



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *staphylococcus aureus*
EN QUESOS ARTESANALES EN MERCADOS DE LA CIUDAD DE
CUENCA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTORAS: ANGELA ESTEFANÍA RODRÍGUEZ DELGADO
MICHELLE CATALINA TACURI CHUNGATA**

DIRECTORA: BQF. ANDREA FERNANDA MACÍAS MATAMOROS

CUENCA _ ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *staphylococcus aureus*
EN QUESOS ARTESANALES EN MERCADOS DE LA CIUDAD DE
CUENCA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTORAS: ANGELA ESTEFANÍA RODRÍGUEZ DELGADO
MICHELLE CATALINA TACURI CHUNGATA**

DIRECTORA: BQF. ANDREA FERNANDA MACÍAS MATAMOROS

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Rodríguez Delgado Angela Estefanía portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **1722262712**. **Tacuri Chungata Michelle Catalina portador(a)** de la cédula de ciudadanía N° **2300704372**. Declaramos ser las autoras de la obra: "**Determinación Microbiológica de *Staphylococcus aureus* en Quesos Artesanales en Mercados de la Ciudad de Cuenca**", sobre la cual nos hacemos responsables sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaramos que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximamos a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaramos finalmente que nuestra obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también nos responsabilizamos y eximamos a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 04 de octubre de 2024

F: 
Rodríguez Delgado Angela Estefanía
C.I. 1722262712

F: 
Tacuri Chungata Michelle Catalina
C.I. 2300704372

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

BQF. Andrea Fernanda Macias Matamoros, MSc
**DOCENTE DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR.
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado " **Determinación Microbiológica de *Staphylococcus aureus* en Quesos Artesanales en Mercados de la Ciudad de Cuenca**", realizado por **Rodríguez Delgado Angela Estefanía**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, Agosto 2024


.....
BQF. Andrea Fernanda Macias Matamoros
C.I.:0704800796

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

BQF. Andrea Fernanda Macias Matamoros, MSc
**DOCENTE DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR.
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado " **Determinación Microbiológica de *Staphylococcus aureus* en Quesos Artesanales en Mercados de la Ciudad de Cuenca**", realizado por **Tacuri Chungata Michelle Catalina**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, Agosto 2024


.....
BQF. Andrea Fernanda Macias Matamoros
C.I.:0704800796

DEDICATORIA.

Dedicamos este trabajo, a nuestros padres y nuestros hermanos por su amor incondicional y por ser nuestro pilar en los momentos más difíciles, ya que con sus sacrificios hicieron que pudiéramos alcanzar nuestras metas educativas.

A nuestros abuelos, tías y tíos, por su apoyo y aliento constante a lo largo de este proceso. Así también, a nuestros seres amados que están en el cielo, que estamos seguras que estarán orgullosos de todos los logros que estamos consiguiendo.

A nuestra directora de tesis, por su guía experta y paciencia infinita durante todo este proceso de investigación.

A nuestros amigos y compañeros, que con su aliento y motivación en los momentos difíciles nos han impulsado a conseguir nuestros objetivos académicos.

Y a todas las personas que creyeron en nosotros y nos inspiraron a perseguir nuestros sueños. Este logro es también de ustedes.

Con amor y gratitud.

Angela y Michelle.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a Dios por este momento importante de nuestra vida, gracias por iluminar nuestro camino, por darnos la sabiduría y la paciencia necesarias para completar este trabajo. Toda la gloria y el honor sean para ti.

A nuestra querida familia, por ser nuestro refugio y fortaleza, por animarnos en cada sueño que hemos perseguido y por creer en nosotros incluso en nuestros momentos de oscuridad, ustedes han sido un faro de luz en nuestro camino hacia la culminación de esta tesis.

No podemos dejar de expresar nuestro profundo agradecimiento por el invaluable apoyo que todos ustedes nos han brindado a lo largo de esta travesía académica.

Finalmente, queremos expresar nuestra gratitud hacia nuestra tutora de tesis BQF. Andrea Macías, su guía y sabiduría ha sido fundamental en la consecución de este logro académico.

Con amor y gratitud.

Angela y Michelle.

**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**Determinación Microbiológica de *Staphylococcus aureus* en Quesos
Artesanales en Mercados de la Ciudad de Cuenca**

Rodríguez Delgado Angela Estefanía y Tacuri Chungata Michelle Catalina

Palabras clave: Queso artesanal, *Staphylococcus aureus*, Norma INEN 1528:2012, Compact Dry X-SA, Agar Manitol Salado.

Resumen

Introducción: La presencia microbiológica en los quesos artesanales se refiere a la cantidad y tipo de microorganismos que pueden encontrarse en estos productos, algunos de ellos benéficos o patógenos. Este aspecto es crítico para garantizar la seguridad alimentaria y la calidad del producto, ya que un manejo inadecuado puede favorecer la proliferación de bacterias perjudiciales.

Objetivo: Determinar mediante placas Compact Dry X-SA la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos artesanales en cuatro mercados de la ciudad de Cuenca.

Metodología: Estudio de tipo descriptivo, donde se obtuvieron 40 muestras de queso artesanal fresco vendido en los mercados: 9 de Octubre, 10 de Agosto, 27 de Febrero, 3 de Noviembre (10 muestras por mercado). Para los cultivos se utilizó placas Compact Dry X-SA y Agar Manitol que permitieron el crecimiento de *S. aureus*. Se utilizaron ensayos confirmatorios: catalasa, coagulasa y DNAsa.

Resultados: De las 40 muestras analizadas, el 25% excedió el límite de 10^2 UFC/mL establecido por la INEN 1528:2012. Todas las muestras sembradas de los mercados 9 de octubre y 10 de agosto dieron positivo al crecimiento de *S. aureus* en Agar Manitol Salado, mientras que, 27 de febrero y 3 de noviembre no tuvieron crecimiento en todas las placas. El 80% de las muestras dieron positivo a catalasa, el 47,5% a coagulasa y 17,5% a DNAsa.

Conclusión: En conclusión, se determinó que en el mercado 10 de Agosto existe mayor presencia de *S. aureus* considerando a aquellas muestras muy numerosas para contar las cuales superaron las 250 colonias.

**ACADEMIC DEPARTMENT OF HEALTH AND WELLNESS
FACULTY OF BIOCHEMISTRY AND PHARMACY**

**Microbiological Determination of *Staphylococcus aureus* in Artisanal
Cheeses in Markets of the City of Cuenca**

Rodríguez Delgado Angela Estefanía and Tacuri Chungata Michelle Catalina

Keywords: Artisanal cheese, *Staphylococcus aureus*, INEN 1528:2012 Standard, Compact Dry X-SA, Mannitol Salt Agar.

Abstract

Introduction: The microbiological presence in artisanal cheeses refers to the quantity and type of microorganisms that may be found in these products, some of which are beneficial or pathogenic. This aspect is essential to ensure food safety and product quality, as improper handling can promote the proliferation of harmful bacteria.

Objective: To determine the presence of *Staphylococcus aureus* in artisanal cheeses from four markets in the city of Cuenca using Compact Dry X-SA plates.

Methodology: This is a descriptive study in which 40 samples of fresh artisanal cheese sold in the following markets were collected: “9 de Octubre,” “10 de Agosto,” “27 de Febrero,” and “3 de Noviembre” (10 samples per market). Compact Dry X-SA plates and Mannitol Agar were used for the cultures, allowing the growth of *S. aureus*. Confirmatory tests were performed: catalase, coagulase, and DNase.

Results: Of the 40 samples analyzed, 25% exceeded the limit of 10^2 CFU/mL established by the Ecuadorian Standardization Service (INEN, by its Spanish acronym) 1528:2012. All samples from the “9 de Octubre” and “10 de Agosto” markets tested positive for *S. aureus* growth on Mannitol Salt Agar, whereas no growth was observed in any plates from the “27 de Febrero” and “3 de Noviembre” markets. Eighty percent (80%) of the samples tested positive for catalase, 47.5% for coagulase, and 17.5% for DNase.

Conclusion: In conclusion, it was determined that the “10 de Agosto” market had the highest presence of *S. aureus*, considering the samples that were too numerous to count, which exceeded 250 colonies.

ABREVIATURAS

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura.

CDC: Centro para el control y la prevención de enfermedades.

CEISH: Comités de Ética de Investigación en Seres Humanos.

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos.

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

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

NTE: Norma Técnica Ecuatoriana.

MNC: Muy Numerosas por Contar

OMS: Organización Mundial de la Salud

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO I	20
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.	20
I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.	20
I.2.- JUSTIFICACIÓN.....	22
I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:.....	23
I.3.- OBJETIVOS.....	23
I.3.1.-Objetivo General:.....	23
I.3.2.-Objetivos Específicos:	23
I.4.- MARCO TEÓRICO	23
I.4.1.- Antecedentes:.....	23
I.4.2.- Marco referencial:	30
I.4.2.1.- QUESO ARTESANAL	30
I.4.2.1.1.- Definición de queso.....	30
I.4.2.1.2.- Clasificación de los Quesos	31
I.4.2.1.3.- Queso Artesanal	32
I.4.2.1.4.- Componentes bromatológicos y nutricionales del queso artesanal	33
I.4.2.1.5.- Proceso de elaboración del queso artesanal	33
I.4.2.1.6.- Microbiología del queso	35
I.4.2.1.7.- Contaminación Alimentaria	36
I.4.2.1.8.- Almacenamiento y transporte de los quesos artesanales	36
I.4.2.1.9.- Enfermedades Transmitidas por alimentos	37
Angela Rodríguez y Michelle Tacuri	11

I.4.2.1.10.- Inocuidad alimentaria	38
I.4.2.1.11.- Principales patógenos en queso fresco artesanal	39
I.4.2.2.- STAPHYLOCOCCUS AUREUS	41
I.4.2.2.1.- Taxonomía	41
I.4.2.2.2.- Definición	41
I.4.2.2.3.- Morfología	42
I.4.2.2.4.- Sintomatología	42
I.4.2.2.5.- Epidemiología	43
I.4.2.2.6.- Virulencia	44
I.4.2.2.7.- Resistencia microbiana	45
I.4.2.2.8.- El mercado como fuente de transmisión de <i>S. aureus</i>	45
I.4.2.2.9.- Trazabilidad.....	46
CAPÍTULO II	47
METODOLOGÍA	47
II.1.- DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	47
II.1.1.- Enfoque.....	47
II.1.2.- Diseño de Investigación	47
II.1.3.- Nivel de investigación	47
II.1.4.- Tipo de Investigación	47
II.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA.....	48
II.2.1.- Universo – Población	48
II.2.2.- Muestreo y muestra	48
II.3.- CRITERIOS DE SELECCIÓN	49
Angela Rodríguez y Michelle Tacuri	12

II.3.1.- Criterios de inclusión.....	49
II.3.2.- Criterios de exclusión.....	49
II.4.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS VARIABLES.....	50
II.4.1.- Variable independiente	50
II.4.2.- Variable dependiente	50
II.5.- PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS.	52
II.5.1.- Medios de cultivo, instrumentos y equipos.....	52
II.5.2.- Reactivos	52
II.5.3.- Diluciones	53
II.5.4.- Siembra de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
II.5.6.- Aislamiento en Agar Manitol Salado	54
II.5.5.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa y DNAsa.....	55
II.6.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS Y ANÁLISIS DE DATOS	56
II.7.- ASPECTOS ÉTICOS.....	57
CAPÍTULO III.....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
III.1.- RESULTADOS MERCADO 9 DE OCTUBRE.....	59
III.1.1.- Resultados generales	59
III.1.2.- Siembra de <i>Staphylococcus aureus</i> en Compact Dry X-SA.....	60
III.1.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa Agar	61
III.2.- RESULTADOS MERCADO 10 DE AGOSTO.....	63
III.2.1.- Resultados generales	63
Angela Rodríguez y Michelle Tacuri	13

III.2.2.- Siembra de <i>Staphylococcus aureus</i> en Compact Dry X-SA.....	64
III.2.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa	65
III.3.- RESULTADOS MERCADO 27 DE FEBRERO	66
III.3.1.- Resultados generales	66
III.3.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa	68
III.4.- RESULTADOS MERCADO 3 DE NOVIEMBRE.....	70
III.4.1.- Resultados generales	70
III.4.2.- Siembra de <i>Staphylococcus aureus</i> en Compact Dry X-SA.....	71
III.4.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa	72
III.5.- RESULTADOS GENERALES Y DISCUSIÓN	73
III.5.1.- Agar Manitol Salado.....	73
III.5.2.- Mercado con mayor número de UFC/mL de <i>Staphylococcus aureus</i> en siembra Compact Dry X-SA	74
III.5.3.- Quesos frescos aceptables o no según INEN 1528:2012.....	75
III.5.4.- Pruebas confirmatorias: catalasa, coagulasa y DNAsa.....	77
III.5.5.- Pruebas confirmatorias positivas (catalasa, coagulasa, DNAsa) a <i>Staphylococcus aureus</i> en los diferentes mercados	78
CAPÍTULO IV.....	80
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
IV.1.- CONCLUSIONES	80
IV.2.- RECOMENDACIONES.....	82
BIBLIOGRAFÍA	83
Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529.2.1999	95

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	36
Tabla 2. Definición de Variable dependiente.....	50
Tabla 3. Diluciones para determinar crecimiento o no de colonias de <i>S. aureus</i> ..	58
Tabla 4. Conteo de <i>S. aureus</i> y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 9 de Octubre.	59
Tabla 5. Conteo de <i>S. aureus</i> y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 10 de Agosto.....	63
Tabla 6. Conteo de <i>S. aureus</i> y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 27 de Febrero	66
Tabla 7. Conteo de <i>S. aureus</i> y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 3 de Noviembre	70
Tabla 8. Resultados de crecimiento de <i>S. aureus</i> en Agar Manitol.....	73
Tabla 9. Total de UFC/mL para cada mercado, siembra Compact Dry X-SA para <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Tabla 10. Número de pruebas confirmatorias positivas por mercado de estudio.	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en Compact Dry X-SA: 9 de Octubre	61
Figura 2. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a <i>S. aureus</i> : 9 de Octubre	62
Figura 3. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa: 9 de Octubre .	62
Figura 4. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en Compact Dry X-SA: 10 de Agosto.....	64
Figura 5. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a <i>S.aureus</i> : 10 de Agosto	65
Figura 6. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa: 10 de Agosto..	65
Figura 7. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en Compact Dry X-SA: 27 de Febrero	68
Figura 8. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a <i>S.aureus</i> : 27 de Febrero	69
Figura 9. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa: 27 de Febrero	69
Figura 10. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en Compact Dry X-SA: 3 de Noviembre.....	71
Figura 11. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a <i>S.aureus</i> : 3 de Noviembre	72
Figura 12. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa: 3 de Noviembre	72
Figura 13. Porcentaje de quesos frescos aptos o no para consumo humano	76
Figura 14. Positivo o negativo a <i>S. aureus</i> con pruebas confirmatorias	78
Figura 15. Porcentaje de pruebas confirmatorias positivas a <i>S. aureus</i> en cada mercado de estudio	79

INTRODUCCIÓN

El queso es uno de los alimentos más antiguos producidos por el ser humano, con una historia que se remonta a miles de años atrás. Aunque los orígenes exactos son inciertos, se cree que la elaboración de queso comenzó hace aproximadamente 8,000 años, vinculado con la domesticación de animales (1).

El queso artesanal es una práctica ancestral que se ha mantenido viva a lo largo del tiempo gracias a la dedicación de pequeños productores que siguen métodos tradicionales y emplean ingredientes naturales. El proceso de elaboración del queso artesanal implica una serie de pasos meticulosos, desde la obtención de la leche fresca hasta la maduración del producto final (2).

La calidad microbiológica de estos quesos artesanales es un aspecto crucial que debe ser considerado, especialmente cuando se comercializan en mercados locales. Al consumir en estado fresco y sin empaque protector, es importante tomar en cuenta el inadecuado manejo de las técnicas de producción, manipulación, transporte, almacenamiento a temperaturas inadecuadas y las condiciones de venta en mercados que pueden comprometer su vida útil, aumentando el riesgo de seguridad sanitaria y deterioro. En tanto, es un producto perecedero que puede convertirse en un vehículo de transmisión de enfermedades si no se maneja adecuadamente (2,3).

En este sentido, surge una problemática mundial de morbimortalidad, es decir, la presencia de enfermedades causadas por el consumo de alimentos. Entre los principales agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) el *S. aureus*, es uno de los principales microorganismos de interés en la seguridad alimentaria a nivel mundial (4). El *S. aureus* es una bacteria patógena resistente a los antibióticos como la metilina o relacionados con la penicilina, tornándose muy peligrosa, por lo que puede causar intoxicaciones alimentarias si encuentra las condiciones necesarias para sobrevivir y multiplicarse, comportándose como un verdadero oportunista (5).

Asimismo, el *Staphylococcus aureus* es conocido por su capacidad de producir enterotoxinas estafilocócicas, las mismas que son proteínas con bajo peso molecular, tolerantes al calor y a las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal del ser humano (6). Por lo tanto, pueden resistir el proceso de pasteurización del queso artesanal y otros tratamientos térmicos. Si el queso presenta la bacteria y sus toxinas puede provocar gastroenteritis con síntomas como náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, cefalea y sudoración, estimulando el peristaltismo intestinal y afectando el sistema nervioso central (7,8).

En el año 2023 en Ecuador se estimó un incremento del 0.11% en productos lácteos como el queso fresco de producción artesanal, constituyendo una base fundamental de alimentación en la cadena agroproductiva. La mejora en la producción está vinculada a prácticas agrícolas y ganaderas más eficientes e iniciativas gubernamentales y privadas para fortalecer el sector, así como al cumplimiento de las normas de calidad establecidas por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) (9,10).

Actualmente, estos alimentos destinados al consumo están regidos por normas y requisitos para garantizar la seguridad de los consumidores. Estas leyes aseguran la inocuidad de los alimentos durante su producción, conservación y venta. En el Ecuador, el control de calidad de quesos frescos está regulada por la normativa NTE INEN 1528:2012, en la cual se describen definiciones y guías para procedimientos microbiológicos y parámetros cuantitativos del número de colonias máximas permitidas para *S. aureus* por mililitro en quesos frescos no madurados. La cuantificación de estos aspectos mencionados define la calidad de los productos lácteos (11).

Si bien, el incumplimiento normativo puede provocar la contaminación del producto y, potencialmente, enfermedades transmitidas por su consumo. En la provincia del Azuay, Cuenca, también se elaboran derivados lácteos y se expenden como quesos frescos manufacturados tradicionalmente. La mayoría de estos productos condicionan una gran oferta y demanda en la población y son adquiridos con

facilidad en diversos mercados de la ciudad para consumo diario, sin un control sanitario adecuado (12).

Por tal razón, la presente investigación se centra en determinar la presencia de *S. aureus* en los quesos artesanales distribuidos en cuatro diferentes mercados de la ciudad de Cuenca, así como también, realizar un análisis de la calidad microbiológica. Además, comprobar el cumplimiento de estas muestras según la normativa vigente NTE INEN 1528:2012: Norma general para quesos frescos no madurados en el Ecuador; para finalmente, aislar y analizar los *S. aureus* mediante pruebas bioquímicas.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

- **Situación problemática**

Evidentemente, la seguridad alimentaria es una preocupación global que afecta tanto a países desarrollados como en vía de desarrollo. Así, la Organización Mundial de la Salud estima que, 600 millones de personas se enferman anualmente por consumir alimentos contaminados causando 420,000 muertes, siendo los niños menores de cinco años los más afectados con 125,000 defunciones al año. En relación al consumo de quesos artesanales contaminados, la OMS lo refiere como un problema de salud, ya que estudios indican que no se toman medidas de higiene y control necesarios para prevenir la contaminación microbiológica (13).

La problemática se centra en la deficiencia en el control de calidad que se genera durante el proceso de elaboración y comercialización del queso a granel en los mercados; siendo estas, las principales fuentes de contaminación patógena y promotores de ETA en los consumidores. Adicional, la mayoría de estos quesos artesanales carecen de una notificación sanitaria por su manufactura artesanal y no cuentan con control microbiológico, presentando vulnerabilidad a bacterias nocivas como el *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*. Si bien puede formar parte de la flora habitual de los seres humanos, también, puede ser un agente de transgresión alimentaria si se encuentra en un medio apto para su reproducción (14).

La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (15) señala que las enfermedades causadas por patógenos alimentarios, como el *S. aureus* en productos lácteos producen brotes de intoxicación alimentaria dando lugar a un problema de salud pública global. En 2022, Ecuador registró 127 casos de intoxicación alimentaria asociada a bacterias no identificadas, posiblemente por enterotoxinas de *S. aureus*, dónde Pichincha lidera con 30 casos, seguida por Azuay con 18 y Guayas con 15 casos. La mayoría de los afectados fueron mujeres

de entre 20 y 49 años. Este dato subraya la necesidad urgente de mejorar la seguridad alimentaria y la identificación de patógenos en el país para prevenir futuros brotes (16).

- **Problema de Investigación**

En relación a lo expuesto, se han realizado previamente algunos estudios en el Ecuador relacionados con esta problemática, donde encontraron *S. aureus* en los quesos artesanales distribuidos en mercados, con valores superiores a los permisibles en la Norma Técnica Ecuatoriana. De manera general, manifiestan que esta contaminación se debe a factores como: la manipulación del alimento por individuos infectados, contaminación cruzada (utensilios), mastitis o malas prácticas de ordeño, malas prácticas de conservación y comercio (16,17,18,19).

En este mismo contexto, un estudio realizado en el mercado 12 de abril de la ciudad de Cuenca donde se obtuvo que el 58% del total de las 64 muestras obtenidas, respecto al queso fresco expandido en este lugar presenta contaminación por *S. aureus*, donde el nivel de estos microorganismos excede el límite máximo permisible por las normas INEN 1528:12 del Ecuador que establece un índice máximo permisible de 10^2 para la bacteria en quesos frescos no madurados (12).

