

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



**DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL REQUESÓN QUE SE  
COMERCIALIZA EN LOS PRINCIPALES SUPERMERCADOS DE LA ZONA  
METROPOLITANA DE SAN SALVADOR**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR**

**KRISCIA BERALLY RIVAS SARAVIA**

**SALLY JOHANNA VANESSA ROQUE ARÉVALO**

**DIANA VERÓNICA TOVAR MARTÍNEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA**

**AGOSTO DE 2008**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR.**

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

**SECRETARIO GENERAL.**

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANO.**

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

**SECRETARIA.**

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

## **COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**

### **COORDINADORA GENERAL.**

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **ASESORA DE ÁREA DE GESTIÓN DE CALIDAD AMBIENTAL**

Licda. Cecilia Haydee Gallardo de Velázquez

### **ASESORA DE ÁREA DE MICROBIOLOGÍA.**

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

### **DOCENTE DIRECTORA.**

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios Todopoderoso** por permitirnos culminar exitosamente nuestra carrera y habernos guiado e iluminado en cada momento.

A **nuestros padres** por su apoyo incondicional en el transcurso de nuestra formación profesional.

Al **resto de nuestra familia** por acompañarnos con sus oraciones y buenos deseos.

Al **comité de trabajo de graduación** Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo Coordinadora general; Licda. Cecilia Haydee Gallardo, MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos Asesoras de Área; MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz Docente Directora; por su ayuda durante el proceso de graduación, guiarnos y aconsejarnos para concluir nuestra carrera con éxito.

Al **resto de docentes** por compartir con nosotros sus conocimientos, habilidades y ayudarnos durante el transcurso de nuestra carrera.

Al **personal de laboratorio, administrativo, bibliotecario y demás** por su colaboración en el transcurso de nuestra formación académica.

**Kriscia, Sally y Diana.**

## DEDICATORIA

A **Dios Todopoderoso** por concederme la oportunidad de culminar mi carrera con éxito, bendecirme y guiarme por el buen camino en cada etapa de mi vida.

A **mi madre Alba Nubia Saravia** por su apoyo incondicional en cada momento, por ser una mujer extraordinaria y un ejemplo en mi vida.

A **mi padre Mario Roberto Rivas** por su apoyo en los momentos difíciles en el transcurso de mi formación profesional.

A **mi hermano Edson** por motivarme a seguir adelante y brindarme su cariño.

A **mis tíos y padrinos, Guillermo y Marina** por haber permitido integrarme a su núcleo familiar, por su apoyo y consejos en el transcurso de mis estudios universitarios.

Al **resto de mi familia** por sus oraciones, bendiciones y sus buenos deseos.

A **mi novio Manrique** por impulsarme en cada momento, por darme fuerzas para seguir adelante y culminar con éxito mi carrera.

A **mis compañeras de tesis, Diana y Sally** por su paciencia, tolerancia, por estar conmigo en los momentos difíciles y compartir conmigo sus conocimientos.

**Kriscia Rivas**

## **DEDICATORIA**

A **Dios Padre, Dios Hijo y Espíritu Santo**, por guiarme, acompañarme y bendecirme durante el desarrollo de mi carrera profesional.

A **mi padre Federico Roque** por su constante apoyo en toda mi vida y sus sabios consejos, que me han ayudado a culminar mi profesión con éxito.

A **mi madre María de Roque** por brindarme su amor, dedicación y ser una persona excepcional.

A **mi hermano Federico y mi hermana Guisselle**, por dedicar su tiempo a motivarme, brindarme sus conocimientos y todo su cariño.

Al **resto de mi familia** por sus más sinceros deseos y apoyo incondicional.

A **mis compañeras de tesis, Kriscia y Diana** por su confianza y esmero para lograr nuestros objetivos.

**Sally Roque**

## DEDICATORIA

A **mi Padre Celestial** por estar conmigo en cada momento de mi vida, por ser mi apoyo, refugio, consuelo y permitirme la culminación de esta etapa de mi vida con éxito.

A **mi madre, Candida Rosa Martínez de Tovar** y a **mi padre, Julio Humberto Tovar García** por sus cuidados, apoyo, por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y por enseñarme a ser una mejor persona por medio de sus consejos y su ejemplo de vida.

A **mis hermanos Julio, Marcela y Luis Felipe** por estar conmigo en cada momento; brindándome su cariño, alegría, comprensión y apoyo.

Al **resto de mi familia y amigos** por brindarme su cariño y acompañarme con sus oraciones y buenos deseos.

A **Jorge González** por su amistad, cariño, comprensión, apoyo, por estar conmigo en los momentos difíciles, aconsejarme y darme fuerzas para seguir adelante.

A **mis compañeras de tesis Kriscia y Sally** por ser unas excelentes compañeras y amigas, por compartir sus conocimientos conmigo y por apoyarme en mi formación académica.

A **mis profesores** por su enseñanza académica y personal, por haber inculcado sus conocimientos en mí y contribuir a mi formación profesional.

**Diana Tovar**

## INDICE

Resumen

Capítulo I

1.0 Introducción xviii

Capítulo II

2.0 Objetivos

Capítulo III

3.0 Marco Teórico 24

3.1 Generalidades del requesón 24

3.1.1 Definición del requesón 25

3.1.2 Materias primas y materiales 25

3.1.3 Proceso de fabricación 26

3.1.4 Marco legal 28

3.1.5 Características y especificaciones 30

3.1.5.1 Características generales 30

3.1.5.2 Características organolépticas 31

3.1.5.3 Características microbiológicas 31

3.1.5.4 Características fisicoquímicas 32



3.1.5.5	Condiciones de almacenamiento y etiquetado	33
3.2	Generalidades de microorganismos contaminantes del requesón	33
3.2.1	<b><i>Escherichia coli</i></b>	34
3.2.2	Coliformes Fecales	37
3.2.3	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	38
3.2.4	<b><i>Salmonella</i></b>	39
3.2.5	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	41
3.3	Fuentes Contaminantes del Requesón	43
3.3.1	Agua	43
3.3.2	Materia Primas	43
3.3.3	Áreas de Producción	44
3.3.4	Equipo	44
3.3.5	Manipuladores	44
Capítulo IV		
4.0	Diseño Metodológico	46
4.1	Tipo de Estudio	46
4.2	Investigación Bibliográfica	46
4.3	Investigación de Campo, Universo y Muestra	47
4.3.1	Universo y Muestra	47

4.4 Parte Experimental	54
4.4.1 Metodología de Análisis	54
Capítulo V	
5.0 Resultados y Análisis de Resultados	67
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	87
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	91
Bibliografía	
Anexos	

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Página
1	Límites Microbiológicos para quesos no Madurados	32
2	Estratos, Supermercados y Número de Supermercados	48
3	Porcentaje de cada línea comercial de Supermercados (Estratos) en la Zona Metropolitana de San Salvador	49
4	Número de Supermercados a muestrear por estrato	50
5	Listado de Supermercados a muestrear.	51
6	Variedad comercial de las diferentes marcas de requesón	52
7	Cantidad de muestras de las diferentes marcas de requesón por estrato.	53
8	Cantidad de muestras a tomar por estrato.	54
9	Marca y presentación del requesón a ser muestreadas en los diferentes supermercados de la zona Metropolitana de San Salvador.	55
10	Características Organolépticas de las diferentes marcas de Requesón.	67
11	Datos de N° de Lote, Fecha de vencimiento, Temperatura de Almacenamiento y Número asignado para el análisis de cada muestra de requesón.	68

12	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> de la marca A.	69
13	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> de la marca B.	69
14	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> de la marca C.	70
15	Resultados obtenidos para la determinación de Coliformes Fecales de la marca A.	72
16	Resultados obtenidos para la determinación de Coliformes Fecales de la marca B.	73
17	Resultados obtenidos para la determinación de Coliformes Fecales de la marca C.	73
18	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Escherichia coli</i></b> de la marca A.	76
19	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Escherichia coli</i></b> de la marca B.	76
20	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Escherichia coli</i></b> de la marca C.	76
21	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Salmonella</i></b> en 25g de la marca A.	78
22	Resultados obtenidos para la determinación de <b><i>Salmonella</i></b> en 25g de la marca B.	79

- 23 Resultados obtenidos para la determinación de **Salmonella** en 25g de la marca C. 80
- 24 Resultados comparativos para las determinaciones realizadas a cada muestra de cada marca de requesón analizada con su respectivo porcentaje. 84

## INDICE DE ANEXOS

### Anexo N°

- 1 Norma Salvadoreña (NSO) 67.01.04:06 “Productos lácteos. Quesos No Madurados Especificaciones”.
- 2 Listado de Marcas de requesón.
- 3 Diagrama en bloque del Proceso de Fabricación del requesón.
- 4 Listado de las principales líneas comerciales de Supermercados en el Área Metropolitana de San Salvador
- 5 Material y equipo
- 6 Reactivos y medios de Cultivo.
- 7 Etiqueta de Identificación de las muestras
- 8 Selección y conteo de Colonias
- 9 Esquema de dilución de muestra
- 10 Esquema de la metodología para la determinación de ***Staphylococcus aureus***.
- 11 Esquema de la metodología para la determinación de Coliformes Fecales.
- 12 Tabla del Número Más Probable (NMP)
- 13 Esquema de la metodología para la determinación de ***Escherichia coli***.
- 14 Esquema de la metodología para la determinación de ***Salmonella***
- 15 Imágenes tomadas durante el desarrollo de la parte experimental.
- 16 Dietas recomendadas por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

## RESUMEN

El presente trabajo de graduación tiene por objeto determinar la calidad microbiológica del requesón que se comercializa en los principales supermercados de la zona metropolitana de San Salvador. Para esto, se seleccionaron muestras de requesón (por métodos estadísticos), obteniéndose: seis supermercados y tres muestras por cada una de tres marcas de requesón a analizar (18 muestras en total). En el desarrollo experimental, y por razones de ética y confidencialidad, se les asignó una letra para identificar a cada una de las marcas: Marca "A", "B" y "C". Las muestras fueron trasladadas en condiciones adecuadas de refrigeración, se analizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). La investigación se extendió durante el periodo de enero a agosto de 2008.

A las muestras, de requesón, previamente tratadas, se les determinó: ***Staphylococcus aureus***, coagulasa positiva (enterotoxigénico) UFC/g, Coliformes fecales, NMP/g, ***Escherichia coli***, UFC/g y ***Salmonella*** en 25 gramos, empleando para ello los métodos de ensayo y análisis establecidos en el Manual de Análisis Bacteriológico. Los resultados obtenidos, se agruparon por muestras de cada marca, en donde para el Recuento de ***Staphylococcus aureus***, un 33 % de la Marca "A" y un 100 % de la Marcas "B" y "C", presentaron crecimiento de colonias. Además estas muestras, presentaron resultados positivos en la prueba de coagulasa y catalasa. En la determinación

de Coliformes fecales, se observaron resultados positivos en el 100 % de las muestras de cada una de las tres marcas. En el aislamiento realizado para ***Escherichia coli*** un 50 % de las muestras de la marca “A” y el 100 % de las Marcas “B” y “C”, resultaron positivas. Para ***Salmonella***, sólo la marca “C” presenta un 100 % de muestras positivas.

Al comparar todos los resultados de cada muestra, con los que especifica la Norma NSO 67.01.04:06 “Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones” (Ver ANEXO No 1) para comprobar la calidad microbiológica del requesón analizado se concluyó que, ninguna de las marcas analizadas se considera apta para el consumo humano, debido a que no cumplen con las especificaciones exigidas.

Finalmente se obtuvo, una investigación íntegra, que constituye un aporte para todos aquellos involucrados en la calidad microbiológica del requesón: los productores, que deben implementar controles más rigurosos durante toda su cadena de producción; los supermercados que deben mantener condiciones de almacenamiento adecuadas; las autoridades sanitarias que deben vigilar rigurosamente los alimentos que son ofrecidos al consumidor y en especial, a todas las personas que consumen este nutritivo alimento, que deben informarse adecuadamente para poder exigir que lo que consume sea un alimento inocuo.



**CAPITULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

En el mercado nacional se comercializa una gran variedad de productos lácteos, entre ellos el requesón, siendo este uno de los de mayor demanda y susceptible a la contaminación microbiana en todas sus etapas: Procesamiento, distribución, almacenamiento y comercialización; por lo tanto se debe asegurar que se encuentre en condiciones microbiológicas óptimas, es decir, libre de microorganismos capaces de disminuir la vida útil del producto y/o causar enfermedades en el consumidor; principalmente, porque es un producto que es consumido por personas que son propensas a adquirir enfermedades transmisibles por los alimentos (ETAs), como son los niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Por otra parte, el requesón es un producto lácteo con muy buena aceptación en la dieta de pacientes hospitalarios y ambulatorios, ya que estos deben tener un consumo de sal y grasa controlado.

Por lo mencionado anteriormente, se considera de importancia determinar la calidad microbiológica del producto lácteo en el mercado, ya que el requesón presenta un ambiente ideal para el crecimiento de ciertos microorganismos, incluyendo patógenos, debido a su alto porcentaje de humedad (80%) <sup>(6)</sup> y nutrientes.

En este sentido, en el desarrollo de la investigación se determinó la calidad microbiológica de tres marcas de requesón “A”, “B” y “C” (Ver ANEXO No 2) que se comercializan en los principales supermercados de la Zona Metropolitana de San Salvador. El muestreo se realizó en 6 sucursales que incluyen las siguientes cadenas comerciales: Súper Selectos, Despensa de Don Juan, Súper Europa e Hiper Paiz; los

cuales fueron seleccionados a través de un método de muestreo estadístico. La investigación se realizó entre los meses de enero a agosto del año 2008.

Una vez obtenidas las muestras, se realizó las determinaciones: ***Staphylococcus aureus***, coagulasa positiva (enterotoxigénico) UFC/g, Coliformes fecales, NMP/g, ***Escherichia coli***, UFC/g, ***Salmonella*** en 25 gramos, empleando para ello los métodos de ensayo y análisis establecidos en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM, siglas en inglés), comparándolos con los Límites Microbiológicos Sanitarios para quesos no madurados que establece la Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO) 67.01.04:06 “Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones”. (Ver ANEXO No 1).

En el presente trabajo, no se incluyó la determinación de ***Listeria monocytogenes***, debido a la falta de insumos necesarios para la realización del análisis microbiológico de dicho microorganismo.

Todas las determinaciones que se han especificado, se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Se considera que la investigación permitió concluir si las diferentes marcas de requesón comercializadas en los principales supermercados de la Zona Metropolitana de San Salvador poseen la calidad microbiológica requerida para el consumo humano. Por lo que se espera que esta investigación sea un gran aporte y contribuya a futuras investigaciones relacionadas a la problemática de estudio.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad microbiológica del requesón que se comercializa en los principales supermercados de la zona metropolitana de San Salvador.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Seleccionar diferentes marcas de requesón, en los principales supermercados, utilizando el método de muestreo aleatorio simple.
- 2.2.2 Realizar el recuento de *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva -enterotoxigénico).
- 2.2.3 Cuantificar Coliformes fecales, por el método del Número Más Probable por gramo de muestra (NMP/g), en las marcas de requesón seleccionadas.
- 2.2.4 Identificar la presencia o ausencia de los microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, y *Salmonella*.

