y construcción al no tener un completo control de protección contra materias extrañas e insectos.

**Palabras claves:** Inocuidad alimentaria, Buenas Prácticas de Manufactura, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*.



## ABSTRACT

The Food Industry is one of the most representative because of the constant demand for food, where quality products are demanded for consumption and this way have control of the incidence of dangers such as microorganisms that are harmful to health. The objective of this study is to determine the incidence of Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus* in fresh cheeses produced in companies located in Canton Cayambe. It was also proposed to characterize the compliance of standards of Good Manufacturing Practices in the process of cheese making, to relate this evaluation with the incidence of microorganisms in fresh cheese. The study was carried out taking samples of pasteurized milk in order to check the effectiveness of the pasteurization, by means of an alkaline phosphatase test. A checklist was also applied in each company and the percentage of compliance with BPM standards was evaluated. The companies were classified according to established treatments as T1 (Large with GMP), T2 (Large without GMP), T3 (Small with GMP) and T4 (Small without GMP). The method to determinate the incidence of microorganisms in fresh cheeses was by counting in Petri dishes, using MacConkey agar media for Enterobacteria and Mannitol Sal agar to determine *S. aureus*. The results determined that of 108 samples taken, 95.37% presented Enterobacteriaceae and 73.14% *Staphylococcus aureus*. There was a greater incidence of microorganisms in the T4, because of the significant data results compares to the rest of treatments, presenting 2065.68 Ufc / g of Enterobacteriaceae and 1051.38 Ufc / g of *S. aureus*. When comparing with the norm NTE INEN 1528, the cheeses of the companies do not fulfill the established limit of microorganism because it had more than the allowed amount (103 Ufc / g in Enterobacteriaceae and 102 Ufc / g in *S. aureus*). It was demonstrated that there is a high incidence of microorganisms in Cayambe companies due to noncompliance of GMP standards focused on design and construction, as they do not have full control of protection against foreign matter and insects.

Key words: Food safety, Good Manufacturing Practices, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo general.....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
2. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1. Inocuidad de los Alimentos .....	4
2.2. BPM en empresas alimentarias .....	5
2.3. Importancia de la Industria Láctea .....	5
2.4. Parámetros de calidad evaluados en leche pasteurizada .....	6
2.4.1. Prueba de la fosfatasa alcalina y su influencia en leche.....	6
2.4.2. Test Phosphatesmo MK .....	7
2.4.3. Producto lácteo principal: queso fresco .....	7
2.5. Importancia de la inocuidad en procesos alimenticios .....	8
2.5.1. Importancia de la Inocuidad en productos derivados de la leche ...	8
2.6. Enfermedades Transmitidas por alimentos.....	9
2.7. Impacto de los microorganismos en alimentos .....	10
2.8. Importancia de Enterobacteriaceae en los alimentos.....	12
2.9. Incidencia de S.aureus en la Industria Láctea.....	16
2.10. Métodos de control de los microorganismos.....	18
2.11. Métodos de determinación de los microorganismos.....	20
2.11.1. Agar MacConkey .....	20
2.11.2. Agar Manitol Sal .....	20
2.12. Normativa de queso fresco en Ecuador.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Proceso de muestreo .....	21
3.2. Proceso de aplicación de la lista de verificación de BPM en empresas evaluadas.....	26

3.3. Prueba de Fosfatasa en la leche pasteurizada para elaboración de queso fresco.....	26
3.4. Determinación de <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en quesos.....	27
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
4.1. Resultados de prueba de fosfatasa alcalina en muestras de leche en empresas .....	28
4.2. Resultados de Lista de verificación de BPM aplicada en cada empresa .....	34
4.3. Resultados Análisis <i>Enterobacterias</i> y <i>Stahylococcus aureus</i> .....	37
4.3.1. Resultados del análisis de varianza de la determinación de la población de <i>Enterobacterias</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> de las 12 empresas evaluadas.....	38
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>49</b>
5.1. Conclusiones .....	49
5.2. Recomendaciones.....	50
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Primera prueba de fosfatasa alcalina en leche por tratamiento.....	30
<b>Figura 2.</b> Segunda prueba de fosfatasa alcalina en leche por tratamiento.....	32
<b>Figura 3.</b> Tercera prueba de fosfatasa alcalina en leche por tratamiento.....	34
<b>Figura 4.</b> Resultado de Staphylococcus aureus y de T1.....	72
<b>Figura 5.</b> Resultado de Staphylococcus aureus y de T2.....	72
<b>Figura 6.</b> Resultado de Staphylococcus aureus y de T3.....	73
<b>Figura 7.</b> Resultado de Staphylococcus aureus y de T4.....	73
<b>Figura 8.</b> Phosphatesmo MI utilizado.....	74
<b>Figura 9.</b> Placa de Agar MacConkey.....	74
<b>Figura 10.</b> Placa de Agar Manitol sal.....	74
<b>Figura 11.</b> Empresa involucrada en el estudio.....	75
<b>Figura 12.</b> Validación de Phosphatesmo MI con Leche pasteurizada cruda mezcla de ambas, para obtener modelo guía para las pruebas.....	75
<b>Figura 13.</b> Agua de peptona en tubos de ensayo y frasco estéril con muestra de queso y agua peptona.....	76
<b>Figura 14.</b> Cajas Petri con medio MacConkey y Manitol Sal para estudio.....	76
<b>Figura 15.</b> Ejemplo de contaje de UFC/g de Enterobacteriaceae y Staphylococcus aureus de varias empresas.....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Enfermedades causadas por patógenos y fuentes de contaminación.....	13
<b>Tabla 2.</b> Factores de estudio.....	23
<b>Tabla 3.</b> Selección de empresas para estudio.....	24
<b>Tabla 4.</b> Colores para identificación de empresas .....	25
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos del estudio.....	25
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza elaborado, con fuentes de variación y grados de libertad.....	26
<b>Tabla 7.</b> Cuadro de valoración para cada parámetro de la lista de Verificación.....	27
<b>Tabla 8.</b> Primera prueba de Fosfatasa alcalina en leche.....	29
<b>Tabla 9.</b> Segunda prueba de fosfatasa alcalina en leche.....	31
<b>Tabla 10.</b> Tercera prueba de fosfatasa alcalina en leche.....	32
<b>Tabla 11.</b> Resultados porcentaje de cumplimiento en lista de verificación de cada empresa según tratamiento .....	35
<b>Tabla 12.</b> Incidencia de Enterobacteriaceae y Staphylococcus aureus en queso fresco.....	38
<b>Tabla 13.</b> Resultados en promedio de Unidades Formadoras de colonias por gramos según los tratamientos y repeticiones con su desviación estándar.....	39
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza de la variable Enterobacteriaceae UFC/g.....	41
<b>Tabla 15.</b> Promedio, Prueba de Tukey (<0,05%) de Enterobacteriaceae en quesos en empresas de Cayambe.....	43

<b>Tabla 16.</b> Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de Enterobacteriaceae en quesos en empresas de Cayambe.....	44
<b>Tabla 17.</b> Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de Enterobacteriaceae en quesos en empresas de Cayambe.....	45
<b>Tabla 18.</b> Análisis de varianza de la variable Staphylococcus aureus UFC/g...	46
<b>Tabla 19.</b> Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de Staphylococcus aureus en quesos en empresas de Cayambe.....	47
<b>Tabla 20.</b> Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de Staphylococcus aureus en quesos en empresas de Cayambe.....	48
<b>Tabla 21.</b> Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de Staphylococcus aureus en quesos en empresas de Cayambe.....	49

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El objetivo fundamental de las empresas alimenticias es satisfacer necesidades de clientes y proteger la salud humana al consumir un alimento. Por lo tanto, la Inocuidad Alimentaria es el factor clave en la Industria (FAO, 2016). Las normativas se aplican actualmente en casi la totalidad de las empresas con la intención de garantizar la inocuidad de los productos, desde la materia prima hasta la obtención del producto final (Cordero, 2015).

Además, se trata de contrarrestar o identificar medios de contaminación o agentes microbianos que pueden encontrarse en las instalaciones o los productos finales elaborados en las empresas, microorganismos que pueden llegar a causar Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) (Cordero, 2015).

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos o ETA's generan problemas en personas que consumen un alimento contaminado, derivando en un problema de salud pública que se pueden relacionar con varios agentes biológicos, físicos o químicos (Plaza, 2013). Dados los cambios ambientales actuales que se han derivado de la resistencia microbiológica a varios agentes de control, aumento de la población, falta de seguimiento en industrias, la incidencia de las ETA's se está incrementando (Espinoza, De la Torre y Salinas, 2004). En los últimos años la incidencia de ETA's subió en 56%, con microorganismos como *Enterobacterias* o *Staphylococcus aureus* (Espinoza et al., 2004).

Las *Enterobacteriaceae* son bacterias Gram negativas, heterogéneas y se consideran como un grupo de tamaño grande de microorganismos conformado por varias especies y generalmente se las encuentran en el aparato digestivo de varios mamíferos (Puerta y Mateos, 2010). Uno de los microorganismos perteneciente al grupo de las *Enterobacteriaceae* más prevalentes y con una importancia clínica elevada es *Escherichia coli* (Puerta y Mateos, 2010).

En las personas por lo general, las *Enterobacteriaceae* prevalecen por infecciones en el tubo digestivo, así como en la faringe y en varias ocasiones el aparato genitourinario (Puerta y Mateos, 2010). Entre los microorganismos que causan daños a consumidores de alimentos, las *Enterobacteriaceae* son consideradas como los patógenos más comunes (Nordmann, Naas y Poirel, 2011). Algunas de las infecciones que causan son cistitis, pielonefritis, neumonía, infección intestinal (Nordmann et al., 2011).

Las infecciones causadas por Enterobacterias se dan por contaminación cruzada, por contacto directo de personas al alimento, contaminación del agua u otros alimentos (Nordmann et al., 2011).

Otro de los patógenos más comunes es *Staphylococcus aureus*; una de las bacterias que causan intoxicaciones por alimentos. Su toxina puede ocasionar enfermedades como síndrome de shock tóxico, intoxicación alimentaria, entre otras (Seija, 2008). El microorganismo presenta una característica importante que es la alta resistencia a antibióticos (Cervantes, García y Salazar, 2014).

El sistema de contaminación de la bacteria puede ser por contacto directo, por el ambiente o por alimentos de diferente origen. Por esta razón se han presentado tasas de mortalidad de alrededor de 9% en el año 2014 a nivel mundial (Cervantes et al., 2014).

En estudios realizados sobre la incidencia del microorganismo en el año 2000, la bacteria causó uno de los mayores brotes de enfermedad intestinal y fue causado por el consumo de queso blanco en Venezuela. En las investigaciones de estudio se determinó la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos con un porcentaje del 69,44% (Arguello et al., 2015).

El microorganismo causa varios tipos de afecciones clínicas en los consumidores, los síntomas que provoca son náuseas, gastroenteritis, dolores en el abdomen, fiebre y vómitos (Arguello et al., 2015).

Existen también otros estudios realizados en Perú donde se determinó incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos. Los resultados mostraron que, de las 39 muestras de queso fresco de 100 gramos



realizados artesanalmente, un 87,2% de las muestras resultaron positivas en *S. aureus* y en 91.9% en *Enterobacteriaceae* (Cristobal y Maurtua, 2010).

En Ecuador se realizó un estudio de investigación en empresas de Riobamba donde se tomaron muestras de queso y superficies para determinación de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus*, también se realizó una evaluación de BPM en las mismas (Arguello et al., 2015). En los resultados la evaluación de BPM, ninguna de las empresas obtuvo un cumplimiento total, un 77% de las empresas no sobrepasó el 40% de la calificación de los criterios. Además, los niveles de los microorganismos determinaron que, en Enterobacterias se tuvo de  $3.66 - 6.08 \times 10^3$  Ufc/g y los valores de *Staphylococcus aureus* llegó a valores de  $6.47 \times 10^3$  Ufc/g. sobrepasando los límites permitidos (Arguello et al., 2015).

Por otra parte, en la provincia de Pichincha existen escasos trabajos sobre incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en quesos. Por esto el presente estudio se plantea con el objetivo de determinar la incidencia de estas dos bacterias en quesos frescos elaborados en empresas del Cantón Cayambe.

El cantón Cayambe es considerado como uno de los sectores lecheros importantes del país, teniendo en cuenta que la producción lechera es una de las actividades económicas más destacadas en el cantón. La leche es el producto principal de la zona y representa el 20% de la producción en el país (Chávez, 2015).

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

Determinar la Incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos elaborados en empresas del Cantón Cayambe

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar el cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura en el proceso de elaboración del queso fresco.

- Relacionar la incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* con las características del proceso de elaboración de quesos frescos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Inocuidad de los Alimentos

La calidad de los alimentos es un factor clave en la industria alimentaria, es una característica compleja que determina si un cliente o consumidor acepta el producto (OMS, 2013). Si no existe un manejo adecuado de la sanidad de los alimentos que se manipulan, pueden presentarse problemas en la salud debido a la posibilidad de que se den enfermedades de transmisión por alimentos (OMS, 2013).

Para lograr inocuidad se da la necesidad de identificar el tipo de contaminación biológica, física o química que de alguna manera se podrían presentar en el ambiente o productos elaborados de una planta alimenticia (Cordero, 2015).

Dada la actual exigencia en las plantas alimentarias por parte de los consumidores para obtener productos seguros y de calidad, las industrias han tomado medidas más exigentes en los procesos para llegar a tener certificaciones de que se están realizando los procesos de manera correcta (Won-González, 2008). El tema de Inocuidad en especial en las plantas alimenticias es fundamental por el riesgo de contaminación que puede existir, que derive a presencia de microorganismos y posteriormente a enfermedades transmitidas por alimentos (Cordero, 2015).

Según el tipo de alimento, el grado de control sobre la inocuidad varía dependiendo del riesgo que implique los productos elaborados según su naturaleza, características, formas de preparación y comercialización

(Rodríguez, Borrás, Pulido y García, 2015). Por ejemplo, en las empresas lácteas en donde es fundamental la inocuidad y el cuidado de control por contaminación cruzada. Por esto, se deben realizar inspecciones periódicas seguidas de las personas involucradas en el proceso, así como las instalaciones (Rodríguez et al., 2015)

## **2.2. Buenas Prácticas de Manufactura en empresas alimentarias**

Las empresas productoras de alimentos deben basarse en el cumplimiento de normas y están sujetas a actividades de vigilancia y control sanitario para saber si se están realizando los procesos de la manera correcta y asegurar la inocuidad de los alimentos que se producen (Cordero, 2015).

Las Buenas prácticas dentro de la industria alimentaria permiten controlar las condiciones operacionales de cada una de las empresas para elaborar alimentos inocuos, tomando en cuenta la materia prima, condiciones sanitarias de los establecimientos, personal, utensilios y materiales utilizados, limpieza, desinfección (Castellanos, Villamil y Romero, 2004). Se considera como un elemento importante para llegar a tener alimentos de calidad, se implementan con el fin de controlar y mejorar los procesos productivos (Pérez, 2014).

Se toma en cuenta la Resolución 067-2015 del ARCSA, el Capítulo II sobre los requisitos de Las Buenas Prácticas de Manufactura, para cumplir con las normas y producir alimentos inocuos, entre algunas de estas normas

## **2.3. Importancia de la Industria Láctea**

La industria láctea representa gran parte del sector Agroindustrial, con un 10 a 30% del sector a nivel mundial, las empresas lácteas son las principales productoras y distribuidoras de leche y sus derivados. La industria contribuye al crecimiento del sector y aporta plazas de trabajo a más de 150000 personas (Carpl, 2002).

La leche es el insumo principal en esta industria, es uno de los alimentos más completos, altamente consumido por su valor nutricional y por su producción, con aproximadamente 460 mil millones de toneladas métricas a nivel mundial (Denicia y Ramírez, 2009). En Ecuador la producción en 2013 fue 6.000.000 litros al día (Zambrano, Castillo y Simbaña, 2017). La leche es el alimento segregado por las glándulas mamarias y primordialmente tiene el objetivo de nutrir a las crías en la primera fase de la vida por su contenido de nutrientes (Zela, 2005). Entre los principales componentes de la leche se menciona agua, carbohidratos, calcio, proteína, grasas, proteínas, vitaminas y minerales (Denicia y Ramírez, 2009).

El estudio de los componentes es esencial para la comprensión de los cambios que pueden ocurrir en la leche durante el procesamiento con tratamientos térmicos o fermentación, en especial cuando se obtienen derivados de la leche como el queso (Zela, 2005).

En la elaboración de productos derivados de la leche, es fundamental un proceso térmico como la pasteurización, proceso que se debe llevar correctamente mediante el cumplimiento de tiempos y temperaturas que aseguren una efectividad del proceso (CARLP, 2012). Para que se considere que el proceso fue efectivo, éste debe eliminar la presencia de bacterias patógenas y se aplica una temperatura de 72 a 75°C durante 20 segundos (González, 2007).

## **2.4. Parámetros de calidad evaluados en leche pasteurizada**

### **2.4.1. Prueba de la fosfatasa alcalina y su influencia en leche**

La fosfatasa es una enzima presente en la leche cruda que se encuentra activa hasta que se realice un proceso de calentamiento con temperaturas superiores a 60°C (Acosta, 2012). La prueba de fosfatasa es eficaz para decidir sobre la efectividad de un proceso de pasteurización (SARH, 2003).

La manera de asegurarse que una pasteurización fue práctica es mediante una prueba de fosfatasa alcalina, si existe presencia de la enzima en la leche el proceso fue inefectivo, en una correcta pasteurización, se tendría la inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina en la leche (Chacón, 2005).

La enzima es conocida por su presencia en algunos órganos de animales, como intestino, riñón, entre otros y produce crecimiento en algunas fases en los animales (Bárcena, García, Padilla, Martínez y Díez, 2014). Esta enzima sirve como control de calidad de la pasteurización de la leche, ya que se inactiva al momento de entrar a un proceso de calentamiento, en temperaturas óptimas de 72 °C a 76°C (Bárcena et al., 2014).

#### **2.4.2. Test Phosphatesmo MK**

El Test Phosphatesmo sirve para identificar si el proceso de pasteurización de leche se realizó correctamente. Se realiza mediante el uso de tiras reactivas para la determinar de manera específica la fosfatasa alcalina en la leche y es un método usado actualmente en la mayoría de empresas de la industria láctea. Si la tira cambia de coloración de blanca a amarilla, es un resultado Positivo (+), si no tiene coloración es un resultado Negativo (-), y si existe una coloración amarillenta baja, es un resultado Intermedio (+/-) (Aqua, 2018).