Frente a esta problemática de carácter local, se plantea el presente estudio sobre la Determinación Microbiológica de *Staphylococcus aureus* en Quesos Artesanales en Mercados de la Ciudad de Cuenca, cuyos mercados de estudio son: 9 de octubre, 10 de agosto, 27 de febrero y 3 de noviembre; para comprobar el cumplimiento de estas muestras según la normativa vigente NTE INEN 1528:2012. El área de conocimiento de investigación corresponde a Salud y Bienestar por ciclos de vida en la línea de calidad de agua y alimentos. La investigación busca cuantificar la presencia de *S. aureus* para evaluar el grado de contaminación y así identificar áreas críticas que necesitan mejoras. La falta de aplicación rigurosa de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en la producción de estos quesos contribuye a la persistencia y proliferación de esta bacteria. Este análisis puede proporcionar una base sólida para implementar estrategias más efectivas de producción y control

sanitario, con el objetivo de mejorar la seguridad alimentaria y garantizar la calidad de los productos lácteos artesanales en la región.

I.2.- JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la demanda de quesos artesanales en Cuenca ha aumentado notablemente, en mercados y eventos de emprendimientos. La investigación sobre la determinación microbiológica de *S. aureus* en estos quesos es crucial debido a las crecientes preocupaciones por la seguridad alimentaria y la salud pública en mercados locales. Actualmente, la información sobre la presencia de estos patógenos es limitada en la región. Este estudio no solo contribuye al conocimiento científico sobre la prevalencia de *S. aureus* en quesos artesanales, sino que también amplía la comprensión de los factores que afectan su contaminación e impactos asociados. Así, se utilizan técnicas microbiológicas avanzadas y protocolos estandarizados, como métodos de cultivo y pruebas bioquímicas, que pueden replicarse en futuras investigaciones. Los hallazgos resultantes mejorarán las prácticas de producción y manejo de estos quesos, capacitando a los productores para implementar medidas de control de calidad y seguridad más efectivas, reduciendo el riesgo de ETA.

Este estudio es crucial por varios motivos; entre ellos, proporcionará información valiosa que se podrá integrar en programas académicos, ofreciendo casos de estudio actualizados. Además, contribuirá a mejorar la seguridad y calidad de los quesos, lo que elevará su valor y beneficiará a los productores locales. Al reducir las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), también protegerá la salud pública. El estudio fomentará prácticas de producción más seguras y sostenibles, y facilitará la formación práctica, futuras investigaciones y aplicaciones en la industria. Los beneficiarios directos incluirán a productores de quesos artesanales, consumidores y estudiantes, mientras que la comunidad en general, las autoridades sanitarias y la economía local se beneficiarán indirectamente al mejorar la reputación y calidad de los productos artesanales.

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:

¿Los quesos artesanales distribuidos en los diferentes mercados de la ciudad de Cuenca presentan contaminación por *Staphylococcus aureus* ?

I.3.- OBJETIVOS

I.3.1.-Objetivo General:

Determinar mediante placas Compact Dry X-SA la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos artesanales de los diferentes mercados de la ciudad de Cuenca.

I.3.2.-Objetivos Específicos:

- Identificar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* por métodos microbiológicos a partir de quesos artesanales vendidos en los diferentes mercados de Cuenca.
- Describir los resultados positivos y negativos a *Staphylococcus aureus* obtenidos de las muestras de quesos frescos mediante las pruebas bioquímicas.
- Analizar la presencia de *Staphylococcus aureus* aislados en los quesos artesanales vendidos en los diferentes mercados de Cuenca de acuerdo con la norma INEN 1528:2012.

I.4.- MARCO TEÓRICO

I.4.1.- Antecedentes:

Los quesos artesanales tienen una larga tradición que se remonta a miles de años, con evidencia de su producción desde la época neolítica. Originarios de diversas culturas alrededor del mundo, estos quesos se elaboran de manera artesanal utilizando métodos tradicionales transmitidos de generación en generación. En Europa, regiones como Francia, Italia, España y Suiza son famosas por su amplia variedad de quesos artesanales, cada uno reflejando las prácticas y tradiciones locales. En América Latina, países como México, Argentina, Perú y Ecuador también poseen una rica tradición quesera, donde los métodos artesanales siguen siendo fundamentales. La producción artesanal de queso se valora por su calidad,

sabor y conexión con las comunidades locales, contrastando con los métodos industriales modernos (20).

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada en algunos países de América, se centraron en investigar la presencia de microorganismos conocidos por causar enfermedades al consumir queso fresco durante el período 2007-2016. Se calcula una prevalencia de patógenos presentes en el queso fresco de aproximadamente 43,71 %, 18,51 % y 16,26 % en *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente. Aunque se han establecido criterios estrictos para el control microbiológico del queso fresco en su comercialización, la alta prevalencia de microorganismos patógenos, principalmente *S. aureus* en este alimento sigue siendo la causa principal de ETA en América. Esto subraya un problema significativo de salud pública que genera debate sobre los beneficios y riesgos asociados (21,22).

En Cuba, una investigación evaluó la calidad higiénico-sanitaria de quesos artesanales en Mayabeque, analizando muestras de leche cruda y queso de 50 productores. Se examinaron microorganismos a 30°C, entre ellos, *Staphylococcus aureus* mediante placas Rida Count ®; donde *Staphylococcus aureus* superó los 4,0 log UFC/ml o g. La mayor contaminación microbiana en los quesos respecto a la leche resalta la necesidad de implementar Buenas Prácticas Lecheras y de Manufactura para asegurar la calidad higiénico-sanitaria de los quesos (23).

Para un estudio realizado en México sobre la presencia de microorganismos alterantes y patógenos como *S. aureus* en quesos distribuidos en Teotitlán. Se obtuvieron conteos de 5,76 log UFC/g utilizando el método tradicional y de 5,98 log UFC/g por siembra en placa Petrifilm. Dichos valores sobrepasan los 3 log UFC/g, niveles que no cumplen la NOM-243-SSA1-2010, representando un riesgo de transmisión de enfermedades alimentarias y afectando su vida de anaquel, lo que implica pérdidas económicas para los productores (24).

Un estudio realizado en Venezuela sobre la intoxicación alimentaria estafilocócica, encontró la presencia de *S. aureus* y la producción de enterotoxinas en muestras de queso artesanal vendidas en mercados de Caracas. Se analizaron 80 muestras

siguiendo la Norma Venezolana COVENIN 1292:89 y se detectaron que el 40% de las muestras contenía *Staphylococcus aureus* con cargas de 10^3 - 10^4 UFC/g, además de enterotoxinas en el 34,2% de las muestras. Estos hallazgos indican deficientes medidas sanitarias y un potencial riesgo para la salud de los consumidores (2).

Según Merchán et al. (25) en Colombia, indica que el queso artesanal se ha convertido en un vehículo de transmisión de microorganismos causantes de infecciones alimentarias. Este estudio buscó identificar la carga microbiana en 31 muestras de queso artesanal de Tunja y evaluar el riesgo para la salud pública según la Norma Técnica Colombiana 750. Las muestras mostraron altos niveles de *S. aureus* ($1,6 \times 10^5$ UFC/g). Todas las muestras excedieron los límites establecidos por la norma, indicando condiciones higiénicas inadecuadas para el consumo debido a los procesos artesanales de elaboración.

Un estudio que se realizó en Perú evaluó la calidad bacteriológica de quesos frescos artesanales. En el análisis de 39 muestras de queso fresco de vaca de mercados en Pueblo Libre y Lima se evaluó la carga microbiana de varios patógenos mediante técnicas microbiológicas convencionales. Los resultados mostraron altos niveles de contaminación en 97,4% de las muestras, con valores superiores a los permitidos por la Norma Técnica Peruana, incluyendo *S. aureus* (87,2%). En este estudio se hicieron pruebas confirmatorias a *S. aureus* donde todas las muestras dieron positivo a catalasa y coagulasa. Esto indica deficiencias higiénicas en la manipulación de los quesos frescos artesanales y un riesgo significativo para la salud del consumidor (26).

Un estudio descriptivo y no experimental realizado en el Laboratorio de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía en Perú, Bagua, se aisló *Staphylococcus aureus* de quesos comercializados en el mercado central de Bagua. Se recolectaron 40 muestras de diferentes tipos de quesos, sembradas en Agar Manitol Salado y confirmadas con la prueba de coagulasa. Los resultados mostraron que el 30% de las muestras contenían *S. aureus* y el 35% *Staphylococcus epidermidis*, destacando una mala manipulación y condiciones

higiénicas deficientes en la elaboración y venta de los quesos, lo que representa un riesgo para la salud pública (27).

En este mismo contexto, una investigación realizada por Rodríguez (28) en Perú, Piura. Donde se hizo recuentos de coliformes totales para identificar y determinar la calidad bacteriológica del queso fresco comercializado en el distrito de Canchaque, utilizando el medio de confirmación Brilliant Green Bile Lactose Broth. Durante cinco semanas se analizaron cinco muestras de queso de 250 g de 10 puestos de venta, determinando que el 60 % de las muestras eran positivas, y concluyendo que la calidad bacteriológica del queso fresco no es apta para el consumo alimentario.

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) durante los últimos meses del año 2023 se estimó un incremento del 0.11% en productos lácteos como el queso fresco, en el país. A causa de este aumento en los quesos es fundamental el análisis de los aspectos microbiológicos en este producto lácteo. Sin embargo, mayoritariamente los productores artesanales incumplen condiciones sanitarias presentando patógenos en los quesos ya sea por su mala elaboración, manipulación o almacenado. Los patógenos que más se han encontrado en quesos artesanales en todo el país son: *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli* (25).

Se ejecutó un estudio en Ecuador donde se analizaron quesos frescos artesanales del mercado Guasmo Sur en Guayaquil para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus*. Se tomaron muestras de 10 locales que venden este tipo de queso en tres horarios diferentes (6:30 am, 12:00 pm y 15:30), totalizando 30 muestras. Se realizaron análisis microbiológicos utilizando Placas Petrifilm 3M Listeria Ambiental y Placas Petrifilm 3M Staph Express. Se encontró que las 30 muestras fueron positivas para *Staphylococcus aureus* en todos los horarios, con niveles superiores a 100 UFC/g. Estos resultados indican deficiencias sanitarias en los quesos analizados, lo cual representa un riesgo para la salud de los consumidores (16).

En una investigación se analizó 52 muestras de queso fresco artesanal de tres mercados del cantón Durán utilizando placas Compact Dry XSA. Los resultados

revelaron que 28 (54%) muestras fueron positivas para *S. aureus*, de las cuales 17 superaron el límite máximo permitido según la norma INEN 1528:2012, mientras que 24 (46%) muestras resultaron negativas. Se estudiaron tres mercados: Mercado Las Manuelas, se encontró que el 100% de estas muestras (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10) superaron el límite máximo permitido por la INEN 1528:2012. Además, presenta mayor crecimiento de UFC de *S. aureus* entre 1.12×10^2 hasta 3.2×10^4 UFC/ML. En el mercado Recreo 5ta Etapa, el 100% de las muestras tomadas superan los límites de UFC/mL entre 1.4×10^2 hasta 5.8×10^2 . En el mercado mayorista, el 100% de las muestras tomadas presentan UFC superiores al límite establecido en la misma norma usada para este estudio con valores desde 1.1×10^2 hasta 5.2×10^3 , sin encontrar MNC en las muestras. Se concluyó que estos quesos no son aptos para su comercialización en los mercados del cantón Durán y representan un riesgo para la salud pública (29).

Por su parte, Mendoza et al. (30) propusieron determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en el proceso de producción del queso fresco artesanal del mercado municipal del cantón Junín, en la Provincia de Manabí. Para ello se seleccionaron aleatoriamente puntos de venta del producto en el mercado de estudio, de los cuales se escogieron tres, obteniendo un total de 51 muestras de queso artesanal, cada una de 20 g. Para analizar la bacteria se utilizó el método de ensayo NTE INEN 1529-14. En este estudio, todas las muestras resultaron positivas para crecimiento de *S. aureus* en pruebas realizadas en agar manitol.

En la zona norte de la provincia de Manabí un estudio reveló que 156 muestras presentaron niveles significativos de contaminación microbiológica, superando los límites establecidos por la normativa ecuatoriana. Utilizando el método Petrifilm, se detectaron altos valores de microorganismos presentando *S. aureus* superiores a 10^2 (2 log₁₀). El 55% de los productos analizados no son aptos para el consumo debido a su incumplimiento de los requisitos de calidad higiénico-sanitaria (19).

Se llevó a cabo un estudio comparativo microbiológico del queso artesanal de Latacunga. Se recolectaron muestras en tres periodos aleatorios y se realizaron recuentos de *Staphylococcus aureus* utilizando placas Petrifilm TM 3M. Los

resultados indicaron que el queso artesanal no cumplió con los requisitos microbiológicos establecidos por la norma NTE INEN 1528, lo que podría representar un riesgo para la salud pública. Aunque se encontraron recuentos más altos de bacterias ácido lácticas en el queso artesanal, estos no satisfacen los criterios de calidad microbiológica. Se aislaron 32 cepas de bacterias ácido lácticas, se encontraron *Staphylococcus aureus* (43,75%) (31).

Estudió en Riobamba, Ecuador, sobre la evaluación de la calidad microbiológica de quesos frescos artesanales en zonas rurales de esta ciudad, enfocándose en el recuento y aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus* para medir su resistencia a los antibióticos. Las muestras se cuantifican según la Norma NTE INEN 1528:2012. El aislamiento e identificación de las cepas se realizaron con técnicas microbiológicas y pruebas bioquímicas, y la susceptibilidad antimicrobiana se evaluó mediante la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer. Se encontró una prevalencia de *S. aureus* del 83,33%, con resistencia a penicilina (100%), cefoxitina (33,33%) y eritromicina (80%), indicando que los quesos superan los rangos de referencia nacionales y que la alta resistencia a antibióticos representa un potencial problema de salud pública (32).

Ahora bien, en la ciudad de Cuenca, la necesidad de actualizar los estudios sobre la calidad microbiológica y obtener información específica sobre la presencia de *S. aureus* en los quesos artesanales expandidos en los mercados de esta ciudad, impulsó la realización de esta investigación, con el objetivo de obtener datos recientes y así beneficiar a la comunidad cuencana.

El estudio identificó la presencia de *Staphylococcus aureus* en queso fresco a granel vendido en mercados municipales y centros comerciales de Cuenca, Ecuador, utilizando métodos fenotípicos. Se realizó un estudio descriptivo y transversal entre mayo y junio de 2023, se analizaron 60 muestras (40 de mercados municipales y 20 de centros comerciales). Las muestras se recolectaron y analizaron siguiendo procedimientos microbiológicos convencionales. Los resultados mostraron que el 88.33% de las muestras tenían crecimiento de colonias características de *S. aureus*, con pruebas bioquímicas indicando 35.84% catalasa

positiva, 15.09% coagulasa positiva y 11.32% DNAsa positiva. Aunque las pruebas bioquímicas indiquen la presencia de *S. aureus* no existe una constante en los resultados en todas las pruebas. La conclusión es que hay una mayor presencia de *S. aureus* en quesos de mercados municipales en comparación con centros comerciales, donde la calidad del producto es mejor (6).

Se realizó un estudio para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos vendidos en el mercado el Arenal de Cuenca, Ecuador. Se recogieron 32 muestras de queso de 8 puestos de venta, y se utilizó la técnica de placas Compact Dry X-SA para la detección. Los resultados indicaron que el 89% de las muestras no cumplían con los parámetros establecidos por la norma NTE INEN 1528:2012. Las muestras con mayor presencia de UFC/g fueron 10.95×10^3 , 11.20×10^3 y 11.60×10^3 , revelando altos niveles de contaminación con *Staphylococcus aureus* (33).

En los quesos analizados en la ciudad de Cuenca, Ecuador, en el mercado 9 de Octubre, el mismo tuvo como objetivo determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en queso fresco. Se recolectaron 30 muestras y se utilizaron placas Compact Dry X-SA según la normativa INEN 1528:2012 para identificar y cuantificar Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados mostraron que el 46,67% de las muestras cumplían con los estándares establecidos, mientras que el 53,33% no, indicando problemas en los hábitos de conservación, higiene y manipulación de los quesos frescos (3).

Otro estudio identificó *Staphylococcus aureus* en la producción de queso fresco artesanal vendido en el Mercado 12 de abril, Cuenca. Se utilizaron materiales procesados bajo estrictos estándares de esterilización y asepsia, y se emplearon placas Compact Dry X-SA para cultivos y ensayos confirmatorios (catalasa y coagulasa). De las 64 muestras analizadas, el 58% presentaron contaminación por *S. aureus*, superando el límite máximo permisible según las normas INEN 1528:12 de Ecuador. Además, se analizaron 4 mercados en Cuenca, teniendo más tendencia a la contaminación, por el número total de pruebas confirmatorias positivas (catalasa, coagulasa, DNAsa), el Mercado 2 (34%) seguido de los

mercados 3 y 4 (32% y 23%, respectivamente). La conclusión es que se identificó *S. aureus* en el queso fresco artesanal vendido en los mercados municipales estudiados. Además, se demuestra que no todas las pruebas confirmatorias presentan una constante para cada análisis de muestra (12).

I.4.2.- Marco referencial:

I.4.2.1.- QUESO ARTESANAL

I.4.2.1.1.- Definición de queso

Durante el procesamiento de la leche, se permite la derivación de una amplia variedad de productos lácteos. Entre estos se encuentra la leche líquida que incluye versiones como la pasteurizada, desnatada y ultra pasteurizada, además la leche fermentada se produce mediante microorganismos específicos. Otros derivados lácteos son: el queso se elabora a partir de la coagulación de la caseína; la mantequilla y el ghee se derivan de la grasa de la leche, obtenidos por batido y clarificación; la leche condensada y evaporada se logra eliminando parte del agua, la primera con azúcar y la segunda estabilizada térmicamente; la leche en polvo se produce al eliminar completamente el agua; la nata es la fracción grasa de la leche y puede obtenerse por descremado; y, el suero es el líquido restante tras la fabricación del queso (34). No obstante, el queso es el producto lácteo de interés para este estudio.

El queso es un producto alimenticio derivado de la leche de cabra, vaca o chivo, siendo este el producto principal para su fabricación, elaborado mediante la coagulación total o parcial de la proteína láctea, conocida como caseína. En el queso, la proporción de proteínas de suero y caseína no es superior a la de la leche. Este proceso implica la eliminación parcial del agua de la leche mediante técnicas como calentamiento, agitación, desuerado y prensado de la cuajada. El resultado es un alimento con diversas texturas, que van desde blandos y semiduros hasta duros y extraduros, y puede estar madurado o no (35,36).

El queso es valorado por su capacidad para conservar los nutrientes esenciales de la leche, incluyendo proteínas, grasas, minerales (como calcio y fósforo) y vitaminas.

Su composición típica incluye caseína, grasa, sólidos insolubles, agua y pequeñas cantidades de azúcares. Aunque es un componente importante de una dieta sana y equilibrada, su consumo debe ser moderado debido a su alta densidad calórica y contenido en grasas. Algunos quesos pueden presentar una capa exterior que puede ser natural o añadida en la maduración (37).

I.4.2.1.2.- Clasificación de los Quesos

La diversidad de quesos existentes es realmente impresionante, abarcando una amplia gama de formas y sabores. Para facilitar su estudio, se han realizado varios intentos de clasificarlos en familias significativas atendiendo a sus características físico-químicas, propiedades reológicas, métodos de fabricación y origen de la leche (38). La clasificación de los quesos se puede hacer según varios criterios, incluyendo el contenido de humedad, el tipo de leche utilizada, el proceso de maduración, la textura, el contenido de grasa y de acuerdo al nivel de producción. A continuación, se detalla cada grupo de clasificación (39):

Por su contenido de humedad de la pastosidad:

- Quesos duros: Entre 49 y 56% de humedad.
- Quesos semiduros: Entre 54 y 63% de humedad.
- Quesos blandos: Más del 67% de humedad.
- Quesos semiblandos: Entre 61 y 69% de humedad.
- Quesos extraduros: Menos del 51% de humedad.

Por el tipo de leche utilizada:

- Quesos de vaca
- Quesos de oveja
- Quesos de cabra
- Quesos de mezcla

Por su proceso de maduración:

- Quesos frescos: Se fermenta la leche antes de consumirlos.

- Quesos maduros: Se fermenta y se madura la leche antes de consumirlos.
- Quesos tiernos: Maduración menos de 21 días.
- Quesos oreados: Maduración de 21 a 90 días.
- Quesos semicurados: Maduración de 3 a 6 meses.
- Quesos curados: Maduración más de 6 meses.

Por la textura:

- Quesos Blandos: Cremosos, a veces untable.
- Quesos Semiduros: Firmes pero maleables.
- Quesos Duros: Muy firmes y a menudo granulados.
- Quesos Azules: Veteados con moho.

Por su contenido en grasa:

- Quesos magros: 25% de grasa.
- Quesos semigrasos: Entre 25 y 45% de grasa.
- Quesos grasos: Entre 45 y 60% de grasa.
- Quesos extragrasos: 60% o más de grasa.

Por su nivel de producción:

- Queso artesanal: Es producido principalmente a mano, en pequeños lotes.
- Queso industrial: Proceso a máquina y automatizado, a gran escala.

Sin embargo, por motivos de investigación el presente trabajo se enfocará en la indagación de conocimientos respecto a los quesos artesanales.

I.4.2.1.3.- Queso Artesanal

El término "artesanal" tiene origen francés y no tiene un equivalente directo en inglés, derivando de la palabra "artesano", que describe la creación de productos a pequeña escala mediante técnicas manuales por personas con habilidades especializadas. En este sentido, al hablar de queso artesanal se hace referencia a

quesos que son elaborados manualmente utilizando métodos tradicionales en pequeñas cantidades, con mínima o ninguna intervención de maquinaria, siguiendo las prácticas y costumbres transmitidas por expertos maestros queseros. A menudo son elaborados en granjas o queserías independientes (40).

Por lo general, para la elaboración del queso artesanal se emplean ingredientes de alta calidad, a menudo de animales alimentados de manera natural y sin hormonas o antibióticos (40). Entre las cualidades sensoriales está la microbiota, la misma que interviene en procesos cruciales como la glucólisis, proteólisis y lipólisis durante la maduración; contribuyendo a su sabor y textura distintivos. Entonces, gran parte del proceso es manual, desde la ordeña hasta el envejecimiento, lo que contribuye a la autenticidad del producto y permite la personalización y experimentación en las recetas (41).