2.2.5 Comparar los resultados obtenidos con los especificados en la Norma NSO 67.01.04:06 “Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones”, para comprobar la calidad microbiológica de las diferentes marcas de requesón comercializadas en los principales supermercados de la Zona Metropolitana de San Salvador.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEÓRICO**

### **3.0 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Generalidades del Requesón**

Existen unas 400 variedades conocidas de quesos que se agrupan en 20 clases. La mayoría de ellas se elaboran con la misma leche variando los microorganismos, enzimas y sal adicionados y cambiando la temperatura durante la elaboración y maduración.

Los quesos se clasifican por su textura y grado de dureza, admitiéndose 2 grandes grupos: El primero, quesos madurados, varía desde los quesos muy duros, con poca humedad, quesos para rayar, pasando por los duros, a los semiblandos, con mayor humedad y blandos. El segundo grupo lo constituyen los quesos blandos sin madurar con un gran contenido de humedad como el requesón. <sup>(15)</sup>

#### **Clasificación de quesos no madurados <sup>(6)</sup>**

- Queso Cottage
- Queso Cottage bajo en grasa
- Queso Ricotta
- Queso Crema (untar)
- Queso Crema bajo en grasa (untar)
- Queso fresco



- Queso fresco bajo en grasa
- Queso de capas
- Queso duro
- Queso Mozzarella
- Quesillo alto y bajo en grasa
- Queso de suero o requesón
- Queso mantequilla

### **3.1.1 Definición del Requesón <sup>(6)</sup>**

**Queso de suero o requesón:** es el queso obtenido por la concentración de suero, con o sin la adición de leche y grasa de leche, y el moldeo de la proteína concentrada, cuyo contenido de grasa es variable según la materia prima utilizada.

El requesón es un queso no madurado, que se encuentra listo para su consumo después de su elaboración.

### **3.1.2 Materias Primas y Materiales<sup>(6)</sup>**

Para la elaboración de quesos no madurados se pueden emplear:

- a) Leche pasteurizada, entera, semidescremada o descremada; también se podrá emplear leche sometida a otros procesos térmicos y cuyas características sean equivalentes o mejores a las de la leche pasteurizada.

- b) Enzimas y/o cultivos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico (fermentos lácticos); Cuajo u otras enzimas coagulantes apropiadas y sal yodada.
- c) Los aditivos alimentarios serán los especificados en la NSO 67.01.14:06 Productos Lácteos. Norma General para el Queso. Especificaciones. Cualquier otro producto de calidad comestible cuyo uso sea permitido por la autoridad nacional competente para la elaboración de quesos no madurados en sus diferentes tipos, o permitidos por el Codex Alimentarius en su última versión.

### **3.1.3 Proceso de Fabricación** <sup>(26)</sup>

El proceso de fabricación del requesón es a base de estructuras producidas por coagulación de las proteínas lactoséricas, mediante acidificación, tratamientos térmicos y calcio (Ver ANEXO No 3)

La caseína es el elemento que se coagula dando su consistencia al queso y este ya no está presente en el suero empleado para elaborar el requesón. Este obtiene su textura de la cocción a alta temperatura, que endurece la albúmina y la globulina presentes en el suero. El añadido de ácido cítrico o tartárico se emplea a veces para catalizar el proceso de coagulación.

En términos sencillos, se trata básicamente de recuperar la mayor cantidad posible de la proteína en el lactosuero y de diseñar cuidadosamente el pH y el

contenido de humedad y de calcio en el producto terminado. El mecanismo principal para la elaboración de requesones es la desnaturalización controlada de las proteínas en el lactosuero, proceso que se favorece a pH alcalinos. Sin embargo, el reto no es trivial pues el producto debe tener ciertos atributos específicos, sensoriales y de textura, esperados por los consumidores.

Entre los ácidos empleados industrialmente se encuentran los ácidos láctico, cítrico, acético y fosfórico, grado alimentario. Al seleccionar el ácido se deben considerar varios factores, tales como: disponibilidad, costo, seguridad en su almacenamiento y manejo, características físicas de la cuajada y sabor y rendimiento de los requesones.

En la elaboración artesanal del requesón generalmente se utiliza vinagre (una solución acuosa de ácido acético) o jugos de frutas ácidas (soluciones acuosas de ácido cítrico) en volúmenes de aproximadamente 5 a 10 % en relación al volumen del lactosuero. El ácido tiene como función bajar el pH hasta valores cercanos al punto isoeléctrico de estas proteínas. Esto, junto con las reacciones de desnaturalización térmica, conduce a la floculación y precipitación de las proteínas lactoséricas.

### 3.1.4 Marco Legal <sup>(8)</sup>

El requesón como un alimento que ingerido aporta al organismo materiales y energía para el desarrollo de los procesos biológicos en el hombre, se encuentra normalizado por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, cumpliendo con las regulaciones y prohibiciones que establece el Código de Salud para todos los alimentos de consumo humano; encontrándose los siguientes artículos de relevancia:

**Art. 85.-** Se prohíbe elaborar, fabricar, vender, donar, almacenar, distribuir, mantener y transferir alimentos alterados, adulterados, falsificados, contaminados o no aptos para consumo humano.

**Art. 86.-** El Ministerio por sí o por medio de sus delegados, tendrá a su cargo la supervisión del cumplimiento de las normas sobre alimentos y bebidas destinadas al consumo de la población dando preferencia a los aspectos siguientes:

1. La inspección y control de todos los aspectos de la elaboración, almacenamiento, refrigeración, envase, distribución y expendio de los artículos alimentarios y bebidas; de materias primas que se utilicen para su fabricación; de los locales o sitios destinados para ese efecto, sus instalaciones, maquinarias, equipos, utensilios u otro objeto destinado para su operación y su

procesamiento, mercados, supermercados, establecimientos públicos y todo sitio similar.

**Art. 89.-** Se establece con carácter obligatorio la pasteurización, esterilización u otro tratamiento de la leche en los lugares de procesamiento industrial, artesanal o cualquier otro establecimiento que se dediquen a tales actividades.

4) Que para procesar la leche utilicen equipos y utensilios de fácil limpieza, y demás materiales que permita obtener productos de buena calidad higiénica.

El Ministerio de Agricultura y Ganadería, deberá realizar campañas de higienización de la leche, que comprenda pruebas de Tuberculosis y Brucelosis, además deberá impartir asesoría técnica a los ganaderos del país para lograr tal objetivo, además de lo anterior, conjuntamente con las autoridades respectivas deberá efectuar un control cuarentenario efectivo en las fronteras, Puertos y Aeropuertos del País, a fin de evitar la importación de este tipo de productos sin que se cumpla con los requisitos higiénicos establecidos en esta ley.

Para los efectos del inciso anterior; el Ministerio deberá controlar periódicamente el cumplimiento de esa obligación y sin perjuicio de lo anterior podrá realizar un control de calidad y los análisis bacteriológicos y físico químico necesarios en todos aquellos lugares en que se produzcan leche y sus derivados.

**Art. 285.-** Son infracciones menos graves contra la salud:

**13)** No cumplir con las normas de salud en las operaciones sobre los alimentos o actividades relacionadas con las mismas.

Además, el requesón se encuentra regulado por el CONACYT bajo la Norma NSO 67.01.04:06 “Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones” (Ver ANEXO No 1), en donde se establecen las características y especificaciones que debe cumplir este producto.

### **3.1.5 Características y Especificaciones**

#### **3.1.5.1 Características Generales <sup>(6)</sup>**

El requesón debe cumplir con las características indicadas a continuación:

- Debe ser elaborado con ingredientes inocuos en cualquiera de sus etapas de Procesamiento.
- Estar libre de cualquier defecto que pueda afectar su ingesta y apariencia del producto final.
- Debe cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura en su elaboración, envasado o empaclado y conservación.

### **3.1.5.2 Características Organolépticas <sup>(6)</sup>**

El requesón debe estar libre de los siguientes defectos:

- Defectos en el sabor: fermentado, rancio, agrio, quemado, mohoso, o cualquier otro sabor anormal o extraño.
- Defectos en el olor: fermentado, amoniacal, fétido, rancio, mohoso, o cualquier olor anormal o extraño.
- Defectos en el color: anormal, no uniforme, manchado o moteado, provocado por el crecimiento de mohos o microorganismos que no correspondan a las características del queso de que se trate.
- Defectos en la textura: no propia o con cristales grandes de lactosa con consistencia ligosa (viscosa, pegajosa) acompañada de olor desagradable.
- Defectos en la apariencia: no propia, con cristales grandes de lactosa, sucia o con desarrollo de mohos u otros hongos.

### **3.1.5.3 Características Microbiológicas <sup>(6)</sup>**

El requesón (queso no madurado), no debe contener microorganismos en número mayor a lo especificado en la Tabla N° 1.

**TABLA N° 1.** Límites Microbiológicos Sanitarios para quesos no Madurados.

<b>Microorganismos</b>	<b>n<sup>1)</sup></b>	<b>c<sup>2)</sup></b>	<b>m<sup>3)</sup></b>	<b>M<sup>4)</sup></b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> , coagulasa positiva (enterotoxigénico) UFC/g	5	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Coliformes fecales, NMP/g	4	2	3	10
<b><i>Escherichia coli</i></b> , UFC/g	5	0	Ausencia	Ausencia
<b><i>Salmonella</i></b> en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b> , en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia

- 1) **n** = Número de muestras que debe analizarse.
- 2) **c** = Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor “**m**” pero no mayor que “**M**”.
- 3) **m** = Recuento máximo recomendado.
- 4) **M** = Recuento máximo permitido.

#### **3.1.5.4 Características Fisicoquímicas <sup>(6)</sup>**

El requesón debe cumplir con una humedad, en porcentaje en masa, máximo de 80.0 y de grasa láctea, en base húmeda, un porcentaje en masa no mayor de 18.0 (ajustada a las Buenas Prácticas de Fabricación).



### 3.1.5.5 Condiciones de Almacenamiento y etiquetado

Las condiciones de almacenamiento y etiquetado para productos lácteos que establecen normas internacionales son:

- Las leyendas de los productos lácteos deberá rotular: "Manténgase en refrigeración" o "Consérvese en refrigeración"

Donde la Refrigeración se refiere: método de conservación físico, con el cual se mantiene el producto a una temperatura máxima de 4°C (277 K). (7)

- Temperatura de almacenamiento de lácteos debe de estar en un rango de 0 – 4 °C. (17)

### 3.2 Generalidades de Microorganismos contaminantes del requesón.

Los alimentos pueden constituir el vehículo de transmisión de dos grupos principales de organismos patógenos para el hombre:

1. Organismos productores de enfermedades infecciosas en los animales, que son trasmisibles al hombre (zoonosis): bacterianas, víricas, por hongos, por helmintos y por protozoos. Estos organismos se encuentran ya en los alimentos en el momento que éstos son obtenidos (contaminación endógena).
2. Organismos productores de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias humanas, que no existían, por lo general, inicialmente en el alimento, pero que se sumaron posteriormente a ellos. (32)

Las características nutricionales que hacen de la leche y sus derivados un alimento completo para la dieta de los seres humanos, también la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

Una de las ramas de la industria láctea que depende en gran manera de la actividad de los microorganismos, es la industria de los quesos. Una gran variedad de ellos han sido elaborados bajo la actividad enzimática de diversas especies bacterianas y fúngicas. En la elaboración de mantequillas también se utilizan cultivos bacterianos seleccionados por su habilidad de producir ácido y sabor.

Otros microorganismos como en el caso del requesón deben ser estudiados no por su utilidad, si no por la capacidad de alterar la composición y características organolépticas o por ser agentes causales de enfermedad en los consumidores. <sup>(19)</sup>

Entre los microorganismos que pueden contaminar el requesón tenemos: <sup>(6)</sup>

### **3.2.1 *Escherichia coli***

Este organismo pertenece a la familia Enterobacteriaceae, de la tribu ***Escherichieae*** y del género ***Escherichia***.

Existe casi siempre en el intestino bajo de los animales de sangre caliente y en el colon del hombre sin causar enfermedades. Cuando llega a otras

localizaciones, como vías urinarias, puede producir infecciones graves que resisten al tratamiento antibiótico.

***Escherichia coli*** es una enterobacteria que se caracteriza por la producción fermentativa de ácido y gas a partir de glucosa y lactosa, entre otros carbohidratos. <sup>(5)</sup>

Otras de sus características son: No forma esporas, es capaz de vivir en aerobiosis como en anaerobiosis (Es decir son anaerobios facultativos). Es un organismo Gram – negativo que posee una membrana interna (citoplasmática), una cadena de peptidoglucano que la rodea, y una compleja membrana externa (pared celular) que comprende la cápsula y que contiene lipopolisacáridos y porinas (canales para la penetración de antibióticos y nutrientes). <sup>(1)</sup>

Posee antígenos somático O y flagelar H. El antígeno O consiste en el lado O de la cadena de polisacáridos que está expuesta hacia la superficie (hacia el lado exterior de la pared celular). Se basa específicamente en la unión de los grupos O de las azúcares. El antígeno O es estable al calor mientras que el antígeno H es lábil al calor. Esta bacteria produce una toxina conocida como “Shiga like toxin” (toxina parecida a ***Shigella dysenteriae***) que es actualmente la toxina más fuerte conocida. Se ha encontrado que puede sobrevivir en pH extremos de 4.0. <sup>(19)</sup>

La presencia de este microorganismo en un alimento interpreta generalmente como contaminación directa o indirecta de origen fecal debido a que su hábitat natural es el tracto digestivo del hombre y animales de sangre caliente. <sup>(32)</sup>

Como se ha mencionado ***E. coli*** se encuentra en el intestino grueso de la mayoría de los animales de sangre caliente y por lo tanto contamina la leche ya sea directa o indirectamente mediante el contacto con material fecal. Si la cepa O157:H7 se encuentra en el ganado lechero, el riesgo de que por contaminación cruzada llegue a la leche aumenta.

La población con mayor riesgo son los niños menores de 5 años, ancianos y personas con problemas previos gastrointestinales. Se cree que la dosis infectiva puede ser tan baja como 10 UFC, y que su incidencia suele ser mayor durante los meses de verano debido a que la producción lechera es mayor. El modo de acción de ***E. coli*** O157:H7 es mediante la producción de grandes cantidades de la toxina (“Shiga like”) que causa daños severos al intestino delgado. Entre sus síntomas se encuentran: fiebre, colitis hemorrágica severa, calambres abdominales, diarrea aguda y luego sanguinolenta, el síndrome hemolítico urémico (insuficiencia renal y anemia hemolítica) o el de trombocitopenia púrpura (defectos de coagulación y afecta el sistema nervioso central). Las diarreas son el primer síntoma que aparece y ocurren entre 2 a 9 días después de consumido el alimento. Alrededor del 5% de los pacientes que llegan a desarrollar el síndrome urémico hemolítico (SUH), mueren.