#### **2.4.3. Producto lácteo principal: queso fresco**

El queso es uno de los derivados lácteos más consumidos a nivel mundial, por su sabor y propiedades, dependiendo del tipo que sea, existen alrededor de 2000 tipos diferentes, el más popular y más consumido, el queso fresco (Ramírez y Vélez, 2012). En Ecuador el consumo de quesos aumentó en un 53,9% en un lapso de 3 años. La oferta de 127 millones de dólares subió a 195 millones lo que representa el aumento de consumo de queso en el país (Expreso, 2014).

La manera en cómo se realiza un queso es importante, es determinante para identificar factores que pueda causar modificaciones en el mismo, factores físicos, químicos, biológicos, lo que radica la importancia en el proceso de

elaboración tomando en cuenta el control de las actividades que puedan afectar las condiciones del producto (Ramírez y Vélez, 2012).

## **2.5. Importancia de la inocuidad en procesos alimenticios**

La inocuidad alimentaria empieza desde la obtención de la materia prima, producción, manipulación, almacenamiento, distribución y consumo de un producto (Ortega et al., 2014). Las normas de inocuidad son fundamentales para evitar los riesgos de contaminación en los alimentos, como microorganismos no deseados que afectan la calidad del producto (Ortega et al., 2014).

La incidencia de patógenos en alimentos se ha incrementado considerablemente provocando que la salud pública se vea afectada por enfermedades de transmisión por alimentos, situación que se agrava por la globalización, comercialización y distribución de los mismos (Amarillas et al., 2017).

Los alimentos son propensos a la contaminación a causa de varios factores derivados principalmente de agentes microbianos patógenos y no patógenos que se pueden presentar en el proceso, almacenamiento, distribución de un producto (Argote et al., 2017). En efecto, al no tener control en el procesamiento existe el riesgo de contaminación que afecta la calidad e inocuidad del mismo (Argote et al., 2017).

### **2.5.1. Importancia de la Inocuidad en productos derivados de la leche**

La calidad e inocuidad de un producto alimenticio se da cuando en el proceso productivo se toman las medidas adecuadas como control en la manipulación del alimento, la materia prima utilizada, procesos realizados correctamente, instalaciones limpias y bien distribuidas y así garantizar la calidad del producto, (Rodríguez et al., 2015).

En la industria láctea, los procesos que se realizan deben tener un control a lo largo de la cadena con el fin de evitar el riesgo de contaminación cruzada que causa enfermedades por microorganismos como gastroenteritis, salmonelosis, tuberculosis, ya sea la causa el personal, materiales ajenos al proceso, utensilios no aptos o equipos mal lavados (Rubeglio y Tesone, 2007).

Los métodos de prevención y control se aplican en la industria para realizar productos derivados de la leche mediante pruebas en la leche como: antibióticos pH y temperatura, acidez, densidad y a lo largo del proceso control de temperatura y control de lavado de manos y uniformes limpios al personal (FAO, 2015).

## **2.6. Enfermedades Transmitidas por alimentos**

La ingesta de alimentos contaminados por microorganismos patógenos causa enfermedades transmitidas por alimentos, generando afecciones a la salud del consumidor (González y Rojas, 2005). La incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos tiene más probabilidad de presentarse en países subdesarrollados, debido al incumplimiento de normas de sanidad en áreas del proceso por falta de limpieza o contaminación por productos ajenos al proceso (Koopér, Calderón, Schneider, Domínguez y Gutiérrez, 2009). Al no existir un control adecuado de normas, en especial las relacionadas con el contacto directo como una incorrecta manipulación, se pueden presentar las enfermedades transmitidas por alimentos (Koopér et al., 2009).

Las Enfermedades transmitidas por Alimentos se originan por microorganismos patógenos que se encuentran contaminando un alimento y generan algunos síntomas en las personas que los consumen como dolores en el abdomen, diarreas o vómitos, fiebre o en algunos casos fallos o molestias neurológicas (Alarcón, Oyarzo, Escudero, Cerda y Valenzuela, 2017).

La incidencia mundial de ETA's se determina mediante la cantidad de personas que presentan síntomas, por casos de hospitalización o por los casos de mortalidad existentes causados por el consumo de un alimento contaminado por microorganismos; en concreto bacterias patógenas (Ordoñez y Quezada, 2014).

A este respecto, en Estados Unidos en 1 año se presentaron alrededor de 76 millones de casos de personas con enfermedades transmitidas por alimentos, con más de 4500 casos de fallecimiento de 350000 hospitalizaciones (Flórez, Rincón, Garzón, Vargas y Enríquez, 2007). A causa de la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos, en el costo económico de las mismas incrementó, según un informe de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), los costos ascendieron a \$ 152 millones (Amarillas et al., 2017).

Existen microorganismos patógenos que son contaminantes de los alimentos y causan enfermedades de transmisión. En efecto, existen aproximadamente 250 agentes microbianos, entre los principales se menciona: bacterias, virus, hongos, parásitos (Luján, Valentín y Molina, 2006).

Los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos son *Enterobacteriaceae* y en este grupo está *Shigella sp* y *Salmonella sp.*, y otros microorganismos de importancia son *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* (Kopper et al., 2009).

## **2.7. Impacto de los microorganismos en alimentos**

Actualmente los microorganismos representan un factor de gran impacto en la sociedad, ya sea por sus usos en ciertos productos actuando de manera beneficiosa, o también como agentes responsables de causar problemas en alimentos y las personas que los consumen (Quality, 2013). Desde el punto de vista sanitario, se considera que los alimentos son fuentes o vehículos de



contaminación que pueden causar intoxicación o infecciones graves (Andino y Yorling, 2010).

Los microorganismos contaminan un producto alimenticio cuando se le proporciona medio de cultivo donde obtienen nutrientes y pueden sintetizar componentes celulares también pueden aumentar la cantidad (Quality. 2013). La temperatura, el ambiente, los restos de materiales alimenticios o la falta de limpieza y desinfección son algunos de los factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos (Quality. 2013). En la mayor parte de casos de contaminación en alimentos se vincula a la falta de medidas de sanidad adecuadas en la producción, almacenamiento o distribución (Andino y Yorling, 2010).

Existe un alto impacto de los microorganismos sobre los alimentos y dependiendo del tipo de microorganismo se determina cuáles son las principales causas de contaminación al producto alimenticio (Malavi, Muzhingi y Abong, 2018). A continuación, se presenta las causas de la presencia de diferentes tipos de microorganismos en alimentos:

- En mohos y levaduras la principal fuente de contaminación deriva del medio donde se elabora un producto, las temperaturas (25 a 30°C), la higiene del manipulador y de los equipos y utensilios que se usan (Malavi, 2018).
- Los aerobios totales se asocian con un deterioro acelerado del alimento, afectando la calidad (Malavi, 2018).
- *Staphylococcus aureus* se relaciona con la higiene inadecuada de los manipuladores en especial por un mal lavado de manos, cortes sin cubrir, el uso incorrecto de mascarillas en el proceso (Malavi, 2018).
- Las *Enterobacterias* como *Coliformes*, se relacionan con la calidad de agua usada para preparar alimentos, personal en contacto con el alimento y deficiencia de los programas de limpieza y saneamiento en las plantas procesadoras (Malavi, 2018).

Los microorganismos patógenos son los que causan daños al consumir un alimento contaminado. Se encuentran como principales patógenos a: bacterias, virus y protozoarios, estos microorganismos al causar enfermedades que pueden ser graves, muchas veces derivan a casos mortalidad (Montaño et al., 2010).

Tabla 1.

*Enfermedades causadas por patógenos y fuentes de contaminación*

<b>ENFERMEDAD</b>	<b>MICROORGANISMO</b>	<b>FUENTE</b>
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Leche cruda y lácteos contaminados
Salmonelosis	<i>Salmonella spp.</i>	Agua no potable, vegetales crudos
Colitis hemorrágica	<i>Escherichia coli</i>	Leche cruda y carnes sin cocer o falta de cocción
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	Alimentos enlatados
Gastroenteritis	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Cereales o alimentos elaborados con poca sanidad
Intoxicación alimentaria	<i>Staphylococcus aureus</i>	Alimentos que se preparan con las manos, otros productos como leche y productos lácteos

Adaptado de Montaño et al., 2010

En la Tabla 1 se muestra un resumen de una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos, el microorganismo responsable y la fuente de la enfermedad.

## 2.8. Importancia de Enterobacteriaceae en los alimentos

*Enterobacteriaceae* es una familia de microorganismos que se caracteriza por clasificarse en varios géneros (Lekárska, 2015). Se conocen 53 géneros en total y más de 170 especies (Standars, 2015). Se reconocen algunas de las especies

de *Enterobacteriaceae* como causantes de algunas infecciones primarias del tracto gastrointestinal como gastroenteritis, otras enfermedades que causan estos microorganismos son: neumonía, meningitis, septicemia, entre otras (Lekárska, 2013).

Las *Enterobacteriaceae* son microorganismos Gram negativos sin espolones. La temperatura óptima de crecimiento es 37°C, aunque algunas especies presentan mejor crecimiento entre los 25 y 30°C. Se caracterizan por tener un crecimiento óptimo en peptona y extracto de carne (Nordann, Naas y Poirel , 2011).

Al ser un microorganismo que prolifera con facilidad en medios simples, requiere una fuente de carbono que se obtiene por medio de energía para aumentar su crecimiento en ambientes aerobios y anaerobios (Marder et al., 2018). Representan una fuente de peligro para contaminación rápida y directa a los alimentos, el queso es un medio fácil de contaminación (Chávez, Rosario, Valle, Venegas y Hernández, 2015).

Estas bacterias se clasifican según la presencia o ausencia de enzimas, diferenciadas por el código genético del cromosoma de la bacteria. Entre los géneros de mayor importancia como patógenos del ser humano se encuentran: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia marcescens*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia* (Muñoz, 2011).

### **2.8.1. Incidencia de *Enterobacteriaceae* en queso fresco**

En la industria láctea, especialmente en la elaboración de queso fresco es fundamental contar con tratamientos de calor, en este caso, la pasteurización (Molleda, 2016). Si el proceso no se realiza con los parámetros requeridos (72-75°C durante 20 segundos o 65°C durante 30 minutos), el producto tiene más probabilidad de contaminación por *Enterobacteriaceae* (Molleda, 2016). En efecto, al no cumplir con los parámetros necesarios, no se estaría eliminando la bacteria (Molleda, 2016).

Existe riesgo de contaminación de *Enterobacteriaceae* en el proceso de desuerado y moldeado; en especial si se realiza artesanalmente o no se tiene equipos especializados (Sereno, 2001). Los manipuladores cumplen un papel fundamental ya que al tener contacto directo con el alimento deben cumplir con los requisitos higiénicos y tomar medidas de protección con la higiene personal y el lavado de manos (Sereno, 2001).

Se ha determinado que la incidencia de *Enterobacteriaceae* puede aumentar en el proceso de prensado del queso. Si los requerimientos como la presión, temperatura y tiempo no son los adecuados para el producto, se tiene el riesgo que los restos de suero en el interior de las bolsas favorezcan el desarrollo de la bacteria que altera la calidad del queso (Sereno, 2001).

El cumplimiento de las condiciones mínimas básicas de los establecimientos es fundamental en la industria láctea (ARCSA, 2015). Para evitar la proliferación de *Enterobacteriaceae* por riesgos del ambiente exterior, las plantas lácteas deben estar diseñadas para ofrecer protección de agentes biológicos o materias extrañas que puedan afectar la calidad del producto (ARCSA, 2015).

### **2.8.2. *Escherichia coli*, la principal en la familia de *Enterobacteriaceae* y su importancia en alimentos**

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos patógenos más conocidos y difundidos a nivel mundial, transmitidos por alimentos y causan problemas de salud pública como enfermedades gastrointestinales (Amarillas, 2017). La bacteria es resistente a varios tratamientos y fármacos por lo que, al momento de aplicar un tratamiento, se considera un desafío (Molleda, 2015).

Esta bacteria se localiza por lo general en el aparato digestivo de varios animales, existen especies patógenas y no patógenas. En su gran mayoría no causan daños mayores. Sin embargo, las cepas patógenas pueden provocar graves problemas a la salud (Rubeglio y Tesone, 2007). La patogenicidad de *E.*

*coli* se relaciona con el factor principal de producción de verotoxinas que inhiben la síntesis de proteínas produciendo daños en el epitelio intestinal (Rubeglio y Tesone, 2007).

El incremento de brotes por *Escherichia coli* ha creado un alto impacto en el sector de la salud, se ha encontrado que, de cada 10.000 habitantes, al menos 8 personas presentan daños por la bacteria (Amarillas, 2017). En el sector alimentario es un aspecto de cuidado la contaminación de alimentos (FAO, 2015). Entre los más comunes se puede mencionar a los productos lácteos, carnes mal elaboradas y poco cocidas, productos en condiciones no óptimas (FAO, 2015).

*Escherichia coli* es uno de los más conocidos por ser el causante de enfermedades gastrointestinales por consumo de alimentos contaminados. En efecto, en varias investigaciones se ha demostrado su presencia en productos derivados de leche (Tecanhuey, 2017).

Varios brotes infecciosos causados por *E. coli* por consumo de queso se asocian a una deficiente pasteurización de la leche o contaminación cruzada por algunos procesos como: el corte de la cuajada, desuerado, moldeado (Tecuanhuey, 2017). En los procesos mencionados se involucra la manipulación de trabajadores por lo que requieren mayor control en cuanto a procesos de limpieza o higiene de trabajadores (Tecanhuey, 2017). En almacenamiento también, si no se mantiene a temperaturas de 2 a 4°C existe posibilidad de contaminación y también en la distribución si no se realiza correctamente (Tecuanhuey, 2017).

La contaminación por *E. coli* en alimentos se da cuando no existen las condiciones sanitarias adecuadas en el procesamiento. Un punto de control principal es la pasteurización, factor principal de control para eliminar bacterias (FAO, 2015). La principal fuente de contaminación es a partir de la transmisión de heces a los alimentos por deficientes condiciones higiénicas de los

manipuladores y en la industria alimentaria los requerimientos higiénicos son los principales a cumplir (FAO, 2015).

## 2.9. Incidencia de *Staphylococcus aureus* en la Industria Láctea

*Staphylococcus aureus* es considerado un microorganismo patógeno para el ser humano. Según datos estadísticos, aproximadamente un 30% de la población tiene a *S. aureus* en el organismo y se presenta mediante bacteridemia y endocarditis infecciosa, enfermedades de la piel y su ubicación principalmente en tejidos pleuropulmonares (Tong, Davis, Eichenberger, Holland y Fowler, 2015).

*S. aureus* es una bacteria comensal Gram-positiva de 0.4 a 1.4 micras. Se caracteriza por su común agrupación como un racimo de uvas. Se han identificado alrededor de 35 especies (Zendejas, Ávalos y Soto, 2014). El subgénero *Staphylococcus* es el más conocido y abundante, por su alta capacidad de adaptación (Zendejas et al., 2014).

Posee una alta capacidad de propagación, por lo que puede transmitirse de una especie a otra y es considerada una de las principales especies que afectan al sistema circulatorio (Zendejas et al., 2014). También provoca infecciones e intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados (Zendejas et al., 2014)

*Staphylococcus aureus* por lo general se encuentra en la región nasofaríngea de las personas y existen grupos que son portadores o persistentes o intermitentes de la bacteria (Alarcón et al., 2017). Los portadores intermitentes representan el 62% de los portadores de *S. aureus* (Alarcón et al., 2017).

En la industria alimentaria se toma en cuenta el tema de uso correcto de mascarillas en especial para los manipuladores en todo el proceso de producción con el fin de evitar la contaminación en caso que la persona sea portadora de la bacteria y pueda contaminar el alimento (Alarcón et al., 2017).

La incidencia de enfermedades por la bacteria ha ido incrementando en los últimos años a nivel mundial en un 14%, en el caso de Brasil, en los años 2000 y 2015, *Staphylococcus aureus* fue el factor causal del 8% de los brotes de intoxicación por alimentos (Campos, Mendes, Torres y Fonseca, 2017). En efecto, la presencia de *Staphylococcus aureus* en alimentos es la tercera causa de intoxicación alimentaria a nivel mundial y siempre se encuentra relacionada con medidas de salud (Luo, Shao, Kamara, Chen, Zhang, Duan y Yang, 2018).

El consumo de toxinas de *S. aureus* se conoce con el nombre de estafiloenterotoxiosis y los síntomas que presenta son: diarrea o vómito y náuseas, dolores en el abdomen (Alarcón et al., 2017). El período de incubación de la bacteria es menor a tres o cuatro horas en el ambiente requerido y si se tiene nutrientes para el desarrollo por lo que evoluciona en 24 a 48 horas, (Alarcón et al., 2017).

La correcta manipulación de los alimentos es esencial en *Staphylococcus aureus*, especialmente en el proceso productivo, es fundamental cubrir completamente la boca y nariz, evitar cortes o heridas en las manos, se toman las medidas para evitar la contaminación a los productos (Alarcón et al., 2017).

*Staphylococcus aureus* es uno de los principales microorganismos aislados que se identifican como contaminantes del queso. Uno de los factores es la presencia de las enterotoxinas en la leche (Cousin, Hardi, Volk y Bodmer, 2018).

El queso es un producto alimenticio transformado por lo que tiene mayor susceptibilidad a ser contaminado con *S. aureus*. La manipulación incorrecta del producto o el origen de la materia prima inadecuada puede ser causante de contaminación (Rodas et al., 2016). Muchas veces se desconoce el origen y la forma de elaboración y al ser un producto altamente consumido, requiere de control en el proceso especialmente en los de manipulación directa como desuerado o moldeado del queso (Luján y Molina, 2017). Son procesos que pueden afectar la calidad del queso tanto en la parte organoléptica como microbiológica generando toxiinfecciones alimentarias (Rodas et al., 2016).

La presencia de microorganismos en el queso se puede dar debido a varios factores, como la presencia de residuos microbianos en la leche que viene desde el ordeño. Por esta razón, el proceso de pasteurización es fundamental. Mediante el tratamiento a 72°C por 20 segundos se logra inhibir la bacteria (Rivera, Mujica, Aranga, Navarro, Zabala y Atencio, 2011). Durante todo el proceso de elaboración se tiene el riesgo de contaminación por medio del personal por lo que se requiere acatamiento de normas establecidas en la Resolución del ARCSA 067, sobre las obligaciones y el comportamiento del personal (ARCSA, 2015).