I.4.2.1.4.- Componentes bromatológicos y nutricionales del queso artesanal

Los componentes nutricionales de los quesos varían según el tipo de leche utilizada, debido a su complejidad bioquímica y microbiológica. Por lo tanto, el queso artesanal no madurado presenta las siguientes características bromatológicas: un pH de 5.1 a 5.9, con un contenido de humedad entre 42.71% y 66.66%, materia seca de 33.3% a 68.9%, cenizas de 2.65% a 5.24%, grasa de 12% a 32%, proteína de 16.81% a 26.62% y NaCl de 0.29% a 1.44%. Este tipo de queso puede ser elaborado con leche cruda y coagulada naturalmente con ácidos orgánicos, incluyendo el envejecimiento en condiciones específicas, que conglomeran las grasas y otros componentes (42). Este queso tiene cerca del 25% hasta 40% de materia grasa, entre 35% y 70% de agua y 3% de sales minerales. Su textura es blanda y elástica, endurecida con cuajo líquido (43).

I.4.2.1.5.- Proceso de elaboración del queso artesanal

La elaboración de quesos artesanales no maduros implica un proceso relativamente simple que preserva la alta humedad y la textura suave del producto final. Este tipo de queso se caracteriza por no pasar por un proceso de maduración, lo que resulta

en un sabor suave y una textura blanda y elástica. De manera general, el proceso básico de producción incluye la coagulación de la leche, generalmente mediante la adición de cuajo o ácidos orgánicos, el desuerado y la cuajada (29).

Para el proceso de elaboración del queso artesanal, se describen las siguientes fases (44,45):

Preparación. En esta fase, se escoge en primer lugar el tipo de leche, sea esta de vaca, cabra u oveja. Inmediatamente, se enfría la leche a 38 °C. Luego, se añade un gramo de cloruro de calcio para recuperar el calcio perdido durante el calentamiento.

Coagulación. Se añaden fermentos lácticos o coagulantes vegetales o animales. Entonces, se disuelve un cuarto de pastilla de cuajo en media taza de agua con una pizca de sal, o alternativamente, se usa un mililitro de cuajo líquido en 10 litros de leche. Esta mezcla se agrega a la leche, agitándose por un minuto, y se deja reposar durante 45 minutos. En esta fase, el queso pasa de un estado líquido a uno sólido o semisólido.

Corte y extracción del suero. Una vez formada la cuajada y con una textura ideal, se procede a cortar en pedazos de un centímetro y se mueve suavemente con una paleta de acero inoxidable o liras durante cinco minutos. A continuación, se calienta la cuajada a 40 °C por cinco minutos y se deja reposar nuevamente. Pasado este tiempo, se drena el suero o la cuajada se desuera usando tela brin en una bandeja, y se guarda el suero para otros usos. Es crucial considerar la cantidad de humedad durante el proceso ya que esto afectará varios aspectos del queso.

Prensado y salado. Una vez el producto en los moldes se procede a prensar la masa y la extracción total del suero aún restante. Después, para la conservación del producto y para formar una corteza protectora contra el crecimiento de microorganismos, se procede al salado. Esto consiste en añadir tres cucharadas de sal gruesa a la cuajada, que luego se muele y se coloca en los mismos moldes.

I.4.2.1.6.- Microbiología del queso

Generalmente, el queso constituye un campo amplio con predisposición a que se desarrollen diferentes poblaciones de microorganismos, incluyendo aquellas de carácter patógeno. La microbiota del queso tiene origen en múltiples factores, tales como: la calidad de la leche utilizada en su elaboración, la adición intencional o accidental del cultivo iniciador durante el proceso de ordeño, procedimientos no controlados, uso de materiales no esterilizados (46). La microbiología de los quesos es extremadamente variada, compuesta por microorganismos beneficiosos que contribuyen a su desarrollo, así como por microorganismos patógenos o asociados al deterioro (38).

Entonces, es importante conocer que la leche de animales sanos contiene menos de 5×10^3 UFC por mililitro. Al enfriarse a 15-21 °C, predominan bacterias mesófilas como *Lactococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter*, entre otras. La refrigeración posterior a 4 °C inhibe la mayoría de microorganismos, excepto los psicrótrofos como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Acinetobacter*. Por su parte, si la leche cruda no se pasteuriza, tampoco las bacterias, los microorganismos patógenos permanecen activos y pueden ser transmitidos directamente a los quesos, como *Bacillus*, *Clostridium* y organismos termorresistentes como *Micrococcus* y *Microbacterium* pueden sobrevivir a altas temperaturas (47).

Si bien las bacterias ácido lácticas, presentes en los quesos, se utilizan después de la pasteurización como cultivos iniciadores para la formación de ácido láctico, lo que ayuda a inhibir otros microorganismos, facilita la coagulación y mejora los factores organolépticos. No obstante, en la elaboración de quesos artesanales no se usan, ya que se trabaja con cuajos o se teme que se alteren los sabores, lo que puede comprometer la inocuidad y contaminar el alimento final (48). La contaminación microbiana es considerada uno de los riesgos más críticos para la seguridad alimentaria, siendo crucial para los queseros contar con leche de alta calidad microbiológica para garantizar un rendimiento y una calidad óptima del queso (49).

En Ecuador, los quesos comercializados en los diferentes lugares autorizados deben cumplir con las normas higiénicas y de salud establecidas por las autoridades competentes. Así, la norma NTE INEN 1528:12 (11), se encarga de regular los requisitos técnicos microbiológicos que deben cumplir los quesos artesanales no madurados, previo a su distribución y comercialización (Tabla 1).

Tabla 1 Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	N	m	M	c	Método de ensayo
<i>Enterobacterias</i> , UFC/g	5	2x10 ²	10 ³	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/g	5	10	10 ²	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	Ausencia	-	0	ISO 11290-1
<i>Salmonella</i> en 25g	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización (NTE INEN 1528:2012).

I.4.2.1.7.- Contaminación Alimentaria

La contaminación alimentaria en quesos artesanales puede resultar de la presencia de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*, que pueden proliferar si no se respetan estrictamente las normas de higiene y almacenamiento. Estos microorganismos pueden ingresar al queso durante la producción, manipulación o distribución, especialmente si el proceso de pasteurización es inadecuado o si se mantienen temperaturas inadecuadas. Estudios destacan la importancia de implementar medidas rigurosas de control de calidad para prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y asegurar la seguridad del queso (50).

I.4.2.1.8.- Almacenamiento y transporte de los quesos artesanales

Para asegurar la calidad y seguridad de los quesos artesanales, es crucial controlar tanto la temperatura como la humedad durante su almacenamiento. Los quesos

frescos requieren temperaturas alrededor de 4°C y mantener una humedad relativa entre el 80% y el 95% evita el secado excesivo y el crecimiento indeseado de moho. Es esencial contar con una buena ventilación para prevenir la acumulación de humedad y la proliferación bacteriana. Además, factores como la densidad de estiba, la velocidad del aire y la compatibilidad entre productos deben ser tomados en consideración. Los quesos deben almacenarse por separado de otros alimentos para evitar la contaminación cruzada y la absorción de olores, en un entorno limpio y desinfectado (51).

Durante el transporte, es fundamental mantener una cadena de frío constante utilizando vehículos con sistemas de refrigeración adecuados, ya que pueden surgir problemas de contaminación, olores, maduración y fragilidad del producto. El embalaje debe proteger los quesos de golpes y contaminantes, asegurando que los materiales utilizados sean seguros para el contacto con alimentos. Los vehículos de transporte deben limpiarse y desinfectarse regularmente para prevenir la contaminación cruzada. Asimismo, es importante minimizar el tiempo de transporte y mantener registros de temperatura y condiciones para garantizar que se cumplan los estándares adecuados. Un almacenamiento adecuado es esencial para mantener las características del producto y evitar contaminación cruzada o química, además de prevenir el crecimiento bacteriano (52).

I.4.2.1.9.- Enfermedades Transmitidas por alimentos

Los alimentos de origen animal, como carne bovina, huevos, carne porcina, aves, pescados, crustáceos, moluscos y productos lácteos, son los alimentos más frecuentemente involucrados en epidemias y casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Para que ocurra una ETA, el patógeno o sus toxinas deben estar presentes en el alimento en cantidades suficientes. Además, el alimento debe ser capaz de sustentar el crecimiento de los patógenos y permanecer en la zona de peligro de temperatura el tiempo suficiente para que los patógenos se multipliquen o produzcan toxinas. Finalmente, debe consumirse una porción suficiente del alimento contaminado para que se sobrepase la barrera de susceptibilidad del individuo (53).

La enfermedad transmitida por alimentos es el resultado de consumir alimentos contaminados con microorganismos patógenos como *Salmonella spp*, *Shigella*, el virus de la hepatitis A, *Trichinella spiralis*, entre otros. Por otro lado, la intoxicación alimentaria se produce cuando toxinas producidas por bacterias o mohos están presentes en los alimentos consumidos, como el *Staphylococcus aureus*, o cuando elementos químicos en cantidades nocivas afectan la salud. Estas toxinas son insípidas e inodoras, y pueden causar enfermedades incluso después de que los microorganismos responsables hayan sido eliminados del alimento (53).

I.4.2.1.10.- Inocuidad alimentaria

La inocuidad alimentaria se refiere a los atributos que hacen aceptables los alimentos para los consumidores, incluyendo cualidades sensoriales como sabor, olor, color, textura, forma y apariencia, así como características químicas e higiénicas que aseguran su seguridad y trazabilidad. Es la garantía de que un alimento no causará consecuencias negativas a la salud del consumidor cuando sea preparado o ingerido de acuerdo con su uso previsto (54). Esta contaminación puede ocurrir en cualquier etapa del proceso, desde la producción hasta el consumo, provocando las ETA en los consumidores. Por lo tanto, las personas involucradas en el manejo de la materia prima, la producción de alimentos, su distribución y venta, tienen la responsabilidad de asegurar que los alimentos se mantengan en buen estado para evitar problemas de contagio (55).

Es crucial evitar la contaminación cruzada, que ocurre cuando agentes contaminantes se transfieren de un alimento contaminado o una superficie a un alimento no contaminado. La responsabilidad de mantener la inocuidad alimentaria recae en todos los involucrados en el proceso, desde la producción hasta el consumo, para prevenir problemas de salud. La atención a estas prácticas es esencial para garantizar alimentos de calidad y nutritivos, protegiendo así la salud pública y promoviendo una sociedad saludable y productiva (56).

I.4.2.1.11.- Principales patógenos en queso fresco artesanal

Las enfermedades que se adquieren a través de los alimentos son el resultado de la ingestión de alimentos o bebidas que han sido contaminadas con microbios dañinos para la salud del consumidor. Los síntomas comunes de las ETA por consumo de queso incluyen trastornos intestinales como diarrea y vómitos, aunque su severidad puede variar significativamente según la cantidad de bacterias o toxinas presentes en el queso (57).

Además, pueden provocar fiebre alta, alteraciones visuales, problemas hepáticos, dolores de cabeza, choques sépticos, entre otros. La duración de estos síntomas depende de la cantidad de alimento consumido y la condición física del individuo afectado. Este tipo de enfermedades afecta principalmente a niños, mujeres embarazadas y adultos mayores, quienes son más vulnerables a sus efectos adversos (25,57).

Según Merchán et al. (25) son algunos de los microorganismos responsables de las ETAs debido al consumo de queso contaminado que incluyen una variedad de bacterias, virus y parásitos. A continuación, se detallan algunos de los principales patógenos implicados que cita este autor:

- ***Staphylococcus aureus*** , es común en la membrana nasal y en la ubre de las vacas. El queso fresco proporciona condiciones idóneas para crecer ya que requiere de pH ácido, alta actividad de agua y concentración de cloruro de sodio (NaCl). Además, produce la enterotoxina B estafilocócica (SEB), responsable de provocar intoxicación alimentaria en los humanos.
- ***Escherichia coli***, un microorganismo presente en la flora intestinal humana y animal, es un indicador de contaminación fecal en los alimentos.
- ***Listeria monocytogenes***, puede contaminar la leche cruda y el queso fresco de dos maneras distintas. La primera es a través de las heces del ganado, mientras que la segunda se da cuando los animales están enfermos con patologías como la listeriosis y la mastitis.

- ***Salmonella entérica***, es una bacteria que puede causar enfermedades transmitidas por los alimentos. Se ha observado que la presencia de esta bacteria en la leche y sus derivados no pasteurizados se debe a diversos factores, entre ellos la contaminación de las manos del ordeñador, las deposiciones de los animales, la falta de higiene en el equipo de ordeño y la presencia de agua contaminada.
- ***Clostridium perfringens***, es una bacteria que puede causar enfermedades que afecta el sistema digestivo en humanos y animales. Este patógeno se encuentra en lugares como el suelo, el polvo, el agua y algunos alimentos, y suele habitar en el tracto gastrointestinal.

En este contexto, se calcula que en Latinoamérica los microorganismos más comunes en el queso fresco son el *Staphylococcus aureus* (43,71%) y la *Escherichia coli* (18,51%); mientras que los menos comunes son la *Listeria monocytogenes* (16,26%), la *Salmonella spp.* (11,66%) y el *Clostridium perfringens* (8,37%) (25).

Sin embargo, para garantizar la inocuidad de los quesos, es esencial implementar protocolos de producción y seguir a cabalidad las medidas de buenas prácticas, independientemente del nivel de producción al que corresponda, artesanal o industrial. Estas prácticas incluyen el uso de protocolos de higiene y desinfección simples pero efectivos. Las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), buscan la sostenibilidad ambiental, económica y social, especialmente para pequeños productores, y garantizan la producción de alimentos más inocuos y saludables. Además, mantener estrictas conductas higiénicas y de sanitización, y realizar controles rutinarios de materias primas, superficies y agua de proceso son fundamentales para evitar la contaminación por microorganismos (58).

I.4.2.2.- STAPHYLOCOCCUS AUREUS

I.4.2.2.1.- Taxonomía

El *Staphylococcus aureus* pertenece al reino Bacteria, filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*, especie *S. aureus* (59). Comúnmente, a esta bacteria se le llama estafilococos, contiene enzimas coagulasa y catalasa. Actualmente, se han identificado 35 especies distintas de estafilococos, incluyendo 17 subespecies en el género *Staphylococcus*, muchos de ellos responsables del 75% de las infecciones humanas (14).

I.4.2.2.2.- Definición

Staphylococcus aureus fue descubierto por el cirujano escocés Alexander Ogston en 1880, quien identificó la bacteria en el pus de una herida quirúrgica mientras observaba el absceso de uno de sus pacientes al microscopio (Díaz y García, 2001). Es una bacteria que, aunque facultativamente anaerobia, típicamente muestra positividad para las enzimas catalasa y coagulasa. No forma esporas y es resistente a altas temperaturas, así se ha demostrado que puede sobrevivir a 121°C aproximadamente diez minutos, a un pH de 4.2 a 9.3 con un pH óptimo para su crecimiento entre 7.0 y 7.5 y se multiplica mejor en ambiente de 20-40°C. Es decir, se reproduce con rapidez bajo diversas condiciones ambientales adversas (14).

Staphylococcus aureus se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente y posee características que incluyen virulencia y resistencia a antibióticos, lo que representa un serio problema de salud global debido a su impacto significativo en la morbilidad y mortalidad. No sólo es capaz de causar infecciones en diversas partes del cuerpo humano, sino también por ser una de las bacterias principales asociadas con ETAs. Estas enfermedades resultan de la capacidad del patógeno para producir toxinas, lo que es especialmente frecuente en ciertos grupos de la población y regiones geográficas con sistemas de salud y control de infecciones limitados. Las infecciones ocurren cuando las toxinas están presentes en el aire, leche, agua potable, aguas residuales, alimentos o equipos utilizados en la preparación de los alimentos (60).

I.4.2.2.3.- Morfología

El *S. aureus* se caracteriza por ser una bacteria esférica (coco), que tiende a agruparse en parejas y en tétradas formando racimos, parecidos a una uva, o grupos irregulares. Individualmente, cada célula tiene un diámetro que oscila entre 0,5 a 1,5 micrómetros, tiene una temperatura máxima de crecimiento de 37 °C, produce un pigmento amarillo dorado y es halotolerante (61). Las células de *Staphylococcus aureus* son Gram positivas, lo que significa que retienen la tinción de cristal violeta en la pared celular durante la coloración de Gram. La pared celular contiene peptidoglicano y ácido teicoico, además, carecen de capacidad de moverse (62).

También, la pared celular de *S. aureus* tiene varias proteínas de superficie con propiedades comunes. Estas incluyen una secuencia señal en el extremo amino-terminal con aminoácidos que se extienden hasta el citoplasma, una parte hidrofóbica que atraviesa la membrana y una región de anclaje en el extremo carboxílico que se une a la pared celular. En el extremo amino-terminal, hay un dominio de adherencia expuesto en la superficie bacteriana que permite que algunas de estas proteínas sirvan como adhesinas. La proteína A es un ejemplo de estas proteínas y tiene propiedades que evitan la fagocitosis al unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas (63).

I.4.2.2.4.- Sintomatología

Debido a su gran capacidad de adaptación, estos microorganismos pueden infectar a casi todas las especies de mamíferos y sobreviven a muchas condiciones ambientales adversas. Por lo tanto, esta bacteria es altamente virulenta, causante de diversas enfermedades desde infecciones cutáneas hasta infecciones graves y, gracias a su facilidad para propagarse, es común que se transmitan entre diferentes especies, incluyendo al ser humano y otros animales (60).

La presencia de este microorganismo es en la piel, la zona nasofaríngea, sistema digestivo, pliegues inguinales y axilares de los seres humanos están de forma normal en nuestro cuerpo entre un 20-30%. Sin embargo, este microorganismo

puede causar intoxicación alimentaria cuando su hábitat se ve alterado y actúa como oportunista, a través de toxinas super antigénicas que resisten a altas temperaturas, así como invadir diversos dispositivos de trabajo. Los síntomas de intoxicación por *S. aureus* incluyen vómitos, náuseas, arcadas, calambres estomacales y decaimiento, y su aparición es rápida y severa dependiendo de la cantidad de toxinas ingeridas y la susceptibilidad individual (64).

I.4.2.2.5.- Epidemiología

S. aureus es uno de los patógenos más prevalentes a nivel mundial, relacionado con una alta mortalidad y como se sabe con una rápida adaptación a la resistencia antimicrobiana. Los humanos actúan como un reservorio natural para la bacteria, con un 30-50% de los adultos sanos colonizados y un 10- 20% con colonización persistente. Tanto las cepas sensibles a la metilina como las resistentes pueden ser colonizadoras persistentes. Las personas colonizadas tienen un mayor riesgo de infecciones, especialmente aquellos con diabetes tipo 1, usuarios de drogas intravenosas, pacientes en hemodiálisis, quirúrgicos o con SIDA. Además, aquellos con defectos en la función leucocitaria están en mayor riesgo de infecciones por estafilococos (14).

Además, *S. aureus* es capaz de fermentar manitol y dar positivo en la prueba de actividad desoxirribonucleica, así como, puede producir una amplia gama de enzimas y toxinas. Es conocida por su implicación en brotes de intoxicación alimentaria, causada por la ingestión de la enterotoxina B termoestable preformada, producida por cepas toxigénicas de *S. aureus* que pueden crecer en los alimentos (14,65).

Ahora bien, para causar una intoxicación alimentaria, se necesita una cantidad de *Staphylococcus aureus* de aproximadamente 10^6 UFC/g de alimento para producir al menos un microgramo de toxina. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) establece que una concentración de 10^5 UFC/g, es decir 100,000 UCF son suficientes para provocar intoxicaciones, y un gramo de toxina por gramo de alimento puede causar síntomas. En la mayoría de los brotes, se han detectado

entre uno y cinco microgramos de toxina ingerida, aunque niveles tan bajo como 0.01 microgramos también pueden causar intoxicación (66).

Por otro lado, la bacteriemia por *S. aureus*, una infección bastante adquirida en la comunidad (SA-AC) es una condición común en pediatría que representa un serio problema de salud pública debido a sus altas tasas de morbimortalidad y resistencia bacteriana. Afecta entre 4,6 y 8,4 niños por cada 100,000, con un 9-12% desarrollando bacteriemia a partir de infecciones locales. Es particularmente grave en niños, a menudo requiriendo hospitalización, tratamientos prolongados, ingreso en unidades de cuidados intensivos en el 33% de los casos, y tiene una tasa de mortalidad entre el 2,5% y el 8%, especialmente con cepas resistentes a la meticilina (67).

I.4.2.2.6.- Virulencia

La virulencia se da por la capacidad del *S. aureus* para causar enfermedades, esto, debido a su habilidad para evadir el sistema inmunitario del huésped, colonizar diferentes tejidos y formar biopelículas resistentes a los tratamientos antimicrobianos. La virulencia de *Staphylococcus aureus* se atribuye a varios factores clave, que incluyen (61):

- **Toxinas:** Produce una variedad de toxinas que contribuyen a su virulencia, como la hemolisina, la toxina Pantón-Valentine (PVL), las toxinas exfoliativas o epidermolíticas, y la toxina 1 del síndrome del choque tóxico (TSST-1). Estas toxinas pueden causar daño tisular directo, inducir respuestas inflamatorias severas y comprometer la integridad de las barreras epiteliales.
- **Enzimas:** *Staphylococcus aureus* produce varias enzimas que facilitan su invasión y diseminación en los tejidos del huésped, como la coagulasa, que permite la formación de coágulos sanguíneos, y la catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno y protege la bacteria de los mecanismos de defensa oxidativos del huésped.
- **Adhesinas:** Estas proteínas de superficie permiten que *S. aureus* se adhiera a diferentes tipos de células y tejidos del huésped, facilitando la colonización y la formación de biopelículas.

- **Resistencia a antibióticos:** Una característica notable de *S. aureus* es su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos.