Esta bacteria pueden llegar a los tanques refrigerados de almacenamiento de leche cruda y producir una contaminación de la leche con el equipo de ordeño, heces o mediante la secreción intramamaria. (18)

### 3.2.2 Coliformes fecales (32)

El termino general “coliformes” comprende *E. coli* y especies de otros géneros de la familia Enterobacteriaceas.

Los coliformes distintos a *E. coli* persisten en el suelo o superficies. Por lo tanto, los gérmenes coliformes no indican necesariamente contaminación de origen fecal, en el sentido de implicar un contacto inmediato con heces o con una superficie contaminada por heces. Es más, los resultados de la determinación cuantitativa de gérmenes coliformes en un alimento pueden no guardar ninguna relación con la cuantía de la contaminación original. Esto ocurre cuando el alimento ha sido conservado o almacenado a temperaturas no adecuadas o durante un tiempo excesivo.

En el intento de encontrar métodos seguros y rápidos para poner de manifiesto la presencia en los alimentos de *E. coli* o de variantes muy próximas, sin la necesidad de purificar los cultivos o de aplicar las pruebas IMVIC, relativamente costosas, surgió un concepto conocido como Coliformes fecales.

Los Coliformes fecales tienen una probabilidad mayor de contener organismos de origen fecal y por ello son indicadores más seguros de contaminación fecal que los Coliformes totales.

### 3.2.3 *Staphylococcus aureus*

***Staphylococcus aureus*** es un coco Gram-positivo del género ***Staphylococcus***. Este microorganismo se caracteriza por ser anaerobio facultativo, no motil, de agrupaciones irregulares en racimo. Además como los *Micrococcus* es catalasa positiva y a diferencia de estos es oxidasa negativa, coagulasa positiva, fermenta glucosa anaeróticamente y posee Acido teicoico en la pared celular. (28)

La presencia de ***Staphylococcus aureus*** en el alimento se interpreta, por lo general, como indicativo de contaminación a partir de la boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos; el material y equipo no bien limpios pueden ser también el origen de la contaminación. (32)

Cuando se encuentra un gran número de ***Staphylococcus*** en un alimento, ello significa que la temperatura de conservación no ha sido la adecuada, así como tampoco la limpieza y desinfección de los utensilios.

Los síndromes de intoxicación alimentaria caracterizados por náuseas, vómitos, diarrea, malestar general, debilidad, y casos más graves por colapsos y otros signos de shock, con un periodo de incubación de 30 minutos a 3 horas, se deben, por lo general, al consumo de alimentos que tienen un gran número de ***Staphylococcus***. Estos síntomas son desencadenados por polipéptidos específicos que actúan como toxinas eméticas, de ahí el nombre de

enterotoxinas, productos que son liberados en el alimento por las cepas de ***Staphylococcus***.<sup>(32)</sup>

### 3.2.4 *Salmonella*

***Salmonella*** es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos que rodean al microorganismo y no desarrolla cápsula ni espora. Son bacterias móviles que producen sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Fermentan glucosa pero no lactosa, y no producen ureasa.

Las ***Salmonellas*** se encuentran de forma natural en el intestino del hombre y de los animales, por lo que las heces son un foco de contaminación de los alimentos y del agua.<sup>(34)</sup>

Un patógeno de importancia en los productos lácteos es ***Salmonella spp.*** Este patógeno de la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas y usualmente móvil por medio de flagelos. Tiene la capacidad de reducir nitrato a nitrito, producir gas a partir de glucosa, no fermentan la lactosa y utiliza citrato como fuente de carbono. Estudios microbiológicos y análisis de productos lácteos identifican alrededor de 2,384 serotipos de ***Salmonella***. Solamente entre 15 a 20 células viables del microorganismo son necesarias para que un consumidor sea infectado, sin embargo la gravedad de los síntomas dependerá la dosis, la edad y el sistema

inmunológico del individuo. El modo de acción de la bacteria es mediante la colonización del intestino delgado, su inflamación y eventual enterocolitis.

La sintomatología varía de acuerdo al serotipo que cause la infección y suele aparecer entre 12 a 36 horas después de consumir el producto contaminado. Los síntomas incluyen: dolor abdominal, diarrea, vómitos, escalofríos y fiebre; en los casos más severos puede causar una deshidratación crónica. La enfermedad dura entre 2 a 6 días y la muerte no está asociada a ella excepto en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas. En el ganado *Salmonella* puede causar: fiebre, diarrea, abortos, disminución en la producción de leche, endotoxemia y eventual muerte. El ganado infectado puede transmitir la bacteria por contacto directo durante la transportación, contaminación con heces fecales e incluso la alimentación durante el amamantamiento. La leche y sus productos derivados, han sido implicados en la transmisión de salmonelosis debido al consumo de leche cruda, tratamientos térmicos inadecuados y contaminación post-proceso.

***Salmonella* ser. *Thyphi*** es la cepa más aislada del género, sin embargo, aunque ***Salmonella* ser. *Thyphimurium*** DT104 es la segunda cepa más aislada entre su género, se ha encontrado que es altamente resistente a tratamientos con antibióticos, lo que debe causar gran preocupación entre la población.

Existen estrategias para reducir la incidencia de ***Salmonella*** en la vaquería y su eventual presencia en la leche y sus derivados. Dichas estrategias incluyen:



evitar la presencia de ganado portador de la cepa, evitar contacto de ganado enfermo con ganado saludable, eliminar la presencia de vectores como roedores y pájaros, buena higiene ambiental, evitar el uso de agua contaminada y establecer protocolos de muestreo para evitar cualquier fuente de infección. También se recomienda la separación de los animales por edad, evitar el contacto del ganado con las heces fecales tanto propias como ajenas, utilizar medidas de bio-seguridad al introducir un nuevo animal a la vaquería, así como evitar el contacto humano con el ganado enfermo. <sup>(18)</sup>

### **3.2.5 *Listeria monocytogenes*** <sup>(18)</sup>

*Listeria monocytogenes* es una bacteria que rara vez causa un brote a un número grande de población. Este microorganismo es Gram positivo, bacilo o cocobacilo, anaerobio facultativo, psicotrófico que posee motilidad a temperatura ambiente. Esta bacteria tolera condiciones extremas de temperatura (-1.5 °C a 45.0°C) y pH (4.3-9.1) lo que le permite sobrevivir en productos con un alto contenido de grasas como son los quesos semi duros.

Los brotes de listeriosis en humanos pueden ser tanto invasivos como no invasivos. Los brotes invasivos causan meningoencefalitis, encefalitis, septicemia y abortos con una alta tasa de mortalidad (20-30%); este tipo de invasión ocurre principalmente en grupos específicos de personas como: niños, ancianos, mujeres embarazadas e inmunocomprometidos. En las mujeres embarazadas no solamente puede causarle aborto sino que se corre el riesgo

de que la criatura nazca muerta o con septicemia aún cuando la mujer experimente síntomas leves parecidos a un resfriado. La listeriosis no invasiva causa diarreas, fiebre, dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, vómitos y dolores abdominales aún en adultos saludables. La dosis infecciosa para *L. monocytogenes* es desconocida y depende de la susceptibilidad del individuo. Se cree que en leche cruda menos de 1,000 organismos pueden causar la enfermedad. Su modo de acción es mediante la invasión del epitelio gastrointestinal y una vez invade a la célula hospedera se riega en la sangre y se convierte en septicemia. Por lo tanto, tiene un fácil acceso al cerebro o traspasar a la placenta y migrar hacia el feto.

A pesar de que los casos de listeriosis son menos comunes que otros brotes asociados a alimentos, representa la segunda causa conocida de fatalidad asociada a alimentos. Por lo tanto, esta bacteria ha sido clasificada por la FDA como una de cero tolerancia en los productos listos para consumo, por lo que hay que eliminar su presencia antes de que el producto llegue al consumidor. La FDA requiere la pasteurización de todos los productos lácteos que se venden, a excepción del queso que se elabora a partir de leche cruda y que ha sido añejado al menos 60 días. Sin embargo, la práctica de la reducción en la incidencia de este patógeno en la vaquería es esencial para reducir el riesgo en el producto terminado.

### **3.3 Fuentes de Contaminación del Requesón. (20)**

Los microorganismos que podrían contaminar el requesón pueden encontrarse en todo lugar: en los animales, en los seres humanos, en el aire, en la tierra, en el agua. El requesón de buena calidad, seguro para consumo humano, es el resultado de reconocidas prácticas sanitarias observadas a lo largo de todas las etapas del proceso, desde la extracción de la leche utilizada como materia prima hasta su envasado del producto final. El número de bacterias presentes en el producto final refleja las condiciones sanitarias bajo las cuales el requesón ha sido procesado y permite determinar el periodo de preservación de este. Las principales fuentes de contaminación en el requesón por presencia de microorganismos pueden ser las siguientes:

#### **3.3.1 Agua**

El agua es empleada para el lavado del equipo de la planta y como materia prima. Si ésta no es evaluada, puede ser una fuente de contaminación, ya que es el medio de transporte de los microorganismos de origen fecal y otros microorganismos que pueden ser patógenos para el ser humano.

#### **3.3.2 Materias primas**

La principal materia prima utilizada en la elaboración del requesón es la Leche. Esta materia prima es sometida generalmente al proceso de pasteurización, el que asegura la destrucción de los microorganismos patógenos que pudieran

estar presentes en ella, introducidos durante el ordeño (Ubre contaminada, atmosfera de establo, etc.) o la manipulación del producto.

### **3.3.3 Área de Producción**

El área utilizada para la elaboración del requesón debe estar sometida a un programa de control ambiental, ya que algunos microorganismos, hongos y levaduras emplean el aire como medio de transporte para alcanzar los substratos donde se desarrollan.

### **3.3.4 Equipo**

Los utensilios empleados en el procesamiento de el requesón pueden acumular organismos de descomposición si no son debidamente lavados y desinfectados después de su uso. Los equipos de madera, o aquellos cuyo diseño no es liso y contiene juntas y ángulos, resultan muy difíciles de limpiar, y proporcionan lugares aptos para el desarrollo de microorganismos.

### **3.3.5 Manipuladores.**

Los manipuladores son la fuente más común de contaminación por ser una variable difícil de controlar. Principalmente este puede aportar microorganismos tales como ***Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***.

Una persona que padece de alguna infección también puede infectar el producto, volviéndola no apta para el consumo humano.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLÓGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 Tipo de Estudio <sup>(28)</sup>

El tipo de estudio es Prospectivo, Transversal y Experimental.

El estudio es prospectivo porque se registró la calidad microbiológica del requesón que se comercializa en la actualidad en los principales supermercados de la zona Metropolitana de San Salvador.

También se considera que el estudio es transversal porque se llevó a cabo durante un período aproximado de ocho meses donde se estudió el problema de interés.

El estudio experimental lo comprende el análisis microbiológico que se realizó a las muestras de requesón que se recolectaron de los principales supermercados del área Metropolitana de San Salvador.

### 4.2 Investigación Bibliográfica

Se tomaron en consideración, fuentes importantes de información de las siguientes bibliotecas:

- Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de las Ingenierías de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Alberto Masferrer (USAM)

- Universidad Nueva San Salvador (UNSSA)
- Internet

### **4.3 Investigación de Campo, Universo y Muestra**

Se seleccionaron muestras de requesón comercializadas en los principales supermercados del área metropolitana de San Salvador, para ser analizadas microbiológicamente en el Laboratorio de Microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

#### **4.3.1 Universo y Muestra** <sup>(3), (24)</sup>

Para esta investigación se utilizó el muestreo aleatorio estratificado para la agrupación y determinación del número de supermercados. Para seleccionar las sucursales de los supermercados de los cuales se obtuvieron las muestras de requesón, se empleó el muestreo aleatorio simple, al igual que para la selección del número de muestras que se tomaron por cada supermercado.

#### **Determinación y selección del número de Supermercados.**

El muestreo estratificado se realizó clasificando los 62 supermercados (Universo) de la zona metropolitana de San Salvador por sus líneas comerciales, (Ver ANEXO No 4) es decir en los estratos siguientes.

**TABLA N° 2.** Estratos, supermercados y número de supermercados.

No de estrato	Nombre del supermercado	Número de supermercados en el área metropolitana de San Salvador
1	Súper Selectos	38
2	Despensa de Don Juan	17
3	Europa	5
4	Hiper Paiz	2
	Total	62

Para seleccionar los supermercados a muestrear por estrato, se utilizó un muestreo aleatorio simple, en donde se eligió al azar.

Fórmula para determinar el tamaño muestral por el método de muestreo estratificado:

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N-1) + Z^2pq}$$

Donde:

N = Universo

n = Muestra

Z = Intervalo de confianza al 95%

p = Población que posee la característica de interés

q = Población que no posee la característica de interés

d = Error muestral máximo permisible en la investigación



Así tenemos:

$$n = \frac{(62) (1.96)^2 (0.5) (0.5)}{(0.5)^2 (62-1) + (1.96)^2 (0.5) (0.5)}$$

$$n = 3.67 \approx 4 \text{ ( Tamaño de muestra)}$$

El porcentaje representativo de cada estrato se representa así:

$$\% = (N_i/N) \times 100$$

Donde:

$N_i$ : Número de supermercados por estrato

$N$ : Número de supermercados en el universo

Así tenemos para el estrato 1:

$$\% = (38/62) \times 100 = 61\%$$

**TABLA Nº 3.** Porcentaje de cada línea comercial de Supermercados (Estratos) en la Zona Metropolitana de San Salvador.

Estrato	Cálculo	Porcentaje (%)
1	$(38/62) \times 100$	61
2	$(17/62) \times 100$	28
3	$(5/62) \times 100$	8
4	$(2/62) \times 100$	3
	Total	100

La unidad muestreada de cada estrato se obtuvo de la siguiente manera:

$$n_i = n \times (N_i / N)$$

Donde:

$n_i$ : Número de supermercados a muestrear por cada estrato.

$n$ : Tamaño de muestra

$N_i$ : Número de supermercados por estrato

$N$ : Número de supermercados en el universo

Así para el estrato 1, tenemos:

$$n_i = 4(38/62)$$

$n_i = 3$  supermercados a muestrear en el estrato 1

**TABLA N° 4.** Número de Supermercados a muestrear por estrato

Estrato	Cálculo para $n_i$	$n_i$
1	4 (38/62)	3
2	4 (17/62)	1
3	4 ( 5/62 )	1
4	4 ( 2/62)	1
<b>Total</b>		6

La selección se realizó aleatoriamente, colocando por estratos en una tómbola cada una de las sucursales de los supermercados a muestrear (un estrato a la vez), obteniéndose el listado de la ubicación de los supermercados, la cual se presenta en la tabla siguiente:

**TABLA Nº 5.** Listado de supermercados a muestrear.

<b>Número</b>	<b>Supermercado</b>	<b>Ubicación o Sucursal</b>
1	Súper Selectos	25 Av Norte No1138.
2	Súper Selectos	Av. Paleca y calle la Joya, Ciudad Delgado.
3	Súper Selectos	Entrada a Tonacatepeque y calle Plan del Pino.
4	Despensa de Don Juan	La Cima.
5	Europa	Bernal.
6	Hiper Paiz	Soyapango.