Es elemental tratar la leche mediante una correcta pasteurización para inactivar las toxinas de la bacteria como la enterotoxina termoestable preformada ya que ésta es la encargada de causar la intoxicación alimentaria (Cousin et al., 2018).

## **2.10. Métodos de control de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus***

La importancia del control de microorganismos en la mayor parte de industrias o áreas, en especial la industria alimentaria, origina la necesidad de aplicar métodos para controlar los microorganismos capaces de generar enfermedades (Freire, García y Velázquez, 2011).

Existen varios métodos para ayudar a contrarrestar el desarrollo de microorganismos: métodos físicos donde se controla temperatura y humedad (Freire et al., 2011). Métodos químicos en los que se aplican desinfectantes o esterilizantes, como ácidos, alcoholes, compuestos fenólicos (Freire et al., 2011).

En la Industria alimentaria, el control de microorganismos es fundamental en especial cuando se tiene riesgo de contaminación de agentes patógenos. Actualmente existen métodos avanzados que permiten controlar microorganismos y conservar alimentos de la mejor manera, alargando su vida útil (Rodríguez, 2002).

Los métodos de control empleados son varios, dependiendo el fin de eliminación del microorganismo, se menciona a:



- Método de separación de microorganismos: Cuando se requiere separar a los organismos y puede ser mediante decantación, por filtrado o por centrifugado (Lee, 2012).
- Método para eliminar o reducir el metabolismo microbiano: Es el método más usado en industrias alimenticias, controlan mediante temperaturas bajas como congelación o refrigeración (0 a 4°C o -4°C). También se puede controlar la humedad o la acidez (Lee, 2012).
- Método para inactivar microorganismos: Se aplica en etapas de procesamiento para inactivar microorganismos mediante altas temperaturas, y dentro de la industria láctea, la pasteurización que puede ser rápida (72-75°C durante 20 segundos) o lenta (65°C durante 30 minutos). Este factor es clave para elaboración de subproductos derivados de la leche (Lee, 2012).

En el caso de *Enterobacteriaceae*, los aspectos relacionados con higiene y sanidad son fundamentales, tanto en los manipuladores de los alimentos como el ambiente e instalaciones (Salgado y Castro, 2007).

Los métodos recomendados para control de *Enterobacterias* se centran en hábitos sanitarios adecuados mediante procedimientos de un correcto lavado de manos, sobretodo de los manipuladores del alimento, es donde debe existir mayor control (Salgado y Castro, 2007). Un plan de saneamiento adecuado donde se tenga los registros de limpieza y desinfección de las distintas áreas del proceso y un control de calidad de agua (Salgado y Castro, 2007).

*Staphylococcus aureus* al tener el riesgo de contaminar un producto por medio de manipuladores de alimentos, requiere de un método estricto para controlarlo, dada su facilidad de llegar a un alimento y su eventual extensión por lo que es importante controlar al microorganismo en el proceso para evitar luego controlar la toxina (Deacon, 2012).

La bacteria se encuentra en las fosas nasales, respiratorias de la mayoría de la población humana y en la piel de ciertos animales, por lo que durante los procesamientos es obligatorio el uso correcto de mascarillas donde se cubra completamente la nariz y boca, control en la limpieza de manos, evitar de cortes o heridas y si es el caso, el uso de guantes que las cubran (Bertó, 2015).

## **2.11. Métodos de determinación de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus***

### **2.11.1. Agar MacConkey**

El agar MacConkey es un medio de cultivo para aislamiento e identificación de microorganismos, bacilos Gram negativos de muestras de alimentos, agua o muestras clínicas. Es un medio adecuado en donde se desarrollan todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Britania, 2018).

Los componentes del medio cumplen una función importante para el desarrollo del microorganismo. La peptona permite que se tengan los nutrientes que se requieren, además se tiene un carbohidrato fermentable que es la lactosa y componentes que ayudan a inhibir casi en su totalidad, el crecimiento de microorganismos Gram positivos (Britania, 2018).

### **2.11.2. Agar Manitol Sal**

El agar Manitol sal se conoce como un medio de cultivo selectivo utilizado para la detección y diferenciación de las especies de estafilococos. Los componentes del medio aportan al crecimiento de los mismo mediante extracto de carne y peptona (Britania, 2018). Son fuente de vitaminas, minerales, carbono y nitrógeno, actúan junto con la tripteína para lograr el crecimiento del microorganismo. El manitol es el carbohidrato presente en el medio y la sal como inhibidor del crecimiento de otros microorganismos (Britania, 2018).

En cuanto al crecimiento de los microorganismos en un medio que tenga una alta concentración de cloruro de sodio, empiezan a formar ácido haciendo que se cambie la coloración del medio debido a la modificación del pH, cambiando del color rojo, característico del medio, a un color amarillo (Britania, 2018). Todo esto se da por una fermentación del manitol, un ejemplo de estos son los estafilos con coagulasa positiva que se presentan con color amarillento y un borde del mismo color. En cambio, los que no realizan la fermentación del manitol se visualizan sin el borde o coloración alrededor (Britania, 2018).

## **2.12. Normativa en cuanto a requisitos microbiológicos de queso fresco en Ecuador**

La normativa que se aplica a quesos frescos se relaciona con leche y productos lácteos. Los requisitos a cumplir en estos productos derivados de animales bovinos y caprinos se aplican para poder asegurar la inocuidad y salud de las personas que consumen los productos, y de esta manera evitar cualquier tipo de engaño mediante prácticas erróneas (INEN, 2012).

Dentro de norma NTE INEN 1528: Norma general para quesos frescos no madurados se toman en cuenta microorganismos que se pueden encontrar en el producto y pueden afectar la calidad, entre estos se encuentran: Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes en 25 g y Salmonella en 25 g (INEN, 2012).

Refiriéndose a quesos en específico en los requisitos, en la parte microbiológica, en cuanto a *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus*, el requisito dice que, el índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad para *Enterobacteriaceae* es de  $2 \cdot 10^2$  Ufc/g y el índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad es  $1 \cdot 10^3$  Ufc/ g y para *Staphylococcus aureus* el índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad es de 10 Ufc/g y el índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad es  $1 \cdot 10^2$  Ufc/g (INEN, 2012).

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Proceso de muestreo**

El tamaño de muestra se determinó mediante un análisis del tamaño de muestra. Se tomó en cuenta el número de empresas lácteas existentes en el cantón Cayambe (63 empresas) (ARCOSA, 2018). Y el tamaño de muestra se obtuvo mediante la fórmula estadística para un muestreo estratificado:

$$M = \frac{N \times P \times Z}{(N - 1)E^2 + Z^2}$$

Donde:

**N**= Tamaño de la población (63)

**P**= Proporción (0.25)

**E**= Error permisible (10%)

**Z**= Niveles de confianza (95% - 1.96)

En el tamaño de la población se tomó en cuenta las 63 empresas lácteas presentes en el Cantón Cayambe, con una proporción del 0,25. La proporción se obtiene de la cantidad que corresponde al número de empresas que representa la totalidad (Salvadó, 2016).

Se tomó la fórmula para un muestreo estratificado donde la población se encuentra dividida según el tamaño de empresa (grande o pequeña) y si tiene Certificación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM o sin BPM).

Luego de aplicar la fórmula para el tamaño de muestra, se llegó a determinar que el número de empresas a tomar en cuenta para la investigación es de 12 (Anexo 5).

Para la representatividad del diseño de la investigación se clasificaron a las empresas grandes y pequeñas para la investigación. Para esto se tomó la producción diaria, donde las empresas grandes se identificaron con más de 1200 litros/día y las empresas pequeñas con menos de 1200 litros/ día incluido 1200 litros/día. Se determinaron también las empresas que poseen o no Certificación en Buenas Prácticas de Manufactura y de esta manera se estratificó el muestreo.

Tabla 2.

*Factores de estudio*

<b>FACTORES</b>	Empresas que tienen BPM	Si BPM No BPM
-----------------	-------------------------	------------------

Tamaño de empresa tomando en cuenta los litros producidos	Grandes: 1200 litros días Pequeñas: menor a 1200 litros días
---	---

*Nota:* BPM es Buenas Prácticas de Manufactura.

Se determinó las empresas grandes y pequeñas mediante el tamaño de producción, dado mediante los litros/día que producen, todas las empresas de tamaño pequeño tenían una producción que iba de 240 litros/día a 1200 litros al día y las empresas de tamaño grande tenían una producción de 1300 litros/día a 7000 litros/día. Por otro lado, las empresas que tenían certificación de Buenas Prácticas de Manufactura o no, se determinaron mediante la certificación o las que no tenían, las cuales tenían una únicamente certificación de Prácticas Correctas de Higiene, la selección se realizó con la cantidad de empresas grandes y pequeñas (6 de cada una) y se seleccionó también relacionándolas con cuáles tenían la certificación BPM y cuáles no. La entidad responsable de certificar a las empresas es Arcsa, mediante esa certificación que acreditan, se determinó si tenían o no BPM.

### 3.1.1. Localización del trabajo de investigación

El proceso de muestreo se realizó en el Cantón Cayambe, ubicada a al noroeste de Pichincha a 90 minutos de Quito. se tomó en cuenta a doce empresas del cantón las cuales se seleccionaron de acuerdo a los factores del estudio. A las empresas se les asignó un código debido a acuerdos de confidencialidad con cada uno de los representantes de las empresas.

En la Tabla 3 se detalla el proceso de clasificación de empresas de acuerdo al Tamaño y si poseen certificación BPM o no.

Tabla 3.

*Selección de empresas para estudio.*

EMPRESA	TIPO DE CERTIFICACIÓN	VOLUMEN PROCESADO (Litros/día)	PRODUCCIÓN DE QUESO FRESCO (Gramos)
PLM	PCH	2500	500-1000g
PLL	PCH	1300	125-500g

<b>PLY</b>	BPM	900	125-465-500 g
<b>PLT</b>	BPM	900	125-400-500 g
<b>PLJ</b>	BPM	1200	450-500-650 g
<b>PLLL</b>	BPM	7000	500-700 g
<b>AGH</b>	BPM	2400	125-450-500 g
<b>PLB</b>	BPM	1190	125-500-700 g
<b>PLFO</b>	BPM	2800	130-260-500 g
<b>PLAN</b>	PCH	800	125-250-500 g
<b>PLSP</b>	PCH	500	125-500 g
<b>PLP</b>	PCH	900	125-500 g
<b>PLQ</b>	PCH	1200	125-500 g
<b>PLU</b>	PCH	500	125-500 g
<b>PLLP</b>	BPM	500	450-650 g
<b>PLDG</b>	BPM	1800	500-600 g
<b>PLTY</b>	PCH	1500	125-500 g
<b>PLDR</b>	PCH	240	500g
<b>PLDL</b>	PCH	800	125-500g
<b>PLPRI</b>	PCH	800	130-250-500g
<b>PLFR</b>	PCH	1200	125-500g
<b>PLV</b>	PCH	320	125-500-600g
<b>PLJY</b>	PCH	1200	500-1000g

Nota: BPM= Buenas Prácticas de Manufactura; PCH=Prácticas Correctas de Higiene

Tabla 4.

*Colores para identificación de empresas*

<b>Empresas grandes sin BPM</b>	
<b>Empresas pequeñas con BPM</b>	
<b>Empresas grandes con BPM</b>	
<b>Empresas pequeñas sin BPM</b>	

La clasificación se realizó siguiendo los lineamientos de tamaño según la producción y si disponían o no de Certificación de Buenas Prácticas de Manufactura.

Tabla 5.

*Tratamientos del estudio*

<b>TRATAMIENTOS</b>	
<b>T1</b>	Empresas de tamaño grande y dispongan de certificado BPM
<b>T3</b>	Empresas de tamaño pequeño y dispongan de certificado BPM

<b>T2</b>	Empresas de tamaño grande y no dispongan de certificado BPM
<b>T4</b>	Empresas de tamaño pequeño y no dispongan de certificado BPM

Con la clasificación se determinaron los cuatro tratamientos establecidos en el estudio donde se seleccionó a las tres empresas grandes y tres pequeñas que dispongan certificación BPM y las que no dispongan certificación BPM.

Para el estudio se identificaron dos variables contables, es decir se midió por la cantidad de microorganismos presentes en el queso, tanto de *Enterobacteriaceae* como *Staphylococcus aureus*, lo cual se midió mediante las Unidades formadoras de colonias por gramo:

- Cantidad de *Enterobacteriaceae* en queso (Ufc/g)
- Cantidad de *Staphylococcus aureus* en queso (Ufc/g)

Para el análisis de varianza se tomó en cuenta las fuentes de variación que son: el total, los factores (Tamaño de empresa y certificación BPM), la interacción de los factores, las repeticiones y el error experimental, todos los aspectos relacionados con los grados de libertad, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6.

*Análisis de varianza elaborado, con fuentes de variación y grados de libertad*

<b>Fuentes de Variación (F de V)</b>	<b>Grados de Libertad (g/l)</b>
Total	35
F1: Tamaño Empresa	1
F2: BPM	1
Tamaño de empresa x BPM	1
Repeticiones	8
Error Experimental	24

Para realizar el análisis funcional se realizó la prueba de Tukey al 5%, aclarando que se realizó únicamente cuando se tienen diferencias significativas.

### **3.2. Proceso de aplicación de la lista de verificación de Buenas Prácticas de Manufactura en empresas evaluadas**

Se elaboró una lista de verificación (Anexo 1) acorde a los parámetros requeridos en la investigación, tomado de la Resolución 067 del Arcsa. En cada una de las empresas se realizó un recorrido por todas las áreas y se otorgó una calificación en cada uno de los aspectos correspondientes como se muestran en el Anexo 1. Cada parámetro se calificó con valores entre 1 y 5 como se muestra en la Tabla 7, donde se detalla el método de calificación de acuerdo al nivel de cumplimiento de cada procedimiento o característica:

Tabla 7.

*Cuadro de valoración para cada parámetro de la lista de verificación*

<b>CUADRO DE VALORACIÓN</b>	
<b>1</b>	No cumple (0-24%)
<b>2</b>	Cumplimiento desfavorable (<25%)
<b>3</b>	Cumplimiento medio (26-50 %)
<b>4</b>	Cumplimiento favorable (51-75%)
<b>5</b>	Óptimo cumplimiento (76-100 %)

La visita se realizó en un tiempo de 20 minutos por empresa. El proceso se aplicó de igual manera en todas las empresas implicadas.

### **3.3. Prueba de Fosfatasa en la leche pasteurizada para elaboración de queso fresco**

Se tomó una muestra de leche (60 ml) con la que se elaboraría el queso, una vez pasteurizada, donde se determinó la validez del proceso, se tomó la muestra



en un frasco estéril. Posteriormente se almacenó la muestra a temperaturas de 0 a 2°C hasta su análisis en el laboratorio, se realizó el transporte el mismo día que se toma la muestra.

En el laboratorio, para el análisis se abrió el frasco estéril con la leche y se insertó una tira del Test Phosphatesmo MI durante 1 segundo. Se retiró la tira de la muestra y se insertó en una funda plástica, incluida en el Test. Finalmente se colocó en la incubadora a 36°C durante 1 hora y cumplido el tiempo establecido se obtuvo los resultados. Así se repitió el análisis con todas las muestras de leche, es decir se realizó con las doce empresas, por cada empresa el proceso se realizó tres veces, por las tres visitas realizadas.

Los resultados de fosfatasa alcalina con Negativos (-) representan que la leche en la empresa respectiva tuvo un adecuado proceso de pasteurización debido a que se logró inhibir la enzima, los resultados planteados como Intermedio (+/-) representan que en el proceso de pasteurización no se llegó a la temperatura y tiempo requerido o hubo una mezcla con leche cruda y finalmente los resultados en Positivo(+) representan que no hubo un proceso de pasteurización, no se llegó a la temperatura requerida o simplemente no se realizó el proceso de pasteurización.

### **3.4. Determinación de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en quesos**

Se tomaron 10 gramos de muestra (queso fresco) y se colocó en un frasco estéril. En el laboratorio se añadieron 90 ml de agua de peptona en el frasco estéril con la muestra, para obtener una relación 1:10 y se homogenizó. Con una micro pipeta de 1000 µl se realizó una dilución donde se colocó 1 ml de la solución en un tubo de ensayo y 9 ml agua peptona y se homogenizó para obtener la muestra lista para inocular en las cajas Petri.

Se identificó las placas Petri con nombres específicos de cada muestra de cada empresa según su tratamiento, luego con una micro pipeta se tomó 100 microlitros de la muestra y se colocó en placas Petri. En las placas con agar

MacConkey para *Enterobacteriaceae* y en las placas con agar Manitol sal para *S. aureus* respectivamente para cada microorganismo. Con el asa de siembra de vidrio, se esparció la solución de la muestra en toda el área de la caja. Finalmente se dejó la placa en incubación a 36°C durante 24 horas. A las 24 horas se tomaron los resultados con el conteo de los microorganismos.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Resultados de prueba de fosfatasa alcalina en muestras de leche en empresas

Los resultados de la prueba de fosfatasa alcalina realizados en las doce empresas, se muestran a continuación en las Tablas 8,9 y 10. Las tres tablas representan las tres visitas realizadas.

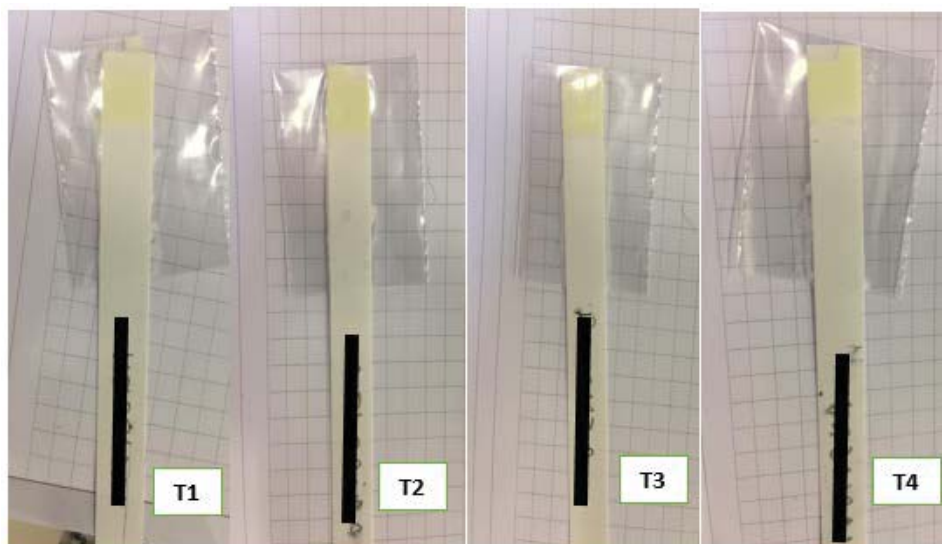
Tabla 8.