I.4.2.2.7.- Resistencia microbiana

S. aureus es un tipo de microorganismo que tiene propiedades únicas de virulencia y defensa contra los antibióticos. La resistencia antimicrobiana de las distintas cepas de *S. aureus* es muy preocupante desde el punto de vista de la salud pública, debido a que esta bacteria ha desarrollado resistencia a todos los antibióticos utilizados en el ámbito clínico, principalmente, la penicilina. La resistencia es una respuesta a la presión constante de los medicamentos antimicrobianos, se debe a la transferencia de genes de resistencia existentes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción. En otras palabras, aunque la resistencia es una consecuencia de la exposición constante a los antibióticos, la verdadera causa radica en la transferencia de genes de resistencia entre cepas de *S. aureus* por mecanismos genéticos móviles (68).

Asimismo, diversos estudios en Latinoamérica han demostrado la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina o MRSA debido a la presencia del gen *mec-A*. Este microorganismo ha sido detectado en alimentos como quesos, carnes y sushi, lo que genera problemas de salud pública, debido a que la meticilina es un fármaco clave en la profilaxis clínica. Los lácteos son especialmente propensos a la contaminación por *S. aureus*, incrementando la probabilidad de encontrar cepas con el gen *mec-A* en estos productos (5).

I.4.2.2.8.- El mercado como fuente de transmisión de *S. aureus*

Staphylococcus aureus, se encuentra en el medio ambiente, incluyendo agua, aire, tierra y áreas de manipulación de alimentos. También, está presente en alimentos ricos en proteínas, como la leche y sus derivados, y se puede encontrar en humanos y animales. En el mercado, la manipulación y venta de quesos artesanales se realiza con un enfoque en mantener la calidad y seguridad del producto. Los quesos se exhiben en puestos que suelen estar diseñados para mantener condiciones óptimas de temperatura y humedad, fundamentales para preservar su frescura y evitar la

proliferación de patógenos. En el punto de venta, los quesos artesanales se destacan por su origen y proceso de elaboración. Los vendedores informan a los consumidores sobre las características del queso, su sabor, y el mejor uso culinario, a menudo ofreciendo muestras para que los clientes puedan probar antes de comprar. Sin embargo, los mercados pueden ser una fuente significativa de transmisión de *S. aureus* debido a varios factores que facilitan la proliferación y dispersión de este patógeno (69).

En estos entornos, la manipulación de alimentos por múltiples personas, la exposición a diversas superficies y utensilios, y las condiciones variables de higiene contribuyen a la contaminación cruzada. La alta concentración de personas y productos alimenticios, especialmente aquellos de origen animal como carnes y quesos, aumenta la probabilidad de contacto con *S. aureus*. Este microorganismo puede sobrevivir en una amplia gama de temperaturas y condiciones ambientales, lo que le permite persistir en los mercados si no se aplican medidas de higiene adecuadas. La falta de refrigeración constante y la manipulación inadecuada de alimentos agravan el riesgo de proliferación bacteriana. Por lo tanto, es esencial implementar estrictas normas de higiene, capacitación para los vendedores y monitoreo regular en los mercados para reducir la transmisión de *Staphylococcus aureus* y garantizar la seguridad alimentaria (29).

I.4.2.2.9.- Trazabilidad

La trazabilidad en el ámbito alimentario es el seguimiento o rastreabilidad de los alimentos, con el objetivo de seguir el recorrido de los alimentos desde la recepción de la materia prima hasta su distribución final en el mercado. Este sistema beneficia a las empresas al permitir un control efectivo de los procesos y la calidad del producto, a los consumidores aumentando su confianza y transparencia en los productos que adquieren, y a las autoridades sanitarias facilitando el control y la gestión eficiente de incidencias. Al detectar problemas, el sistema de trazabilidad permite localizar y retirar rápidamente productos del mercado, mejorando así la seguridad alimentaria y racionalizando los recursos (70).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

II.1.- DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

II.1.1.- Enfoque

El estudio corresponde a un enfoque cuantitativo, debido a que se recolectaron los datos a través de métodos y técnicas experimentales que permitieron la obtención de información sobre las variables de investigación relacionadas con la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos artesanales expendidos en los mercados de Cuenca. Además, se empleó la estadística descriptiva para el análisis de datos (72).

II.1.2.- Diseño de Investigación

Es un diseño no experimental, porque no se manipularon variables, se evaluó el fenómeno en su ambiente natural (72).

II.1.3.- Nivel de investigación

El diseño de la investigación fue descriptivo, consistió en analizar las muestras adquiridas en los mercados de Cuenca, en concreto de los quesos frescos vendidos. Así como, se describió el análisis de la presencia de *Staphylococcus aureus* en las muestras de quesos artesanales obtenidas en los puestos de venta en los mercados. Se obtuvo la percepción de los objetos de estudio sin influir sobre ella de ninguna manera, únicamente se recogió información de manera independiente y no se indicó relación alguna (72).

II.1.4.- Tipo de Investigación

Esta investigación fue de tipo exploratorio, ya que permitió una primera aproximación al problema estudiado, identificando la situación de la contaminación en quesos artesanales. Además, fue una investigación de campo, obteniendo datos y muestras directamente de los mercados de Cuenca, donde se comercializan estos productos. Se utilizó una metodología observacional con análisis de laboratorio, empleando pruebas específicas para detectar la presencia de *Staphylococcus*

aureus y determinar si los quesos cumplen con la norma INEN 1528:2012. El estudio fue de corte transversal, pues se realizó en un único momento, proporcionando una evaluación puntual de la contaminación microbiológica en los quesos analizados. (72).

II.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

II.2.1.- Universo – Población

Para efecto de la investigación se contó con una población de 40 muestras de quesos frescos artesanales (N=40) que se expidan en locales de venta situados dentro de los mercados de Cuenca, los mismos que corresponden al total de fichas registradas (Anexo 20) en este estudio durante el mes de mayo del año 2024. La población de estudio pertenece específicamente a cuatro mercados de la ciudad de Cuenca: el mercado 9 de octubre, el mercado 10 de agosto, el mercado 27 de febrero y el mercado 3 de noviembre (Anexo 1, 2, 3, 4, respectivamente). Se tomaron 10 muestras de 100 gramos cada una en cada mercado y se ocupó 10 gramos para el estudio.

II.2.2.- Muestreo y muestra

Se procedió a la selección de la muestra, el mismo día pero en diferentes puestos de venta, correspondiendo a un muestreo probabilístico aleatorio simple, ya que cada elemento de la población tuvo la misma probabilidad de ser seleccionado para formar parte de la muestra. Este método ayuda a garantizar la representatividad de la muestra y minimiza el sesgo en los resultados. El tamaño muestral correspondió a 40 muestras de quesos tomadas en los diferentes mercados de Cuenca, que después sirvieron para su posterior análisis en el laboratorio, sin ninguna pérdida de datos.

II.3.- CRITERIOS DE SELECCIÓN

Para la formalización de la población se tuvo en cuenta los siguientes criterios de selección:

II.3.1.- Criterios de inclusión

- Quesos frescos clasificados como artesanales según la INEN 1528:2012.
- Quesos vendidos en los cuatro mercados dentro de la ciudad de Cuenca (mercado 9 de octubre, el mercado 10 de agosto, el mercado 27 de febrero y el mercado 3 de noviembre).
- Quesos producidos hace una semana antes de la toma de muestra, previo a la explicación verbal del vendedor.
- Puestos de venta que se encuentren dentro del mercado.

II.3.2.- Criterios de exclusión

- Quesos frescos que no sean considerados artesanales (por ejemplo, quesos industriales o semi-industriales).
- Quesos vendidos fuera de los cuatro mercados de Cuenca seleccionados para este estudio.
- Quesos que no hayan sido producidos hace más de una semana antes de la toma de la muestra, previo a la explicación del vendedor.
- Puestos de venta que han sido cerrados por razones de higiene o se encuentren fuera de los mercados.

II.4.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

II.4.1.- Variable independiente

Mercados de Cuenca de expendio de quesos: cualitativa nominal

- Definición: Los diferentes mercados de Cuenca donde se venden los quesos frescos artesanales.
- Escala: Mercados de venta de expendio de quesos del 1 al 4 (mercado 9 de octubre, el mercado 10 de agosto, el mercado 27 de febrero y el mercado 3 de noviembre).

II.4.2.- Variable dependiente

Presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos comercializados en los mercados de Cuenca: cualitativa nominal.

- Definición: presencia de cocos GRAM positivos en pruebas bioquímicas y microbiológicas.
- Escala de medición: Positivo – Negativo a *Staphylococcus aureus*.

Tabla 2 Definición de Variable dependiente

Pruebas	Definición	Clasificación	Indicador	Escala
Agar Manitol Salado	Es un medio de cultivo selectivo, específico para <i>S. aureus</i> , capaces de fermentar el manitol	Cualitativa nominal	Técnica bacteriológica	Positiva Negativa
Catalasa	Prueba bioquímica, para la diferenciación entre cocos grampositivos y gramnegativos, se añade peróxido de hidrógeno y si la catalasa está	Cualitativa nominal	Técnica bacteriológica	Positiva Negativa

	presente, se descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno generando burbujas de gas.			
Coagulasa	Prueba bioquímica, para la diferenciación entre <i>S. aureus</i> y <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos, si la coagulasa está presente se forma grumos y coágulos debido a que es una enzima que coagula el plasma sanguíneo.	Cualitativa nominal	Técnica bacteriológica	Positiva Negativa
Prueba microscópica	Son pruebas para examinar muestras de material biológico o de otro tipo a nivel microscópico (Análisis de tejidos, células y microorganismos)	Cualitativa nominal	Técnica Microscópica	Positiva Negativa
DNAsa	Enzima extracelular que degrada el ADN en nucleótidos menores, tiene gran utilidad como prueba de diferenciación entre <i>Staphylococcus aureus</i> y otras especies de <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos.	Cualitativa nominal	Técnica Microscópica	Positiva Negativa

Fuente: Elaboración propia.

II.5.- PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS.

II.5.1.- Medios de cultivo, instrumentos y equipos

Para esta investigación fue necesario usar medios de cultivo, que son una mezcla de nutrientes y otras sustancias necesarias para el crecimiento y la reproducción de microorganismos (*Staphylococcus aureus*) en el laboratorio. Estos medios pueden ser líquidos (caldos) o sólidos (agar) y se componen de diversas sustancias que proporcionan las condiciones óptimas para el desarrollo microbiano. Asimismo, los instrumentos y equipos utilizados fueron fundamentales para llevar a cabo los estudios microbiológicos, diagnósticos y pruebas bioquímicas, garantizando el desarrollo y análisis adecuado de microorganismos en condiciones controladas. A continuación, se detalla los medios de cultivo, instrumentos y equipos usados para este estudio (11,71):

- Los medios de cultivos utilizados: Compact Dry S.A, Placas DNAsa, Manitol salado.
- Los instrumentos usados para esta investigación fueron: algodón, tubos eppendorf, portaobjetos, cooler, palillos de dientes, toallas absorbentes, papel kraft, fósforo, asas, tubos con rosca estériles, esterilizador, pipetas, mecheros, vaso de precipitación de 250ml, stomachers, erlenmeyer de 600ml, cajas petri.
- Los equipos que se usaron en este estudio fueron: incubadora, autoclave, balanza, gradillas, contador de colonias, refrigerador, estufa, indicadores de ph, licuadora, microscopio.

II.5.2.- Reactivos

Los reactivos corresponden a sustancias químicas utilizadas en el laboratorio para provocar reacciones químicas necesarias para detectar, medir o analizar la presencia de una sustancia específica.

Para este estudio se usaron: Plasma citratado, Peróxido de hidrógeno, Agua destilada, Agua peptonada, Alcohol al 70%, Alcohol industrial al 96%.

II.5.3.- Diluciones

Según la norma INEN 1529.2.1999 (11,71) establece estándares y procedimientos para diversas prácticas, incluidas las diluciones de muestras en análisis microbiológicos, químicos y otros. A continuación, se describen las tres diluciones utilizadas para obtener aquellas que son precisas y reproducibles para la obtención de resultados confiables (Anexo 5).

Para preparar una dilución inicial, se tomaron 10 g de la muestra y se mezclaron con 90 mL de agua peptonada. Este proceso se realizó mediante pulverización y homogeneización mecánica utilizando una licuadora, operando a intervalos de 5 segundos durante un tiempo total de no más de 2 minutos. Este preparado resultó en una concentración de 1:10 (71).

Para la segunda dilución, con una concentración de 1:100, se tomó 1 mL de la solución inicial y se añadió a un tubo de ensayo que contenían 9 mL de agua peptonada, asegurando una homogeneización completa de la mezcla (71).

La tercera dilución, con una concentración de 1:1000, se preparó siguiendo el mismo procedimiento que la dilución anterior. Es decir, se tomó 1 mL de la solución inicial y se añadió a un tubo de ensayo que contenían 9 mL de agua peptonada (71).

Durante todo el proceso, se mantuvieron estrictas condiciones de esterilidad para evitar cualquier tipo de contaminación. Las herramientas y materiales utilizados, como pipetas, tubos de ensayo y el agua peptonada, fueron esterilizados adecuadamente antes de su uso. La licuadora fue desinfectada antes de la pulverización y homogeneización para garantizar la pureza de la muestra.

II.5.4.- Siembra de *Staphylococcus aureus*

El método de siembra de *Staphylococcus aureus* en placas Compact Dry X-SA se empleó para el crecimiento microbiológico. Este método es altamente eficaz y

específico para la multiplicación e identificación de *Staphylococcus aureus* debido a las propiedades del medio de cultivo en estas placas. Tiene un rango de conteo 1- 250 UFC (73).

Para este proceso se realizó la siembra microbiológica de las 10 muestras tomadas en cada uno de los cuatro mercados, se tomó 1 mL de cada dilución preparada utilizando una pipeta estéril y un asa colocándolo directamente en la placa Compact Dry X-SA, permitiendo que el líquido se distribuya uniformemente por capilaridad sin necesidad de extenderlo manualmente (Anexo 6). Se colocó las placas en una incubadora a 37 °C y se dejó incubar durante 48 horas, asegurándose de que las tapas estén hacia arriba para evitar la condensación en la muestra. Después de la incubación, se observó las placas para identificar y contar las colonias de *Staphylococcus aureus*, que se distinguieron notablemente por su color azul debido a la composición del medio de cultivo. Finalmente, se registró el número de colonias en cada placa (Anexo 7).

II.5.6.- Aislamiento en Agar Manitol Salado

El agar manitol salado (MSA) es un medio de cultivo diferencial y selectivo utilizado comúnmente para el aislamiento y la identificación de *Staphylococcus aureus*. Este medio contiene altas concentraciones de sal, manitol y un indicador de pH que permite diferenciar entre bacterias que fermentan el manitol y las bacterias que no fermentan (74).

Para este procedimiento se aislaron únicamente las muestras que presentaron crecimiento de *S. aureus* en las placas Compact Dry X-SA. Se utilizó una asa redonda para tomar una colonia y realizar el aislamiento en el MSA. Se colocó la muestra en el centro de la placa de agar manitol usando un asa de siembra estéril, se dispersó la muestra en la superficie de la placa siguiendo el método estriado para obtener colonias aisladas. Este método consiste en arrastrar la muestra en zigzag sobre la superficie del agar (Anexo 8).

Posteriormente, se colocaron las placas sembradas en una incubadora a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se observó la presencia de colonias

de *Staphylococcus aureus* que fermentaron el manitol produjeron un cambio de color en el medio, transformándolo de rojo a amarillo debido a la producción de ácido, que baja el pH del medio (Anexo 9). Mientras que, las colonias de *S. aureus* que no fermentan el manitol mantuvieron el color rojo del medio (Anexo 10). Por lo tanto, se confirmó el crecimiento de *S. aureus* por la fragmentación o cambio de color del cultivo a amarillo (Anexo 9).

De igual manera, durante todo el proceso, se mantuvieron estrictas condiciones de esterilidad para evitar cualquier tipo de contaminación y alteración patógena en los cultivos y pruebas utilizadas en este estudio. De todas las colonias que crecieron en esta siembra en agar pasan a las pruebas confirmatorias.

II.5.5.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa y DNAsa

Las pruebas de catalasa, coagulasa y DNAsa son herramientas esenciales en la microbiología clínica para confirmar la identidad de *Staphylococcus aureus*. La prueba de catalasa ayuda a distinguir los estafilococos de los estreptococos, la prueba de coagulasa confirma específicamente a *Staphylococcus aureus* y la prueba de DNAsa proporciona una confirmación adicional al detectar la producción de la enzima DNAsa. Estas pruebas combinadas permiten una identificación precisa y confiable de *S. aureus* en muestras clínicas y de laboratorio.

Para la prueba de catalasa se utilizó para diferenciar los estafilococos (catalasa positivos) de los estreptococos (catalasa negativos) (33). Así, para el ensayo de catalasa se utilizaron únicamente las muestras que resultaron positivas en Agar manitol salado, se colocó una pequeña cantidad de una colonia de *Staphylococcus aureus* con una asa de siembra en un portaobjetos por cada muestra recolectada. Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la muestra (Anexo 11). Se observó inmediatamente la formación rápida de burbujas de oxígeno o desprendimiento de CO₂, indicando la presencia de la enzima catalasa, característico de *Staphylococcus aureus*, lo que significa una muestra positiva a catalasa. Y, por el contrario, en la muestra negativa a catalasa se observó ausencia de formación de burbujas en el cultivo (Anexo 12).

Por su parte, la prueba de coagulasa es específica para *S. aureus*, ya que esta bacteria produce la enzima coagulasa (33). Para ello, se utilizaron únicamente las muestras que resultaron positivas en Agar manitol salado, se inoculó una pequeña cantidad de colonia en un tubo de ensayo que contenga 0.5 mL de plasma citratado (Anexo 13). Se logró que éste preparado sea homogéneo y se llevó a incubación por un período de dos horas a una temperatura de 37 °C. La muestra positiva mostró la formación de coágulos en el plasma, indicando la presencia de la enzima coagulasa producida por *Staphylococcus aureus* (Anexo 14). Mientras que, en la muestra negativa no hubo formación de coágulos, indicando la ausencia de la enzima.

Por otro lado, la prueba de DNAsa se utilizó para detectar la producción de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa) por *S. aureus* (33). Para este procedimiento, se utilizaron únicamente las muestras que dieron positivas en las dos pruebas confirmatorias catalasa y coagulasa, se inoculó una línea recta del cultivo bacteriano sobre la superficie del agar DNAsa con un asa de siembra (Anexo 15). De inmediato, se incubó la placa a 37 °C durante 24 horas (Anexo 15). Se observó la aparición de una zona clara alrededor del crecimiento bacteriano de color morado, indicando la degradación del ADN por la enzima DNAsa producida por *S. aureus* (Anexo 16). Mientras que, la ausencia de actividad DNAsa, no hubo una zona clara alrededor del crecimiento bacteriano manteniéndose con el mismo color de la colonia (Anexo 17).

Todos estos procesos se llevaron a cabo bajo ambientes y condiciones estériles.

II.6.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS Y ANÁLISIS DE DATOS

Para la toma de muestras se contó con la aprobación de los puestos de venta para lo cual, no fue necesario hacer oficios dirigidos desde la Universidad Católica de Cuenca, sino bastó con el permiso informal realizado personalmente entre las partes reunidas el mismo día de la toma de muestras (13 de mayo de 2024). Una vez dada la autorización, se procedió a comprar las muestras en diferentes puntos de venta dentro de los mercados de estudio. Para el procesamiento de información se utilizó estadística descriptiva, mediante medidas de frecuencia absoluta y porcentual. El

procesamiento de los datos obtenidos fue realizado en el programa de software Microsoft – Excel 2019, cuyos resultados se explican a través de la edición de gráficos y tablas en este mismo programa.

II.7.- ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto no involucra muestras humanas ni datos personales de individuos, por lo que no se requiere la aprobación del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos (CEISH). El CEISH generalmente supervisa estudios que implican la participación directa de seres humanos, asegurando que se respeten los principios de autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia. Para llevar a cabo la investigación en los mercados: 9 de octubre, 10 de agosto, 27 de febrero y 3 de noviembre, se obtuvo la autorización de los comerciantes que venden queso fresco en los diferentes mercados. Este acercamiento informal, pero cordial, con los comerciantes permitió la entrada a los investigadores y la recolección de muestras de quesos artesanales dentro del mercado, a través de la compra, y facilitó la colaboración con los vendedores de quesos, explicándoles el propósito del estudio y asegurando que comprendan que los resultados se utilizarán únicamente con fines de investigación.

Por su parte, ninguno de los autores de este documento tuvo conflicto de intereses durante la elaboración del estudio.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De manera general, para el conteo de unidades formadoras de colonias en los cuatro mercados estudiados, se realizaron diluciones en concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, con el objetivo de detectar el crecimiento microbiológico de *S. aureus* (71). No obstante, en las diluciones de 1:100 y 1:1000 no se observó crecimiento de *S. aureus*. Por lo tanto, se utilizó la dilución de 1:10 para la siembra microbiológica de todas las muestras (tabla 3).

Tabla 3. Diluciones para determinar crecimiento o no de colonias de *S. aureus*

Mercados de estudio	Dilución 1:10	Dilución 1:100	Dilución 1:1000
9 de Octubre (M1 a M10)	Crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
10 de Agosto (M1 a M10)	Crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
27 de Febrero (M1 a M10)	Crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
3 de Noviembre (M1 a M10)	Crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento

Nota. *M1= muestra 1 ... *M10= muestra 10... **Fuente:** Elaboración propia.