### **Determinación y selección de las marcas de requesón a muestrear**

Se realizó una investigación previa, acerca de la variedad comercial de requesón que poseen las diferentes líneas comerciales, realizando dos visitas en dos sucursales diferentes de cada una de estas, seleccionadas al azar, en donde se encontró la existencia de 3 marcas (Ver ANEXO No 2) en todos los supermercados visitados; solamente en una sucursal de una línea comercial se encontró una cuarta marca (Ver ANEXO No 2); sin embargo, se decidió descartarla debido a que no posee regularidad de venta en los diferentes

supermercados, evitando de esta manera la inexistencia del producto en el momento de realizar el muestreo.

**TABLA N° 6.** Variedad comercial de las diferentes marcas de requesón.

Estrato	Marca "A"	Marca "B"	Marca "C"
1	Si	Si	Si
2	Si	Si	Si
3	Si	Si	Si
4	Si	Si	Si

Para conocer la cantidad de muestras de requesón que se tomaron en cada supermercado se desarrolló la siguiente fórmula.

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Donde:

n = Muestra

Z = Intervalo de confianza

p = Población que posee la característica de interés

q = Población que no posee la característica de interés

d = Error muestral máximo permisible

Así tenemos:

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.5) (0.5)}{(0.5)^2}$$

$$n = 3.84 \approx 4$$

$n = 4$  muestras por supermercados.

Debido a que el valor encontrado para el número máximo de muestras que se debían tomar por supermercado es 4 y tomando en cuenta que en cada supermercado sólo se encontraron 3 marcas de requesón en la investigación previa, se analizaron 3 muestras correspondientes a las marcas "A", "B" y "C" (Ver ANEXO No 2) que corresponde a cada línea comercial (estrato).

**TABLA N° 7.** Cantidad de muestras de las diferentes marcas de requesón por estrato.

Estrato	Marca "A"	Marca "B"	Marca "C"	Total de muestras por supermercado (*n)
1	1 muestra	1 muestra	1 muestra	3 muestras
2	1 muestra	1 muestra	1 muestra	3 muestras
3	1 muestra	1 muestra	1 muestra	3 muestras
4	1 muestra	1 muestra	1 muestra	3 muestras

Por tanto, tenemos para el estrato 1 en donde se tomaron 3 supermercados:

$$n_T = *n \times \# \text{ de supermercados por estrato}$$

$$n_T = 3 \times 3$$

$$n_T = 9 \text{ muestras de requesón}$$

Se tomaron 9 muestras de requesón para el estrato 1, es decir 1 bolsa de requesón de cada marca (3 bolsas) por cada uno de los 3 supermercados.

**TABLA N° 8.** Cantidad de muestras a tomar por estrato.

<b>Estrato</b>	<b>Muestras de requesón por estrato</b>
1	9
2	3
3	3
4	3
Total	18 muestras

Estas muestras se recolectaron en los supermercados seleccionados.

#### **4.4 Parte Experimental**

##### **4.4.1 Metodología de Análisis**

La metodología de análisis que se aplicó para cada una de las muestras de requesón seleccionadas se describe a continuación. El equipo y los materiales se presentan en el ANEXO No 5 y los medios y reactivos en el ANEXO No 6.

##### **Toma de Muestra para Análisis**

Se obtuvo una muestra, para el análisis microbiológico, de cada marca y presentación de requesón (Ver Tabla N° 9). Estas se trasladaron del supermercado al laboratorio, en condiciones adecuadas de refrigeración (en una hielera) y debidamente etiquetadas (Ver ANEXO No 7).

**TABLA N° 9.** Marca y presentación del requesón a ser muestreado en los diferentes supermercados de la Zona Metropolitana de San Salvador.

No	Marca de Requesón	Presentación
1	“A”	Envase de 500,0 g
2	“B”	Bolsa de 1 Lb
3	“C”	Bolsa de 370.0 g

#### **Pre- tratamiento de la Muestra (22)**

Se tomó la muestra para análisis en forma aséptica, usando un algodón impregnado de alcohol y frotando el empaque original de la muestra, para quitar cualquier suciedad externa que pudiera existir; agitar para homogenizar el contenido.

#### **Dilución de la muestra (22)**

La preparación de la dilución de cada una de las muestras de Requesón analizadas, se describe a continuación:

#### **Dilución $10^{-1}$**

1. En un frasco de dilución, conteniendo 90.0 mL de búfer fosfato pH 7.2, pesar en forma aséptica, alrededor de  $10.0 \pm 0.1$  g de muestra de Requesón.

2. Mezclar cuidadosamente la dilución agitando 25 veces, en un arco de 30 cm durante un tiempo de 7 segundos.

### **Dilución $10^{-2}$**

1. Tomar, con una pipeta estéril una alícuota de 10.0 mL de la dilución  $10^{-1}$
2. Transferir a un frasco de dilución con 90.0 mL de búfer fosfato pH 7.2.
3. Mezclar cuidadosamente la dilución agitando 25 veces, en un arco de 30 cm durante un tiempo de 7 segundos.

### **Dilución $10^{-3}$**

1. Tomar, con una pipeta estéril. una alícuota de 10.0 mL de la dilución  $10^{-2}$
2. Transferir a un frasco de dilución con 90.0 mL de búfer fosfato pH 7.2.
3. Mezclar cuidadosamente la dilución agitando 25 veces, en un arco de 30 cm durante un tiempo de 7 segundos.

Al terminar el procedimiento anteriormente descrito, no deberá transcurrir más de 15 minutos entre la dilución de la muestra y su inoculación en un medio adecuado. (Ver ANEXO No 9).



### Recuento en Placa de *Staphylococcus aureus* <sup>(10)</sup>

Este método es conveniente para el análisis de alimentos en que pueden esperarse más de 100 UFC/g de *Staphylococcus aureus* (Ver ANEXO No 10).

### Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

1. De la dilución  $10^{-1}$ , transferir asépticamente 1 mL de suspensión de prueba y distribuir equitativamente (por ejemplo, 0.4 mL, 0.3 mL, y 0.3 mL). a 3 placas con agar Baird-Parker.
2. Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar, usando una varilla en L. Retener los platos en la posición horizontal hasta que el inóculo sea absorbido por el agar (aproximadamente 10 min. en las placas completamente secas). Si el inóculo no es prontamente absorbido, colocar las placas en la incubadora por aproximadamente 1 hora.
3. Las placas invertidas se incuban por un tiempo de 45-48 horas a una temperatura de 35°C.
4. Seleccionar placas que contengan de 20 a 200 colonias con apariencia típica de *Staphylococcus aureus*. Las colonias de *Staphylococcus aureus* son circulares, lisas, convexas, húmedas, de 2 a 3 mm de diámetro en las placas no amontonadas, de color gris a negro azabache, frecuentemente con el margen de luz blanquecino, rodeado por una zona opaca y frecuentemente con una

zona clara exterior; las colonias tienen consistencia gomosa cuando son tocadas por la punta de un asa.

### **Recuento en Placa de *Staphylococcus aureus***

1. Si se observan varios tipos de colonias típicas que parecen ser ***Staphylococcus aureus*** en las placas seleccionados, se cuentan separadamente. Pueden registrarse placas con menos de 20 colonias y con más de 200 colonias, pero contando en el último caso, solamente aquellas que tengan la apariencia típica de ***Staphylococcus***.
2. Seleccionar de cada placa más de 1 colonia sospechosa de ser ***Staphylococcus aureus***, y realizar la prueba para la producción de Coagulasa; y de obtener resultados positivos, multiplicar el número de colonias de cada placa por el factor de dilución de muestra. Informar este número como el número de ***Staphylococcus aureus*** por gramo de muestra probado (UFC/g).

### **Prueba de la Coagulasa**

1. Transferir colonias sospechosas de ***Staphylococcus aureus*** en tubos pequeños que contengan de 0.2 a 0.3 mL el caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y emulsionar completamente.

2. Inocular la suspensión de BHI, en un medio de mantenimiento conveniente como el Agar Tripticosa Soya (TSA).
3. Incubar el cultivo que contiene BHI a una temperatura de 35°C por un tiempo de 18 a 24 horas. Agregue 0.5 mL de Coagulasa de Plasma reconstituido con EDTA al cultivo de BHI y mezclar completamente.
4. Incubar a una temperatura de 35°C y examinar por un período de cada 24 horas, hasta la formación de coagulo. Sólo un firme y completo coagulo que se quedan en el lugar cuando el tubo se inclina o se invierte es considerado positivo para ***Staphylococcus aureus***. La coagulación parcial, se clasifica con un 2+ y 3+ dependiendo del coagulo formado.

#### **Prueba Auxiliar: Prueba de la Catalasa**

1. Con una asa, recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre el portaobjetos de vidrio, limpio y seco.
2. Agregar, con gotero una gota de Agua Oxigenada al 3 %. Observar la formación inmediata de burbujas (Resultado positivo).

#### **Recuento de Coliformes Fecales (NMP/g) <sup>(11)</sup>**

##### **Prueba Presuntiva para Coliformes, Coliformes Fecales y *Escherichia coli***

1. De cada una de las tres diluciones preparadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), se transfiere con una pipeta estéril y por triplicado, una alícuota de 1.0 mL, a cada uno de los nueve tubos conteniendo Caldo Rapidcol.

2. Incubar los tubos a una temperatura de 35° C.
3. Examinar los tubos a 24± 2 horas, para detectar un cambio de color de amarillo tenue a azul verdoso (Reacción positiva).
4. Examinar estos tubos en luz UV y observar si presentan fluorescencia (Reacción Positiva para *Escherichia coli*).
5. Reincubar nuevamente los tubos negativos por un período adicional de 24 horas.
6. Examinar y registrar cualquier cambio de color.
7. Realizar la prueba Confirmativa a todos los tubos presuntamente positivos (tubos con cambio de color de amarillo tenue a azul verdoso).

### **Prueba Confirmativa para Coliformes Fecales**

1. Agitar suavemente cada uno de los tubos con Rapidcol que muestran cambio de color, y con un asa circular se transfiere una porción de la suspensión a un tubo que contiene caldo EC y una campana de Durhan.
2. Incubar los tubos con caldo EC a una temperatura de 45.5 °C por un tiempo de 24 ± 2 horas.
3. Examinar los tubos a las 24 y 48 horas, para evidenciar la formación de gas (ver ANEXO No 11)
4. Calcular el Número Más Probable (NMP) de Bacterias Coliformes Fecales, que se encuentran en la muestra, basados en la proporción de tubos positivos confirmados (Ver ANEXO No 12).

### Determinación de *Escherichia coli* (UFC/g) <sup>(9)</sup>

#### Aislamiento

1. De la dilución  $10^{-1}$  estriar el cultivo en placas de agar MacConkey sorbitol.
2. Incubar a 37°C durante 18- 24 horas.
3. Transferir una a dos colonias sospechosas en placas de TSA.
4. Incubar a 37°C durante 24 horas.
5. Transferir una a dos colonias a agar Eosina Azul de Metileno (EMB).
6. Dejar en incubación a 37°C durante 24 horas.
7. La presencia de colonias verdes brillantes se considera prueba positiva para *Escherichia coli* (Ver ANEXO No 13).

### Determinación de *Salmonella* en 25 gramos <sup>(13)</sup>

El método está basado en el análisis de 25 g de muestra y la adicción de 225 mL de caldo para mantener una proporción de 1:9 muestra/caldo. Esta proporción, se mantiene en las diluciones previamente hechas, por lo tanto se tomarán de estas para realizar las pruebas de identificación de *Salmonella*.

1. Transferir 0.1 mL de la dilución  $10^{-1}$  a un tubo que contiene 10 mL de medio Rappaport-Vassiliadis (RV) y 1.0 mL de la misma dilución a otro tubo que contiene 10 mL de caldo Tetrionato (TT). Mezclar.
2. Incubar los medios de enriquecimiento selectivos como sigue:

- a. Los alimentos con una carga microbiana alta. Incubar el medio de RV a  $24 \pm 2$  h a  $42 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  (baño de agua). Incube el caldo de TT a  $24 \pm 2$  h a  $43 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  (baño de agua).
3. Mezclar y con el uso de una micropipeta extraer  $10 \mu\text{L}$  de caldo TT en agar ***Salmonella - Shigella***. Repetir el procedimiento anterior, utilizando caldo VR.
4. Incubar las placas a una temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de  $24 \pm 2$  horas.
5. Examinar en las placas la presencia de colonias que pueden ser ***Salmonella***. (Ver ANEXO No 14)

#### - Morfología Típica de la ***Salmonella***

Colonias típicas de ***Salmonella***, se observan, como se describe: Las colonias de gérmenes lactosa-negativos son incoloras, y las de gérmenes lactosa positivas son rosadas hasta rojas. Las colonias de microorganismos formadores de  $\text{H}_2\text{S}$  presentan un centro negro Colonias incoloras, transparentes.

#### - Morfología Atípica de la ***Salmonella***

En la ausencia de colonias de ***Salmonella*** típicas o sospechosas, buscar colonias atípicas de ***Salmonella*** como sigue:

6. Tomar una colonia seleccionada con la punta de un asa estéril e inocular estriando en tubos con agar TSI.
7. Incubar los tubos con agar TSI a 35°C por 24 ± 2 horas, mantener las condiciones aerobias con los tapones flojamente colocados para prevenir la producción excesiva de Sulfuro de Hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Cultivos de **Salmonella** típicamente vuelven alcalino (rojo) la inclinación del tubo y ácido (amarillo) el extremo, con o sin la producción de H<sub>2</sub>S (tiñendo de negro el agar) en TSI.

Las pruebas presuntivas positivas en TSI, se les aplica el análisis bioquímico para la identificación de **Salmonella**.

### **Pruebas Bioquímicas**

Los siguientes análisis bioquímicos se realizaron a los cultivos sospechosos de **Salmonella**.

#### **Producción de Indol**

Inocular las colonias sospechosas de **Salmonella** en un tubo que contenga Caldo de Triptófano. Incubar durante una temperatura de 35° C por un tiempo de 24 ± 2 horas. Detectar la presencia de indol agregando 0.5 mL de éter y 0.5 mL del Reactivo de Kovacs. El análisis positivo se evidencia por la aparición de un color rojo claro en la capa superior del tubo inoculado.

### **Análisis de Vogues-Proskauer (VP)**

Inocular las colonias sospechosas de *Salmonella* en un tubo que contenga Caldo MR-VP. Incubar durante una temperatura de 35° C por un tiempo de 24 ± 2 horas. Agregar 0.6 mL de la solución de alfa-naftol y 0.2 mL de la solución de hidróxido de potasio al 40%. Agitar luego de la adición de cada solución. El análisis positivo se evidencia por la aparición de un color rosado en el tubo inoculado.

### **Rojo de Metilo (MR)**

Inocular las colonias sospechosas de *Salmonella* a un tubo que contenga Caldo MR-VP. Incubar durante una temperatura de 35° C por un tiempo de 24 ± 2 horas. Agregar, a temperatura ambiente 0.3 mL de la solución indicadora de Rojo de Metilo. El análisis positivo se evidencia por la aparición de un color rojo claro en el tubo inoculado.