*Primera prueba de Fosfatasa alcalina en leche*

PRUEBA DE FOSFATASA EN LECHE		
	EMPRESAS	RESULTADO
<b>T1:</b> <b>Empresas grandes con BPM</b>	E1H	(-)
	E4LL	(+/-)
	E9FO	(-)
<b>T2:</b> <b>Empresas grandes sin BPM</b>	E2LF	(-)
	E3M	(+/-)
	E8FR	(-)
<b>T3:</b> <b>Empresas pequeñas con BPM</b>	E7Y	(-)
	E10B	(-)
	E12T	(-)
<b>T4:</b> <b>Empresas pequeñas sin BPM</b>	E5P	(-)
	E6U	(+)
	E11DL	(+/-)

Nota: (-) es Negativo; (+/-) es Intermedio y (+) es Positivo

En la primera prueba de fosfatasa alcalina en leche se puede observar que, de acuerdo a los tratamientos planteados, como T1 (Empresas grandes y poseen BPM), se realizó un adecuado proceso que llegó a las temperaturas requeridas con resultados en negativo, pero en una de las empresas, E4LL, se tuvo un resultado intermedio, esto significa que la temperatura no llegó a 73°C durante 20 segundos ya que al realizar la lista de verificación, se detalló que en la empresa el proceso de pasteurización se realizó a 70°C. En el caso de T2 (Empresas grandes sin BPM) los resultados son Negativos a excepción de la empresa E3M que tiene un resultado Intermedio, razón dada por un manejo bajo de normas de Buenas prácticas de Manufactura sobre todo por no presentar registros de control de la temperatura a la que manejaban la pasteurización. En el T3 (Empresas pequeñas sin BPM) todos los resultados son Negativos. Esto indica que la implementación de BPM en la empresa lleva a realizar los procesos adecuadamente y en el T4 (Empresas pequeñas sin BPM) se tiene un resultado positivo, uno intermedio y un negativo, lo que demuestra que al no tener certificación BPM no existe un control adecuado sobretodo en distribución de áreas y control de temperaturas del proceso y del ambiente en que se manejan los procesos.



*Figura 1.*

Primera prueba de fosfatasa alcalina en leche por tratamiento

En la Figura 1 se puede observar el cambio de coloración según los tratamientos, donde las empresas que tienen certificación BPM (Tratamiento 1 y 3), tiene una coloración amarillenta clara en comparación con las empresas de que no tiene certificación BPM (Tratamiento 2 y 4).

Tabla 9.

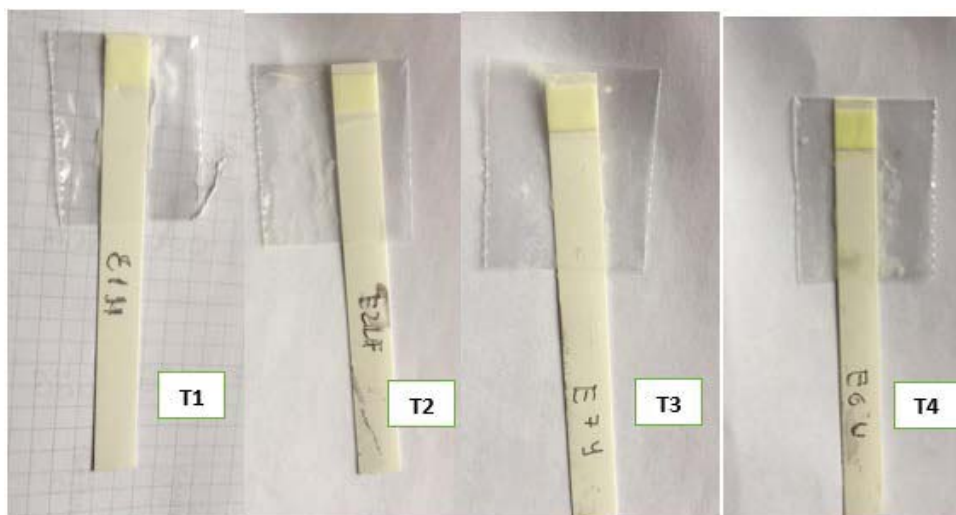
*Segunda prueba de fosfatasa alcalina en leche*

<b>PRUEBA DE FOSFATASA EN LECHE</b>		
	<b>EMPRESAS</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>T1: Empresas grandes con BPM</b>	E1H	(-)
	E4LL	(+/-)
	E9FO	(-)
<b>T2: Empresas grandes sin BPM</b>	E2LF	(-)
	E3M	(+/-)
	E8FR	(-)
<b>T3: Empresas pequeñas con BPM</b>	E7Y	(-)
	E10B	(-)
	E12T	(-)
<b>T4: Empresas pequeñas sin BPM</b>	E5P	(+/-)
	E6U	(+/-)
	E11DL	(-)

*Nota:* (-) es Negativo; (+/-) es Intermedio y (+) es Positivo

En la segunda prueba de fosfatasa alcalina en leche se puede observar que, de acuerdo a los tratamientos planteados, como T1 (Empresas grandes y poseen BPM) realizaron un correcto proceso de pasteurización, según datos tomados del proceso las empresas realizaron la pasteurización a 75°C durante 20 segundos por lo que se obtuvo resultados en negativo, pero en una de las empresas, E4LL, se obtuvo un resultado intermedio, es decir no se tuvo un correcto proceso que posteriormente se verá reflejado en el contaje en los quesos, la pasteurización se realizó a 69°C. En el caso de T2 (Empresas grandes sin BPM) los resultados son Negativos a excepción de la empresa E2LF que tiene un resultado Intermedio. El resultado se da porque al no tener la

certificación de Buenas Prácticas de Manufactura en la empresa, no se tuvo control en el proceso de pasteurización al realizar el mismo a 70°C. En el T3 (Empresas pequeñas sin BPM) todos los resultados son Negativos, lo que indica que la implementación de BPM en la empresa los lleva a realizar los procesos adecuadamente especialmente en la pasteurización. Finalmente, en el T4 (Empresas pequeñas sin BPM) se tiene dos resultados en intermedio y uno en negativo lo que demuestra que al no tener implementadas BPM no existe un control adecuado sobre procesos sobre todo en la pasteurización, donde los aparatos de control utilizados no se están usando bien para tomar la temperatura y el tiempo adecuado de 73°C durante 20 segundos.



*Figura 2.*

Segunda prueba de fosfatasa alcalina en leche por tratamiento

En la Figura 2 se puede observar el cambio de coloración según los tratamientos, donde las empresas que tienen certificación BPM (Tratamiento 1 y 3), tiene una coloración amarillenta clara en comparación con las empresas de que no tiene certificación BPM (Tratamiento 2 y 4) sobretodo en la empresa del Tratamiento 4 que es una empresa pequeña sin BPM, la coloración es un amarillo intenso.

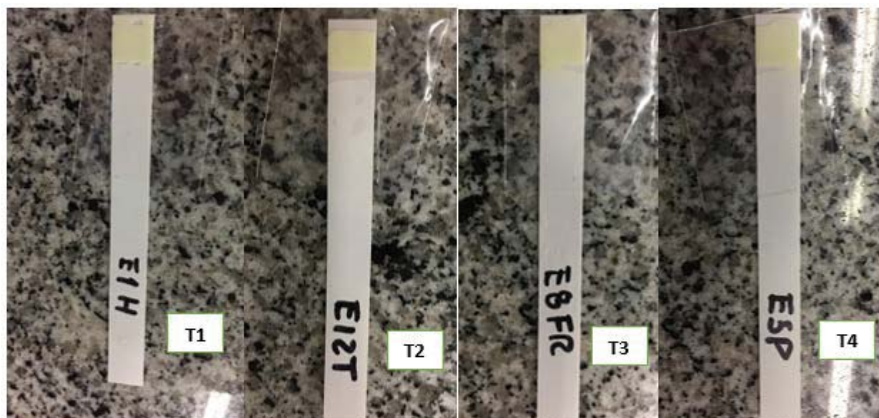
Tabla 10.

*Tercera prueba de fosfatasa alcalina en leche*

PRUEBA DE FOSFATASA EN LECHE		
	EMPRESAS	RESULTADO
<b>T1: Empresas grandes con BPM</b>	E1H	(-)
	E4LL	(-)
	E9FO	(-)
<b>T2: Empresas grandes sin BPM</b>	E2LF	(-)
	E3M	(-)
	E8FR	(-)
<b>T3: Empresas pequeñas con BPM</b>	E7Y	(-)
	E10B	(-)
	E12T	(-)
<b>T4: Empresas pequeñas sin BPM</b>	E5P	(+/-)
	E6U	(+/-)
	E11DL	(-)

*Nota:* (-) es Negativo; (+/-) es Intermedio y (+) es Positivo

En la tercera prueba de fosfatasa alcalina en leche se puede observar que, de acuerdo a los tratamientos planteados, como T1 (Empresas grandes y poseen BPM) realizaron un adecuado proceso que llegó a las temperaturas requeridas con resultados en Negativo, debido a su implementación de normas BPM, en el caso de la empresa que presentaron resultados en intermedio, ahora posee un resultado en negativo, en donde se ve que hubo una mejora en sus procesos. En el caso de T2 (Empresas grandes sin BPM) los resultados son Negativos, las empresas en este tratamiento no tienen BPM, pero realizaron sus procesos de una manera correcta. En el T3 (Empresas pequeñas sin BPM) todos los resultados son negativos, lo que indica que la implementación de BPM en la empresa los lleva a realizar los procesos adecuadamente y en el T4 (Empresas pequeñas sin BPM) se tiene dos resultados Intermedios y uno Negativo, identificando claramente que debido a la falta de implementación de BPM, existe un menor control en el proceso de pasteurización.



*Figura 3.*

*Tercera prueba de fosfatasa alcalina en leche por tratamiento*

En la Figura 3 se puede observar el cambio de coloración según los tratamientos, donde las empresas que tienen certificación BPM (Tratamiento 1 y 3), tiene una coloración amarillenta clara en comparación con las empresas de que no tiene certificación BPM (Tratamiento 2 y 4) donde el color es amarillo más intenso.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura o FAO (2011), se ha presentado que en las empresas lácteas que tienen implementadas Buenas Prácticas de Manufactura, presentan índices bajos de microorganismos en las pruebas microbiológicas. Esto radica que el proceso de pasteurización se realiza de acuerdo a lo establecido en la norma, en el caso de Ecuador, la resolución 067 del Arcsa, tomando en cuenta parámetros de control de instrumentos de equipos y registros de los mismos. Por lo tanto, las empresas que presentaron resultados en positivo o Intermedio, en las muestras de las tres visitas realizadas, representan las empresas que no tienen implementadas BPM's por lo que no se controló el proceso con las temperaturas y tiempo requeridos derivando a que haya presencia de fosfatasa en las muestras de leche que posteriormente puede llevar a mayor incidencia de microorganismos en el queso.

#### 4.2. Resultados de Lista de verificación de BPM aplicada en cada empresa

Las doce empresas implicadas en el estudio obtuvieron diferentes porcentajes de cumplimiento según los parámetros que cumplían y si las empresas ya tenían o no certificación de las Buenas Prácticas de Manufactura. A continuación, se presentan los resultados de los porcentajes de cumplimiento de todas las empresas.

Tabla 11.

*Resultados porcentaje de cumplimiento en lista de verificación de cada empresa según tratamiento.*

	<b>EMPRESAS</b>	<b>PORCENTAJE DE CUMPLIMIENTO</b>
<b>T1: Empresas grandes con BPM</b>	E1H	98,7%
	E4LL	96,1%
	E9FO	97,8%
<b>T2: Empresas grandes sin BPM</b>	E2LF	89,5%
	E3M	91,5
	E8FR	90,3%
<b>T3: Empresas pequeñas con BPM</b>	E7Y	100%
	E10B	96,5%
	E12T	97,9%
<b>T4: Empresas pequeñas sin BPM</b>	E5P	89,9%
	E6U	85,5%
	E11DL	85, 16%

Según se puede observar en un ejemplo del Anexo 1, de una empresa del Tratamiento 1, donde según los parámetros establecidos, cumple los requisitos planteados en la Resolución 067 del Arcsa, por lo que tiene una calificación de 98,7% de cumplimiento. Las empresas del Tratamiento 1, al tener certificación de Buenas Prácticas de Manufactura cumplen los requerimientos de la norma. Sobre todo, en infraestructura y diseño de la planta ya que al ser empresas grandes se dispone del espacio suficiente para realizar las operaciones y las áreas se dividen de acuerdo al producto procesado en relación con el grado de



contaminación. Uno de los aspectos más importantes que cumplen con calificaciones de 5 (100% cumplimiento), en requisitos higiénicos del personal donde se cumple con requisitos del uniforme limpio del personal, calzado adecuado y la evidencia del lavado y desinfección de manos. Los resultados de las empresas de este tratamiento 1, tienen en común el cumplimiento de las normas mencionadas, en especial las de requisitos de Instalaciones lo que se relaciona con el tamaño de la empresa.

De acuerdo al Arcsa (2015) en la Resolución 067 sobre las Buenas Prácticas de Manufactura, los requisitos de las Instalaciones, es fundamental para controlar las condiciones mínimas básicas y evitar contaminación en el producto. Si se tiene el espacio suficiente y las áreas se dividen de acuerdo al grado de higiene para evitar cruces de materia prima con producto terminado, se tendrá un mejor control de contaminación. Al ser las empresas del T1, empresas grandes con BPM, influye el tamaño de las instalaciones.

En relación de las empresas el Tratamiento 2, los promedios se encuentran en valores entre 89 a 91%. Estas son empresas grandes, pero no tienen implementadas Buenas Prácticas de Manufactura. Sin embargo, se tiene un cumplimiento de 75% de parámetros, pero los aspectos que las empresas de este tratamiento presentan en común son en requisitos relacionados a: protección de polvo, insectos o materias del exterior. Las empresas no tienen un control de la contaminación que viene del exterior, se dio una calificación de 3 (Cumplimiento medio 50%) porque en éstas se encontraban puertas abiertas que daban directamente a la calle y también ventanas abiertas sin ningún tipo de protección que permitía el ingreso de insectos y contaminación de la ciudad. Otro aspecto crítico que presentaron las empresas de este tratamiento se relaciona a las condiciones específicas de las áreas, estructuras internas y accesorios. En este aspecto, las empresas no disponían de dispensadores de desinfectante en las áreas críticas. Esta característica se presentó en todas las empresas de este tratamiento ya que se calificó con 3 (Cumplimiento medio- 50%) porque en las áreas de empaque y moldeado del queso no se tenía dispensadores de desinfectante. En efecto, en este tratamiento no se vio influenciado el tamaño

porque se cumplen los requisitos de las instalaciones sino, más bien en aspectos de control de calidad como son implementos sanitarios necesarios.

En cuanto a las empresas del Tratamiento 3, se puede observar que los valores van de 97 a 100%. En este grupo no se vio influenciado el tamaño de la empresa, pues se lograron cumplir con los parámetros de las instalaciones sobre una adecuada distribución de áreas. El parámetro dentro de la norma que no permitió a las empresas de este grupo llegar a un cumplimiento total, se centró en el Artículo 29 de Equipos y utensilios de la Resolución del Arcsa (2015) sobre evitar el uso de madera o materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente. Al momento de la evaluación se encontraron utensilios de madera, inadecuados para el proceso, lo que bajó la calificación a las empresas de este tratamiento. En cuestión de otros aspectos de la norma, las empresas lograron tener altas calificaciones lo que demostró que al ser certificadas con BPM's cumplen con lo establecido.

En las empresas del Tratamiento 4 se observa las calificaciones más bajas en relación al resto de tratamientos con porcentajes de 85 a 89%. La causa de las calificaciones en las empresas de este tratamiento coincide en aspectos de las Instalaciones sobre todo en el diseño ya que al ser empresas pequeñas no logran ofrecer una total protección contra materias del exterior al dejar puertas y ventanas abiertas que tienen contacto directo con la ciudad o el campo donde se encontraban ubicadas. De igual manera, al no tener un espacio grande, limitadas por su producción, las áreas no se encontraban divididas ni diferenciadas, lo que causa mayor riesgo de contaminación. Se encuentra relacionados también aspectos de Equipos y utensilios, en las empresas se encontró que muchas de las superficies y materiales utilizados representaban un riesgo de contaminación al no encontrarse limpios y no ser de fácil limpieza y desinfección. Un aspecto crítico observado en las empresas fue que, al no tener dispensadores de jabón y desinfectante en áreas determinante, no existía un correcto lavado de manos, lo que deriva a posibles riesgos de contaminación al producto.

De acuerdo al Arcsa (2015), en la Resolución 067, es fundamental el diseño y distribución del área para evitar contaminación cruzada de materia prima a producto terminado, como es el caso de las empresas en este tratamiento, así como tener elementos de protección contra materias extrañas del exterior, que es uno de los puntos de baja calificación en este tratamiento.

#### 4.3. Resultados Análisis *Enterobacterias* y *Staphylococcus aureus*

En el conteo en Ufc/g de las dos variables (*Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus*) de todas las empresas pertenecientes a cada tratamiento se tiene un total de 108 muestras como esta detallado, por cada unidad experimental y por repetición, en el Anexo 4.

En la tabla 12 se detalla el conteo en Ufc/g de las dos variables (*Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus*) de todas las empresas pertenecientes a cada tratamiento, el número total de muestras fueron 108.

Tabla 12.