Se tomaron 10 muestras de queso fresco artesanal para cada mercado de estudio en el siguiente orden: 9 de Octubre, 10 de Agosto, 27 de Febrero y 3 de Noviembre. Además, se detallan todos los resultados obtenidos en las pruebas microbiológicas de crecimiento (Compact Dry X-SA y Agar Manitol Salado) y pruebas confirmatorias para catalasa, coagulasa y DNAsa. A continuación, se muestran los resultados obtenidos por cada mercado de estudio:

III.1.- RESULTADOS MERCADO 9 DE OCTUBRE

III.1.1.- Resultados generales

Los resultados generales expuestos en la tabla 4 indican que una de las diez muestras tomadas en el mercado 9 de Octubre (10%) sobrepasa los límites establecidos por la INEN 1528:2012 para *S. aureus*. Esta muestra fue detectada con un número de unidades formadoras de colonias (UFC) superior a 100 UFC/ml, lo cual excede el umbral permitido para que los quesos sean considerados aceptables para el consumo humano. En relación a un estudio realizado en este mismo mercado indica que el 53% del total de muestras tomadas igualmente no cumplen con la INEN 1528:2012 y existe presencia de *S. aureus* en las muestras de queso (3). En este estudio, todas las muestras dan positivo a una prueba confirmatoria de catalasa y dos muestras dan positivo a pruebas de coagulasa. Finalmente, la muestra 4 da positivo a DNasa y, también, a catalasa y coagulasa, pero en la siembra Compact Dry no muestra colonias de crecimiento para *S.aureus*.

Tabla 4 Conteo de *S. aureus* y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 9 de Octubre.

N° muestra	Conteo de <i>Staphylococcus aureus</i> 100 UFC/mL (INEN:1528)	<i>S. aureus</i> 10 ² UFC/mL	Número total de pruebas positivas (catalasa, coagulasa)	Muestras positivas a DNasa	Cumplimiento INEN:1528	
					Cumple	No Cumple
1	215 UFC/mL*	2.15x10 ²	1 CATALASA	-		X
2	30 UFC/mL	3x10 ¹	1 CATALASA	-	X	
3	46 UFC/mL	4.6x 10 ¹	1 CATALASA	-	X	
4	1 UFC/mL	1x10 ⁰	2 CATALASA COAGULASA	+	X	
5	20 UFC/mL	2x10 ¹	1 CATALASA	-	X	

6	61 UFC/mL	6.1×10^1	1 CATALASA	-	X
7	19 UFC/mL	1.9×10^1	2 CATALASA COAGULA SA	-	X
8	13 UFC/mL	1.3×10^1	1 CATALASA	-	X
9	1 UFC/mL	1×10^0	1 CATALASA	-	X
10	99 UFC/mL	9.9×1^1	1 CATALASA	-	X

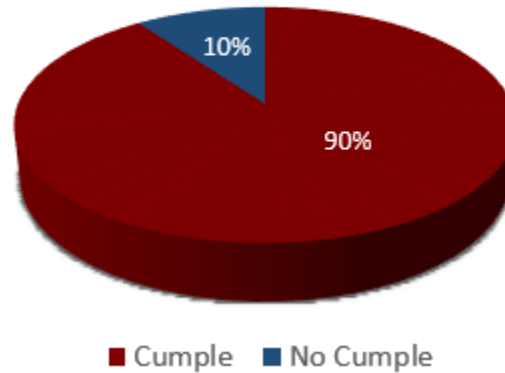
Nota: *Muestras con UFC/mL >100 UFC/mL. *(-):negativo. *(+):positivo. *(x): cumple o no cumple. **Fuente:** Elaboración propia.

III.1.2.- Siembra de *Staphylococcus aureus* en Compact Dry X-SA

En la figura 1 se observa a través de la siembra de *S. aureus* en placas Compact Dry X-SA, a una dilución de 1:10 en 1 mL, que el 10% de las muestras tomadas en el mercado 9 de Octubre no cumple con la Norma INEN 1528:2012. Lo que significa, que el crecimiento microbiológico es positivo a *S. aureus*, puesto que está por encima de los 10^2 UFC/mL estipulado en la norma, correspondiente a la muestra: 1 que está en 2.15×10^2 UFC/mL. Ahora bien, las muestras 2,3,4,5,6,7,8,9,10 que corresponden al 90% aparentemente son quesos aptos para el consumo humano, según esta prueba microbiológica. En comparación con una investigación realizada en el mercado las Manuelas en Durán, las muestras de queso son analizadas en la misma siembra que es este estudio, se encontró que el 100% de estas muestras (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10) superaron el límite máximo permitido por la INEN 1528:2012. Además, presenta mayor crecimiento de UFC de *S. aureus* entre 1.12×10^2 hasta 3.2×10^3 UFC/mL que las muestras tomadas en el mercado 9 de Octubre. Lo que significa que estos quesos no son aptos para el consumo humano (29).

Figura 1 Crecimiento de *S. aureus* en Compact Dry X-SA: 9 de Octubre

Siembra con COMPACT DRY X-SA (9 de octubre)

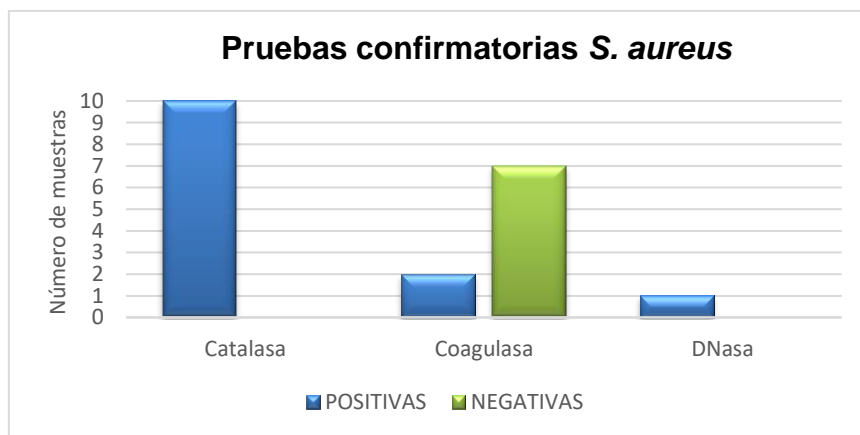


Fuente: Elaboración propia.

III.1.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa Agar

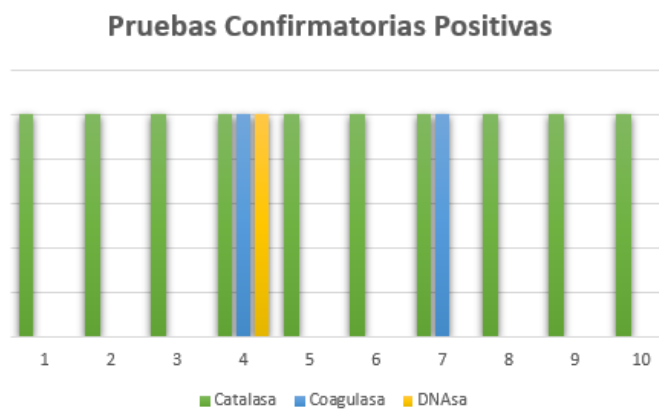
Según lo graficado en la figura 2, del total de las muestras de queso fresco artesanal tomadas en el mercado 9 de Octubre, todas dieron positivo a *S. aureus* en las pruebas de catalasa (100%). Mientras que, a la prueba confirmatoria de coagulasa (20%) las muestras dan positivo y solo la muestra 4 da positivo a DNAsa (10%). Así mismo, la muestra 4 da positivo a *S. aureus* en las tres pruebas confirmatorias aplicadas en este estudio como se ve en la figura 3. Estos hallazgos corroboran lo expuesto en un estudio donde indica que no existe una constante entre las pruebas confirmatorias para cada muestra (12).

Figura 2. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a *S. aureus*: 9 de Octubre



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNasa: 9 de Octubre



Fuente: Elaboración propia.

III.2.- RESULTADOS MERCADO 10 DE AGOSTO

III.2.1.- Resultados generales

Lo expuesto en la tabla 5 indica que tres de diez muestras tomadas en el mercado 10 de Agosto, el 30%, sobrepasan los límites establecidos por la INEN 1528:2012 para *S. aureus*. Fueron detectadas por el número de UFC que corresponden a 100 UFC/ml, bajo estos parámetros los quesos son aceptables para el consumo. De igual manera, un estudio realizado en un mercado de Venezuela corrobora un potencial riesgo para la salud de los consumidores del queso en condiciones que superan el límite establecido por la norma COVENIN 1292:89, igualmente 10² UFC/mL. Entonces, se encontró que en el 74,2% de las muestras creció *S. aureus* con cargas de 10³x10⁴ (2). Además, respecto al *S. aureus* todas las muestras dan positivo a una prueba confirmatoria de catalasa, siete muestras dan positivo a coagulasa. Finalmente, tres muestras dan positivo a DNAsa.

Tabla 5. Conteo de *S. aureus* y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 10 de Agosto.

N° muestra	Conteo de <i>Staphylococcus aureus</i> 100 UFC/mL (INEN:1528)	<i>S. aureus</i> 10 ² UFC/mL	Número total de pruebas positivas (catalasa, coagulasa)	Muestras positiva a DNAsa	Cumplimiento INEN:1528	
					Cumple	No Cumple
1	21 UFC/mL	2.1x 10 ¹	2 CATALASA COAGULASA	-	X	
2	4 UFC/mL	4x10 ⁰	2 CATALASA COAGULASA	+	X	
3	3 UFC/mL	3x10 ⁰	2 CATALASA COAGULASA	-	X	
4	248 UFC/mL*	2.48x10 ²	1 CATALASA	-		X
5	MNC*	MNC*	1 CATALASA	-		X
6	26 UFC/mL	2.6x 10 ¹	2 CATALASA COAGULASA	+	X	
7	32 UFC/mL	3.2x 10 ¹	2 CATALASA COAGULASA	+	X	

8	22 UFC/mL	2.2×10^1	2 CATALASA COAGULASA	-	X
9	14 UFC/mL	1.4×10^1	2 CATALASA COAGULASA	-	X
10	MNC*	MNC*	1 CATALASA	-	X

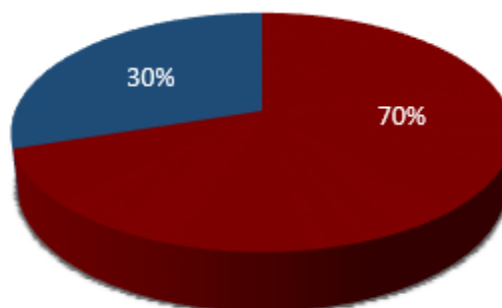
Nota: *Muestras con UFC/mL >100. *MNC: Muy numerosas de contar. *(-):negativo. *(+):positivo. *(x): No cumple. **Fuente:** Elaboración propia.

III.2.2.- Siembra de *Staphylococcus aureus* en Compact Dry X-SA

En la figura 4 se observa a través de la siembra de *S. aureus* en placas Compact Dry X-SA, a una dilución de 1:10 en 1 mL, que el 30% de las muestras tomadas en el mercado 10 de Agosto no cumplen con la Norma INEN 1528:2012. Lo que significa, que el crecimiento microbiológico es positivo a *S. aureus*, puesto que está por encima de los 10^2 UFC/ml estipulado en la norma, correspondientes a las muestras: 4,5,10 que van desde 2.48×10^2 UFC/mL y MNC. Ahora bien, la muestra 1,2,3,6,7,8,9 que corresponden al (70%) aparentan ser quesos aptos para el consumo humano, según esta prueba microbiológica. En este sentido, pasa igual en el mercado Recreo 5ta Etapa de Durán, donde el 100% de las muestras tomadas superan los límites de UFC/mL entre 1.4×10^2 hasta 5.8×10^2 , presentando menor crecimiento de colonias de *S. aureus* en las muestras de quesos tomadas (1,2,3,4,5,6) en relación al mercado 10 de Agosto (29).

Figura 4. Crecimiento de *S. aureus* en Compact Dry X-SA: 10 de Agosto

Siembra con COMPACT DRY X-SA (10 de agosto)



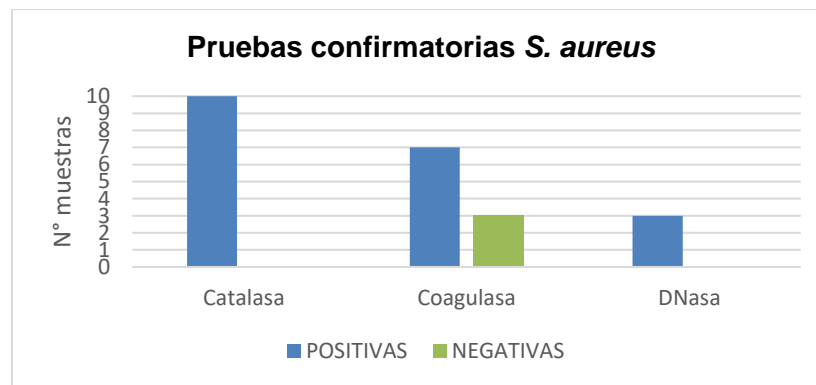
Fuente: Elaboración propia.

■ Cumple ■ No Cumple

III.2.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa

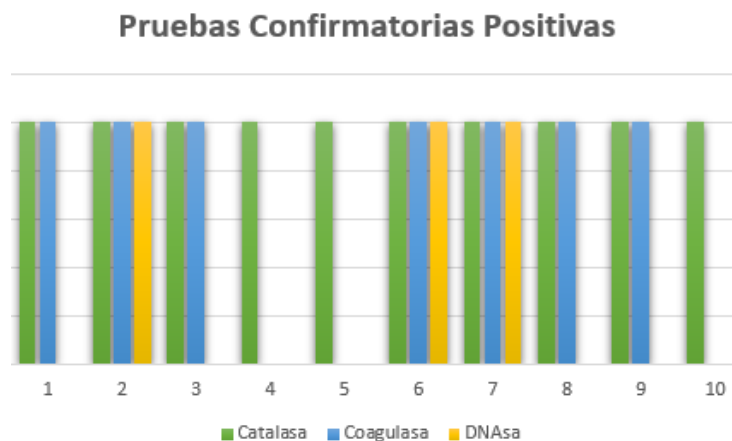
Como se observa en la figura 5 del total de las muestras de queso fresco artesanal tomadas en el mercado 10 de Agosto, todas dieron positivo a *S. aureus* en las pruebas de catalasa (100%), mientras que la coagulasa dieron siete muestras positivas 1,2,3,6,7,8,9 (70%) y tres muestras 2,6,7 dan positivo a DNAsa (30%). Así mismo, las muestras 2,6,7 (figura 6) dan positivo a *S. aureus* en las tres pruebas confirmatorias aplicadas en este estudio. Estos hallazgos corroboran lo expuesto en un estudio donde indica que no existe una constante entre las pruebas confirmatorias para cada muestra (12).

Figura 5. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a *S.aureus*: 10 de Agosto



Fuente: Elaboración propia.

Figura 6. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa: 10 de Agosto



Fuente: Elaboración propia.

III.3.- RESULTADOS MERCADO 27 DE FEBRERO

III.3.1.- Resultados generales

Lo expuesto en la tabla 6 indica que tres de las diez muestras tomadas en el mercado 27 de febrero sobrepasan los límites establecidos por la INEN 1528:2012 para *S. aureus* (100 UFC/ml). No obstante, las otras dos se encuentran dentro del límite establecido 1.6×10^1 - 2.4×10^1 y las cinco muestras no muestran colonias por contar, lo que significa que estas muestras son aptas para consumo. Por el contrario, todas las muestras de queso artesanal del mercado Tunja no cumplen con los parámetros establecidos por la Norma Técnica Colombiana 750, mostraron niveles superiores de *S. aureus* $1,6 \times 10^5$ UFC/g. Es importante mencionar que cada país establece los UFC/mL o g respecto a sus consideraciones (25). Además, respecto a la presencia de *S. aureus* cinco muestras dan positivo a una prueba confirmatoria de catalasa, tres muestras dan positivo a las pruebas de coagulasa. Finalmente, dos muestras dan positivo a DNAsa

Tabla 6. Conteo de *S. aureus* y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 27 de Febrero

N° muestra	Conteo de <i>Staphylococcus aureus</i> 100 UFC/mL (INEN:1528)	<i>S. aureus</i> 10 ² UFC/mL	Número total de pruebas positivas (catalasa, coagulasa)	Muestras positivas a DNAsa	Cumplimiento INEN:1528	
					Cumple	No Cumple
1	Ausencia	Ausencia	-	-	X	
2	Ausencia	Ausencia	-	-	X	
3	Ausencia	Ausencia	-	-	X	
4	MCN*	MCN*	1 CATALASA	-		X
5	Ausencia	Ausencia	-	-	X	
6	MNC*	MCN*	2 CATALASA COAGULAS A	-		X
7	16 UFC/mL	1.6×10^1	2 CATALASA	+	X	

COAGULAS						
A						
8	MCN*	MCN*	2	+		X
CATALASA						
COAGULAS						
A						
9	Ausencia	Ausencia	-	-	X	
10	24 UFC/mL	2.4x10 ¹	1	-	X	
CATALASA						

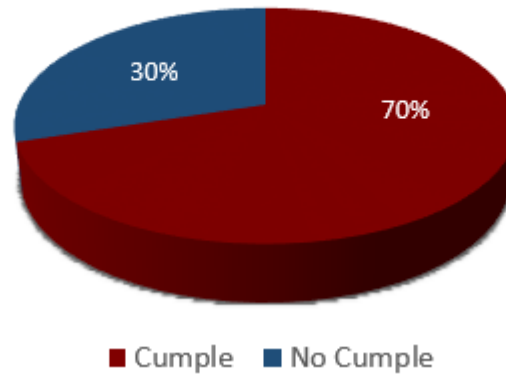
Nota: *Muestras con UFC/mL >100. *MNC: Muy numerosas de contar. *(-):negativo. *(+):positivo. *(x): No cumple. **Fuente:** Elaboración propia.

III.3.2.- Siembra de *Staphylococcus aureus* en Compact Dry X-SA

En la figura 7 se observa a través de la siembra de *S. aureus* en placas Compact Dry X-SA, a una dilución de 1:10 en 1 mL, que el 30% de las muestras tomadas en el mercado 27 de Febrero no cumplen con la Norma INEN 1528:2012, de las cuales son MNC. Lo que significa, que el crecimiento microbiológico es positivo a *S. aureus*, puesto que está por encima de los 10² UFC/ml estipulado en la norma, corresponden a las muestras: 4,6,8 las cuales son MNC. Ahora bien, las muestras 1,2,3,5,9 presentan ausencia de colonias y las muestras correspondientes a la 7, 10 que van desde 1.6x10¹-2.4x10¹ entonces se determina que el 70% de los quesos evaluados se consideran aptos para el consumo humano, según esta prueba y la norma. Por otro lado, en un mercado de Manabí se determinó que el 55% de los productos analizados no son aptos para el consumo debido a su incumplimiento de los requisitos de calidad higiénico-sanitaria INEN:1528. Sin embargo, cabe mencionar que en la siembra de *S. aureus* en la investigación mencionada se utilizaron las placas Compact Dry X-SA (19).

Figura 7. Crecimiento de *S. aureus* en Compact Dry X-SA: 27 de Febrero

Siembra con COMPACT DRY X-SA (27 de febrero)

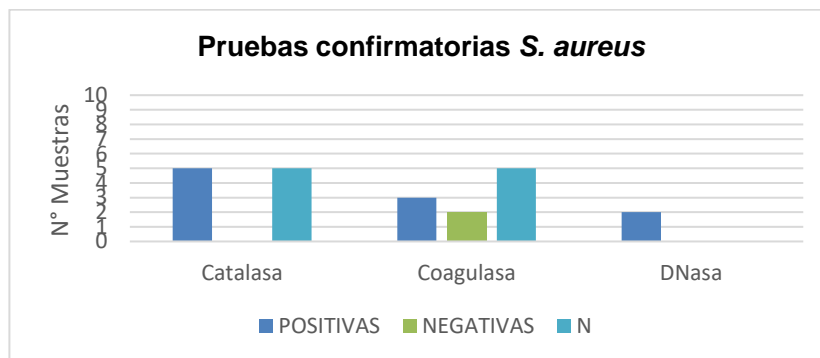


Fuente: Elaboración propia.

III.3.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa

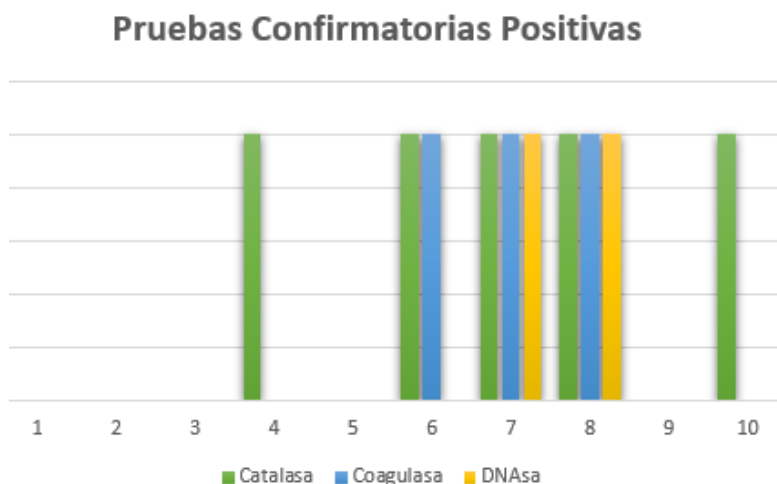
Como se observa en la figura 8, del total de las muestras de queso fresco artesanal tomadas en el mercado 27 de Febrero, cinco muestras 4,6,7,8,10 dieron positivo a *S. aureus* en las pruebas de catalasa (50%). Por su parte, a coagulasa dieron tres muestras positivas 6,7,8 (30%) y dos muestras negativas 4 y 10 (20%). Las muestras 7,8 dan positivo a DNAsa (20%). Así mismo, las muestras 7,8 dan positivo a *S. aureus* en las tres pruebas confirmatorias aplicadas en este estudio, como se ve en la figura 9. Estos hallazgos asienten lo expuesto en un estudio donde las pruebas confirmatorias no representan una constante para cada muestra, pues puede ser positiva a una prueba y negativa a otra (12).

Figura 8. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a *S.aureus*: 27 de Febrero



Nota: *N: Ninguna colonia por contar. **Fuente:** Elaboración propia.

Figura 9. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa: 27 de Febrero



Fuente: Elaboración propia.