### **Citrato**

Inocular las colonias sospechosas de *Salmonella* a un tubo que contenga Agar Citrato, evitando un enturbiamiento detectable. Incubar durante una temperatura de 35° C por un tiempo de 24 ± 2 horas. Observar si se desarrolla una coloración azul que indica un resultado positivo en el tubo inoculado, en caso de ser el color verde inicial del medio es una reacción Negativa.



### Interpretación de Resultados:

Se considera como ***Salmonella***, a todos los cultivos que presentan las características bioquímicas siguientes:

Prueba Bioquímica	Característica
Indol:	Negativo
Rojo de Metilo:	Positivo
Voges Proskauer :	Negativo
Citrato:	Negativo o Positivo

### Identificación de Salmonella

1. Inocular en agar MacConkey, con un asa estéril, por el método de estría en placa, colonias sospechosas de ser ***Salmonella*** a partir del agar ***Salmonella - Shigella***.
2. Incubar las placas a 35 ° C por 24 ± 2 horas. Examinar las placas que presentan colonias sospechosas: colonias transparentes y descoloridas, a veces con el centro oscuro.

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

El muestreo realizado en los principales supermercados de la Zona metropolitana de San Salvador, para la obtención de 18 muestras de 3 marcas diferentes de requesón y su posterior análisis microbiológico en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), dieron como resultado los datos que a continuación se presentan (Ver imágenes en ANEXO 15).

**TABLA Nº 10.** Características Organolépticas de las Diferentes Marcas de Requesón que se comercializan en los principales Supermercados de la Zona Metropolitana de San Salvador.

CARACTERÍSTICA/MARCA	“A”	“B”	“C”
APARIENCIA	Masa Semisólida	Masa Semisólida	Masa Semisólida
COLOR	Blanco	Blanco ligeramente naranja	Blanco
OLOR	Característico a lácteo	Característico a lácteo	Característico a lácteo
SABOR	Característico a requesón	Característico a requesón	Característico a requesón
PRESENTACIÓN	Envase de polietileno de alta densidad x 500 g	Bolsa plástica por 1 Lb	Bolsa plástica x 370 g

Las marcas de requesón “A”, “B” y “C”, presentan una apariencia, olor y sabor similares. El requesón “B” tiene un color diferente (Blanco ligeramente naranja) al de las otras marcas. La marca “A”, presenta un material de empaque más resistente con un sello de seguridad bajo la tapa; en cambio, la marca “B” es envasado en bolsa plástica y cerrado con una grapa metálica; la marca “C” es

envasado en 2 bolsas plásticas de menor grosor y cerrada con una cinta plástica.

**TABLA N° 11.** Datos de Numero de lote, Fecha de vencimiento, Temperatura de almacenamiento y **Número asignado** para el análisis de cada muestra de requesón que se comercializa en los supermercados muestreados.

<b>SUPERMERCADO/MARCA</b>	<b>“A”</b>	<b>“B”</b>	<b>“C”</b>
1. Super Selectos, 25 Av. Norte N 1138	Lote: RQ/5006409. Vence: 28/05/08 T°:4°C <b>No: 1</b>	Lote: P1011103 Vence: 17/05/08 T°:4°C <b>No: 2</b>	Lote: Sin Lote Vence:17/05/08 T°:4°C <b>No: 3</b>
2. Super Selectos, Ciudad Delgado	Lote: RQ/5006409. Vence: 28/05/08 T°:4°C <b>No: 4</b>	Lote: P1011104 Vence: 18/05/08 T°:4°C <b>No: 5</b>	Lote: Sin Lote Vence:15/05/08 T°:4°C <b>No: 6</b>
3. Super Selectos, Tonacatepeque	Lote: RQ/5006410. Vence: 29/05/08 T°:4°C <b>No: 7</b>	Lote: P1011105 Vence: 19/05/08 T°:4°C <b>No: 8</b>	Lote: Sin Lote Vence:14/05/08 T°:4°C <b>No: 9</b>
4. Despensa de Don Juan La Cima	Lote: RQ/5006409. Vence: 28/05/08 T°:4°C <b>No: 10</b>	Lote: P1011104 Vence: 18/05/08 T°:4°C <b>No: 11</b>	Lote: Sin Lote Vence:16/05/08 T°:4°C <b>No: 12</b>
5. Europa Bernal	Lote: RQ/5006408. Vence: 27/05/08 T°:4°C <b>No: 13</b>	Lote: P1011105 Vence: 18/05/08 T°:4°C <b>No: 14</b>	Lote: Sin Lote Vence:16/05/08 T°:4°C <b>No: 15</b>
6. Hiper Paiz, Soyapango	Lote: RQ/5006408. Vence: 27/05/08 T°:4°C <b>No: 16</b>	Lote: P1011106 Vence: 19/05/08 T°:4°C <b>No: 17</b>	Lote: Sin Lote Vence:14/05/08 T°:4°C <b>No: 18</b>

En los seis supermercados muestreados se encontraron las tres marcas de requesón, obteniéndose para las seis muestras que corresponden a cada marca, números de lotes diferentes de la marca “A” y “B” con sus respectivas fechas de vencimiento; sin embargo la marca “C” no presenta número de lote, pero si fecha de vencimiento, contando dentro de las muestras con 4 fechas de vencimiento diferentes.

Las condiciones de temperatura de almacenamiento registradas en el momento de la toma de muestra de requesón, correspondían a las especificadas por Normas Internacionales (0 - 4 °C), pero esto no garantiza que no existan fluctuaciones durante el tiempo de vida de anaquel del producto. Para la realización del análisis se le asignó un número a cada muestra de cada marca con el objeto de facilitar la identificación y el registro de datos.

**TABLA Nº 12.** Resultados obtenidos para la Determinación de *Staphylococcus aureus*\* de la marca "A".

DETERMINACIÓN/ MARCA ( NÚMERO ASIGNADO PARA ANÁLISIS)	"A"					
	1	4	7	10	13	16
RECUENTO EN PLACA (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	>65000	>65000
PRUEBA DE CATALASA	-	-	-	-	+	+
PRUEBA DE COAGULASA	-	-	-	-	+	+

\* Valores obtenidos de la sumatoria de las 3 placas que se hicieron de la dilución  $10^{-1}$ .

**TABLA Nº 13.** Resultados obtenidos para la Determinación de *Staphylococcus aureus*\* de la marca "B".

DETERMINACIÓN/ MARCA (NÚMERO ASIGNADO PARA ANÁLISIS)	"B"					
	2	5	8	11	14	17
RECUENTO EN PLACA ( UFC/g)	>65000	>65000	>65000	>65000	>65000	>65000
PRUEBA DE CATALASA	+	+	+	+	+	+
PRUEBA DE COAGULASA	+	+	+	+	+	+

\* Valores obtenidos de la sumatoria de las 3 placas que se hicieron de la dilución  $10^{-1}$ .

**TABLA Nº 14.** Resultados obtenidos para la Determinación de *Staphylococcus aureus*\* de la marca "C".

DETERMINACIÓN/ MARCA(NUMERO ASIGNADO PARA ANALISIS)	"C"					
	3	6	9	12	15	18
RECuento EN PLACA (UFC/g)	>65000	>65000	>65000	>65000	>65000	>65000
PRUEBA DE CATALASA	+	+	+	+	+	+
PRUEBA DE COAGULASA	+	+	+	+	+	+

\* Valores obtenidos de la sumatoria de las 3 placas que se hicieron de la dilución  $10^{-1}$ .

Las tablas No 12, 13 y 14 presentan los resultados obtenidos en las determinaciones de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird Parker, que es un medio selectivo para el aislamiento de *Staphylococcus* coagulasa positiva, ya que en la composición del medio se incluye cloruro de litio y telurito potásico, que inhiben la microbiota acompañante, mientras que el piruvato sódico y la glicina favorecen el desarrollo de *Staphylococcus*. La adición de la emulsión de yema de huevo y telurito es responsable de la opacidad del medio. Las colonias características de *Staphylococcus aureus* son circulares, amontonadas, con consistencia gomosa, de color negro azabache (por la reducción del telurito a telurio) y están rodeadas de un halo transparente debido a la hidrólisis de la lecitina del huevo por acción de una lipasa liberada por la bacteria.

En todas las muestras de requesón de la marca "B" y "C"; y en dos de las seis muestras de la marca "A" (No 13 y 16) se observaban innumerables colonias

características de ***Staphylococcus aureus*** lo cual hizo imposible el recuento de estas, reportándose como > 65000 UFC/g multiplicado por el factor de dilución para cada muestra. A las muestras que en Agar Baird Parker presentaron colonias presuntivas positivas de ***Staphylococcus aureus*** se les realizó una prueba auxiliar y una confirmativa, evidenciándose resultados positivos en ambas.

Observándose lo que se describe a continuación:

- Prueba auxiliar (Catalasa): Se formó un burbujeo rápido y abundante al poner en contacto las colonias presuntivas de ***Staphylococcus aureus*** con peróxido de hidrógeno al 3%, debido a la presencia de la enzima Catalasa en el microorganismo que degrada el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno molecular. Esta prueba se empleó para diferenciar el género ***Staphylococcus*** (Catalasa positivo) del género ***Streptococcus*** (Catalasa negativo).<sup>(16)</sup>
- Prueba confirmativa (Coagulasa): Se formó un coagulo que permaneció firme en el fondo al inclinar el tubo, debido a la reacción de una enzima extracelular del ***S. aureus***, la procoagulasa, con un factor activador presente en el plasma similar a la protrombina formando el complejo coagulasa que al reaccionar con el fibrinógeno origina el coagulo de fibrina. Esta prueba permite diferenciar ***Staphylococcus aureus*** que es

coagulasa positivo, del resto de especies de *Staphylococcus* que son coagulasa negativas.<sup>(16)</sup>

Las placas de la marca "A" correspondientes a las muestras con números 1, 4, 7 y 10 no presentaron crecimiento alguno; por lo que se reporta como <10 UFC/g y por consiguiente no se les realizó las pruebas auxiliar y confirmativa.

**TABLA Nº 15.** Resultados obtenidos para la Determinación de Coliformes Fecales\* de la Marca "A".

DETERMINACIÓN/ MARCA	"A"																	
	1			4			7			10			13			16		
Dilución	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nº de Tubos Positivos Pba. Presuntiva	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-
Nº de Tubos Positivos Pba. Presuntiva (fluorescencia)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3+	-	-	3+	-	-
Nº de Tubos Positivos Pba. Confirmativa	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-	3+	-	-
NMP/g	23			23			23			23			23			23		

\*Los números 1,2 y 3 de cada muestra corresponden a las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  respectivamente.

**Nota:** 3+ = Tres tubos con resultado positivo para la dilución indicada,  
( - ) = Resultado Negativo para la dilución indicada.



**TABLA Nº 16.** Resultados obtenidos para la Determinación de Coliformes Fecales\* de la Marca "B".

DETERMINACIÓN/ MARCA	"B"																	
	2			5			8			11			14			17		
Dilución	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nº de Tubos Positivos Pba. Presuntiva	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nº de Tubos Positivos Pba. Presuntiva (fluorescencia)	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3	3	-	-
				+									+	+	+	+		
Nº de Tubos Positivos Pba. Confirmativa	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NMP/g	>1100			>1100			>1100			>1100			>1100			>1100		

\*Los números 1, 2 y 3 de cada muestra corresponden a las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  respectivamente.

**Nota:** 3+ = Tres tubos con resultado positivo para la dilución indicada,  
(-) = Resultado Negativo para la dilución indicada.

**TABLA Nº 17.** Resultados obtenidos para la Determinación de Coliformes Fecales\* de la Marca "C".

DETERMINACIÓN/ MARCA	"C"																	
	3			6			9			12			15			18		
Dilución	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nº de Tubos Positivos Pba. Presuntiva	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nº de Tubos Positivos Pba. Presuntiva (fluorescencia)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nº de Tubos Positivos Pba. Confirmativa	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NMP/g	>1100			>1100			>1100			>1100			>1100			>1100		

\*Los números 1, 2 y 3 de cada muestra corresponden a las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  respectivamente.

**Nota:** 3+ = Tres tubos con resultado positivo para la dilución indicada,  
(-) = Resultado Negativo para la dilución indicada.

Las Tablas No 15,16 y 17, presentan los resultados obtenidos en las Pruebas Presuntivas y Confirmativas para la Determinación de Coliformes Fecales en las marcas de requesón analizadas. Además de presentar los resultados en el medio Rapidcol para detectar la presunta presencia de *E. coli*. (Ver pag.58, para complementar los resultados en la determinación de este microorganismo). Se consideran como pruebas positivas los siguientes cambios:

- Prueba Presuntiva para Coliformes en el medio Rapidcol: cambio de color de amarillo tenue a azul verdoso. Debido a la presencia en el medio del Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) que incrementa la síntesis y la actividad de la  $\beta$ -D-galactosidasa (presentes en las coliformes) la cual reacciona con el sustrato cromogénico del medio, dando lugar al cambio de color.<sup>(16)</sup>
- Prueba Presuntiva para *E. coli* en el medio Rapidcol: fluorescencia bajo luz UV, ya que *Escherichia coli* es la única de las Enterobacterias que posee la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa capaz de escindir el sustrato 4-metilumbeliferil-  $\beta$ -D-glucorónido (MUG), formando metilumbeliferona, que se caracteriza por ser fluorescente al iluminarse con luz UV, lo que permite su detección fácilmente.<sup>(16)</sup>
- Prueba Confirmativa en el medio EC: se observa el desplazamiento de la campana de Durhan en el medio, o la efervescencia al mover el tubo conteniendo el medio. Esto es debido a la presencia abundante de lactosa en el medio EC que a la temperatura de 45.5 °C, favorece

la producción fermentativa de ácido y gas por parte de las Coliformes fecales, considerándose como prueba confirmativa por ser los únicos microorganismos capaces de crecer a esta temperatura (similar a la del intestino).

A continuación, se describen los resultados para cada marca:

- Marca "A": en el medio Rapidcol para coliformes y en el medio EC para Coliformes fecales, se observaron resultados positivos en los tres tubos de la dilución  $10^{-1}$  de todas las muestras analizadas, y se observó fluorescencia únicamente en la 1ª dilución de las muestras No 13 y 16.
- Marca "B": presentaron pruebas positivas para Coliformes en el medio Rapidcol y prueba positiva en EC para Coliformes fecales, en cada uno de los tres tubos de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , de todas las muestras analizadas. Los tubos correspondientes a la Primera dilución de las muestras No 5 y 17, y los tubos de las tres diluciones de la muestra No 14, presentaron fluorescencia bajo luz U.V.
- Marca "C": todos los tubos de las tres diluciones de cada una de las muestras, resultaron positivos en la prueba Presuntiva para Coliformes y *E. coli*, y la prueba Confirmativa para Coliformes Fecales.

**TABLA Nº 18.** Resultados obtenidos para la Determinación de *Escherichia coli* \*de la marca "A".

MEDIO/ MARCA	"A"					
	1	4	7	10	13	16
Mac Conkey Sorbitol (UFC/g)	<10	10	<10	<10	10	10
TSA	-	+	-	-	+	+
EMB	-	+	-	-	+	+

\*Resultados obtenidos de la sumatoria de las placas por duplicado para la dilución  $10^{-1}$ .