*Incidencia de Enterobacteriaceae y Staphylococcus aureus en queso fresco.*

			Número (unidad)	Porcentaje %
<b>Muestras Total</b>			108	100
<b>Muestras</b>	<b>totales</b>	<b>de</b>	103	95,37
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>				
<b>Muestras</b>	<b>totales</b>	<b>de</b>	79	73,14
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>				

Según el número total de muestras, un 95,37% resultaron positivas en *Enterobacteriaceae* y 73,14% en *S. aureus*, lo que demuestra que existe una alta incidencia de las bacterias, dependiendo de cada tratamiento y las empresas pertenecientes a los tratamientos, se ve influido por el proceso de pasteurización. El tratamiento 4 (Empresas pequeñas sin BPM) fue el que presentó mayores resultados de Fosfatasa positiva en leche lo que demostró que en el proceso, la pasteurización se realizó a temperaturas menores de 72°C por tiempos cortos o en algunos casos pudo haberse agregado leche cruda. De igual manera influyó

el incumplimiento de las normas en cuanto a la distribución adecuada de las áreas, lo que derivó a posible contaminación cruzada, también en aspectos de contaminación por superficies y materiales contaminadas como el contacto directo del personal que no realizó un proceso de lavado de manos adecuado.,

En el estudio realizado por Cristobal y Maurtua (2010), se presentan datos comparativos sobre la incidencia de *Staphylococcus aureus* en 30 muestras de queso donde 87% resultaron positivas en la bacteria y en *Enterobacterias*, 90% resultado positiva en este microorganismo. En este estudio se realizó de igual manera en las empresas una evaluación de la certificación de Buenas Prácticas de Manufactura. Aquí un 70% de las empresas no cumplió con los parámetros requeridos de control en el proceso sobre todo en las operaciones de producción en los procesos donde no se controlaban las condiciones de operación como la temperatura y el tiempo en el proceso de pasteurización.

#### 4.3.1. Resultados del análisis de varianza de la determinación de la población de *Enterobacterias* y *Staphylococcus aureus* las 12 empresas evaluadas

Los resultados se organizaron en relación a los tratamientos y las variables y las veces que se repitió el proceso. A continuación, se presentan los análisis de varianza, separación de medias y se toma en cuenta que los análisis se realizaron con la prueba de Tukey al 5%.

Tabla 13.

*Resultados en promedio de Unidades Formadoras de colonias por gramos según los tratamientos y repeticiones con su desviación estándar*

VARIABLES (Ufc/g)	T1	T3	T2	T4
	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
R1 <i>Enterobacteriaceae</i>	276,7±134,3	260,0±242,5	355,3±38,8	3573,3±1713,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	170,0±285,8	106,7±184,8	83,7±101,8	573,3±890,0

<b>R2</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	732,7±485,5	76,7±107,9	640,0±307,9	2217,7±1303,0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	150,0±217,0	171,0±287,6	5,3±4,7	913,3±677,2
<b>R3</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	665,7±369,3	233,3±208,2	286,0±231,3	1476,7±948,7
	<i>Staphylococcus aureus</i>	76,7±106,9	47,7±74,1	10,0±10,0	782,3±654,2
<b>R4</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	673,3±694,0	428,7±489,8	1083,3±1070,2	1490,0±600,1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	700,0±1212,4	283,3±482,1	16,7±15,3	993,3±1393,7
<b>R5</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	415,3±506,9	333,3±500,0	345,3±184,8	1726,7±895,9
	<i>Staphylococcus aureus</i>	236,7±401,3	97,7±169,2	20,0±20,0	553,3±743,0
<b>R6</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	653,3±825,9	74,3±56,9	860,7±1166,2	1960,0±36,1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	146,7±245,4	83,7±136,3	16,7±20,8	613,3±860,3
<b>R7</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	886,7±1483,8	153,3±215,7	578,3±326,6	2053,3±607,1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	367,0±634,8	223,3±386,8	3,0±2,6	2166,7±1331,7
<b>R8</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	1083,3±1661,6	133,7±114,9	292,7±176,8	1966,7±641,7
	<i>Staphylococcus aureus</i>	90,0±155,9	216,3±374,7	18,3±13,6	1629,3±1707,2
<b>R9</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	336,0±248,0	70,7±75,4	341,3±121,6	2126,7±510,8
	<i>Staphylococcus aureus</i>	66,7±115,5	327,3±565,2	2,3±1,5	1243,0±1231,4

En cada tratamiento se realizó un promedio de la cantidad en Ufc/g de los microorganismos presentes en las muestras de cada empresa y se muestra con su desviación estándar.

En la tabla se puede observar la diferencia de la cantidad en Ufc/g de los microorganismos (*Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus*), diferenciados por el tamaño de la empresa y la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura. Se observa que los valores del Tratamiento 4 (Empresas pequeñas sin BPM) son los que presentan los valores más altos. Lo que quiere decir que los microorganismos tienen más incidencia en estas empresas porque en estas empresas no se tiene protección contra materias del exterior que son contaminantes para el producto y también por falta de control en procesos de limpieza de utensilios, equipos y en los trabajadores. Además, una característica importante de estas empresas es la pasteurización inadecuada que presentaron dados en los resultados de la fosfatasa alcalina, lo que influyó también en la incidencia de los microorganismos.

Según Donnelly (2014), los productos que presentan alta incidencia de microorganismos y son elaborados con leche que ha pasado por un proceso térmico de pasteurización, muchas veces no tuvieron un control adecuado de la temperatura en la que se realizó, es decir, existió errores en el proceso y también por insuficiencia de limpieza y sanitización en los equipos utilizados.

Tabla 14.

*Análisis de varianza de la variable Enterobacteriaceae Ufc/g*

<b>Fuentes de Variación. (F de V)</b>	<b>Grados de libertad (g/l)</b>	<b>Suma de Cuadrados (SC)</b>	<b>Cuadrado Medio (CM)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Total</b>	35	6,90		
<b>Tamaño Empresa</b>	1	0,01	0,01 <sup>ns</sup>	0,6738
<b>BPM</b>	1	2,27	2,27 <sup>**</sup>	0,0001

<b>Tamaño</b>	1	3,16	3,16**	0,0001
<b>Empresa x BPM</b>				
<b>Error experimental</b>	24	1,19	0,05	

Nota: F.V.= ns= no significativo; \* significativo (<5%), \*\*altamente significativo (<1%)

En el análisis de varianza de *Enterobacteriaceae* como se puede observar en la Tabla 14, se determinó que el factor: tamaño de la empresa (T.E), no es significativo a la variable ( $p=0,06738$ ), lo que deriva a que el tamaño de la empresa no influye en la cantidad de Ufc/g de *Enterobacteriaceae* en las muestras. El factor BPM, es significativo en relación a valor ( $p=0,0001$ ), por lo que la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura en las empresas influye en la cantidad de Ufc/g de *Enterobacteriaceae*. Esto se da porque al tener una correcta distribución de áreas para evitar la contaminación y la instalación, se ofrece protección de materias extrañas. Por otra parte, la certificación de Buenas Prácticas de Manufactura, aseguran que se toman las medidas adecuadas en cuanto a operaciones de producción y aseguramiento y control de Calidad (FAO, 2015). En Enterobacterias es importante el control del tratamiento tiempo-temperatura que se aplica en la leche. De igual manera la limpieza y desinfección de los equipos y utensilios involucrados es importante, ya que al no ser de fácil limpieza como es la madera, es un riesgo de contaminación. De igual manera la falta de control en procesos de limpieza y requisitos de higiene como el correcto lavado de manos y uso de desinfectante en áreas críticas derivan a la incidencia de Enterobacterias en los productos. Finalmente, la interacción de Factores es altamente significativa (0,001) en relación a la variable *Enterobacteriaceae* UFC/g porque al mencionar las razones de implementación de normas y cumplimiento de las mismas, son fundamentales para reducir el riesgo de microorganismos en el proceso y el tamaño de empresa será un factor de ayuda para tener más control de los procesos de elaboración del queso como la pasteurización. La pasteurización elimina la mayoría de la población de bacterias de la leche, pero si no se realiza con los parámetros de 72°C por 15 a 20 segundos, o no se tiene control del cumplimiento de aspectos de BPM, como la

limpieza y desinfección adecuada de equipos y utensilios, se tendrá incidencia de microorganismos en los productos que se elaboran (Donnelly, 2014).

Tabla 15.

*Promedio, desviación estándar, prueba de Tukey (<0,05%) de Enterobacteriaceae en quesos en empresas de Cayambe según tamaño de empresa*

<b>Enterobacteriaceae</b>		
<b>Tamaño Empresa</b>	<b>Medias</b>	
Pequeñas	1130,84±1056,45	A
Grandes	583,66 ± 269,83	B

*Nota:* A y B son valores diferentes. Los valores que tienen una letra igual no presentan diferencia significativa.

En la Tabla 15 se determinó las medias de los valores del Factor 1 (Tamaño de Empresa) en donde se observa la diferencia en los niveles 2 y 1 (Pequeñas y Grandes) respectivamente. Se presentó una diferencia significativa en los valores por la cantidad de Ufc/g de *Enterobacteriaceae*, donde las empresas de tamaño pequeño tienen 1130,84 UFC/g y las empresas de tamaño grande un recuento de 583,66 UFC/g. Esto se da porque por lo general, según lo presentado, las empresas pequeñas al no tener alta capacidad de producción por los limitantes del espacio, las áreas no se distribuyen de acuerdo a las operaciones a realizar, lo que deriva a un riesgo de contaminación. A comparación de las empresas grandes que tienen mayor capacidad y pueden organizar sus procesos de mejor manera donde se puede controlar los procedimientos desde la pasteurización hasta el empaque del producto, tomado en cuenta procedimientos de limpieza.

Al relacionar los valores obtenidos con los requisitos microbiológicos permitidos en queso fresco, según el INEN (2012) en la Norma NTE INEN1528 sobre Queso Fresco Requisitos, plantea que para tener un Nivel de Calidad Buena se debe tener un conteo máximo de  $2 \times 10^2$  y el conteo para considerar de un Nivel



Aceptable de Calidad debe ser de  $10^3$ . Por lo tanto, las empresas pequeñas estarían incumpliendo con la norma al pasarse de los 1000 UFC/g, a diferencia de las empresas grandes donde se presentó un contaje menor de 1000 UFC/g pero más de 200 UFC/g, con un Nivel Aceptable de Calidad.

Tabla 16.

*Promedio, Prueba de Tukey (<0,05%) de Enterobacteriaceae en quesos en empresas de Cayambe según certificación BPM*

<b>BPM</b>	<b>Medias</b>	
Sin BPM	1296.56±918,83	A
Con BPM	415,94± 301,21	B

*Nota:* A y B son valores diferentes. Los valores que tienen una letra igual no presentan diferencia significativa.

En la Tabla 16 se determinó las medias de los valores del Factor 2 (BPM) en donde se observa la diferencia en los niveles 2 y 1 (Sin BPM y Con BPM) respectivamente, existe una diferencia significativa en los valores por la cantidad de UFC/g de *Enterobacteriaceae*, las empresas que no tienen Buenas Prácticas de Manufactura tienen 1130,84 UFC/g y las empresas que poseen Buenas Prácticas de Manufactura un recuento de 415,94 UFC/g. Esto se da claramente porque la implementación de BPM ayuda a mejorar procesos, donde se tiene mayor control sobre todo en aspectos de requisitos higiénicos y aseguramiento y control de calidad. Con las BPM se cumplen los tratamientos de tiempo-temperatura en la pasteurización, enfriamiento y prensado del producto que ayudan a disminuir la presencia de *Enterobacteriaceae*, de igual manera al poseer equipos y utensilios limpios, de fácil limpieza y que se puedan monitorear para controlar el proceso. En especial limpieza e higiene en el personal que manipula el alimento.

En cuanto a los requisitos microbiológicos, según INEN (2012) en la Norma NTE INEN1528 sobre Queso Fresco Requisitos, el valor de las empresas sin BPM estarían incumpliendo con lo establecido al superar los 1000 UFC/g para que se

plantee como Aceptable Calidad, en cuanto a las empresas que si poseen BPM estarían cumpliendo con el Nivel Aceptable de calidad.

Tabla 17.

*Promedio, Prueba de Tukey (<0,05%) de Enterobacteriaceae en quesos en empresas de Cayambe en la interacción de factores*

<b>Tamaño empresa</b>	<b>BPM</b>	<b>Medias</b>	
Pequeña	Sin BPM	2065,68±623,92	A
Grande	Con BPM	635,89±260,45	B
Grande	Sin BPM	531,43±283,16	B
Pequeña	Con BPM	196±126,95	B

*Nota:* A y B son valores diferentes. Los valores que tienen una letra igual no presentan diferencia significativa.

En la Tabla 17 se determinó las medias de los valores de la interacción de factores (T.E. x BPM) en donde se observa la diferencia en los niveles 1-2 y 1-2 de cada uno, se determina que existe una diferencia significativa en los niveles 2x2 (Empresas pequeñas sin BPM) del resto de niveles, en el resto no existe diferencias significativas, la incidencia de mayor cantidad de UFC/g de *Enterobacteriaceae* se da en las empresas pequeñas sin BPM con 2065,68 UFC/g, lo que determina que al no tener implementadas BPM y al ser empresas pequeñas por la baja producción, los procesos no se realizan de la mejor manera. Una empresa de tamaño pequeño que no tiene una certificación de Buenas Prácticas de Manufactura otorgada por el Arcsa, tiene una mayor incidencia a presentar Enterobacterias porque no existe un control de los procesos, en especial la pasteurización, donde se demostró mediante la prueba de fosfatasa alcalina, donde los resultados varían entre Positivo (+) e Intermedio (+/-). Dada por la misma razón de no tener un control que certifique que el proceso se realizó a la temperatura y tiempo requeridos. Así como no se cumplió en otros aspectos de las condiciones específicas de áreas, estructuras internas y accesorios detallados en el Artículo 6 de la Resolución 067 (Arcsa, 2015).

Tabla 18.

*Análisis de varianza de la variable Staphylococcus aureus UFC/g*

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>Grados de libertad (g.l)</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>P-valor</b>
<b>Total</b>	35	20,58		
<b>Tamaño Empresa</b>	1	7,82	7,82**	0,0001
<b>BPM</b>	1	0,29	0,29 <sup>ns</sup>	0,1360
<b>Tamaño Empresa x BPM</b>	1	8,80	8,80**	0,0001
<b>Error</b>	24	2,86	0,12	

*Nota:* ns= no significativo; \* significativo (<5%), \*\*altamente significativo (<1%)

En el análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* (Tabla 18), se determinó que el factor, Tamaño de la empresa (T.E), es altamente significativo a la variable ( $p=0,0001$ ) lo que deriva a que el tamaño de la empresa, en este caso, influye en la cantidad de UFC/g de *Staphylococcus aureus* en las muestras. El factor BPM, es no significativo en relación a la variable ( $p=0,1360$ ). Esto se da porque la mayor parte de las empresas de este factor, el espacio físico fue un determinante para la propagación de la bacteria. Como menciona Alarcón (2017) *Staphylococcus aureus por lo general se encuentra* en la región nasofaríngea de las personas y los posibles portadores de la bacteria al no utilizar la mascarilla adecuadamente pueden contaminar el ambiente más en espacios pequeños. La interacción de Factores es altamente significativa ( $p=0,001$ ) en relación a la variable *Staphylococcus aureus* UFC/g porque al mencionar las razones de implementación de normas y cumplimiento de las mismas en este caso control del personal, la vestimenta y uso de cofia, mascarilla y guantes. Los aspectos son fundamentales para reducir el riesgo de microorganismos en el proceso y el tamaño de empresa será un factor de ayuda para tener más control de los procesos junto con la implementación y cumplimiento.

Tabla 19.

*Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de Staphylococcus aureus en quesos en empresas de Cayambe*

<b>Tamaño Empresa</b>	<b>Medias</b>	
Pequeña	612,49±590,56	A
Grande	121,10±174,31	B

*Nota:* A y B son valores diferentes. Los valores que tienen una letra igual no presentan diferencia significativa.

En la Tabla 24 se determinó las medias de los valores del Factor 1 (Tamaño de Empresa) en donde se observa la diferencia en los niveles 2 y 1 (Pequeñas y Grandes) respectivamente, se presenta una diferencia significativa en los valores por la cantidad de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, donde las empresas de tamaño pequeño tienen 612,49 UFC/g y las empresas de tamaño grande un recuento de 121,10 UFC/g. Esto se da porque, las empresas pequeñas al no tener alta capacidad de producción por los limitantes del espacio, las áreas no se distribuyen de acuerdo a las operaciones a realizar, es decir no se tienen los espacios adecuados para cada actividad. Esto deriva a un riesgo de contaminación, en especial con esta bacteria que se propaga por los manipuladores de los alimentos. En comparación, las empresas grandes presentan mayor capacidad y tienen mejor organización de procesos donde se puede controlar los procedimientos desde la pasteurización hasta el empaque del producto, tomado en cuenta procedimientos de limpieza y a los trabajadores con los registros de verificación de la limpieza de manos y vestimenta adecuada.

En cuanto a los requisitos microbiológicos, según lo planteado por INEN (2012) en la Norma NTE INEN:1528 sobre Queso Fresco Requisitos, plantea que para tener un Nivel de Calidad Buena se debe tener un contaje máximo de 10 y el contaje para considerar de un Nivel Aceptable de Calidad debe ser de  $10^2$ , por lo que en este factor las empresas no cumplen con lo establecido en la norma, para ser considerados de Buena o Aceptable calidad, dado que el contaje sobrepasa los 10 y 100 UFC/g admitido.

Tabla 20.

*Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de Staphylococcus aureus en quesos en empresas de Cayambe*

<b>BPM</b>	<b>Medias</b>	
Sin BPM	535,77±649,87	A
Con BPM	197,82±155,52	B

*Nota:* A y B son valores diferentes. Los valores que tienen una letra igual no presentan diferencia significativa.

En la Tabla 20 se determinó las medias de los valores del Factor 2 (BPM) en donde se observa la diferencia en los niveles 2 y 1 (Sin BPM y Con BPM) respectivamente, existe una diferencia significativa en los valores por la cantidad de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, donde las empresas que no tienen Buenas Prácticas de Manufactura tienen 535,77 UFC/g y las empresas que poseen Buenas Prácticas de Manufactura un recuento de 197,82 UFC/g. Esto se da claramente porque la implementación de BPM ayuda a mejorar procesos, donde se tiene mayor control sobre todo en aspectos de requisitos higiénicos y aseguramiento y control de calidad. Al tener procedimientos y registros de sanidad y en los manipuladores de alimentos donde se tenga control de lavado de manos y de la vestimenta. En el personal es importante revisar el uniforme completo, con cofia y mascarilla que se coloque correctamente, por el riesgo de contaminación al producto, también revisión en las manos para tener un control si no llevan heridas o cortes y si los hay, la obligación de uso de guantes.