III.4.- RESULTADOS MERCADO 3 DE NOVIEMBRE

III.4.1.- Resultados generales

Los resultados generales expuestos en la tabla indican que tres de las diez muestras tomadas en el mercado 3 de Noviembre (30%) sobrepasan los límites establecidos por la INEN 1528:2012 para *S. aureus* (100 UFC/ml). No obstante, otras dos muestras presentan ausencia de colonias y otras cinco se encuentran dentro 1.4×10^1 - 4.1×10^1 de los límites establecidos en la norma. Con los mismos parámetros para *S. aureus* en la Norma Venezolana COVENIN 1292:89 (10^2), un estudio en el mercado de este país detectaron que el 60% de las muestras cumple con la normativa, siendo un gran porcentaje de los quesos analizados aptos para consumo (2). También, respecto a la presencia de *S. aureus* una muestra da positivo a las tres pruebas confirmatorias, dos muestras no muestran resultados, siete muestras dan positivo a las pruebas de catalasa y coagulasa. Finalmente, una muestra da positivo a DNAsa.

Tabla 7. Conteo de *S. aureus* y Cumplimiento de los Límites de la Norma INEN 1528:2012 en Muestras de quesos del Mercado 3 de Noviembre

N° muestra	Conteo de <i>S. aureus</i> 100 UFC/mL (INEN:1528)	<i>S. aureus</i> 10 ² UFC/MI	N° total de pruebas positivas (catalasa, coagulasa)	Muestras positivas a DNasa	Cumplimiento INEN:1528	
					Cumple	No cumple
1	MCN*	MCN*	1 CATALASA	-		X
2	MCN*	MCN*	1 COAGULASA	-		X
3	14 UFC/mL	1.4×10^1	2 CATALASA COAGULASA	-	X	
4	9 UFC/mL	9×10^0	2 CATALASA COAGULASA	+	X	
5	Ausencia	Ausencia	-	-	X	
6	145 UFC/mL*	1.45×10^2	2 CATALASA COAGULASA	-		X
7	1 UFC/mL	1×10^0	2 CATALASA COAGULASA	-	X	

8	23 UFC/mL	2.3×10^1	2 CATALASA COAGULASA	-	X	
9	41 UFC/mL	4.1×10^1	2 CATALASA COAGULASA	-	X	
10	Ausencia	Ausencia	-	-	X	

Nota: *MNC: Muy numerosas de contar. *(-):negativo. *(+):positivo. *(x): No cumple.

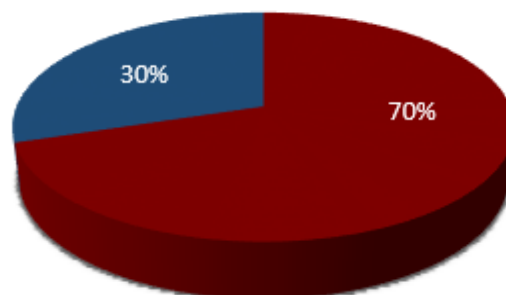
Fuente: Elaboración propia.

III.4.2.- Siembra de *Staphylococcus aureus* en Compact Dry X-SA

En la figura 10 se observa a través de la siembra de *S. aureus* en placas Compact Dry X-SA, a una dilución de 1:10 en 1 mL, que el 30% de las muestras tomadas en el mercado 3 de Noviembre no cumplen con la Norma INEN 1528:2012, de las cuales el 20% son MNC. Lo que significa, que el crecimiento microbiológico es positivo a *S. aureus*, puesto que está por encima de los 10^2 UFC/mL estipulado en la norma, los cuales corresponden a las muestras: 1,2,6. En comparación con un estudio realizado en el mercado mayorista de Durán, donde el 100% de las muestras tomadas presentan UFC superiores al límite establecido en la misma norma usada para este estudio con valores desde 1.1×10^2 hasta 5.2×10^3 , sin encontrar MNC en las muestras (29). Ahora bien, las muestras 3,4,5,7,8,9,10 que corresponde al 70% de quesos aptos para el consumo humano porque cumplen el rango estipulado. En este contexto, las muestras 5 y 10 no presentan colonias por contar (N), sin embargo, refieren quesos aptos para el consumo humano, según esta prueba y la norma.

Figura 10. Crecimiento de *S. aureus* en Compact Dry X-SA: 3 de Noviembre

Siembra con COMPACT DRY X-SA (27 de febrero)



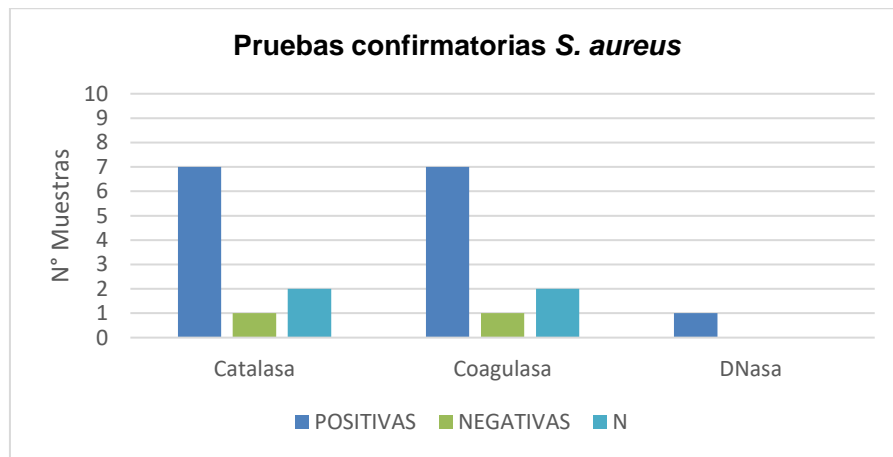
Fuente: Elaboración propia.

■ Cumple ■ No Cumple

III.4.3.- Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa

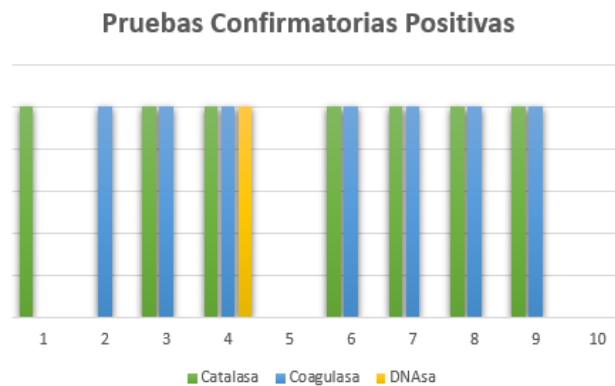
Como se observa en la figura 11, del total de las muestras de queso fresco artesanal tomadas en el mercado 3 de Noviembre, siete muestras 1,3,4,6,7,8,9 dieron positivo y la muestra 2 dio negativo a *S. aureus*, en las pruebas de catalasa. Por su parte, a coagulasa dieron siete muestras positivas 2,3,4,6,7,8,9 (70%) y una muestra negativa 1. La muestra 4 dio positivo a DNAsa (10%). Asimismo, la muestra 4 dio positivo a *S. aureus* en las tres pruebas confirmatorias aplicadas en este estudio (figura 12).

Figura 11. Pruebas confirmatorias positivas o negativas a *S.aureus*: 3 de Noviembre



Nota: *N: Ninguna colonia por contar. **Fuente:** Elaboración propia.

Figura 12. Pruebas confirmatorias a catalasa, coagulasa, DNAsa: 3 de Noviembre



Fuente: Elaboración propia.

III.5.- RESULTADOS GENERALES Y DISCUSIÓN

III.5.1.- Agar Manitol Salado

Como se observa en la tabla 8, de todas las 10 muestras recolectadas de queso fresco en cada uno de los mercados de Cuenca analizados (9 de Octubre, 10 de Agosto), todas las bacterias crecieron dando positivo a *S. aureus* mientras que, los mercados (27 de Febrero y 3 de Noviembre) no tuvieron resultados positivos en su totalidad. Al igual que, las muestras tomadas en el mercado Junín de Manabí donde la mayoría de las muestras resultaron positivas para crecimiento de *S. aureus* en pruebas realizadas en Agar Manitol Salado (30). Lo que corrobora que es una herramienta valiosa en microbiología, debido a su gran capacidad para diferenciar, principalmente, *S. aureus* mediante un procedimiento sencillo y claro (74).

Tabla 8. Resultados de crecimiento de *S. aureus* en Agar Manitol

N° muestras	Mercado 9 de Octubre		N° muestras	Mercado 10 de Agosto		N° muestras	Mercado 27 de Febrero		N° muestras	Mercado 3 de Noviembre	
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo		Positivo	Negativo		Positivo	Negativo
	1	+			11		+			21	
2	+		12	+		22		-	32	+	
3	+		13	+		23		-	33	+	
4	+		14	+		24	+		34	+	
5	+		15	+		25		-	35		-
6	+		16	+		26	+		36	+	
7	+		17	+		27	+		37	+	
8	+		18	+		28	+		38	+	
9	+		19	+		29		-	39	+	
10	+		20	+		30	+		40		-

Fuente: Elaboración propia.

III.5.2.- Mercado con mayor número de UFC/mL de *Staphylococcus aureus* en siembra Compact Dry X-SA

En la tabla 9, se observa el número de UFC contables en dilución 1:10 en siembra Compact Dry X-SA, donde hubo crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Se obtuvo que el mercado con mayor número contable de UFC corresponde al mercado 9 de Octubre con 5.05×10^2 UFC/mL; indicando mayor presencia de *S. aureus* en los quesos expandidos en este mercado. Por su parte, el mercado con menor número de UFC contables en siembra Compact Dry X-SA, respecto a la presencia de *S. aureus*, corresponde al mercado 27 de Febrero con 4×10^1 UFC/mL.

No obstante, para este estudio se consideró también a las muestras denominadas MNC (o muestras muy numerosas por contar), las mismas que al tener un número de colonias mayor a 250 en siembra Compact Dry X-SA son denominadas con MNC. Pero, para cuantificar estas muestras y dar mejores resultados se designó con el número de UFC/mL mínimo correspondiente a 2.5×10^2 o 250 UFC/mL para cada muestra denominada MNC. Este número 2.5×10^2 UFC/mL por cada MNC fue sumada al número de UFC contables. Validando el método Compact Dry X-SA demostró ser altamente eficaz y específico para la multiplicación e identificación de *S. aureus* debido a las propiedades del medio de cultivo utilizado en estas placas. Con un rango de conteo de 1-250 UFC, este método permite una identificación precisa y rápida de la contaminación por *S. aureus* (73).

Con este cálculo se determinó que el mercado 10 de Agosto es el que presenta mayor número de UFC/mL (8.7×10^2) de *S. aureus* en los quesos que aquí se venden. Entonces, el mercado 9 de octubre es el que presenta menor número de UFC/mL (5.05×10^2) para *S. aureus*.

Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con investigaciones previas. Así, un estudio realizado en mercados de Venezuela encontró la presencia de *S. aureus* en muestras de queso artesanal vendidas. Se detectaron que el total de las muestras del mercado con mayor carga de *S. aureus* estaba entre 10^3 - 10^4 UFC/g, cargas similares de longitud a las de la presente investigación. Ahora bien, los quesos vendidos en el Arenal de Cuenca mostraron una alta carga de *S. aureus*

con valores de hasta 11.60×10^3 UFC/g, sin embargo, son cargas menores a los encontrados en este estudio. En esta misma línea de investigación, en México, se registraron altos niveles de *S. aureus* de 9.16, 9.23 y 9.18 \log_{10}^2 UFC/g en muestras de queso. Igualmente, se aprecia cargas menores de UFC que el presente estudio (33). Estos hallazgos indican altos niveles de contaminación y deficiencias en la higiene durante el proceso de elaboración y venta del queso (2).

Tabla 9. Total de UFC/mL para cada mercado, siembra Compact Dry X-SA para *Staphylococcus aureus*

Mercados	Número de UFC/mL contables (100 UFC/MI)	MNC*	Total UFC/mL (# UFC/mL contables + MNC)	N*
9 de Octubre	505 UFC/mL ⁽⁺⁾		505 UFC/mL ⁽⁻⁾	
10 de Agosto	370 UFC/mL	2 MNC = 500 UFC/mL	870 UFC/mL ⁽⁺⁾	
27 de Febrero	40 UFC/mL ⁽⁻⁾	3 MNC = 750 UFC/mL	790 UFC/mL	5 = 0
3 de Noviembre	233 UFC/mL	2 MNC = 500 UFC/mL	733 UFC/mL	2 = 0

Nota: *MNC: Muy numerosas de contar = o >250 UFC/mL. Para este estudio se consideran 250 UFC/mL por cada MNC. *N: No hay colonias por contar $< a 1 = 0$. *+= mercado con mayor número de UFC. *- = mercado con menor número de UFC. Para este estudio se considera un valor nulo o cero. **Fuente:** Elaboración propia.

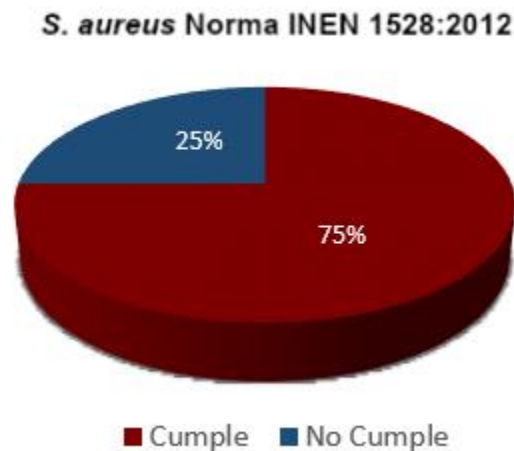
III.5.3.- Quesos frescos aceptables o no según INEN 1528:2012

Como se observa en la figura 13, el 25% del total de las muestras de quesos tomadas en los diferentes mercados presentan contaminación por *Staphylococcus aureus*, puesto que la concentración de estos microorganismos excedió el límite máximo permisible por las normas INEN 1528:12 del Ecuador. Es decir, excedió el 10×10^2 UFC/mL permitido, según la prueba microbiológica Compact Dry X-SA. Por otro lado, el 75% del total de muestras de quesos analizadas se consideran aptas para el consumo humano ya que no excedan el límite de UFC/mL referido en la norma. Corroborando estos hallazgos, un estudio realizado en Cuenca respecto a los quesos frescos vendidos en el mercado 12 abril, igual, mediante la prueba

microbiológica Compact Dry X-SA también se encontró que la mayoría de las muestras analizadas (58%) presentan contaminación por *S. aureus* puesto que exceden el límite de UFC/mL establecido por la norma INEN 1528:2012 (1×10^2); consideradas como inaceptables. Mientras que, el 42% de las muestras analizadas son consideradas como aceptables para el consumo (12).

Asimismo, en el mercado de Tunja de Colombia indica que el queso artesanal vendido se ha convertido en un vehículo de contaminación de microorganismos. Donde se encontró que el 100% de las muestras revelaron altos niveles de *S. aureus* sobrepasando los límites de la Norma Técnica Colombiana 750 ($1,6 \times 10^5$ UFC/g) (25). Confirmando la presencia *S. aureus* en quesos frescos expandidos en tres mercados del cantón Durán con Compact Dry XSA, se obtuvo que el 54% muestras fueron positivas para *S. aureus*, superando el límite máximo permitido según la norma INEN 1528:2012 (29). Los límites de UFC para estos tres estudios, establecidos en las respectivas normas de cada país, es de 10^2 UFC/mL.

Figura 13. Porcentaje de quesos frescos aptos o no para consumo humano



Fuente: Elaboración propia.

III.5.4.- Pruebas confirmatorias: catalasa, coagulasa y DNAsa

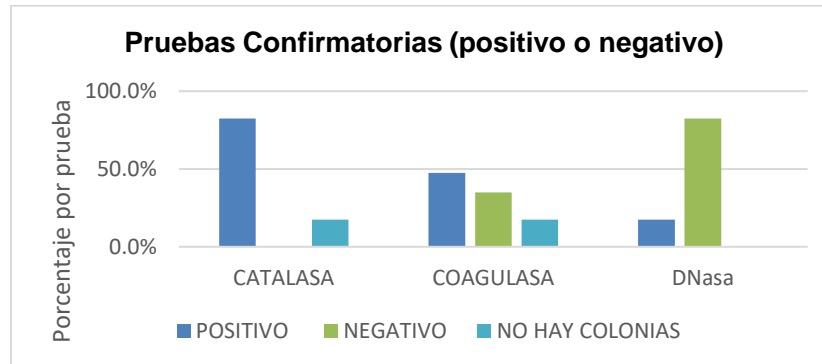
Como se observa en la figura 14, del total de las muestras de queso fresco tomadas en los diferentes mercados de estudio, el 80% dio positivo y el 20% dio negativo a catalasa. Por su parte, el 47,5% del total de las muestras dio positivo a coagulasa, el 35% negativo y el 17,5% no hubo UFC por contar (menos de 10). Finalmente, para la prueba DNAsa el 82,5% dio negativo y solamente 17,5% dio positivo. Siendo la prueba confirmatoria catalasa positiva la que tuvo mayor crecimiento de colonias características de *S. aureus*. La prueba DNAsa mostró menor crecimiento para colonias positivas a esta bacteria. No existe una constante entre las pruebas confirmatorias para cada muestra.

Aludiendo a los resultados de este estudio con otro similar, se identificó la presencia de *S. aureus* en queso fresco a granel vendido en mercados municipales y centros comerciales de Cuenca, utilizando métodos microbiológicos convencionales. Los resultados mostraron que el 88.33% de las muestras tenían crecimiento de colonias características de *S. aureus* con pruebas bioquímicas. Se indica que el 35.84% corresponde a catalasa positiva, 15.09% coagulasa positiva y 11.32% DNAsa positiva. Igualmente, se comprueba que la catalasa es la que presenta mayor crecimiento y la DNAsa menor crecimiento de UFC de *S. aureus* (6).

No obstante, hay otros estudios que tienen diferentes resultados respecto a los quesos frescos vendidos en mercados en Pueblo Libre y Lima, donde según las pruebas confirmatorias a *S. aureus* todas las muestras dieron positivo a catalasa y coagulasa, ninguna a DNAsa. Pero, sigue siendo catalasa la prueba confirmatoria que lidera el mayor número de UFC al crecimiento de *S. aureus* (26).

Si se realiza un breve análisis, se puede determinar que la catalasa es la prueba confirmatoria que genera mayor crecimiento de UFC para *S. aureus* en los estudios mencionados. Así como también, otras investigaciones demuestran que aunque las diferentes pruebas bioquímicas indiquen la presencia de *S. aureus* no existe una constante para cada muestra en los resultados en todas las pruebas (12).

Figura 14. Positivo o negativo a *S. aureus* con pruebas confirmatorias



Fuente: Elaboración propia.

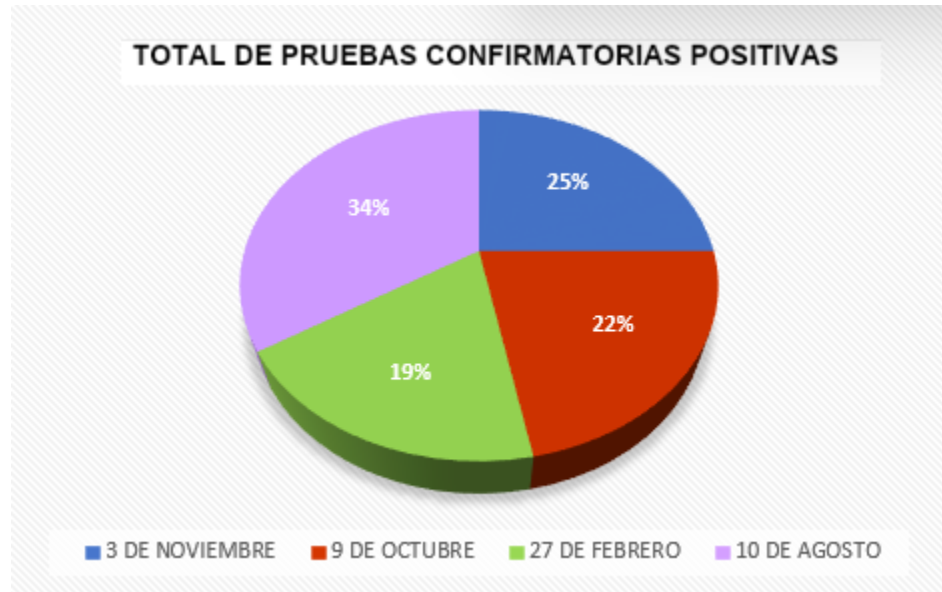
III.5.5.- Pruebas confirmatorias positivas (catalasa, coagulasa, DNAsa) a *Staphylococcus aureus* en los diferentes mercados

Como se observa en la figura 15, el mercado con mayor porcentaje de pruebas confirmatorias positivas (catalasa, coagulasa, DNAsa) corresponde al mercado 10 de Agosto con el 34% (20 muestras), segundo corresponde al mercado 3 de Noviembre con el 25% (15 muestras), seguido del mercado 9 de Octubre con el 22% (13 muestras) y el 27 de Febrero con 19% (10 muestras), respectivamente esto significa que hay una mayor presencia de *S. aureus* en quesos frescos artesanales vendidos en el mercado 10 de Agosto, lo que indirectamente implica una menor calidad del producto (tabla 10). Entonces, el mercado 27 de Febrero refieren menor presencia de *S. aureus* en quesos frescos aquí expendidos.

Para dar validez a estos resultados, se analiza un estudio similar donde se analizaron cuatro mercados en Cuenca, donde se considera el número total de pruebas confirmatorias positivas (catalasa, coagulasa, DNAsa) que son contabilizadas para cada mercado. Se indica que la tendencia a la contaminación por *S. aureus* es el Mercado 2 con 34%, seguido de los mercados 3 y 4 con el 32% y 23%, respectivamente. En definitiva se identificó *S. aureus* en el queso fresco artesanal vendido en los cuatro mercados municipales estudiados, lo que significa

deficiencias higiénicas en la manipulación de los quesos frescos artesanales y un riesgo significativo para la salud del consumidor (12).