**TABLA Nº 19.** Resultados obtenidos para la Determinación de *Escherichia coli* \*de la marca "B".

MEDIO/ MARCA	"B"					
	2	5	8	11	14	17
Mac Conkey Sorbitol (UFC/g)	90	180	440	580	150	240
TSA	+	+	+	+	+	+
EMB	+	+	+	+	+	+

\*Resultados obtenidos del promedio de las placas por duplicado para la dilución  $10^{-1}$ .

**TABLA Nº 20.** Resultados obtenidos para la Determinación de *Escherichia coli* \*de la marca "C".

MEDIO/ MARCA	"C"					
	3	6	9	12	15	18
Mac Conkey Sorbitol (UFC/g)	250	80	240	470	240	480
TSA(UFC/g)	+	+	+	+	+	+
EMB	+	+	+	+	+	+

\*Resultados obtenidos de la sumatoria de las placas por duplicado para la dilución  $10^{-1}$ .

Las tablas N° 18, 19 y 20 presentan los resultados obtenidos en las determinaciones de *Escherichia coli*. En las muestras analizadas de la marca “B” y “C”, todas presentaron crecimiento de colonias de color rosado intenso con recuentos diferentes en Agar Mac Conkey, y en la marca “A” únicamente 3 muestras presentan un recuento de 10 UFC/g (No 4, 13 y 16). El agar Mac Conkey es un medio selectivo por contener sales biliares y cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias no entéricas y es un medio diferencial por que contiene lactosa y un indicador de pH, las bacterias capaces de fermentar este azúcar como es el caso de la *Escherichia coli*, producen un cambio en el pH del medio por la liberación de productos ácidos y como consecuencia sus colonias aparecerán de color rosado intenso a violeta.<sup>(16)</sup>

Después de la incubación de las muestras presuntivas positivas en el medio de mantenimiento (TSA) y su posterior inoculación en el medio EMB, se observó en este último el crecimiento de colonias verdes brillantes. El medio EMB permite la diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa (*E. coli*), y aquellos que son incapaces de hacerlo. Esto se evidencia por los indicadores eosina y azul de metileno que ejerce un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Las cepas de *Escherichia coli* presentan un característico brillo metálico verdoso.<sup>(16)</sup>

**TABLA Nº 21.** Resultados obtenidos para la Determinación de **Salmonella** en 25 g de la marca “A”.

MEDIO / MARCA	“A”					
	1	4	7	10	13	16
Agar <b>Salmonella-Shigella</b> (Siembra RV)	-C	-C	-C	-C	+C	+C
Agar <b>Salmonella-Shigella</b> (Siembra TT)	-C	-C	-C	-C	+C	+C
Agar TSI (RV)	N/A	N/A	N/A	N/A	A/A g (+)	A/A g (+)
Agar TSI (TT)	N/A	N/A	N/A	N/A	A/A g (+)	A/A g (+)
Indol TT/RV	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-
Voges Proskauer TT/RV	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-
Rojo de Metilo TT/RV	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-
Citrato TT/RV	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-
Agar McConkey TT	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-
Agar McConkey RV	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-

**Nota:** N/A= No Aplica, A/A = Amarillo (ácido)/Amarillo (ácido), g (+) =Producción de gas; (-C) = Ausencia de colonias, (+C) =Colonias presuntivas positivas de ser **Salmonella**, (-)=Prueba Negativa en IMVIC.

**TABLA N° 22.** Resultados obtenidos para la Determinación de **Salmonella** en 25 g de la marca “B”.

MEDIO / MARCA	“B”					
	2	5	8	11	14	17
Agar <b>Salmonella-Shigella</b> (Siembra RV)	+C	+C	+C	+C	+C	+C
Agar <b>Salmonella-Shigella</b> (Siembra TT)	+C	+C	+C	+C	+C	+C
Agar TSI (RV)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)
Agar TSI (TT)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)	A/A g (+)
Indol TT/RV	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer TT/RV	-	-	-	-	-	-
Rojo de Metilo TT/RV	-	-	-	-	-	-
Citrato TT/RV	-	-	-	-	-	-
Agar McConkey TT	-	-	-	-	-	-
Agar McConkey RV	-	-	-	-	-	-

**Nota:** A/A = Amarillo (ácido)/Amarillo (ácido), g (+) =Producción de gas (+C) =Colonias presuntivas positivas de ser **Salmonella**, (-)=Prueba Negativa en IMVIC.

**TABLA Nº 23.** Resultados obtenidos para la Determinación de **Salmonella** en 25 g de la marca “C”.

MEDIO / MARCA	“C”					
	3	6	9	12	15	18
Agar <b>Salmonella-Shigella</b> (Siembra RV)	C+	C+	C+	C+	C+	C+
Agar <b>Salmonella-Shigella</b> (Siembra TT)	C+	C+	C+	C+	C+	C+
Agar TSI (RV)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)
Agar TSI (TT)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)	R/A ↑H <sub>2</sub> S, g (+)
Indol TT/RV	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Vogues Proskauer TT/RV	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Rojo de Metilo TT/RV	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Citrato TT/RV	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-
Agar McConkey TT	+	+	+	+	+	+
Agar McConkey RV	+	+	+	+	+	+

**Nota:** R/A =Rojo (alcalino) /Amarillo (ácido), g (+) =Producción de gas;↑ H<sub>2</sub>S= Producción de sulfuro de hidrógeno, (C+) =Colonias presuntivas positivas de ser **Salmonella**, (-/-)=Prueba Negativa en IMVIC para cultivos provenientes de caldo TT y RV respectivamente, (+/+)=Prueba Positiva en IMVIC para cultivos provenientes de caldo TT y RV respectivamente.

Para el aislamiento de **Salmonella** a partir de alimentos, se inocula en medios de enriquecimiento selectivos Tetrionato (TT) y Rappaport Vassidalis (RV), que inhiben la microbiota acompañante. Luego fue inoculado en el agar



selectivo ***Salmonella-Shigella***, que posee sales biliares, que inhiben el crecimiento de Coliformes, muy abundantes en la microbiota fecal. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias. Se observan colonias incoloras por ser un microorganismo incapaz de fermentar lactosa, lo cual se evidencia por el indicador rojo neutro que posee el medio. Por otra parte, el medio diferencial TSI posee azúcares: lactosa, sacarosa y glucosa, que son hidratos de carbono fermentables (producción de gas), el tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico y el rojo de fenol que es el indicador de pH, virando de color amarillo en medio ácido y color rojo en medio básico. El agar Mac Conkey es un medio selectivo por contener sales biliares y cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias no entéricas y es un medio diferencial por que contiene lactosa y un indicador de pH, las bacterias incapaces de fermentar este azúcar como es el caso de la ***Salmonella***, no producen cambio en el pH del medio y como consecuencia sus colonias son incoloras. <sup>(16)</sup>

Las tablas N° 21, 22 y 23 muestran los resultados obtenidos en la determinación de ***Salmonella***, siendo estos los siguientes:

En las muestras de la marca "A" N° 1, 4, 7 y 10 no se observó crecimiento de colonias en el medio ***Salmonella-Shigella*** inoculado a partir de los medios TT y RV, por lo cual no aplicaba realizar las pruebas diferenciales (IMVIC). Sin embargo en las placas de ***Salmonella-Shigella*** correspondiente a las muestras

No 13 y 16 se observaron crecimiento de colonias rosadas que no corresponden a la morfología típica de **Salmonella**. Para descartar un resultado falso negativo se realizaron las pruebas bioquímicas cuyos resultados fueron los siguientes para el microorganismo presente en las muestras analizadas:

- Formación de gas sin producción de H<sub>2</sub>S en TSI.
- En la prueba de Indol el microorganismo no degrada el aminoácido Triptofano (No se observó formación de anillo color rojo en la capa superior del tubo).
- No hay conversión de acetoina a diacetil en la prueba de Vogues-Proskahuer.
- No hay formación de ácidos fuertes a partir de glucosa en la prueba de Rojo de Metilo.
- El microorganismo no utiliza el citrato como fuente de carbono, en la prueba del citrato.
- En la prueba confirmativa en agar Mac Conkey se observaron colonias con un color rosado fuerte.

Resultados similares se obtuvieron en todas las muestras de la marca “B”, en donde en el agar **Salmonella – Shigella** hubo crecimiento de colonias rosadas no características a la morfología de el microorganismo **Salmonella**, observándose iguales resultados que las muestras de la marca “A” N° 13 y 16

en las pruebas bioquímicas y prueba confirmativa Mac Conkey expuestas anteriormente.

Todas las muestras de la marca "C" inoculadas en el medio **Salmonella-Shigella** a partir de los medios de enriquecimiento TT y RV presentaron colonias incontables en el medio, con morfología típica de **Salmonella** (Colonias traslucidas con punto negro en el centro). En la prueba TSI se visualizo un color rojo en el bisel del tubo y color amarillo en el fondo, con producción de H<sub>2</sub>S y formación de gas. Los resultados en las pruebas bioquímicas fueron los siguientes.

- El microorganismo presente en las muestras N° 3, 6, 9, 12, 15 no degrada el aminoácido Triptófano (No se observo formación de anillo color rojo en la capa superior del tubo) en la prueba de Indol.
- No hay conversión de acetoína a diacetil en la prueba de Voges-Proskahuer.
- Existe formación de ácidos fuertes a partir de glucosa en la prueba de Rojo de Metilo.

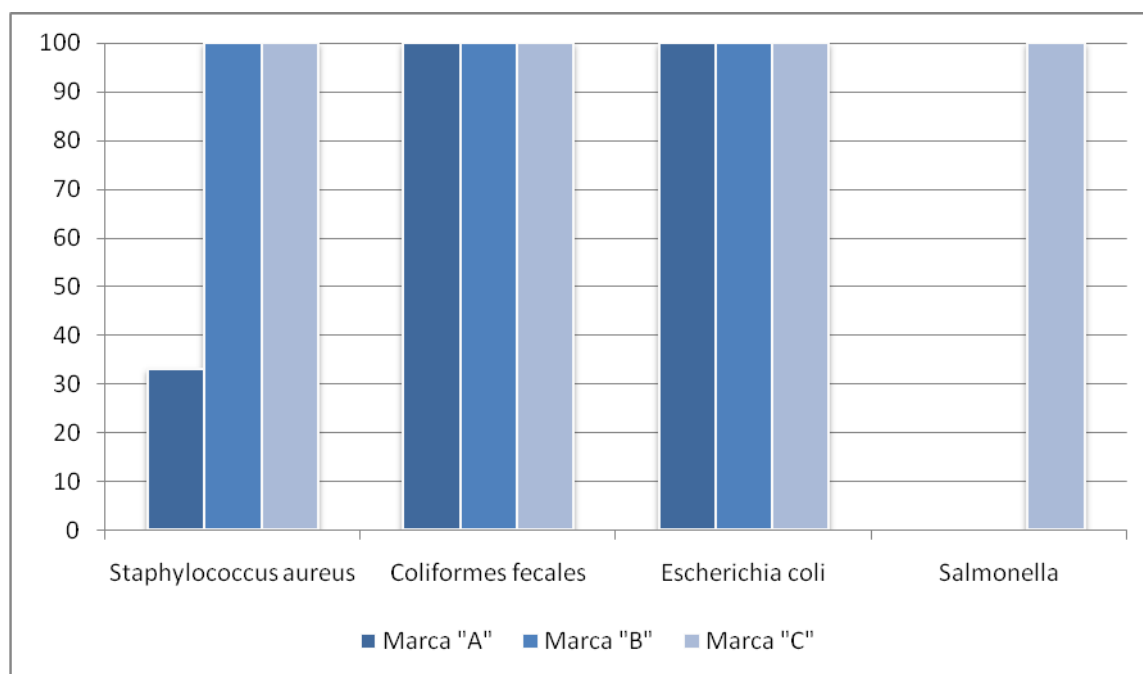
Los microorganismos presentes en las muestras N° 3, 6, 12 que fueron inoculados en el medio **Salmonella-Shigella** provenientes de los caldos Tetrionato y Rappaport utilizan el citrato como fuente de carbono (Prueba

positiva), en cambio los microorganismos presentes en las muestras 9, 15, 18 no lo utilizan (Prueba negativa).

### Comparación de Resultados

**TABLA N° 24.** Resultados comparativos para las determinaciones realizadas a cada muestra de cada marca de requesón analizada con su respectivo porcentaje.

Marca/Determinación	No de Muestras con Resultado Positivo / Porcentaje							
	<i>Staphylococcus aureus</i>		Coliformes fecales		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i>	
A	2	33 %	6	100 %	3	50 %	0	0
B	6	100 %	6	100 %	6	100 %	0	0
C	6	100 %	6	100 %	6	100 %	6	100 %



**Figura N° 1.** Porcentaje de muestras con resultados positivos para cada determinación realizada.

La Tabla N° 24 y Figura N° 1, muestra los resultados comparativos de cada una de las determinaciones realizadas para cada una de las seis muestras analizadas por cada una de las tres marcas muestreadas. Estos resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Determinación de ***Staphylococcus aureus***: En dos muestras de la marca “A”, se confirmó la presencia de esta bacteria, lo que corresponde a un 33 % de muestras positivas. Para las marcas “B” y “C”, se obtuvo un 100% de muestras positivas.
- En el análisis realizado en la determinación de Coliformes fecales: El 100 % de las muestras analizadas de las tres marcas dieron resultados positivos.
- En el aislamiento realizado para ***Escherichia coli***: El 50 % de las muestras de la marca “A”, presentan esta bacteria, al igual que el 100 % de las muestras de la marca “B” y “C”.
- En la determinación de el microorganismo ***Salmonella***: En todas las muestras de las marca “C” se confirmó la presencia de este microorganismo, es decir, en el 100 % de las muestras analizadas. Caso contrario ocurre con las muestras de las marcas “B” y “C”, que se encuentran libres de ***Salmonella***.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0. CONCLUSIONES

1. Las 18 muestras de requesón analizadas se encuentran libres de defectos de sabor, olor, color, textura y apariencia, cumpliendo con las características organolépticas especificadas en la Norma NSO. 67.01.04.06 “Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones”.
2. De acuerdo a los resultados obtenidos en el Recuento de *Staphylococcus aureus*, el 67 % de las muestras de la marca “A” cumplen con las especificaciones estipuladas por la Norma NSO. 67.01.04.06 para este microorganismo; sin embargo, un 33 % de estas muestras se encuentran fuera de especificaciones al igual que el 100 % de las muestras de la marca “B” y “C”.
3. En el análisis realizado en la determinación de Coliformes fecales, ninguna de las muestras de requesón de las diferentes marcas se encuentran dentro de los recuentos máximos recomendados (3 NMP/g), o por lo menos, dentro de los recuentos máximos permitidos (10 NMP/g), establecidos por la Norma NSO 67.01.04:06.
4. Los resultados obtenidos en la determinación de Coliformes fecales, indican una probabilidad mayor de contener organismos de origen fecal y por ello son indicadores de muy poca o mala higiene, tanto del personal

que manipula al requesón en sus diferentes etapas de procesamiento, como de la materia prima que se utiliza para elaborar este producto lácteo.