En cuanto a los requisitos microbiológicos, según INEN (2012) en la Norma NTE INEN1528 sobre Queso Fresco Requisitos, el valor de las empresas con y sin BPM estarían incumpliendo con lo establecido al superar los 100 UFC/g para que se plantee como Aceptable Calidad y Buena Calidad.

Tabla 21.

Promedio desviación estándar, Prueba de Tukey (<0,05%) de *Staphylococcus aureus* en quesos en empresas de Cayambe

Tamaño empresa	BPM	Medias	E.E
Pequeña	Sin BPM	1051,98±545,19	93,77 A
Grande	Con BPM	222,64±201,85	93,77 B
Pequeña	Con BPM	173±96,28	93,77 B
Grande	Sin BPM	19,56±24,98	93,77 B

Nota: A y B son valores diferentes. Los valores que tienen una letra igual no presentan diferencia significativa.

En la Tabla 21 se determinó las medias de los valores de la interacción de factores (T.E. x BPM) en donde se observa la diferencia en los niveles 1-2 y 1-2 de cada uno, se determina que existe una diferencia significativa en los niveles 2x2 (Empresas pequeñas sin BPM) del resto de niveles, en el resto no existe diferencias significativas, la incidencia de mayor cantidad de UFC/g de *Enterobacteriaceae* se da en las empresas pequeñas sin BPM con 1051,98 UFC/g, lo que determina que al no tener implementadas BPM y tener poca producción, los procesos no se realizan de la manera más adecuada, lo que determina que al no tener implementadas BPM y al ser empresas pequeñas por la baja producción, los procesos no se realizan de la mejor manera. Una empresa de tamaño pequeño que no tiene una certificación de Buenas Prácticas de Manufactura otorgada por el Arcsa, tiene una mayor incidencia a presentar *S.aureus* porque no existe un control de los procesos.

En cuanto requisitos microbiológicos solo la interacción de 1-1 de Empresas grandes con BPM, estaría cumpliendo con lo establecido en la norma, como nivel de Aceptable Calidad con menos de 200 Ufc/g (INEN, 2012).

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

La cantidad de UFC/g de *Enterobacteriaceae* representan un 95,37% del total de muestras tomadas (108), en relación a *Staphylococcus aureus* la cantidad de UFC/g representan un 73,14% del total de muestras, lo que determina que la incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* es alta en quesos en empresas del cantón Cayambe.

El cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura en las empresas se ve evidenciado en sus procesos, según se determinó por tratamientos, el tratamiento 1 tienen alto cumplimiento de la lista de verificación (98%) por infraestructura y diseño de la planta ya que al ser empresas grandes se dispone del espacio suficiente para realizar las operaciones y las áreas se dividen de acuerdo al grado de contaminación. En cuanto a empresas del tratamiento 2, el cumplimiento (90%) se ve influenciado por requisitos de protección de polvo, insectos o materias del exterior. No se tiene un control de la contaminación que viene del exterior. En el Tratamiento 3 el cumplimiento (93,8) se ve influenciado el uso de madera o materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente. Finalmente, el Tratamiento 4 el cumplimiento (80%) se ve influenciado por falta de dispensadores de jabón y desinfectante en áreas determinante, por lo que no se daba un correcto lavado de manos, lo que deriva a posibles riesgos de contaminación al producto.

La calidad de la materia prima y su proceso de pasteurización influye directamente sobre el resultado en el producto final (queso), si no se realiza un adecuado proceso de pasteurización, existe mayor probabilidad de incidencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en los mismos, según se determinó en los resultados de fosfatasa alcalina de las muestras de leche, la falta de implementación de Buenas Prácticas de Manufactura y el tamaño de la empresa influyen sobre el tratamiento térmico que se le da a la leche porque en empresas que no son certificadas con BPM, no existen control en las operaciones de producción sobre tiempo y temperatura y muchas veces en este

tipo de industria, en especial con poca producción no toman en cuenta como un proceso de alta importancia. A comparación de empresas certificadas y de alta producción que toman tiempos y temperaturas de manera estricta.

La incidencia de los microorganismos en quesos frescos se ve influido por el Tamaño de la empresa y la certificación de Buenas Prácticas de Manufactura, en *Enterobacteriaceae*, por lo que se observa una mayor incidencia en Empresas pequeñas y sin BPM. Se da porque al no tener procedimientos y registros que controlen todos los procesos de la elaboración del queso, todos los equipos y utensilios no cumplen con los requerimientos óptimos o en el proceso se tienen productos contaminantes que no pertenecen al proceso como agua para limpiar o lubricantes para equipos. El personal también cumple un papel importante porque sin los accesorios para controlar la contaminación, no existe un correcto lavado de manos y uso adecuado de uniformes, lo que puede causar contaminación cruzada al producto. En *S. aureus* se observa mayor incidencia también en empresas pequeñas sin BPM por las mismas razones de falta de control. En este caso contar las empresas con instalaciones pequeñas el riesgo de contaminación en el ambiente aumenta.

## **5.2. Recomendaciones**

Aportar con las industrias implicadas sobre la importancia de la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura, en especial las empresas que únicamente tienen Prácticas Correctas de higiene. Al ser distribuidores de productos lácteos existen siempre los riesgos de contaminación y riesgos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Se realizaría mediante el análisis de los resultados con los representantes de las industrias y realizando visitas a la planta para poder revisar cada uno de los parámetros evaluados en la lista de verificación para que puedan llegar a la máxima calificación.

En el proceso de determinación de presencia de los microorganismos, se recomienda realizar la inoculación en varias diluciones (4 diluciones recomendables). Con el fin de tener un conteo óptimo y elegir el conteo el más



adecuado para el proceso. Al ser una industria grande, muchas veces existen cambios en las empresas que alteran los resultados de una muestra a otra.

Evaluar el proceso de pasteurización en cada empresa dados los resultados de fosfatasa alcalina en la leche. Lo que demuestra que no se está prestando importancia al tiempo y temperatura adecuados (72°C por 20 minutos).

Profundizar la investigación del proceso en empresas que presentaron resultados adecuados tanto en la Fosfatasa alcalina como un alto porcentaje de cumplimiento en la lista de verificación de Buenas Prácticas de Manufactura, pero en el conteo de los microorganismos en Ufc/g presentaron cantidades altas que incumplen con lo establecido en la norma.

## REFERENCIAS

- Acqua. (2018). *Tiras Reactivas Phosphatesmo MI*. Recuperado el 28 de Mayo del 2018 de <http://linealab.net/agroindustria-y-alimentos/72-tiras-reactivas-phosphatesmo-mi.html>)
- Alarcón, M., Oyarzo, C., Escudero, C., Cerda, F., y Valenzuela, F. (2017). *Portación de Staphylococcus aureus enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos*. Recuperado el 26 de Mayo de 2018 de [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872017001201559&lng=en&nrm=iso&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872017001201559&lng=en&nrm=iso&tlng=en) .
- Amarillas, L., Rubí, L., Chaidez, C., González, A., Lightbourn, L., y León, J. (2017). *Isolation and Characterization of phiLLS, a Novel Phage with Potential Biocontrol Agent against Multidrug-Resistant Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. Recuperado el 11 de Junio de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5519627/>
- Andino, F., y Yorling, C. (2010). *Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria*. Recuperado el 18 de Febrero del 2018 de <https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>
- Argote, F., Suárez, Z., Tobar, M., Pérez, J., Hurtado, A., y Delgado, J. (2017). *Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Escherichia coli*. Recuperado el 18 de Mayo de 2018 de [https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612017000400052](https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612017000400052)
- Arguello, P., Lucero, O., Castillo, G., Escobar, S., Albuja, A., Gallegos, J., y Carrascal, A. (2015). *Calidad microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba (Ecuador)*. Recuperado el 04 de Abril de 2018 de

<https://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4983/1/56T00630%20UDCTFC.pdf>

Bárcena, J., García, C., Padilla, C., Martínez, E., y Díez, J. (2014). *Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina*. *Revista UCO Bioquímica y Biología molecular*. Recuperado el 06 de Mayo de 2018 de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-368-1983.PD>

Bertó, R. (2015). *Seguridad e Higiene Alimentaria, Staphylococcus aureus en la Industria Alimentaria*. Recuperado el 17 de Febrero del 2018 de <http://www.betelgeux.es/blog/2015/07/09/staphylococcus-aureus-en-la-industria-alimentaria/>

Britania. (2018). *Agar Mac Conkey y sus funciones*. Recuperado el 29 de Mayo del 2018 de [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2834ae226e6.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2834ae226e6.pdf)

Campo, A., Mendes, R., Torres, E., y Fonseca, J. (2017). *Staphylococcus aureus en alimentos*. Recuperado el 11 de Junio de 2018 de <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios/article/view/3531/11812>

Carpl, A. (2002). *Prevención de la Contaminación en la Industria Láctea*. *Barcelona*. Recuperado el 30 de Marzo de 2018 de [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/lac\\_es.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/lac_es.pdf)

Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. Recuperado el 16 de Mayo de 2018 de <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48300>

Chávez, J. (2015). *Cayambe uno de los grandes productores lácteos del país*. *El Comercio*. Recuperado el 29 de Marzo de 2018 de <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/feria-del-queso-se-realiza.html>

- Cordero, A. (2015). *Determinación de Listeria spp en quesos frescos elaborados en las fábricas artesanales del Cantón San Fernando. Cuenca.* Recuperado el 19 de Marzo de 2018 de <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/4836/1/11281.pdf>
- Cousin, M., Hardi, M., Volk, V, y Bodmer, M. (2018). *Control of Staphylococcus aureus in dairy herds in a region with raw milk cheese production: farmers' attitudes, knowledge, behaviour and belief in self-efficacy.* BioMed Central. Recuperado el 08 de Abril de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5810121/>
- Cristobal, R., y Maurtua, D. (2010). *Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de Lactobacillus spp.* Recuperado el 18 de Marzo de 2018 de <https://www.scielo.org/article/rpsp/2003.v14n3/158-164/>
- Deacon, A. (2012). *Staphylococcus aureus, el patógeno de los manipuladores.* Recuperado el 15 de Marzo del 2018 de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2003/11/22/9514.php>
- Denicia, E., y Ramírez, M. (2009). *La Industria de Leche y la contaminación del agua.* Recuperado el 18 de Abril de 2018 de <http://www.elementos.buap.mx/num73/htm/27.htm>
- Díaz, F., Caicedo, J., y Mejía, L. (2016). *Modelo de gestión de la inocuidad del sector lácteo en el Departamento de caldas (Colombia).* Recuperado el 03 de Junio de 2018 de <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/414-851-1-PB.pdf>
- Espinoza, A., De la Torre, M., & Salinas, F. (2004). *Determinación de Listeria monocytogenes en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003.* Recuperado el 28 de Febrero del 2018 de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342004000200003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342004000200003)

- FAO. (2016). *Sistemas de Gestión de la Inocuidad de los Alimentos*. Recuperado el 16 de Marzo del 2018 de: <http://www.fao.org/docrep/007/j0776s/j0776s07.htm>
- FAO. (2015). *Prevención de la E.coli en los Alimentos*. FAO. Recuperado el 04 de Abril del 2018 de [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf)
- Flórez, A., Rincón, A., Garzón, P., Vargas, N., y Enríquez, C. (2007). *Factores relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes de cinco ciudades de Colombia*. Recuperado el 12 de Abril de 2018 de <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/129/200>
- Freire, P., García, M., y Suárez, A. (2011). *Microbiología oral y control de los microorganismos*. Recuperado el 06 de Abril del 2018 de <https://microral.wikispaces.com/7.+Control+de+los+microorganismos>.
- INEN. (2012). *NTE INEN 1528: Norma general para quesos frescos no madurados*. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado el 23 de Marzo de 2018 de <https://archive.org/details/ec.nte.1528.2012>
- Lee, A. (2012). *Microbiología Industrial Alimentaria*. Unizar. Recuperado el 12 de Abril del 2018 de [http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica\\_biologia/docencia/ByMIn d/de%20javier%20Raso/MICROBIOLOGIA%20INDUSTRIAL%20Alimentaria.pdf](http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/ByMIn d/de%20javier%20Raso/MICROBIOLOGIA%20INDUSTRIAL%20Alimentaria.pdf)
- Luján, D., Valentín, M., y Molina, M. (2017). *Evaluación de la presencia de Staphylococcus aureus en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima - Perú*. Recuperado el 01 de Junio de 2018 de <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/166/148>
- Luo, K., Shao, F., Kamara, K., Chen, S., Zhang, R., Duan, G., y Yang, H. (2018). *Molecular characteristics of antimicrobial resistance and virulence determinants of Staphylococcus aureus isolates derived from clinical*

*infection and food*. Recuperado el 19 de Mayo de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29676483>

Malavi, D., Muzhingi, T., y Abong, G. (2018). *Good Manufacturing Practices and Microbial Contamination Sources in Orange Fleshed Sweet Potato Puree Processing Plant in Kenya*. *International Journey of Food Science*. Recuperado el 23 de Mayo de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5902010/>

Marder, E., et al. (2018). *Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2017*. Recuperado el 11 de Abril de 2018 de [https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6711a3.htm?s\\_cid=mm6711a3\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6711a3.htm?s_cid=mm6711a3_w)

Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., y Sánchez, J. (2010). *Los Microorganismos; pequeños gigantes*. Recuperado el 02 de Junio de 2018 de <http://www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf>

Nordann, P., Naas, T., y Poirel, L. (2011). *Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Recuperado el 19 de Abril de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000347>

Novachem. (2018). *Agar Base Manitol Sal de Novachem Del Ecuador*. Recuperado el 14 de Junio de 2018 de: <http://www.novachem.com.ec/producto/agar-base-sal-manitol/>

Pérez, N. (2014). *Diseño y Desarrollo del Plan de Buenas Prácticas de Manufactura para la planta de Producción de Alimentos Balanceados de Agrotécnica en la Ciudad de Riobamba*. Recuperado el 09 de Marzo de 2018 de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3894/1/56T00503%20UDCTFC.pdf>

Plaza, L. (2013). *Análisis Microbiológico en Quesos Frescos que se expenden en supermercados de la Ciudad de Guayaquil, determinando la presencia*

- o ausencia de Listeria y Salmonella*. Recuperado el 02 de Marzo de 2018 de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30915>
- ProEcuador. (2014). *Alimentos Frescos y Procesados*. Recuperado el 19 de Abril de 2018 de <https://www.proecuador.gob.ec/sector1-3/>
- Puerta, A., y Mateos, F. (2010). *Enterobacterias*. Recuperado el 17 de Mayo de 2018 de [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias\\_Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf)
- Quality, F. (2013). *Microorganismos y Alimentos*. Recuperado el 13 de Marzo de 2018 de [http://www.epralima.com/infoodquality/materiais\\_espanhol/Manuais/3.Microorganismos\\_y\\_alimentos.pdf](http://www.epralima.com/infoodquality/materiais_espanhol/Manuais/3.Microorganismos_y_alimentos.pdf)
- Ramírez, C., y Vélez, J. (2016). *Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad*. Recuperado el 09 de Junio de 2018 de [https://www.researchgate.net/profile/Carolina\\_Ramirez\\_Lopez/publication/303959697\\_Quesos\\_frescos\\_propiedades\\_metodos\\_de\\_determinacion\\_y\\_factores\\_que\\_afectan\\_su\\_calidad/links/57601b6208ae227f4a3ee94e/Quesos-frescos-propiedades-metodos-de-determinacion-y-factores-que-afectan-su-calidad.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Carolina_Ramirez_Lopez/publication/303959697_Quesos_frescos_propiedades_metodos_de_determinacion_y_factores_que_afectan_su_calidad/links/57601b6208ae227f4a3ee94e/Quesos-frescos-propiedades-metodos-de-determinacion-y-factores-que-afectan-su-calidad.pdf)
- Rivera, J., Mujica, I., Aranga, V., Navarro, C., Zabala, I., y Atencio, L. (2011). *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmido. Recuperado el 23 de Junio de 2018 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95918239003>
- Rodríguez, J. (2002). *El control de patógenos en los Alimentos*. Recuperado el 10 de Mayo de 2018 de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2001/04/12/38.php>
- Rodríguez, J., Borrás, L., Pulido, M., y García, D. (2015). *Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de*

- Tunja, Colombia. Recuperado el 04 de Abril de 2018 de <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/47/56>
- Rubeglio, E., y Tesone, A. (2007). *Escherichia coli* 0157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. Recuperado el 05 de Junio de 2018 de <http://www.scielo.org.ar/pdf/aap/v105n3/v105n3a01.pdf>
- Salgado, M., y Castro, K. (2007). *Importancia de las Buenas Prácticas de Manufactura en cafeterías y restaurantes*. Recuperado el 10 de Abril de 2018 de [http://vector.ucaldas.edu.co/downloads/Vector2\\_4.pdf](http://vector.ucaldas.edu.co/downloads/Vector2_4.pdf)
- SARH. (2003). *Fosfatasa residual, método de prueba*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Recuperado el 03 de Junio de 2018 de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-368-1983.PDF>
- Seija, V. (2008). *Etiopatogenia microbiológica*. Recuperado el 12 de Marzo de 2018 de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Standars, U. (2015). *UK Identification of Enterobacteriaceae Public Health England*. Recuperado el 11 de Abril de 2018 de [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/identification\\_of\\_enterobacteriaceae.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/identification_of_enterobacteriaceae.pdf)
- Tecanhuey, M. (2017). *Response of Listeria monocytogenes and Escherichia coli inoculated in Fresh Cheese exposed to thyme essential oil by direct contact*. UDLAP Biblioteca. Recuperado el 27 de Marzo de 2018 de [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/tecuanhuey\\_lopez\\_md/](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/tecuanhuey_lopez_md/)
- Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T., y Fowler, V. (2015). *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management*. Recuperado el 01 de Junio de 2018 de <http://cmr.asm.org/content/28/3/603.full.pdf+html>
- Zendejas, G., Avalos, H., y Soto, M. (2014). *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de*



identificación. Recuperado el 28 de Mayo de 2018 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