Figura 15. Porcentaje de pruebas confirmatorias positivas a *S. aureus* en cada mercado de estudio



Fuente: Elaboración propia

Tabla 10. Número de pruebas confirmatorias positivas por mercado de estudio

MERCADOS	POSITIVOS		
	CATALASA	COAGULASA	DNAsa
9 DE OCTUBRE	10	2	1
10 DE AGOSTO*	10	7	3
27 DE FEBRERO	5	3	2
3 DE NOVIEMBRE	7	7	1

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

Se identificó el crecimiento de *S. aureus* en el 25% de las muestras de quesos artesanales recolectadas de los diferentes mercados de Cuenca, con la formación de colonias amarillas sobre la superficie mediante el método microbiológico de Agar Manitol Salado. Asimismo, a través del método de conteo microbiológico Compact Dry X-SA, se determinó el crecimiento de *S. aureus* con la formación de colonias azules sobre su superficie, siendo el mercado 9 de Octubre el que mostró la mayor cantidad de UFC contables con 5.05×10^2 UFC/mL. No obstante, al considerar las muestras MNC, que superaron las 250 colonias en siembra Compact Dry X-SA, concluyó que el mercado 10 de Agosto presentó la mayor concentración de *S. aureus* aproximadamente con 8.7×10^2 UFC/mL en los quesos vendidos en este mercado.

Los resultados de las pruebas bioquímicas confirmatorias a catalasa, coagulasa y DNAsa revelaron un número considerable de muestras positivas para *Staphylococcus aureus*. Así, del total de las muestras analizadas, la prueba de catalasa positiva fue la que mostró el mayor crecimiento de colonias características de *Staphylococcus aureus* con el 80%, mientras que la prueba de DNAsa mostró el menor crecimiento de esta bacteria con el 82,5%. Mientras que, el 47.5% del total de las muestras dio positivo a coagulasa y solo el 17,5% dio positivo a DNAsa. En este sentido, mediante el análisis del total de pruebas bioquímicas confirmatorias positivas para cada mercado, se determinó que el mercado 10 de Agosto es el que presenta mayor presencia de *S. aureus* con un 34% en quesos frescos artesanales vendidos en este lugar, seguido del mercado 3 de Noviembre con el 25%..

Con el análisis de las muestras de quesos artesanales tomados en los cuatro mercados de Cuenca mediante cuantificación de UFC en Compact Dry X-SA, se determinó que el 25% de las muestras obtenidas excedieron el límite máximo permisible por las normas INEN 1528:12 del Ecuador (10^2 UFC/mL) para

microorganismos *S. aureus* . Lo que significa que, un porcentaje significativo de los quesos artesanales expendidos en estos mercados de Cuenca no cumplen con los límites establecidos para la presencia de *S. aureus* .

Así también, los resultados obtenidos mediante el análisis con pruebas microbiológicas como Compact Dry X-SA y Agar Manitol Salado, así como, pruebas confirmatorias para catalasa, coagulasa y DNAsa. Se determinó la presencia de *Staphylococcus aureus* en las muestras recolectadas en los puntos de venta de quesos artesanales dentro de los mercados 9 de Octubre, 10 de Agosto, 27 de Febrero y 3 de Noviembre. Lo que indica que, los resultados positivos representan una preocupación potencial para la salud pública, dado que *Staphylococcus aureus* es conocido por producir toxinas que pueden causar enfermedades en los consumidores, ya que, estos productos podrían no ser adecuados para el consumo humano, de acuerdo a la norma INEN 1528:2012 establecida en el Ecuador para quesos frescos.

Finalmente, la variabilidad en los resultados de las pruebas confirmatorias y las pruebas microbiológicas sugiere que no existe una constancia entre ellas para cada muestra. Estos hallazgos resaltan la importancia de utilizar múltiples pruebas confirmatorias para una identificación más precisa de *S. aureus* en quesos frescos artesanales.

IV.2.- RECOMENDACIONES

- Implementar y fortalecer BPM a lo largo de toda la cadena de producción de quesos artesanales en Cuenca, desde su elaboración hasta su venta en los mercados. Esto incluye capacitar a los productores y vendedores sobre la importancia de mantener un ambiente limpio y controlado para reducir la contaminación microbiológica.
- Realizar inspecciones y monitoreos periódicos en los mercados de Cuenca para detectar y controlar *S. aureus* y otros patógenos en quesos artesanales. Implementar programas de control de calidad con pruebas microbiológicas regulares, en coordinación con practicantes universitarios y las autoridades del mercado, para asegurar que los productos cumplan con los estándares de seguridad alimentaria.
- Revisar y mejorar las condiciones de almacenamiento en los mercados para reducir el riesgo de contaminación cruzada. Esto implica, que los quesos artesanales se almacenen y transporten a temperaturas adecuadas para prevenir el crecimiento de bacterias.
- Asegurar que los productores y vendedores de quesos artesanales cumplan con las normativas vigentes, como la norma INEN 1528:2012, para garantizar la seguridad y calidad de los productos. La implementación de sanciones adecuadas para aquellos que no cumplan con las regulaciones establecidas.
- Fomentar la colaboración entre las autoridades sanitarias, los productores de quesos, las asociaciones de comerciantes y los consumidores para establecer estrategias efectivas de control y prevención de la contaminación microbiana. Con la creación de alianzas con universidades e institutos de investigación para promover estudios de mejora de la seguridad alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Romero MI. La importancia cultural de la producción artesanal del queso de cabra [Internet]. Málaga: Quesos Santa María del Cerro; 29 de marzo de 2024 [citado el 4 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.quesossantamariadelcerro.com/la-importancia-cultural-de-la-produccion-artesanal-del-queso-de-cabra>
2. Márquez GJ. Recuento de *Staphylococcus aureus* y detección de enterotoxinas estafilocócicas en queso blanco venezolano artesanal tipo telita expendido en mercados de la ciudad de Caracas. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [Internet]. 2012 [citado el 4 de junio de 2024]; 32(2):112–5. Disponible en: <https://ve.scielo.org/pdf/rsvm/v32n2/art07.pdf>
3. Roldán G, Washima M, Torres S. Determinación de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos del mercado 9 de octubre de la ciudad de Cuenca, Agosto 2023. Tesla Revista Científica [Internet]. 2024 [citado el 4 de junio de 2024]; 4(1):1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.55204/trc.v4i1.e295>
4. Vanegas LM, González GL, Martínez LA, Buitrago F. Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos en Bogotá. Rev MVZ Córdoba [Internet]. 4 de febrero de 2008 [citado el 4 de junio de 2024]; 13(2):1288–1293. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v13n2/v13n2a3.pdf>
5. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. Infección por estafilococo e influenza estacional [Internet]. Estados Unidos: CDC. 14 de noviembre de 2022 [citado el 4 de junio de 2024]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/flu/symptoms/flustaph.htm>
6. Feijó S, Pinos E, Ortiz J. Identificación de *Staphylococcus aureus* a partir de queso fresco expendido en mercados y centros comerciales de la ciudad de Cuenca. Revista Anatomía Digital [Internet]. Septiembre 2023; 6(3):103-118. Disponible en: <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i3.3.2708>

7. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* [internet]. 31 December 1988 [citado el 5 de junio de 2024]; 7(4):311-316. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90057-8)
8. Luján D, Valentín M, Molina M. Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima-Perú. *Revista Salud Pública y Nutrición* [Internet]. Abril-Junio 2006 [citado el 5 de junio de 2024]; 7(2):1-6. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=13245>
9. Arguello P, Lucero O, Castillo G, Escobar S, Albuja A, Gallegos J, Carrascal A. Calidad microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba (Ecuador). *Revista Perspectiva*. 2015; 16(1).
10. Vásquez V, Salhuana JG, Jiménez LA, Abanto LM. Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos frescos en Cajamarca. *Ecología aplicada* [Internet]. Febrero 2018 [citado el 5 de junio de 2024]; 17(1):45-51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>
11. Resolución N°379 - NTE INEN 1528. Norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos [Internet]. FAO. Marzo 2012 [citado el 17 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC113120/>
12. Ordoñez Z, Parra C. Identificación de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales expendidos en el mercado 12 de abril de la ciudad de Cuenca, período enero 2023 [Internet]. [Tesis de licenciatura]. Cuenca: Universidad Católica de Cuenca; 2023. Disponible en: <https://dspace.ucacue.edu.ec/server/api/core/bitstreams/7c9d87db-552f-4717-a564-188984b2e9e9/content>

13. Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos [Internet]. OMS. 30 de abril de 2020 [citado el 9 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
14. Hurtado MP, de la Parte MA, Brito A. *Staphylococcus aureus* : Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [Internet]. Julio 2002 [citado el 9 de junio de 2024]; 22(2):112-118. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003
15. International Commission On Microbiological Specifications For Foods. Guía simplificada para el entendimiento y uso de objetivos de inocuidad de los alimentos y objetivos de rendimiento [Internet]. ICMSF. 2006 [citado el 9 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.icmsf.org/wp-content/uploads/2018/02/GuiaSimplificadosp.pdf>
16. Bayas AS. Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en los quesos artesanales que se expenden en el mercado del Guasmo sur Coop. Cristal [Internet]. [Tesis de licenciatura]. Guayaquil: Universidad Agraria del Ecuador; 2021. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/BAYAS%20%20FLORES%20ALMA%20SO FIA.pdf>
17. Pazmiño-Gómez B, Núñez-Rodríguez P, Coello-Peralta L, Rodas-Pazmiño A, Rodas-Pazmiño K, Rodas-Neira E, et al. Presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos comercializados en la Ciudad de Milagro, Octubre –Noviembre 2013. Revista Cumbres [Internet]. Octubre 2016 [citado el 9 de junio de 2024]; 2(2):25-29. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/cumbres/articulo/presencia-de-staphylococcus-aureus-en-quesos-comercializados-en-la-ciudad-de-milagro-octubre-noviembre-2013>
18. Orozco B. Incidencia de Enterobacterias y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos en empresas del cantón del cantón Cayambe [Internet]. [Tesis de

- licenciatura]. Quito: Universidad de las Américas; 2018. Disponible en: <https://dspace.udla.edu.ec/jspui/handle/33000/9974>
19. Arteaga-Solórzano RA, Armenteros-Amaya M, Quintana-García D, Martínez-Vasallo A. Evaluación de las buenas prácticas en la elaboración de queso artesanal en Manabí, Ecuador. *Revista de Salud Animal*. 2021; 15(43):1-10.
 20. Hynes P. *The History and Culture of Cheese: From Ancient Traditions to Modern Delicacies*. The Laughing Cow. 2018.
 21. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children No Identified Predisposing Risk. *JAMA* [Internet]. Febrero 1998 [citado el 9 de junio de 2024]; 279(8):593-598. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/187279>
 22. Merchán N, Pineda L, Cárdenas A, González N, Otálora N, Sánchez Y. Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* [Internet]. 2018 [citado el 9 de junio de 2024]; 56(1). Disponible en: <https://revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/171>
 23. Flores Y, Armenteros M, Riverón Y, Remón D, Martínez A. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de los quesos frescos artesanales de la provincia Mayabeque, Cuba. *Revista de Salud Animal* [Internet]. Agosto 2020; 42(2):1-6. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v42n2/2224-4700-ras-42-02-e04.pdf>
 24. González-Montiel L, Franco-Fernández, M. Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology* [Internet]. Agosto 2015; 18(3):250-257. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/jLGqkMhFqD3MxS8BVRybM5K/?format=pdf&lang=es>
 25. Merchán N, Zurymar S, Niño L, Urbano E. Determinación de la inocuidad microbiológica de quesos artesanales según las normas técnicas colombianas. *Revista Chilena de Nutrición* [Internet]. Junio 2019 [citado el 10 de junio de 2024];

- 46(3):288-294. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v46n3/0717-7518-rchnut-46-03-0288.pdf>
26. Cristóbal R, Mautua D. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp.* Revista Panamericana de Salud Pública [Internet]. 2003; 14(3):158-164. Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2003.v14n3/158-164/es>
27. Bustamante K, Lingán L, Montenegro J. *Staphylococcus aureus* aislados de quesos comercializados en la ciudad de Bagua, Amazonas. Revista de Investigación Científica DE KAMU AGROPEC [Internet]. Mayo 2024; 5(1):53-61. Disponible en: <https://doi.org/10.55996/dekamuagropec.v5i1.210>
28. Rodríguez A. Determinación de coliformes totales en queso fresco comercializado en el distrito de Canchaque - Provincia Huancabamba - Piura - 2019 [Tesis de licenciatura]. Piura: Universidad Nacional de Piura; 2019.
29. Moreno K. Presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales comercializados en los principales mercados del cantón Durán [Internet]. [Tesis de licenciatura]. Guayaquil: Universidad Agraria del Ecuador; 2021. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/MORENO%20VILLALOBOS%20KATTY%20ONATALIA.pdf>
30. Mendoza YM, Muñoz FJ, Lozano MJ, Andrade FE, López M. (2020). Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en queso fresco artesanal del mercado municipal del cantón Junín de la provincia de Manabí. Revista Alimentos Hoy. 2020; 28(49):41-46. Disponible en: <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/553>
31. Vargas J. Evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional elaborado en una planta industrial y en una artesanal de la ciudad de Latacunga [Internet]. [Tesis de licenciatura]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2018. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8834/1/56T00769.pdf>

32. Albuja A, Escobar S, Guevara L, Andueza F, Yugcha P, Arguello P. Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislado en quesos frescos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba-Ecuador. Revista Científica Perfiles [Internet]. 2018 [citado el 11 de junio de 2024]; 20(2):76-81. Disponible en: http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9391/1/per_n20_v2_09.pdf
33. Villa K, Peralta K, Torres S. Identificación de *Staphylococcus aureus* en quesos expendidos en el mercado el Arenal Cuenca- Ecuador en el período marzo 2023. Revista Anatomía Digital [Internet]. 2023 [citado el 21 de julio de 2024]; 6(3):6-18. Disponible en: <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i3.1.2628>
34. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Portal lácteo [Internet]. FAO. 2023 [citado el 10 de julio del 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/types-and-characteristics/es>
35. Castillo A. Acidosis subclínica en vacas lecheras. Emeritus Farm Advisor - Dairy Science. 2015; (5):67-82.
36. Codex Alimentarius. Norma general de los quesos [Internet]. FAO e OMS. 2021 [citado el 10 de julio del 2023]. Disponible en: [fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS_283s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS_283s.pdf)
37. León J. Análisis de viabilidad económica en la producción de quesos artesanales en el cantón Yaguachi [Internet]. [Tesis de Licenciatura]. Milagro: Universidad Agraria del Ecuador; 2021. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/LEON%20FALCONES%20JOHSTIN%20AL-EJANDRO.pdf>
38. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. Fundamentals of cheese science [Internet]. 2a ed. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer; 2016, 9-87. Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/Atef-Abou-El->

[Nour/publication/286119901_CHEESES_Processed_Cheese/links/60e2e4eca6fdccb74506d072/CHEESES-Processed-Cheese.pdf](https://www.researchgate.net/publication/286119901_CHEESES_Processed_Cheese/links/60e2e4eca6fdccb74506d072/CHEESES-Processed-Cheese.pdf)

39. Universidad Nacional de la Plata. Introducción a la elaboración de quesos [Internet]. LIPA. Marzo 2020. Disponible en: <https://lipa.agro.unlp.edu.ar/wp-content/uploads/sites/29/2020/03/Guia-QUESOS.pdf>
40. Báez E, Medina J, Escalona A, Rodríguez J, Olivares A, Thomas L. Quesos artesanales venezolanos: evaluación de la calidad bacteriológica e identificación de bacterias ácido lácticas como componentes bacterianos de interés biotecnológico. Revista Científica [Internet]. 2016; 26(2):65-70. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/959/95945988002/html/>
41. Frazier WC. Microbiología de los alimentos. 4a ed. ACRIBIA; 1993.
42. Alais C. Ciencia de la leche: principios de técnica lechera [Internet]. Barcelona, España: Reverté; 1985. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=bW_ULacGBZMC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
43. Medin R. Alimentos: introducción, técnica y seguridad. 4ª ed. Fundación Proturismo; 2011.
44. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Procesos para la elaboración de productos lácteos [Internet]. Guatemala: FAO. 2011 [citado el 10 de julio del 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/bo954s/bo954s.pdf>
45. Escuela Europea Versalles. La elaboración del queso artesano [Internet]. España: Artesanía; 2020 [citado el 17 de junio del 2024]. Disponible en: <https://escuelaversailles.com/elaboracion-queso-artesano-fases/>
46. Mcsweeney P, Cotter PD, Everett DW. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 4th ed. London: Elsevier Academic Press ; 2017:251-278.
47. Santamarina-García G, Fresno JM, Virto M, Amores G, Aranceta J. La microbiota del queso y su importancia funcional. Revista Española de Nutrición Comunitaria

- [Internet]. 2020 [citado el 29 de junio de 2024]; 26(4):1-16. Disponible en: https://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC_2020_4_10._-RENC-D-20-0037.pdf
48. Cobo-Monterroza R, Rosas-Quijano R, Gálvez-López D, Adriano-Anaya L, Vázquez-Ovando A. Bacterias ácido lácticas nativas como cultivo iniciador para la elaboración de queso crema mexicano. *Agronomía Mesoamericana* [Internet]. 2019; 30(3):855-870. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v30n3/2215-3608-am-30-03-00855.pdf>
49. Donnelly C. *Cheese and microbes*. United States of America: ASM PRESS; 2014, 40-379.
50. López M., Fernández J., Rivas C. Seguridad alimentaria en la producción de quesos: una revisión de los riesgos asociados. *Revista de Higiene y Sanidad Alimentaria* [Internet]. 2019;11(2):145-156.
51. Robles J. Descripción de las buenas prácticas de manufactura (BPM) en la elaboración de quesos para obtener un producto de calidad [Internet]. [Tesis de Licenciatura]. Machala: Universidad Técnica De Machala; 2020. Disponible en: <https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16118/1/ECUACA-2020-MV-DE00008.pdf>
52. Angamarca M. Patrón de comportamiento de las características físico-químicas de la leche en tres tipos de ganaderías [Internet]. [Tesis de Licenciatura]. Cuenca: Universidad de Cuenca; 2019. Disponible en: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31732/1/Trabajo%20de%20Titulaci%c3%b3n.pdf>
53. Organización Panamericana de la Salud. *Enfermedades transmitidas por alimentos*. OPS-PAHO. 2022. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-transmitidas-por-alimentos>
54. Prieto M, Mouwen J, López S, Cerdeño A. Concepto de Calidad en la Industria Agroalimentaria. *Interciencia* [Internet]. Abril 2008 [citado el 21 de junio de 2024]; 33(4):258-264. Disponible en:

https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000400006

55. Lobos O, Pávez P. Manual de Quesos para pequeñas queserías de la región de Los Ríos. Boletín Instituto de Investigaciones Agropecuarias [Internet]. 2021; 437. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/67574>
56. Organización Mundial de la Salud. Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. WHO. 2010 [citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/159844/9789241507950_eng.pdf
57. Baque E, Chugchilan K. Evaluación de la calidad microbiológica de quesos frescos comercializados en un mercado de la provincia del Guayas y producidos en una quesera artesanal de la provincia de Chimborazo [Internet]. [Tesis de Licenciatura]. Chimborazo: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2019. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9716/1/56T00850.pdf>
58. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Manual de buenas prácticas agrícolas para la agricultura familiar campesina [Internet]. FAO. 2007. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1085s/a1085s00.htm>.
59. De la Fuente López R. Estudio del género staphylococcus (Rosenbach, 1884) en ovinos (estirpes coagulasa negativas y agente etiológico de la enfermedad de los abscesos) [Tesis de maestría]. España: Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=198684>
60. Zendeja-Manzo G, Avalos-Flores H, Soto-Padilla M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus* : Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica [Internet]. 2014; 25(3):129-143. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/42>
61. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus* . Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio [Internet]. 2014; 61(1):28-40. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48300>

62. Prescott ML, Harley JP, Klein DA. Microbiología 4a. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 1999.
63. Foster TJ, McDevitt D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus* : their possible roles in virulence. FEMS Microbiology Letters [Internet]. 1994; 118:199-205. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8020742/>
64. Garzón P, Martínez R, Molina M. *Staphylococcus aureus* : generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA. 2019; 17(32): 25-38. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-25.pdf>
65. Schwendimann L, Berger T, Graber HU, Meier S, Hummerjohann J, Jakob E. Effect of Scalding Temperature on Growth of *Staphylococcus aureus* and Formation of Staphylococcal Enterotoxin during the Production of Alpine Cheese in a Laboratory Cheesemaking Model. Journal of Food Protection [Internet]. Octubre 2020 [citado el 4 de julio de 2024]; 83(10):18221-18228. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32502266/>
66. Tallent S, Hait J, Reginald W, Gayle A. *Staphylococcus aureus* . Bacteriological Analytical Manual [Internet]. 8th Edition. Chapter 12. 2016. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>
67. Pantoja F, Ricuarte W, Rosero D. Relación entre la muerte y el ingreso a cuidados intensivos de pacientes pediátricos con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad, 2014-2017. Revista Biomédica [Internet]. Marzo 2021; 41(1):145-152. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5275/4687>
68. Castellano M, Perozo A. Mecanismos de resistencia a antibióticos B- lactámicos en *Staphylococcus aureus* . Kasma. 2010; 38(1):18-35.
69. Díaz-Rivero C, García BG de. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Revista de Salud Pública de Nutrición [Internet]. 2001 [citado 4 de julio

de 2024]; 2(3):1-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=23155>

70. García Aparisi GF. Gestión de la calidad y de la seguridad e higiene alimentarias [Internet]. 1a Ed. Madrid-España: Síntesis S.A. 2013; 129-174. Disponible en: https://www.google.com.ec/books/edition/Gesti%C3%B3n_de_la_calidad_y_de_la_seguridad/8En-jwEACAAJ?hl=es
71. Por Acuerdo Ministerial No. 990025 - NTE INEN 1529.2. Control microbiológico de los alimentos toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Instituto Ecuatoriano de Normalización. 1999.
72. Hernández-Sampieri R, Fernández-Collado C, Baptista-Lucio P. Metodología de la investigación. México: McGraw-Hill Education; 2014.
73. Compact dry-xsa [Internet]. Compact-dry Latinoamérica. [citado 20 de julio de 2024]. Disponible en: <https://compact-dry.com/productos/compactdry-xsa/>
74. Britania. Manitol Salado Agar [Internet]. Argentina: Laboratorio Britania. [citado el 21 de julio de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607073c954fa9.pdf

ANEXOS

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528:2012

En el Ecuador, según la norma NTE INEN 1528:2012 la entidad encargada de verificar el cumplimiento de las normas ecuatorianas, incluyendo los requerimientos microbiológicos establecidos, es el Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN): Norma General para quesos frescos no madurados. Esta normativa incluye definiciones específicas y características que estos productos deben cumplir, asimismo cubre aspectos como el proceso de coagulación, las técnicas de elaboración y las propiedades físicas, químicas y organolépticas del queso. Los quesos frescos no madurados están listos para el consumo poco después de su fabricación, sin pasar por un proceso de maduración prolongado. Esta norma asegura la calidad y seguridad del queso fresco destinado al consumo directo o a posterior elaboración (11).