5. En el aislamiento realizado para ***Escherichia coli*** en el 50 % de las muestras de la marca “A” y el 100 % de las marcas “B” y “C” analizadas se confirmó la presencia de este microorganismo, por lo que no cumple con las especificaciones exigidas por la Norma NSO 67.01.04:06 para este microorganismo.
6. En la determinación de el microorganismo ***Salmonella***, las marcas “A” y “B” se encuentran libres de este microorganismo patógeno; caso contrario ocurre con la marca “C” en donde el 100 % de las muestras presenta ***Salmonella*** por lo que se encuentra fuera de especificaciones según la Norma NSO 67.01.04:06.
7. Las condiciones de temperatura de almacenamiento registradas en el momento de la toma de muestra de requesón en los supermercados, correspondían a las especificadas por Normas Internacionales (0 - 4 °C), pero esto no garantiza que no hubieran cambios en la temperatura, durante el transporte del producto, desde la planta productora hasta los supermercados, rompiéndose la cadena de frío y existiendo la posibilidad de favorecer el crecimiento de microorganismos en las muestras de requesón analizadas.



8. Las etiquetas de las muestras de las marcas analizadas declaran que son sometidos a procesos de pasteurización, lo que indica que la contaminación de microorganismos en el requesón analizado puede deberse a deficiencias en el proceso de pasteurización, además de fallas en el control microbiológico de las materias primas utilizadas, falta de higiene del personal y de los utensilios usados en el proceso de fabricación y deficiencias en las condiciones de transporte y almacenamiento del producto terminado.
  
9. En general, según los resultados obtenidos para cada una de las muestras de las marcas analizadas, ninguna se considera apta para el consumo humano, porque desde el momento que no cumple con una de las especificaciones que exige la Norma NSO 67.01.04:06 el producto es considerado no conforme.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0. RECOMENDACIONES

1. Dar un seguimiento por parte de las autoridades del Ministerio de Agricultura y Ganadería, de la inocuidad de la leche que se utiliza en el procesamiento de productos lácteos en general, y en el requesón, en particular.
2. Realizar visitas más continuas, por parte de los técnicos del Ministerio de Salud, a las plantas productoras de productos lácteos (requesón), para verificar el cumplimiento de Buenas Prácticas de Higiene del Personal que labora en esas fábricas.
3. Concientizar al personal que labora en las plantas productoras de requesón sobre la importancia del aseo e higiene personal y correcta limpieza de utensilios para evitar contaminar al producto terminado.
4. Que futuras investigaciones den seguimiento al presente trabajo, realizando un estudio específico para la determinación de ***Listeria monocytogenes***, debido a que la Norma NSO. 67.01.04.06 “Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones” lo exige.
5. A los productores de requesón, deben mejorar el material de empaque de sus productos; para prevenir la contaminación del producto terminado cuando este sea manipulado.

6. A los productores de requesón, deben verificar la cadena de frío de los productos lácteos, durante su transporte y posterior almacenamiento, con la finalidad de mantener condiciones adecuadas de refrigeración que mantengan al producto microbiológicamente aceptable.
7. Que las autoridades sanitarias competentes deben realizar un monitoreo constante de análisis microbiológico de los productos lácteos, en específico, el requesón, que se suministra a los pacientes hospitalarios (ambulatorios o internos), por ser estos mas susceptibles de adquirir enfermedades transmitidas por los alimentos.
8. Que las personas que consumen lácteos, especialmente requesón, deben informarse adecuadamente para poder exigir que el alimento que consumen sea de calidad, indicando que es apto para el consumo humano.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Aguado J. y otros. 1998. Infecciones por Enterobacterias (en línea). España p. 3622 – 3623. Consultado en 24 de enero de 2008. Disponible en <http://www.sepeap.es/libros/MEDICINE98/Artikulu/m7807.pdf>
2. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. 1984. 4<sup>o</sup> Edition. Virginia, USA, Inc. Edited by Sydney Williams. Published by The Association of Official Analytical Chemist. p. 939-982
3. Bonilla G. 1995. Estadística II. Métodos Prácticos de Inferencia Estadística. 2 ed. San Salvador ES. Ed. UCA editores. p. 11-17, 86-93
4. Brisabois, V. y otros. 1997. Gérmenes patógenos en la leche y los productos lácteos: situación en Francia y Europa. (en línea). Europa. Consultado el 22 de enero de 2008. Disponible en <http://www.oie.int/OIE%20-%20Revue%20E-160217.htm>
5. Carpenter, P. 1979. Microbiología. 4<sup>a</sup> ed. México. Editorial Interamericana. p. 129, 133.

6. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). NSO 67.01.04:06 “Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones”. 1º Actualización.
  
7. Control Sanitario de Bienes y Servicios y otros. 1993. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-035-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Quesos de Suero. Especificaciones Sanitarias. (en línea) p. 4, 9. Consultado el 21 de Enero de 2008. Disponible en [http:// biblioteca.salud.gob.mx/pdf](http://biblioteca.salud.gob.mx/pdf)
  
8. Corte Suprema de Justicia de El Salvador. Código de Salud. 2007. Alimentos y bebidas (en línea). Sección 12. Consultado el 20 de Enero de 2008. Disponible en [http:// www.csj.gob.sv/leyes.nsf/ed400a03431a.htm](http://www.csj.gob.sv/leyes.nsf/ed400a03431a.htm)
  
9. FDA (Food and Drug Administration) 1992. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 7 ed. AOAC. Internacional Arlington USA. p. 27 – 31
  
10. FDA (Food and Drug Administration) 2001. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 8 ed. Chapter 12. AOAC. (on line) USA. Consultado el 24 de Enero de 2008. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>

11. FDA (Food and Drug Administration) 2002. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 8 ed. Chapter 4. AOAC. (on line) USA. Consultado el 24 de Enero de 2008 Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>
  
12. FDA (Food and Drug Administration) 2007. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 8 ed. Appendix 2. Most Probable Number from Serial Dilutions. AOAC. (on line) USA. Consultado el 24 de Enero de 2008. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/appendix2.html>
  
13. FDA (Food and Drug Administration) 2007. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 8 ed. Chapter 5. AOAC. (on line) USA. Consultado el 24 de Enero de 2008. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>
  
14. FDA (Food and Drug Administration) 2007. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 8 ed. Media Index AOAC. (on line) USA. Consultado el 24 de Enero de 2008. Disponible en [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/media\\_index.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/media_index.html)
  
15. Forsythe, S.J. y otros. Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP. 2 ed. Zaragoza, España. Editorial Acribia.1999. Páginas: 127-129.



16. Gamazo, C. y otros. 2005. Manual Práctico de Microbiología (en línea). p. 250 – 255. Consultado en 14 de Mayo de 2008. Disponible en <http://www.books.google.com.mx/books?isbn=8445815199>
17. GENCAT (Generalitat Catalunya). 2003. Seguridad alimentaria. (en línea). España. p. 5. Consultado el 21 de enero de 2008. Disponible en **¡Error! Referencia de hipervínculo no válida.**
18. González C. y otros. 2005. Determinación de Coliformes Totales en los Productos Lácteos y su Comparación entre dos Queserías del Municipio de Pijijiapan, Chiapas, México. (en línea). Consultado el 24 de Enero de 2008. Disponible en <http://www.mediagraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2007/bqs071af.pdf>.
19. Hernández M. 2006. Incidencia de los patógenos ***Escherichia coli O157:H7***, ***Listeria monocytogenes*** y ***Salmonella spp.*** en la Leche Cruda en los Tanques de Enfriamiento en Vaquerías de Puerto Rico. (en línea) Tesis. MSc. Universidad de Puerto Rico. p. 8 -13. Consultado el 27 de Enero de 2008. Disponible en <http://grad.uprm.edu/tesis/floreshernandez.pdf>

20. ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). Microorganismos de los alimentos. 2 ed. Zaragoza, España. v 1 Editorial Acribia. p. 5-6, 14
21. Johnson R. 1990. Estadística Elemental. 2 ed. México. Grupo Editorial Iberoamericano. p. 18-19.
22. Manzano, H. y otros. 1998. Evaluación de la calidad microbiológica del yogurt comercializado en la ciudad de San Salvador. Trabajo de Graduación. Lic. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
23. Martínez, H. y otros. 2004. Determinación de la calidad de leches crudas y quesillos elaborados artesanalmente en plantas productoras de lácteos, área metropolitana de San Salvador. Trabajo de Graduación. Lic. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
24. Martínez, S. y otros. 2007. Determinación de la ***Escherichia coli*** 0157:H7 en carne molida de res cruda Comercializada en Supermercados del área metropolitana de San Salvador, Período 2007, Tesis, Lic. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. p. 55-59.

25. Merck, Disco compacto. 2000. ChemDAT The Merck Chemical Database. Alemania.
26. Oficina de Ciencia y Tecnología. 2007. Cap. 4. Opciones para darle valor agregado al Lactosuero de Quesería. (en línea). Consultado el 22 de febrero de 2008. Disponible en <http://www.sciense.org>.
27. Padilla, V. y otros. 1996. Investigación de la Contaminación Microbiológica de Productos Lácteos Producidos en forma Artesanal. (en línea). Honduras. Consultado el 22 de enero de 2008. Disponible en <http://www.cescoco.gob.hn/informes/Investigacion%20de%20la%20Contaminacion%20Microbiologica%20de%20productos%20lacteos.pdf>
28. Pineda, E. y otros. 1994. Metodología de la Investigación Manual para el Desarrollo de Personal de Salud. 2 ed. Organización Mundial de la Salud. p. 80-88.
29. Prescott, L. 1993. Microbiology. Second edition. USA. Wm. C. Brown Publishers. p. 435-438, 453-454.
30. Revelli, G. y otros. 2004. Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago

del Estero. (en línea). Argentina. Consultado el 22 de Enero de 2008.

Disponible en <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v36n3/v36n3a10.pdf>

31. Reyes, J. 2002. Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos. (en línea). Venezuela. Consultado el 22 de enero de 2008. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/scielo.html>
32. Romero, F. 1991. Determinación de la calidad de leche cruda expendida en el sector Nor- oriente de San Salvador. Trabajo de Graduación Ing. Agr. El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador.
33. Thatcher, F. y otros. 1973. Análisis Microbiológico de los Alimentos. Zaragoza, España. Editorial Acribia. Páginas:17-23, 30-37, 40
34. WIKIPEDIA. 2008. Ricota, Elaboración (en línea) Enciclopedia. Consultada el 25 de Enero de 2008. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Reques>
35. WIKIPEDIA. 2008. **Salmonella**. (en línea) Enciclopedia. Consultada el 22 de Enero de 2008. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella>

## **ANEXOS**

### **ANEXO No 1**

**Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO) 67.01.04:06.**

**“Productos Lácteos. Quesos No Madurados. Especificaciones”**

**NORMA SALVADOREÑA**

**NSO 67.01.04:06**

**CONACYT**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**PRODUCTOS LÁCTEOS. QUESOS NO MADURADOS. ESPECIFICACIONES.**

**CORRESPONDENCIA:** Al momento de su elaboración, esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Colonia Médica, Avenida Dr. Emilio Álvarez, y Pasaje Dr. GUILLERMO Rodríguez Pacas No 51, San Salvador, El Salvador, Centro América. Tel: 2226-2800,2225-6222; Fax- 2225-6255; e-mail:infoq@conacyt.gob.sv

**Primera actualización.**

## **INFORME**

Los Comités Técnicos de Normalización de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, son los organismos encargados de realizar el estudio de las normas. Están integrados por representantes del Sector Productor, Gobierno, Organismos de Protección al Consumidor y Académico Universitario.

Con el fin de garantizar un consenso nacional e internacional, los proyectos elaborados por los Comités se someten a un período de consulta pública durante el cual puede formular observaciones cualquier persona.

El estudio fue aprobado como NSO 67.01.04:06 PRODUCTOS LÁCTEOS. QUESOS NO MADURADOS. ESPECIFICACIONES Primera actualización. Por el Comité Técnico de Normalización 01 Comité Técnico de Normalización de Leche y Productos Lácteos. La oficialización conlleva la ratificación por Junta Directiva y el Acuerdo Ejecutivo del Ministerio de Economía.

Esta norma está sujeta a permanente revisión con el objeto de que responda en todo momento a las necesidades y exigencias de la técnica moderna. Las solicitudes fundadas para su revisión merecerán la mayor atención del Organismo del Consejo: Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad.

## MIEMBROS PARTICIPANTES DEL COMITÉ 01

Francisco Morales	Luis Torres y Cía. QUESO PETACONES
Juan Antonio López	AGROSANIA S.A. de C.V.
Herminia de Luna	LACTOSA de C.V.
Rosy Zuleta Chávez	LACTOSA de C.V.
Salvador Larin	Cooperativa EL JOBO
Cecilia Gálvez	Empresas Lácteas FOREMOST, S.A. de C.V.
Marina Panameño	M S P A S
Ana Patricia Laguardia	DIVISIÓN INOCUIDAD - MAG
Claudia Alfaro	Universidad Centroamericana (UCA)
Oscar Reyes	DEFENSORIA PARA EL CONSUMIDOR
LuisMonroy	CAMAGRO/CNPML
Ricardo Harrison	CONACYT



## **1. OBJETO**

Esta norma tiene por objeto establecer las características y especificaciones que deben cumplir los quesos frescos o no madurados.

## **2. CAMPO DE APLICACIÓN**

Esta norma aplica únicamente a los quesos frescos o no madurados, que están listos para el consumo después de su elaboración.

## **3. DEFINICIONES**

### **3.1 Queso**

El producto blando, pastoso, granulado, semi duro, duro, extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

a) coagulación total o parcial de la proteína de leche, leche desnatada (descremada), leche parcialmente desnatada (semidescremada), nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla, o de cualquier combinación de estos productos, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación; y/o

b) técnicas de elaboración que conducen a la coagulación de la proteína de la leche y/o productos obtenidos de la leche y que dan un producto final que

posee las mismas características físicas, químicas, y organolépticas que el producto definido en el apartado (a).

### **3.2 Queso condimentado y/o saborizado**

Es el queso al cual se han agregado condimentos y/o saborizantes naturales o artificiales autorizados por la entidad competente.

### **3.3 Queso no madurado**

Es el queso que está listo para su consumo después de su elaboración.

### **3.4 Queso cottage:**

Es el queso suave sin curar, preparado por la mezcla de cuajada seca de queso cottage y crema.

#### **3.4.1 Queso cottage clásico o estándar:**

Es el queso suave sin curar, preparado por la mezcla de cuajada seca de queso cottage y crema. La mezcla cremosa está preparada de ingredientes adecuados y seguros que incluyen, pero no limitados a estos, leche de vaca o sustancias derivadas de ella. Cualquier ingrediente usado que no sea lácteo deberá tener una función útil, otra que no sea el aumentar el contenido de sólidos totales en el alimento terminado y debe usarse en una cantidad no mayor de la requerida en lo razonable, para cumplir el efecto que se desea. La mezcla cremosa puede estar pasteurizada; sin embargo, ingredientes lábiles al calor, como las

bacterias iniciadoras, pueden agregarse después de pasteurizado. El contenido de grasa mínimo del producto terminado debe ser 4%.