## **ANEXOS**

**Anexo 1. Resultados de Lista de verificación de empresa perteneciente al Tratamiento1.**

<b>LISTA DE VERIFICACIÓN- BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (EMPRESAS CAYAMBE)</b>				<b>NOMBRE ESTABLECIMIENTO: E1H</b>
				<b>FECHA: 9 Abril 2018</b>
<b>No</b>	<b>REQUISITOS</b>	<b>VALORACIÓN</b>	<b>CUMPLE /NO CUMPLE</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
<b>REQUISITOS DE LAS INSTALACIONES</b>				
<b>(Art. 5) Diseño y Construcción</b>				
1	Ofrece protección contra polvo, materias extrañas, insectos, roedores, aves y otros elementos del ambiente exterior	5	C	
2	La construcción es sólida y dispone de espacio suficiente para la instalación; operación y mantenimiento de los equipos	5	C	
3	Las áreas interiores están divididas de acuerdo al grado de higiene y al riesgo de contaminación.	5	C	
<b>(Art. 6) Condiciones específicas de las áreas, estructuras internas y accesorios.</b>				
<b>9. Instalaciones Sanitarias</b>				
4	Las instalaciones sanitarias no tienen acceso directo a las áreas de Producción.	5	C	
5	Se dispone de dispensador de jabón, papel higiénico, implementos para secado de manos, recipientes cerrados para depósito de material usado en las instalaciones sanitarias	5	C	
6	Se dispone de dispensadores de desinfectante en las áreas críticas	5	C	
7	Se ha dispuesto comunicaciones o advertencias al personal sobre la obligatoriedad de lavarse las manos después de usar los sanitarios y antes de reiniciar las labores de producción	5	C	

EQUIPOS Y UTENSILLOS				
<b>(Art. 8) (Art. 29)</b>				
8	Diseño y distribución está acorde a las operaciones a realizar	5	C	
9	Las superficies y materiales en contacto con el alimento, no representan riesgo de contaminación	5	C	
10	Se evita el uso de madera o materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente o se tiene certeza que no es una fuente de contaminación	3	NC	Se encuentran dos tablas de madera
11	Los equipos y utensilios ofrecen facilidades para la limpieza, desinfección e inspección	5	C	
12	Las mesas de trabajo con las que cuenta son lisas, bordes redondeados, impermeables, inoxidable y de fácil limpieza	5	C	
13	Cuentan con dispositivos para impedir la contaminación del producto por lubricantes, refrigerantes, etc.	5	C	
<b>(Art. 9) Monitoreo de los equipos</b>				
14	Provista de instrumentación e implementos de control adecuados	5	C	
REQUISITOS HIGIÉNICOS DE FABRICACIÓN PERSONAL				
<b>(Art. 10) Consideraciones Generales</b>				
15	Se mantiene la higiene y el cuidado personal	5	C	
<b>(Art. 13) Higiene y medidas de protección</b>				
16	El personal dispone de uniformes que permitan visualizar su limpieza, se encuentran en buen estado y limpios	5	C	
17	El calzado es adecuado para el proceso productivo (cerrado e impermeable)	5	C	
18	El uniforme es lavable o desechable y las operaciones de lavado se realiza en un lugar apropiado	5	C	
19	Se evidencia que el personal se lava las manos y desinfecta según procedimientos establecidos	5	C	
<b>(Art. 14) Comportamiento del personal</b>				
20	El personal acata las normas establecidas que señalan la prohibición de fumar y consumir alimentos y bebidas	5	C	
21	El personal de áreas productivas mantiene el cabello cubierto, uñas cortas, sin esmalte, sin joyas, sin maquillaje, barba o bigote cubiertos durante la jornada de trabajo	5	C	
<b>(Art. 17)</b>				
22	Las visitas y el personal administrativo ingresan a áreas de proceso con las debidas protecciones y con ropa adecuada	5	C	

OPERACIONES DE PRODUCCIÓN				
<b>(Art. 28) (Art. 31)</b> Procedimientos y actividades de producción				
23	Se realiza controles de las condiciones de operación(tiempo, temperatura, humedad, actividad acuosa ( <i>Aw</i> ), pH, presión, etc., cuando el proceso y naturaleza del alimento lo requiera	5	C	
24	Se tiene riesgo de contaminación como agua, goteras o cualquier tipo de sustancia que salpique al alimento en el proceso	5	C	
<b>(Art. 30) Condiciones pre operacionales</b>				
25	Existen procedimientos de producción y están disponibles	5	C	
26	Se cuenta con aparatos de control en buen estado de funcionamiento	5	C	
ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD				
27	EL tratamiento de tiempo-temperatura aplicado a la leche cruda corresponde a un tratamiento de pasteurización	5	C	73°C por 4 minutos
28	Las personas que manipulan directamente el producto usan algún tipo de protector de boca y nariz	5	C	
29	En caso de respuesta afirmativa a la pregunta anterior, el protector usado tapa eficazmente boca y nariz	5	C	
30	Las personas que manipulan directamente el producto tienen las manos limpias, uñas cortas y sin heridas visibles?	5	C	
31	Durante las operaciones de procesamiento del queso y mientras éste se encuentra expuesto, no puede haber operaciones que se realicen al mismo tiempo y que tengan riesgo de contaminar el producto que está expuesto	5	C	

**Anexo 2. Resultados de Lista de verificación de empresa perteneciente al Tratamiento2.**

LISTA DE VERIFICACIÓN- BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (EMPRESAS CAYAMBE)			NOMBRE ESTABLECIMIENTO: E2LF FECHA: 23/04/2018	
No	REQUISITOS	VALORACIÓN	CRIT/NOCRI T (ESTIMATIVO)	OBSERVACIONES
<b>(Art. 5) Diseño y Construcción</b>				
1	Ofrece protección contra polvo, materias extrañas, insectos, roedores, aves y otros elementos del ambiente exterior	3	C	
2	La construcción es sólida y dispone de espacio suficiente para la instalación; operación y mantenimiento de los equipos	4	NC	
3	Las áreas interiores están divididas de acuerdo al grado de higiene y al riesgo de contaminación.	5	C	
<b>(Art. 6) Condiciones específicas de las áreas, estructuras internas y accesorios.</b>				
<b>9. Instalaciones Sanitarias</b>				
4	Las instalaciones sanitarias no tienen acceso directo a las áreas de Producción.	5	C	
5	Se dispone de dispensador de jabón, papel higiénico, implementos para secado de manos, recipientes cerrados para depósito de material usado en las instalaciones sanitarias	4	C	
6	Se dispone de dispensadores de desinfectante en las áreas críticas	3	C	
7	Se ha dispuesto comunicaciones o advertencias al personal sobre la obligatoriedad de lavarse las manos después de usar los sanitarios y antes de reiniciar las labores de producción	4	C	

EQUIPOS Y UTENSILLOS				
<b>(Art. 8) (Art. 29)</b>				
8	Diseño y distribución está acorde a las operaciones a realizar	4	NC	
9	Las superficies y materiales en contacto con el alimento, no representan riesgo de contaminación	4	C	Una mesa sucia
10	Se evita el uso de madera o materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente o se tiene certeza que no es una fuente de contaminación	3	C	Uso de tablas de madera
11	Los equipos y utensilios ofrecen facilidades para la limpieza, desinfección e inspección	5	C	
12	Las mesas de trabajo con las que cuenta son lisas, bordes redondeados, impermeables, inoxidable y de fácil limpieza	5	C	
13	Cuentan con dispositivos para impedir la contaminación del producto por lubricantes, refrigerantes, etc.	5	NC	
<b>(Art. 9) Monitoreo de los equipos</b>				
14	Provista de instrumentación e implementos de control adecuados	4	NC	
REQUISITOS HIGIÉNICOS DE FABRICACIÓN PERSONAL				
<b>(Art. 10) Consideraciones Generales</b>				
15	Se mantiene la higiene y el cuidado personal	5	C	
<b>(Art. 13) Higiene y medidas de protección</b>				
16	El personal dispone de uniformes que permitan visualizar su limpieza, se encuentran en buen estado y limpios	5	C	
17	El calzado es adecuado para el proceso productivo (cerrado e impermeable)	5	NC	
18	El uniforme es lavable o desechable y las operaciones de lavado se realiza en un lugar apropiado	5	C	
19	Se evidencia que el personal se lava las manos y desinfecta según procedimientos establecidos	5	C	
<b>(Art. 14) Comportamiento del personal</b>				
20	El personal acata las normas establecidas que señalan la prohibición de fumar y consumir alimentos y bebidas	4	C	
21	El personal de áreas productivas mantiene el cabello cubierto, uñas cortas, sin esmalte, sin joyas, sin maquillaje, barba o bigote cubiertos durante la jornada de trabajo	5	C	
<b>(Art. 17)</b>				
22	Las visitas y el personal administrativo ingresan a áreas de proceso con las debidas protecciones y con ropa adecuada	5	C	

OPERACIONES DE PRODUCCIÓN				
<b>(Art. 28) (Art. 31)</b> Procedimientos y actividades de producción				
23	Se realiza controles de las condiciones de operación(tiempo, temperatura, humedad, actividad acuosa (Aw), pH, presión, etc., cuando el proceso y naturaleza del alimento lo requiera	4	C	
24	Se tiene riesgo de contaminación como agua, goteras o cualquier tipo de sustancia que salpique al alimento en el proceso	5	C	
<b>(Art. 30) Condiciones pre operacionales</b>				
25	Existen procedimientos de producción y están disponibles	4	NC	
26	Se cuenta con aparatos de control en buen estado de funcionamiento	4	C	
ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD				
27	EL tratamiento de tiempo-temperatura aplicado a la leche cruda corresponde a un tratamiento de pasteurización	5	C	73° por 5 minutos
28	Las personas que manipulan directamente el producto usan algún tipo de protector de boca y nariz?	5	C	
29	En caso de respuesta afirmativa a la pregunta anterior, el protector usado tapa eficazmente boca y nariz?	4	C	
30	Las personas que manipulan directamente el producto tienen las manos limpias, uñas cortas y sin heridas visibles?	5	C	
31	Durante las operaciones de procesamiento del queso y mientras éste se encuentra expuesto, no puede haber operaciones que se realicen al mismo tiempo y que tengan riesgo de contaminar el producto que está expuesto	5	C	



**Anexo 3. Resultados de Lista de verificación de empresa perteneciente al Tratamiento3.**

LISTA DE VERIFICACIÓN- BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (EMPRESAS CAYAMBE)			NOMBRE ESTABLECIMIENTO: E7Y	
			FECHA: 23/04/2018	
No	REQUISITOS	VALORACIÓN	CRIT/NOCRI T (ESTIMATIVO)	OBSERVACIONES
<b>REQUISITOS DE LAS INSTALACIONES</b>				
<b>(Art. 5) Diseño y Construcción</b>				
1	Ofrece protección contra polvo, materias extrañas, insectos, roedores, aves y otros elementos del ambiente exterior	5	C	
2	La construcción es sólida y dispone de espacio suficiente para la instalación; operación y mantenimiento de los equipos	5	NC	
3	Las áreas interiores están divididas de acuerdo al grado de higiene y al riesgo de contaminación.	5	C	
<b>(Art. 6) Condiciones específicas de las áreas, estructuras internas y accesorios.</b>				
<b>9. Instalaciones Sanitarias</b>				
4	Las instalaciones sanitarias no tienen acceso directo a las áreas de Producción.	5	C	
5	Se dispone de dispensador de jabón, papel higiénico, implementos para secado de manos, recipientes cerrados para depósito de material usado en las instalaciones sanitarias	5	C	
6	Se dispone de dispensadores de desinfectante en las áreas críticas	5	C	
7	Se ha dispuesto comunicaciones o advertencias al personal sobre la obligatoriedad de lavarse las manos después de usar los sanitarios y antes de reiniciar las labores de producción	5	C	

EQUIPOS Y UTENSILLOS				
<b>(Art. 8) (Art. 29)</b>				
8	Diseño y distribución está acorde a las operaciones a realizar	5	NC	
9	Las superficies y materiales en contacto con el alimento, no representan riesgo de contaminación	5	C	
10	Se evita el uso de madera o materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente o se tiene certeza que no es una fuente de contaminación	5	C	
11	Los equipos y utensilios ofrecen facilidades para la limpieza, desinfección e inspección	5	C	
12	Las mesas de trabajo con las que cuenta son lisas, bordes redondeados, impermeables, inoxidables y de fácil limpieza	5	C	
13	Cuentan con dispositivos para impedir la contaminación del producto por lubricantes, refrigerantes, etc.	5	NC	
<b>(Art. 9) Monitoreo de los equipos</b>				
14	Provista de instrumentación e implementos de control adecuados	5	NC	
REQUISITOS HIGIÉNICOS DE FABRICACIÓN PERSONAL				
<b>(Art. 10) Consideraciones Generales</b>				
15	Se mantiene la higiene y el cuidado personal	5	C	
<b>(Art. 13) Higiene y medidas de protección</b>				
16	El personal dispone de uniformes que permitan visualizar su limpieza, se encuentran en buen estado y limpios	5	C	
17	El calzado es adecuado para el proceso productivo (cerrado e impermeable)	5	NC	
18	El uniforme es lavable o desechable y las operaciones de lavado se realiza en un lugar apropiado	5	C	
19	Se evidencia que el personal se lava las manos y desinfecta según procedimientos establecidos	5	C	
<b>(Art. 14) Comportamiento del personal</b>				
20	El personal acata las normas establecidas que señalan la prohibición de fumar y consumir alimentos y bebidas	5	C	
21	El personal de áreas productivas mantiene el cabello cubierto, uñas cortas, sin esmalte, sin joyas, sin maquillaje, barba o bigote cubiertos durante la jornada de trabajo	5	C	
<b>(Art. 17)</b>				
22	Las visitas y el personal administrativo ingresan a áreas de proceso con las debidas protecciones y con ropa adecuada	5	C	

OPERACIONES DE PRODUCCIÓN				
<b>(Art. 28) (Art. 31)</b> Procedimientos y actividades de producción				
23	Se realiza controles de las condiciones de operación(tiempo, temperatura, humedad, actividad acuosa (Aw), pH, presión, etc., cuando el proceso y naturaleza del alimento lo requiera	5	C	
24	Se tiene riesgo de contaminación como agua, goteras o cualquier tipo de sustancia que salpique al alimento en el proceso	5	C	
<b>(Art. 30) Condiciones pre operacionales</b>				
25	Existen procedimientos de producción y están disponibles	5	NC	
26	Se cuenta con aparatos de control en buen estado de funcionamiento	5	C	
ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD				
27	EL tratamiento de tiempo-temperatura aplicado a la leche cruda corresponde a un tratamiento de pasteurización	5	C	74°C por 40 minutos
28	Las personas que manipulan directamente el producto usan algún tipo de protector de boca y nariz?	5	C	
29	En caso de respuesta afirmativa a la pregunta anterior, el protector usado tapa eficazmente boca y nariz?	5	C	
30	Las personas que manipulan directamente el producto tienen las manos limpias, uñas cortas y sin heridas visibles?	5	C	
31	Durante las operaciones de procesamiento del queso y mientras éste se encuentra expuesto, no puede haber operaciones que se realicen al mismo tiempo y que tengan riesgo de contaminar el producto que está expuesto	5	C	

**Anexo 4. Resultados de Lista de verificación de empresa perteneciente al Tratamiento4.**

LISTA DE VERIFICACIÓN- BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (EMPRESAS CAYAMBE)			NOMBRE ESTABLECIMIENTO: E11DL	
			FECHA: 07/15/2018	
No	REQUISITOS	VALORACIÓN	CRIT/NOCRI T (ESTIMATIVO)	OBSERVACIONES
<b>REQUISITOS DE LAS INSTALACIONES</b>				
<b>(Art. 5) Diseño y Construcción</b>				
1	Ofrece protección contra polvo, materias extrañas, insectos, roedores, aves y otros elementos del ambiente exterior	2	C	
2	La construcción es sólida y dispone de espacio suficiente para la instalación; operación y mantenimiento de los equipos	4	NC	
3	Las áreas interiores están divididas de acuerdo al grado de higiene y al riesgo de contaminación.	3	C	
<b>(Art. 6) Condiciones específicas de las áreas, estructuras internas y accesorios.</b>				
<b>9. Instalaciones Sanitarias</b>				
4	Las instalaciones sanitarias no tienen acceso directo a las áreas de Producción.	5	C	
5	Se dispone de dispensador de jabón, papel higiénico, implementos para secado de manos, recipientes cerrados para depósito de material usado en las instalaciones sanitarias	4	C	
6	Se dispone de dispensadores de desinfectante en las áreas críticas	3	C	
7	Se ha dispuesto comunicaciones o advertencias al personal sobre la obligatoriedad de lavarse las manos después de usar los sanitarios y antes de reiniciar las labores de producción	4	C	
<b>EQUIPOS Y UTENSILLOS</b>				
<b>(Art. 8) (Art. 29)</b>				
8	Diseño y distribución está acorde a las operaciones a realizar	4	NC	
9	Las superficies y materiales en contacto con el alimento, no representan riesgo de contaminación	4	C	Mesas y materiales sucios
10	Se evita el uso de madera o materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente o se tiene certeza que no es una fuente de contaminación	4	C	Uso de tablas de madera
11	Los equipos y utensilios ofrecen facilidades para la limpieza, desinfección e inspección	5	C	
12	Las mesas de trabajo con las que cuenta son lisas, bordes redondeados, impermeables, inoxidable y de fácil limpieza	5	C	
13	Cuentan con dispositivos para impedir la contaminación del producto por lubricantes, refrigerantes, etc.	4	NC	
<b>(Art. 9) Monitoreo de los equipos</b>				