Los requisitos microbiológicos abordan límites mínimos y máximos para varios factores, como el número total de microorganismos presentes, la presencia de tipos específicos de bacterias y hongos, y la ausencia de bacterias dañinas o patógenas, incluyendo *Staphylococcus aureus* (tal como se expone en la tabla 1). Estos requisitos están diseñados para garantizar que los quesos frescos sean seguros para el consumo humano y que cumplan con los estándares apropiados de calidad y frescura (11).

Para los controles complementarios de quesos frescos no madurados, la norma NTE INEN 1528 ha establecido que: terminado el proceso de elaboración de los quesos corresponde llevar un control riguroso en el almacenamiento de manera obligatoria y darle continuidad a la cadena de frío con una temperatura de 2 – 6°C para luego ser distribuido, transportado y comercializado, este procedimiento se debe realizar de una manera apropiada para que el producto no se deteriore o se produzca una contaminación cruzada, para garantizar el mantenimiento del producto. La implementación de estas normas busca asegurar la calidad y seguridad de los quesos frescos no madurados, protegiendo tanto a los consumidores como a la industria alimentaria local (11).

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529.2.1999

La norma INEN 1529.2.1999 establece requisitos físicos y químicos como el contenido de humedad, grasa, niveles de pH y textura del queso fresco, asegurando así la consistencia y calidad del producto final. Además, especifica los niveles permisibles de microorganismos patógenos y los métodos de prueba correspondientes. Incluye directrices claras para el etiquetado del producto, detallando información esencial como nombre, ingredientes, peso neto, fecha de caducidad e información del fabricante. Finalmente, detalla los materiales y métodos de empaque, así como las condiciones de almacenamiento, vida útil y los procedimientos para pruebas y cumplimiento, asegurando así que el queso fresco cumpla con todos los estándares establecidos (71).

En cuanto, al equipo y material para las muestras microbiológicas deben ser de acero inoxidable o material resistente que no altere las muestras. Deben ser robustos pero ligeros. Las soldaduras deben resistir hasta 180°C, y las superficies deben ser lisas y sin hendiduras. Además, los frascos para las muestras tienen que ser resistentes a esterilizaciones, inertes, impermeables y preferiblemente opacos. Pueden ser de acero inoxidable, vidrio, ciertos plásticos o desechables. Por su parte, el material debe estar limpio, seco y esterilizado por métodos como autoclave (121°C, 20 min), aire caliente (170-175°C, 1 h), vapor fluente (100°C, 1 h), agua hirviendo (20 min), inmersión en etanol al 96% y flameado, o combustión directa. El equipo y material específico durante la aplicación de pruebas bioquímicas incluye (71):

- Para abrir envases: Tijeras, cuchillos, abridores de latas y botellas, etc.
- Para tomar muestras: Sierras, sondas, cucharas, plantillas de metal, etc.
- Para controlar la temperatura: Termómetro manual de cuadrante.
- Para transportar muestras: Nevera portátil, nevera isotérmica.
- Para etiquetar: Etiquetas y marcadores.
- Esterilización: Autoclave, horno, mechero de alcohol, agente desinfectante.

- Mantenimiento de muestras: Refrigeradora y congelador.
- Descongelación de muestras: Baño de agua con control termostático.
- Frascos para muestras: Boca ancha con tapa de rosca, material absorbente.
- Homogeneización: Homogeneizadores, vortex, trituradores, molinos.
- Medición de pH: pH metro con compensación de temperatura.
- Pesaje de muestras: Balanza de clase II con exactitud mínima de 0,1 g.
- Materiales varios: Erlenmeyers, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas.

Diluyentes (71):

- Agua Peptona al 0,1%: Uso general.
- Agua Peptona Tamponada: Para Salmonella.
- Agua Peptona Sal al 15%: Para halófilos extremos.
- Agua Peptona Sal al 5%: Para halófilos moderados y halotolerantes.
- Caldo Reforzado para Clostridios: Para anaerobios.
- Solución de Citrato Sódico al 2%, pH 7,5 ± 0,1: Para quesos, leches fermentadas, leche en polvo.
- Solución de Fosfato Dipotásico al 2%: Para caseína ácida, caseína láctica, suero ácido.
- Solución Salina Peptonada: Uso general.

Anexo 1. Puntos de venta del queso fresco artesanal en el Mercado 9 de Octubre.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 2. Puntos de venta de queso fresco artesanal en el Mercado 10 de Agosto.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 3. Puntos de venta de queso fresco artesanal en el Mercado 27 de Febrero



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 4. Puntos de venta de queso fresco artesanal en el Mercado 3 de Noviembre



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 5. Preparación de Agua peptona para diluciones (10 gramos de queso).



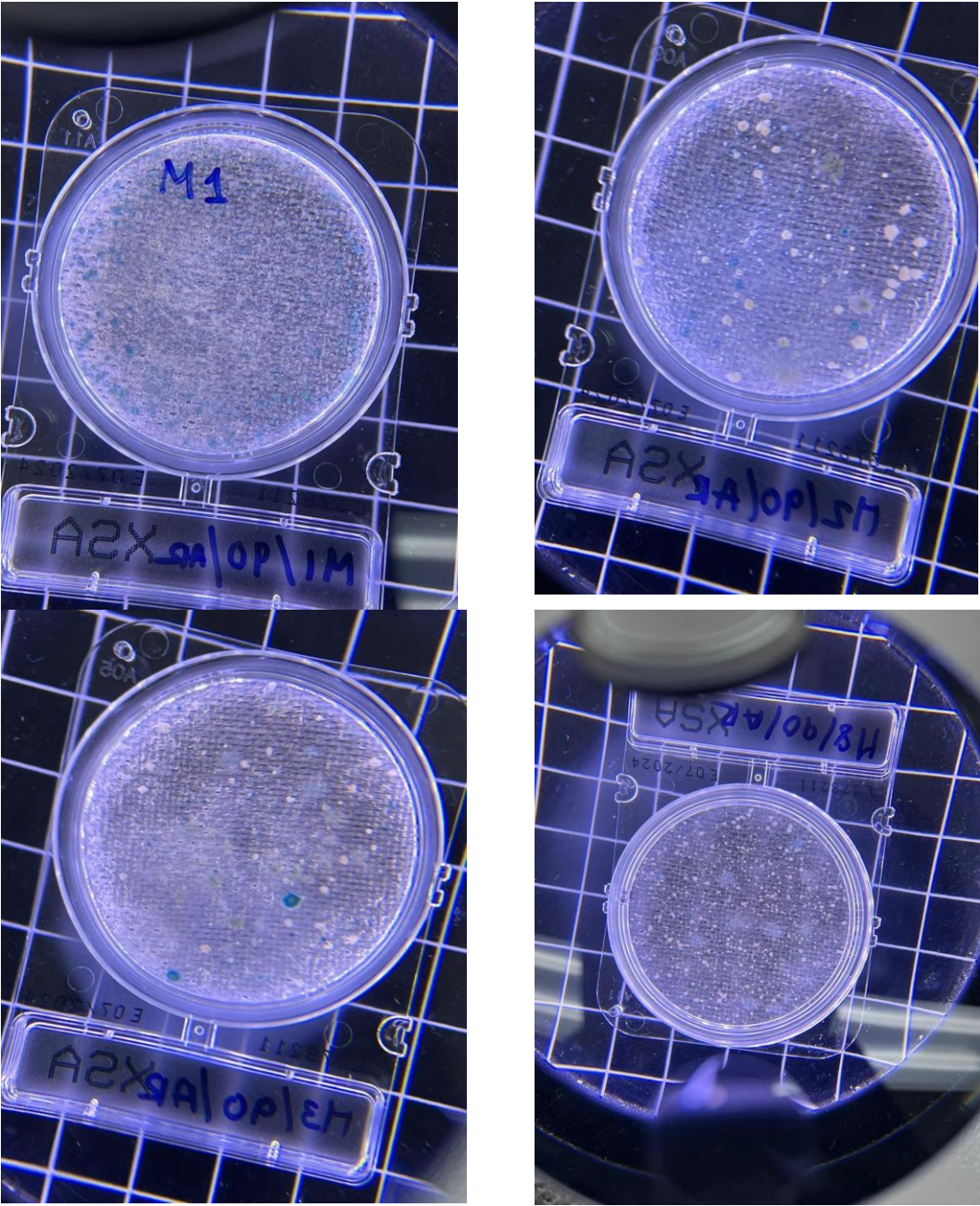
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 6. Siembra microbiológica en las placas Compact Dry X-SA.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 7. Crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus* de color azul, en las placas Compact Dry X-SA.



Fuente: Elaboración propia.

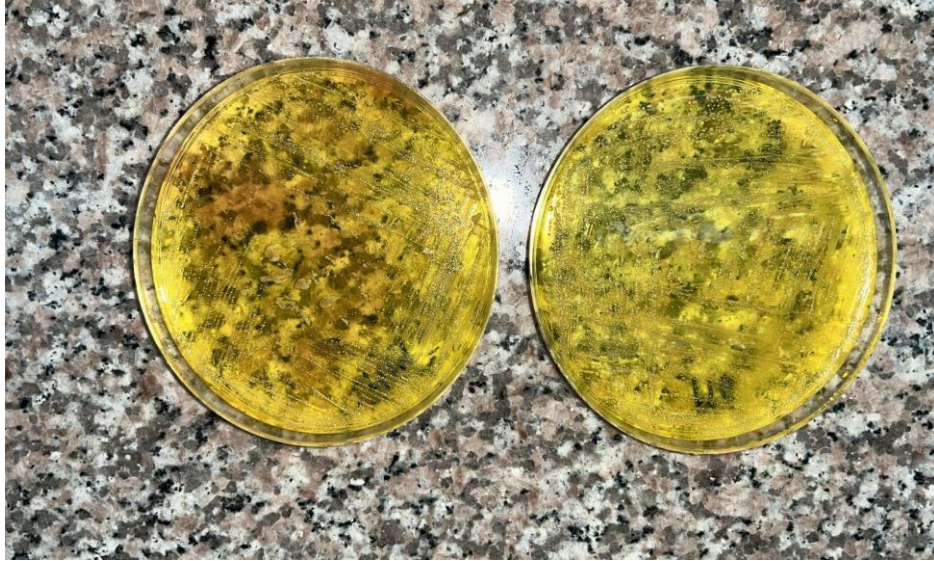
Anexo 8. Aislamiento de las colonias en el Agar Manitol Salado.



Fuente: Elaboración propia.

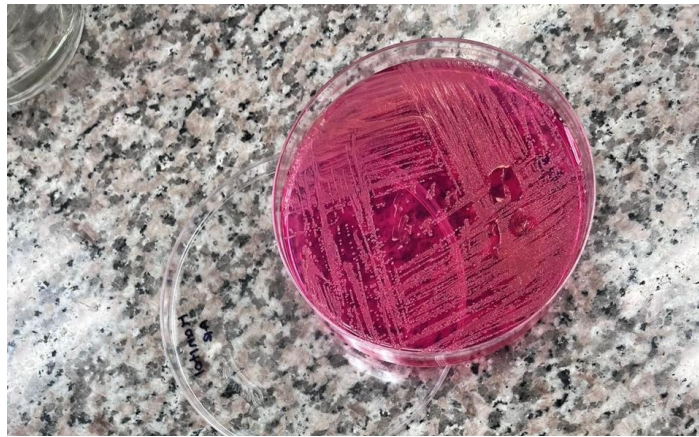
Anexo 9. Positivo a Agar Manitol Salado: *Staphylococcus aureus* (color amarillo)





Fuente: Elaboración propia.

Anexo 10. Negativo a Agar Manitol Salado: *Staphylococcus aureus* (color rojo)



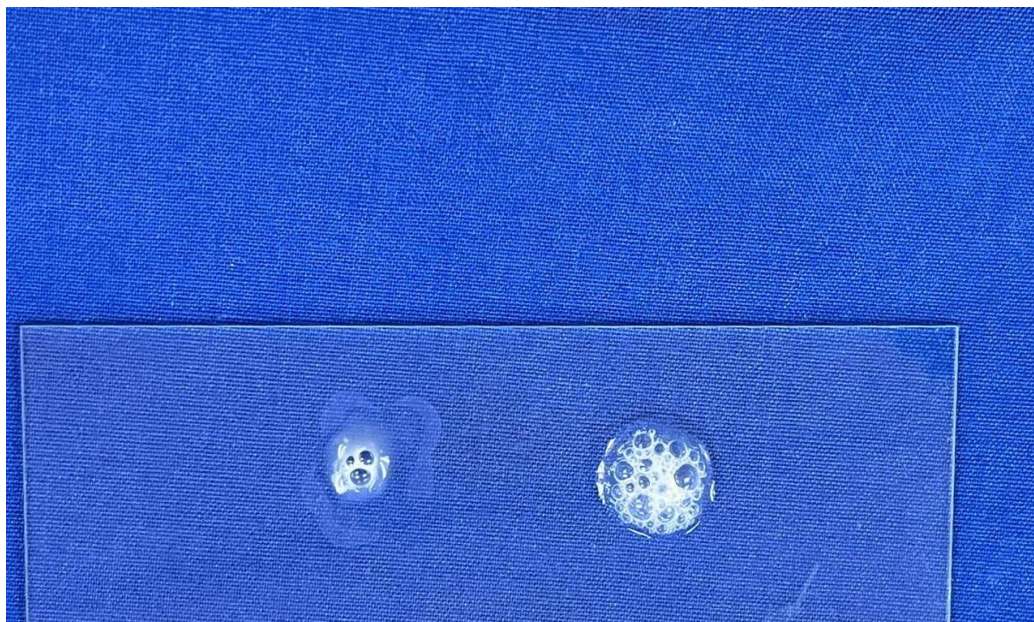
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 11. Prueba de Catalasa: *Staphylococcus aureus* con peróxido de hidrógeno



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 12. Negativo y positivo a catalasa: *Staphylococcus aureus*



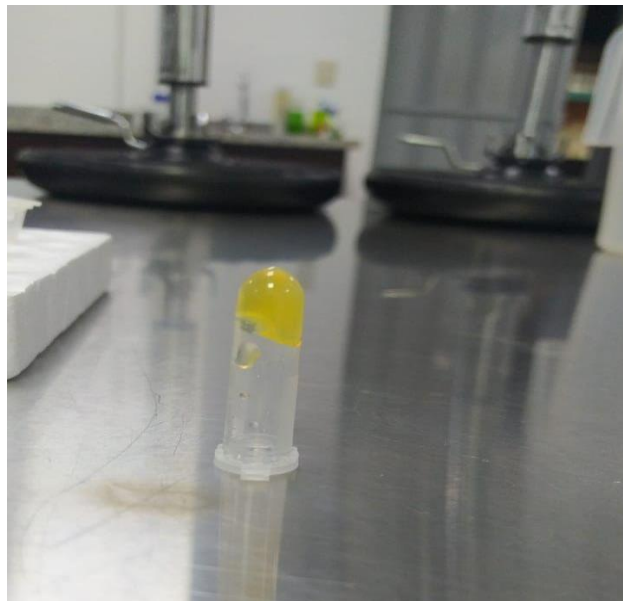
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 13. Inoculación de *Staphylococcus aureus* en un tubo con Pool de plasma



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 14. Positivo a coagulasa: *Staphylococcus aureus*



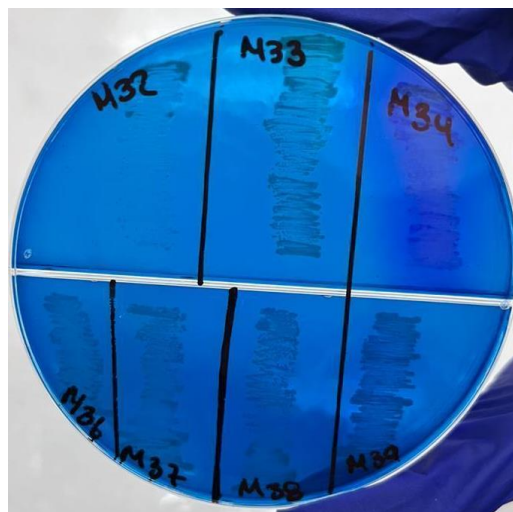
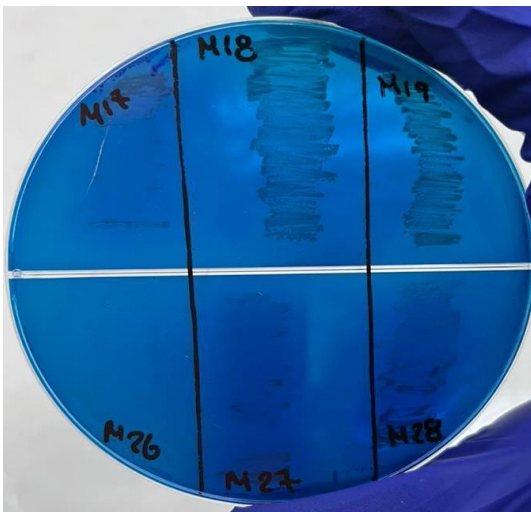
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 15. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* en el Agar DNAsa.



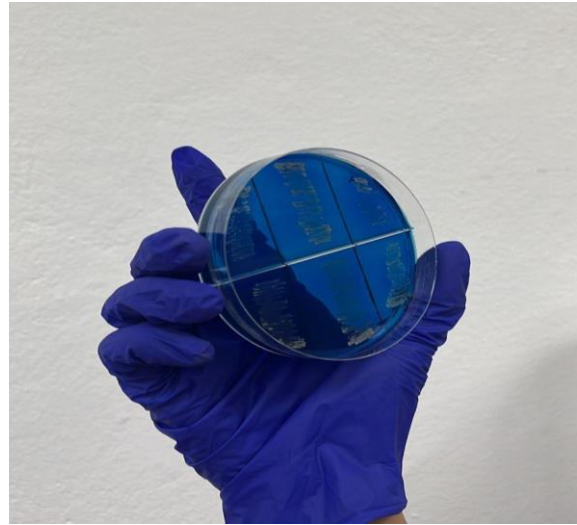
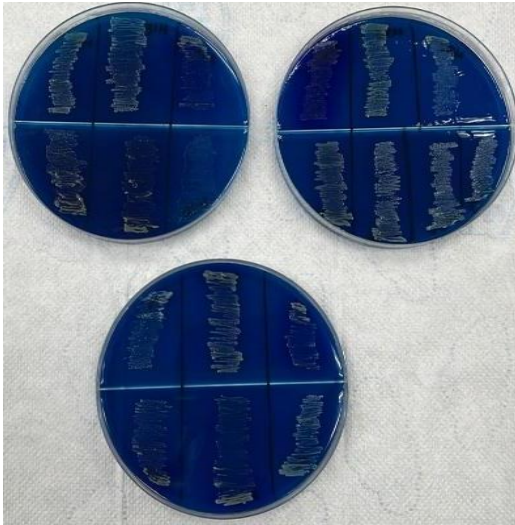
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 16. Positivo a DNasa: *Staphylococcus aureus* (color morado)



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 17. Negativo a DNasa: *Staphylococcus aureus* (color del medio)



Fuente: Elaboración propia

Anexo 18. Fichas de registro de resultados

DATE: _____
SUBJECT: _____

Tesis 13/05/24 Prácticas

Compac - manitol	Catal.	Coag.	DNASA
9 Oct. 111 → 215	+	-	-
112 → 30	+	-	-
113 → 46	+	-	-
114 → 1	+	+	+
115 → 20	+	-	-
116 → 61	+	-	-
117 → 19	+	+	-
118 → 13	+	-	-
119 → 1	+	-	-
110 → 99	+	-	-
10 Ago	Catal	Coag	DNASA
111 → 21	+	+	+
112 → 4	+	+	+
113 → 3	+	+	-
114 → 248	+	-	-
115 → MNC	+	-	-
116 → 26	+	+	+
117 → 32	+	+	+
118 → 22	+	+	-
119 → 14	+	+	-
120 → MNC	+	-	-

DATE: _____
SUBJECT: _____

27 Feb	Catal	Coag	DNASA
121 → N	-	-	-
122 → N	-	-	-
123 → N	-	-	-
124 → MNC	+	-	-
125 → N	-	-	-
126 → MNC	+	+	-
127 → 16	+	+	+
128 → MNC	+	+	+
129 → N	-	-	-
130 → 24	+	-	-
30 Nov	Catal	Coag	DNASA
131 → MNC	+	-	-
132 → MNC	-	+	-
133 → 14	+	+	-
134 → 9	+	+	+
135 → N	-	-	-
136 → 145	+	+	-
137 → 1	+	+	-
138 → 23	+	+	-
139 → 41	+	+	-
140 → N	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Rodríguez Delgado Angela Estefanía portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **1722262712**. **Tacuri Chungata Michelle Catalina** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **2300704372**. En calidad de autoras y titulares de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación "**Determinación Microbiológica de *staphylococcus aureus* en Quesos Artesanales en Mercados de la Ciudad de Cuenca** " de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconocemos a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizamos además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de octubre de 2024

F: 
Rodríguez Delgado Angela Estefanía
C.I. 1722262712

F: 
Tacuri Chungata Michelle Catalina
C.I. 2300704372