14	Provista de instrumentación e implementos de control adecuados	4	NC	
<b>REQUISITOS HIGIÉNICOS DE FABRICACIÓN PERSONAL</b>				
<b>(Art. 10) Consideraciones Generales</b>				
15	Se mantiene la higiene y el cuidado personal	5	C	
<b>(Art. 13) Higiene y medidas de protección</b>				
16	El personal dispone de uniformes que permitan visualizar su limpies, se encuentran en buen estado y limpios	5	C	
17	El calzado es adecuado para el proceso productivo (cerrado e impermeable)	5	NC	
18	El uniforme es lavable o desechable y las operaciones de lavado se realiza en un lugar apropiado	5	C	
19	Se evidencia que el personal se lava las manos y desinfecta según procedimientos establecidos	4	C	
<b>(Art. 14) Comportamiento del personal</b>				
20	El personal acata las normas establecidas que señalan la prohibición de fumar y consumir alimentos y bebidas	5	C	
21	El personal de áreas productivas mantiene el cabello cubierto, uñas cortas, sin esmalte, sin joyas, sin maquillaje, barba o bigote cubiertos durante la jornada de trabajo	5	C	
<b>(Art. 17)</b>				
22	Las visitas y el personal administrativo ingresan a áreas de proceso con las debidas protecciones y con ropa adecuada	4	C	Ingresar administrador sin uniforme
<b>OPERACIONES DE PRODUCCIÓN</b>				
<b>(Art. 28) (Art. 31) Procedimientos y actividades de producción</b>				
23	Se realiza controles de las condiciones de operación(tiempo, temperatura, humedad, actividad acuosa (Aw), pH, presión, etc., cuando el proceso y naturaleza del alimento lo requiera	4	C	
24	Se tiene riesgo de contaminación como agua, goteras o cualquier tipo de sustancia que salpique al alimento en el proceso	3	C	
<b>(Art. 30) Condiciones pre operacionales</b>				
25	Existen procedimientos de producción y están disponibles	3	NC	
26	Se cuenta con aparatos de control en buen estado de funcionamiento	5	C	
<b>ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD</b>				
27	EL tratamiento de tiempo-temperatura aplicado a la leche cruda corresponde a un tratamiento de pasteurización	5	C	72°C por 5 minutos
28	Las personas que manipulan directamente el producto usan algún tipo de protector de boca y nariz?	5	C	
29	En caso de respuesta afirmativa a la pregunta anterior, el protector usado tapa eficazmente boca y nariz?	4	C	

30	Las personas que manipulan directamente el producto tienen las manos limpias, uñas cortas y sin heridas visibles?	5	C	
31	Durante las operaciones de procesamiento del queso y mientras éste se encuentra expuesto, no puede haber operaciones que se realicen al mismo tiempo y que tengan riesgo de contaminar el producto que está expuesto	5	C	

### Anexo 5. Resolución de fórmula de Tamaño de muestra

$$M = \frac{63 \times 0.25 \times (1.96)^2}{(63-1)(0.10)^2 + (1.96)^2}$$

$$M = \frac{60,5052}{4,4616}$$

$$M = 12$$

**Anexo 6. Resultado de contaje total por muestra y repetición, de Enterobacteriaceae y Staphylococcus aureus en queso fresco**

Empresa	R1		R2		R3		R4		R5		R6		R7		R8		R9		
	Enterobact eriaceae (UFC/g)	Staphyloco ccus aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	Enterobact eriaceae (UFC/g)	occos aureus (UFC/g)	
T1	E4LL	220	500	1120	400	900	200	1470	2100	700	1600	430	1100	3000	270	600	200		
	E4H	180	10	890	40	857	20	350	0	100	0	280	10	30	1	200	0	300	0
	E9FO	430	0	188	10	240	10	200	0	146	10	80	0	30	0	50	0	108	0
	PROMEEI	276,7	170,0	732,7	150,0	665,7	76,7	673,3	700,0	415,3	653,3	146,7	886,7	1083,3	90,0	336,0	66,7		
T2	E7Y	0	0	0	0	0	0	16	10	20	0	43	10	0	1	0	0	0	
	E12T	480	0	200	10	400	10	300	0	910	0	140	0	60	0	200	0	62	2
	E10B	300	320	30	503	300	133	970	840	70	293	40	400	670	200	649	150	980	
	PROMEEI	260,0	106,7	76,7	171,0	233,3	47,7	428,7	283,3	333,3	74,3	83,7	153,3	223,3	216,3	70,7	327,3		
T3	E3M	336	40	900	0	550	0	2310	0	453	0	2205	0	900	0	312	3	291	1
	E2LF	330	11	720	7	119	10	340	30	451	40	257	40	247	4	459	23	253	2
	E8FR	400	200	300	9	189	20	600	20	132	20	120	10	588	5	107	29	480	4
	PROMEEI	355,3	83,7	640,0	5,3	286,0	10,0	1083,3	16,7	345,3	860,7	16,7	578,3	292,7	18,3	341,3	2,3		
T4	E5P	1720	20	1253	1640	1840	47	1890	110	2130	10	1950	20	2600	1500	2580	688	2160	39
	E6U	3900	1600	3700	800	2190	1000	1780	2600	2350	1400	1600	2160	3700	2020	3600	2620	1190	
	E11DL	5100	100	1700	300	400	1300	800	270	700	2000	220	1400	1300	600	1600	2500		
	PROMEEI	3573,3	573,3	2217,7	913,3	1476,7	782,3	1490,0	993,3	1726,7	553,3	613,3	2053,3	2166,7	1629,3	1966,7	2126,7	1243,0	

#### Anexo 7. Resultados de *S. aureus* y *Enterobacteriaceae* del tratamiento 1

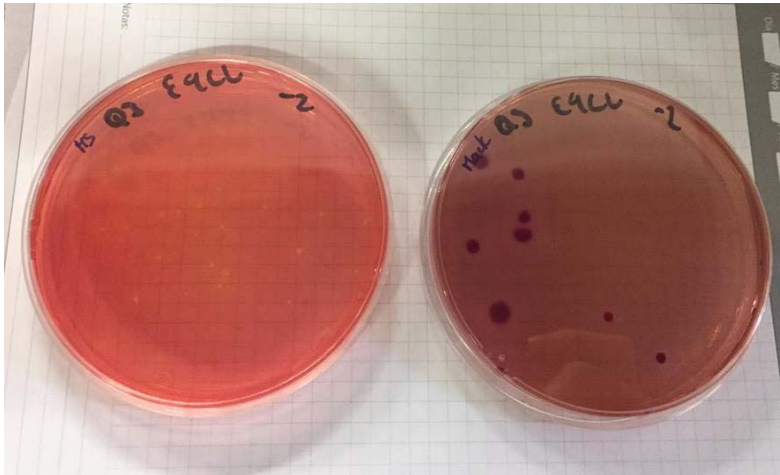


Figura 4. Ejemplo de resultados de T1 en recuento de *Staphylococcus aureus* y *Enterobacteriaceae* en UFC/g empresa E4LL.

Fuente: Autoría personal

#### Anexo 8. Resultados de *S. aureus* y *Enterobacteriaceae* del tratamiento 2

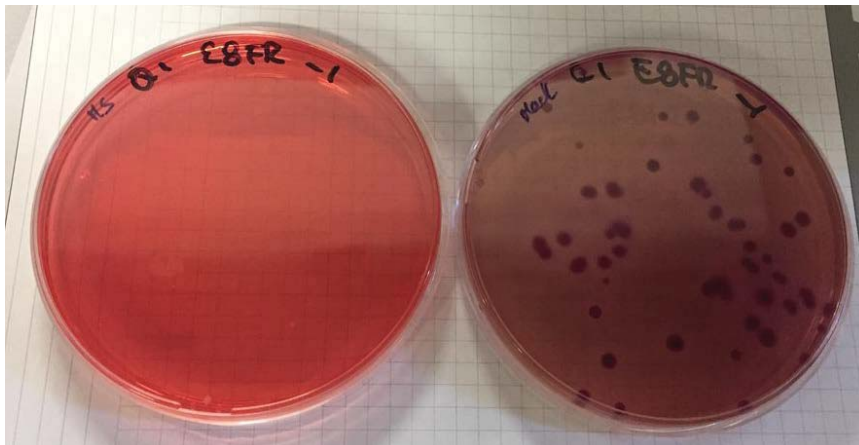


Figura 5. Ejemplo de resultados de T2 en recuento de *Staphylococcus aureus* y *Enterobacteriaceae* en UFC/g empresa E8FR.

Fuente: Autoría personal



### Anexo 9. Resultados de *S. aureus* y *Enterobacteriaceae* del tratamiento 3

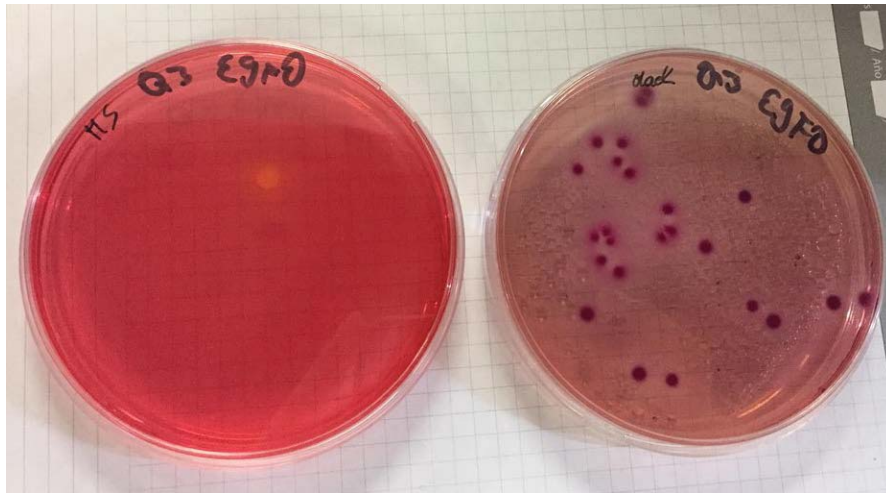


Figura 6. Ejemplo de resultados de T3 en recuento de *Staphylococcus aureus* y *Enterobacteriaceae* en UFC/g empresa E9FO

Fuente: Autoría personal.

### Anexo 10. Resultados de *S. aureus* y *Enterobacteriaceae* del tratamiento 4

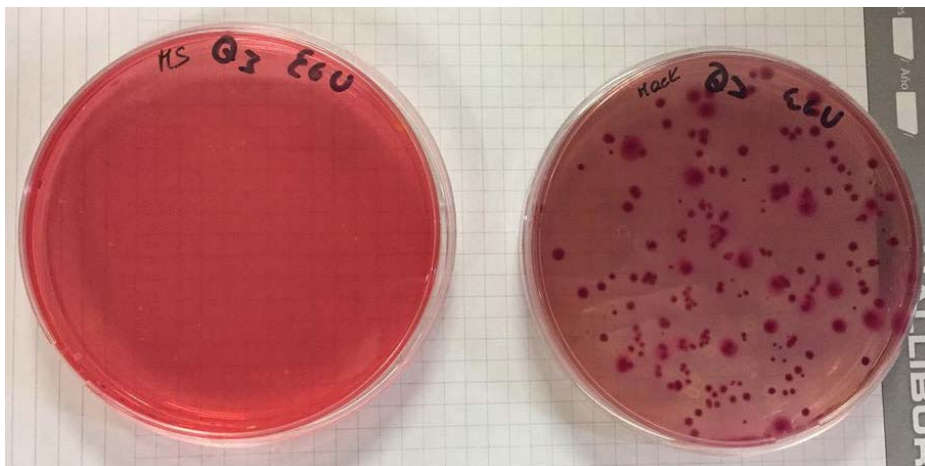


Figura 7. Ejemplo de resultados de T4 en recuento de *Staphylococcus aureus* y *Enterobacteriaceae* en UFC/g empresa E6U.

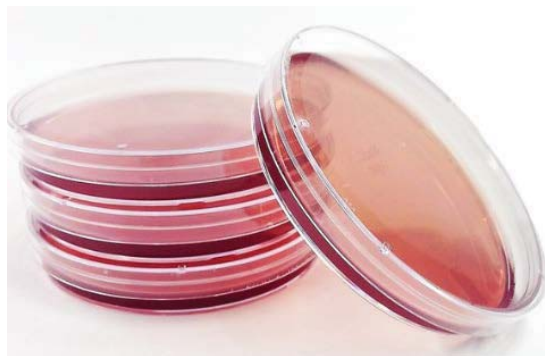
Fuente: Autoría personal

## Anexo 11. Materiales utilizados en el proceso



*Figura 8. Phosphatesmo MI utilizado*

Fuente: Acqua, 2018.



*Figura 9. Placa de Agar MacConkey*

Fuente: Tomado de Diamante, 2018.



*Figura 10. Placa de Agar Manitol sal*

Fuente: Tomado de Novachem, 2018.

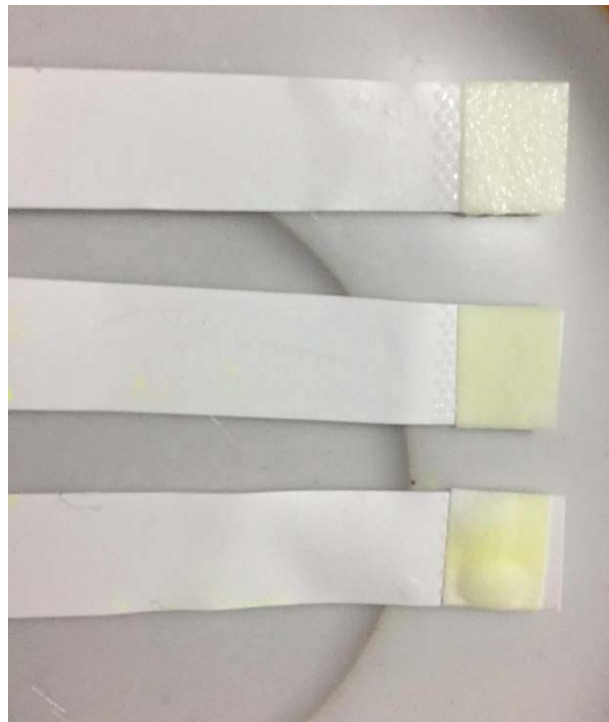
## Anexo 12. Visita a empresas para toma de muestras



*Figura 11.* Empresa involucrada en el estudio.

Fuente: Autoría personal

## Anexo 13. Medio de validación de Phosphatesmo



*Figura 12.* Validación de Phosphatesmo MI con Leche pasteurizada, cruda y mezcla de ambas, para obtener modelo guía para las pruebas.

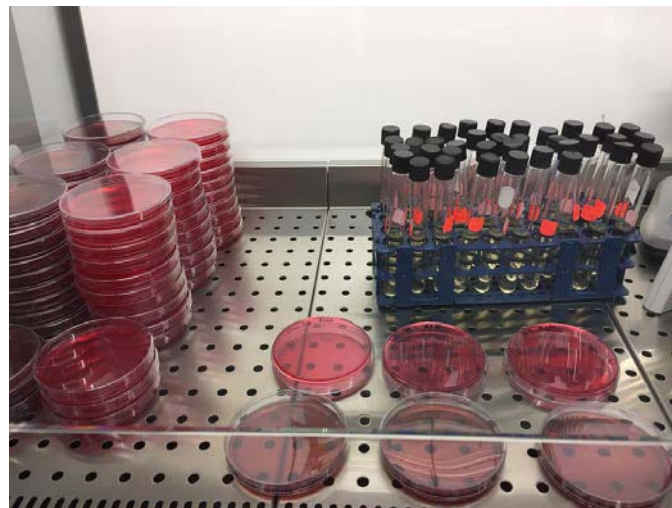
Fuente: Autoría personal

## Anexo 14. Materiales de laboratorio usados



*Figura 13.* Agua de peptona en tubos de ensayo y frasco estéril con muestra de queso y agua peptona.

Fuente: Autoría personal



*Figura 14.* Cajas Petri con medio MacConkey y Manitol Sal para estudio.

Fuente: Autoría personal

## Anexo 15 Unidades Formadoras de Colonias de Enterobacterias y Staphylococcus aureus de muestras queso en cajas Petri

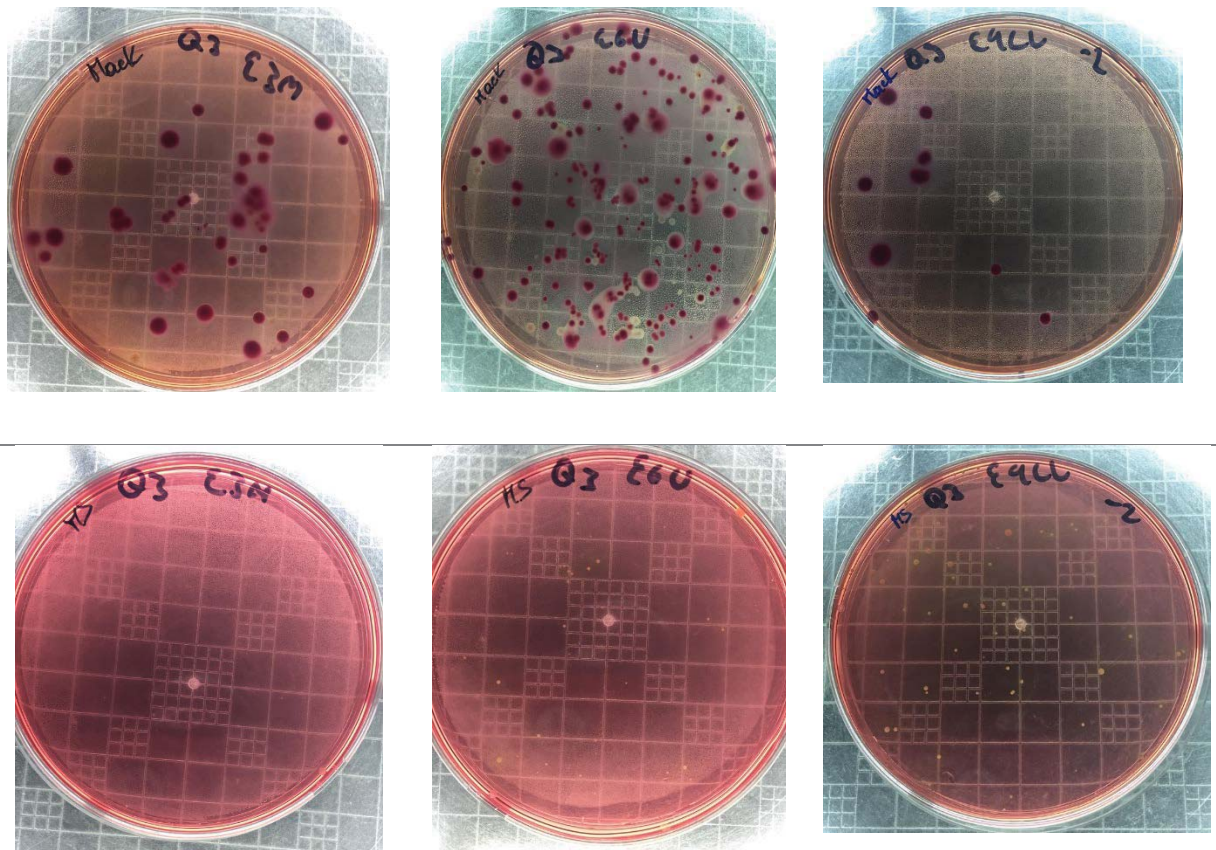


Figura 15. Ejemplo de contaje de UFC/g de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* de varias empresas.

Fuente: Autoría personal