#### **3.4.2 Cuajada seca de queso cottage:**

Es el queso suave sin curar, que contiene menos del 0,5 % de grasa.

#### **3.4.3 Queso cottage bajo en grasa:**

Es el alimento preparado de la misma forma, con un contenido de grasa no menor de 0.5 % ni mayor de 2 %.

#### **3.5 Queso ricota:**

Es el queso no madurado, escaldado, alto en humedad, de textura granular blanda o suave, preparado con suero de leche o suero de queso con leche, cuajado por la acción del calor y la adición de cultivos lácticos y ácidos orgánicos, cuyo contenido de grasa butírica es igualo superior a 0.5 % m/m, cuando se ha empleado solamente suero de leche en la preparación e igual o superior a 4 % m/m cuando se ha empleado leche.

#### **3.6 Queso crema:**

Es el queso no madurado ni escaldado, con un contenido relativamente alto de grasa butírica, de textura homogénea, pastosa, cremosa, no granular, preparado con crema y leche, cuajado con cultivos lácticos y/o enzimas. Su contenido de grasa será como mínimo 33%.

### **3.6.1 Queso crema bajo en grasa:**

Es el queso no madurado ni escaldado, con un contenido relativamente alto de grasa butírica, de textura homogénea, pastosa, cremosa, no granular, preparado con crema y leche, cuajado con cultivos lácticos y/o enzimas. Su contenido de grasa será menor o igual a 27 % de grasa.

### **3.7 Queso fresco:**

Es el queso no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semi descremada, o descremada, cuajado con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácteos. También se designa como queso blanco.

### **3.8 Queso de capas o capitas:**

Es el queso cultivado, levemente madurado, escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, no granular, levemente clástico preparado con leche entera, semidescremada, cuajado con enzimas, ácidos orgánicos y cultivos lácticos.

### **3.9 Queso duro:**

Es el queso no madurado, escaldado o no, prensado, de textura dura, desmenuzable, preparado con leche entera, semidescremada o descremada, cuajado con cultivos lácteos y enzimas, cuyo porcentaje de grasa es variable dependiendo del tipo de leche empleada en su elaboración y tiene un contenido relativamente bajo de humedad.

### **3.10 Queso mozzarella:**

Es el queso madurado o no madurado, escaldado, moldeado, de textura suave elástica (pasta filamentosa), cuya cuajada puede ser estirada, preparado de leche entera, cuajada con cultivos lácteos, enzimas y/o ácidos orgánicos.

### **3.11 Quesillo:**

Es el queso no madurado, escaldado, fundido, fabricado con leche fresca, entera, semi descremada o descremada cultivada o acidificada con ácidos orgánicos.

### **3.12 Queso de suero o requesón:**

Es el queso obtenido por la concentración de suero, con o sin la adición de leche y grasa de leche, y el moldeo de la proteína concentrada, cuyo contenido de grasa es variable según la materia prima utilizada.

### **3.13 Queso mantequilla:**

Es el queso no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera o semi descremada, cuajada con enzimas y/o ácidos orgánicos, con o sin cultivos lácteos.

## **4. CLASIFICACIÓN Y DESIGNACIÓN**

### **4.1 CLASIFICACIÓN**

El producto se clasificará de acuerdo a su composición y características físicas en los siguientes tipos:

- a) Queso cottage
- b) Queso cottage bajo en grasa
- c) Queso ricotta
- d) Queso crema (untar)
- e) Queso crema bajo en grasa (untar)
- f) Queso fresco, bajo en grasa
- g) Queso fresco
- h) Queso de capas
- i) Queso duro
- j) Queso mozzarella
- k) Quesillo alto y bajo en grasa
- l) Queso de suero o requesón
- m) Queso mantequilla

## **4.2 DESIGNACIÓN**

El nombre debe ser "queso", seguido de una denominación especificada en la normativa nacional, o un nombre típico o autóctono, o regional, a excepción de las denominaciones en que se sobreentienda que se refiere a queso.

Bajo ninguna circunstancia debe inducir a engaño o error respecto de las características del mismo.

Cuando se designe "queso" esta debe acompañarse de los términos "duro", "duro blando", "blando o suave" según corresponda.

Se permite el uso del nombre de fantasía siempre y cuando se anteponga o especifique el tipo de queso.

Cuando el producto sea destinado a la exportación, este debe cumplir con la normativa del país de destino.

Los quesos que no estén regulados en las normas salvadoreñas, deben cumplir con lo establecido en las normas del país de origen o con las normas del Codex Alimentarius en su última actualización.

En caso de que el producto no se designe con el nombre de una variedad sino solamente con el nombre "queso", esta designación podrá ir acompañada por el término descriptivo que corresponda entre los que figuran, en la Tabla N° 25

**Tabla N° 25. Término descriptivo designado según el porcentaje de humedad que posea la variedad de queso.**

<b>Según su consistencia</b>	
<b>Porcentaje de Humedad</b>	<b>Denominación</b>
< 39	Duro
40-49	Semi duro (duro blando)
> 50	Blando/suave

Nota 1. En caso que un producto autóctono sea denominado queso "duro blando", este debe contener una humedad de 40 a 49 %.

## **5. MATERIAS PRIMAS Y MATERIALES**

Para la elaboración de los quesos no madurados se pueden emplear los ingredientes, que se indican a continuación, los cuales deben cumplir con las normas salvadoreñas correspondientes, o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius.

a) Leche pasteurizada, entera, semi descremada o descremada, leche evaporada, crema; también se podrá emplear leche sometida a otros procesos térmicos y cuyas características microbiológicas sean equivalentes o mejores que las de la leche pasteurizada.



b) Enzimas y/o cultivos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico (fermentos lácticos); cuajo u otras enzimas coagulantes apropiadas y sal yodada.

c) Los aditivos alimentarios serán los especificados en la NSO 67.01.14: 06 PRODUCTOS LÁCTEOS. NORMA GENERAL PARA EL QUESO. ESPECIFICACIONES

d) Cualquier otro producto de calidad comestible cuyo uso sea permitido por la autoridad nacional competente para la elaboración de quesos no madurados en sus diferentes tipos, o permitidos por el Codex Alimentarius en su última versión.

## **6. CARACTERÍSTICAS Y ESPECIFICACIONES.**

### **6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.**

Los quesos no madurados deben ser elaborados con ingredientes inocuos en cualquiera de sus etapas del proceso, y estar libre de cualquier defecto que pueda afectar su comestibilidad y el buen aspecto del producto final; los quesos no madurados deben ser elaborados, envasados o empacados y conservados de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura.

## **6.2 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:**

La apariencia, la textura, el color, el olor y el sabor de los quesos no madurados deben ser los característicos para el tipo de queso que corresponda y deben estar libres de los defectos indicados a continuación:

- a) Defectos en el sabor: fermentado, rancio, agrio, quemado, mohoso, o cualquier otro sabor anormal o extraño.
- b) Defectos en el olor: fermentado, amoniacal, fétido, rancio, mohoso, o cualquier olor anormal o extraño.
- c) Defectos en el color: anormal: no uniforme, manchado o moteado, provocado por crecimiento de mohos o microorganismos que no correspondan a las características del queso de que se trate.
- d) Defectos en la textura: no propia o con cristales grandes de lactosa con consistencia ligosa (viscosa, pegajosa) acompañada de olor desagradable.
- e) Defectos en la apariencia: no propia, con cristales grandes de lactosa, sucia o con desarrollo de mohos u otros hongos.

### 6.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS

El producto deberá cumplir con las características físico-químicas especificadas en la Tabla 26:

**Tabla N° 26. Características físico - químicas**

Tipo de queso no madurado	Humedad, % en masa , máximo	Grasa láctea, % en masa, en base húmeda
1. Queso cottage	80,0	mínimo 4,0
2. Queso cottage bajo en grasa	80,0	max 2,0
3. Queso ricotta (elaborado solamente con suero de leche)	80,0	Mínimo de 0,5 <sup>1</sup>
4. Queso crema (untar)	55,0	no menor de 33,0
5. Queso crema bajo en grasa (untar)	60,0	menor o igual a 27.0
6. Queso fresco, bajo en grasa	70,0	no menos de 4.0
7, Queso fresco	65,0	no menor de 8,0
8. Queso de capas	45,0	20 - 33 %
9. Queso duro	39,0	no menor de 17
10. Queso mozzarella	60,0	no menor de 18,0
11. Quesillo alto en grasa	60,0	mayor de 15,0
12. Quesillo bajo en grasa	65,0	menor o igual a 15,0
13. Queso de suero o requesón	80,0	no mayor de 18,0 "
14. Queso mantequilla	65,0	no menor de 12,0

1) Cuando se declare leche entre los ingredientes empleados en la elaboración, el requisito será de 4% como mínimo.

2) La grasa será ajustada de acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación

### 6.4 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

El producto no debe contener microorganismos en número mayor a lo especificado en la Tabla N° 27.

**Tabla N°27. Límites microbiológicos sanitarios para quesos no madurados**

<b>Microorganismos</b>	<b>n <sup>1)</sup></b>	<b>C <sup>2)</sup></b>	<b>M <sup>3)</sup></b>	<b>M <sup>4)</sup></b>
<i>Staphilococcus aureus</i> , coagulosa positiva (enterotoxigénico) UFC/g	5	1	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
Coliformes fecales, NMP/g	5	2	3	10
<i>Escherichia coli</i> . UFC/g	5	0	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella</i> en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> , en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia

<sup>1)</sup> n = Número de muestras que debe analizarse.

<sup>2)</sup> C = Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor "m" pero no mayor que "M".

<sup>3)</sup> m = Recuento máximo recomendado.

<sup>4)</sup> M = Recuento máximo permitido.

### **ADITIVOS ALIMENTARIOS.**

Se pueden utilizar los aditivos alimentarios permitidos en la NSO 67.01.14:06 PRODUCTOSLACTEOS. NORMA GENERAL PARA EL QUESO. ESPECIFICACIONES.

Además de los anteriores se podrán utilizar los siguientes:

#### **7.1 REGULADORES DE pH**

Se podrán emplear como reguladores del pH los ácidos o álcalis indicados en la

Tabla 28:

**Tabla N° 28. Reguladores del pH**

Reguladores del pH	Dosis máxima en el producto final.
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido cítrico</li> <li>- Ácido fosfórico</li> <li>- Ácido acético</li> <li>- Ácido láctico</li> <li>- Ácido sódico y/o carbonato cálcico</li> </ul>	Cantidad limitada por las buenas prácticas de fabricación para cada tipo de queso y que la adición de éstos reguladores no afecten las características del producto.

### **7.2 COADYUVANTES DE LA COAGULACIÓN.**

Se puede emplear como coadyuvante de la coagulación el cloruro de calcio en una cantidad máxima de 0,02 % m/m, con respecto a la leche empleada en la elaboración y referido a la sal anhidra.

### **7.3 ESTABILIZADORES.**

Se pueden emplear las sustancias estabilizantes que se indican en la Tabla 29, preferiblemente en los casos de queso cottage, y sus variantes.

**Tabla N° 29. Estabilizadores**

Estabilizadores	Dosis máxima en el producto final
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Goma de algarrobo</li> <li>- Goma karaya</li> <li>- Goma guar</li> <li>- Gelatina</li> <li>- Carboximetil celulosa de sodio</li> <li>- Carragenina</li> <li>- Goma de avena</li> <li>- Alginatos de sodio y potasio</li> <li>- Alginato de propilenglicol</li> <li>- Goma Xanthán</li> </ul>	0,5%, expresado en masa, solos o mezclados

#### **7.4 CONSERVADORES.**

Solamente en los quesos no madurados que su presentación sea en rodajas o en porciones equivalentes a unidades de consumo, se podrá emplear como conservador el ácido sórbico y/o sus sales de sodio y potasio en una cantidad máxima de 0.3% expresado en masa en el producto final y referido a ácido sórbico.

#### **7.5 SUSTANCIAS PARA AHUMADO.**

El producto podrá ser opcionalmente ahumado mediante las técnicas tradicionales; o bien, podrá ser adicionado con sustancias preparadas por condensación o precipitación del humo de madera, en la cantidad necesaria para lograr el efecto deseado.

Nota 2: La madera empleada deberá ser preferiblemente no resinosa y no deberá haber sido tratada con barniz, pintura, adhesivos, aglomerantes o sustancias químicas de cualquier índole.

#### **7.6 OTROS ADITIVOS O INGREDIENTES.**

Se podrán emplear otros aditivos o ingredientes, no especificados en la presente norma, tales como chile, loroco, ajo, cebolla y otros; cuya función es dar olor y sabor; permitidos por Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social .

### **8. MÉTODOS DE ENSAYO Y ANÁLISIS PARA PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS**

Para los análisis de los parámetros microbiológicos se deben utilizar los métodos descritos a continuación:

**8.1 *Staphylococcus aureus*** Capítulo 12 FDA Manual de Análisis Bacteriológicos 8ª Edición. AOAC o su versión más reciente.

**8.2 Coliformes fecales** Capitulo 4 FDA/CFSAN BAM 2002 o en su versión más reciente.

**8.3 *Escherichia coli***. Capitulo 4 FDA Manual de Análisis Bacteriológico 8ª. AOAC 1995 Método 991.1-4 o su versión más reciente..

**8.4 *Salmonella*** en 25 gramos. Salmonella, Capítulo 5 FDA, Manual de Análisis Bacteriológicos, 8ª Edición AOAC o su versión más reciente.

**8.5 *Listeria monocytogenes***. Capitulo 10 FDA Manual de Análisis Bacteriológicos, 8a. Edición AOAC o su versión más reciente.

#### **8.6 TOMA DE MUESTRAS.**

Se debe hacer de acuerdo a: AOAC Método Oficial 968.12. Muestreo de Productos Lácteos. Capítulo 33 Subcapítulo 1

### **9. MÉTODOS DE ENSAYO Y ANÁLISIS PARA COMPONENTES FÍSICO QUÍMICOS.**

Para los ensayos físicos químicos se utilizarán los descritos en el Volumen 13 del Codex Alimentarius en su última edición o los aceptados por el Laboratorio Oficial.

## **10. VERIFICACIÓN DE LA ADULTERACIÓN DEL PRODUCTO CON GRASA NO BUTÍRICA.**

La grasa extraída del producto deberá cumplir con las siguientes características:

- a) El perfil de ácidos grasos deberá ser el característico de la grasa láctea.
- b) La relación de los ácidos grasos  $C_{14}/C_{16}$  no deberá ser mayor de 3.0.
- c) El análisis de esteroides deberá mostrar ausencia de fitoesteroides.

Nota 3: Si la grasa láctea extraída del producto no cumple con los requisitos indicados anteriormente, se considerará que el producto ha sido adulterado con grasa no láctea.

## **11. ENVASE Y ETIQUETADO**

### **11.1 ENVASE.**

Los envases para los quesos madurados deberán ser de materiales de naturaleza tal que no alteren las características sensoriales del producto ni produzcan sustancias dañinas o tóxicas.

### **11.2 ETIQUETA**

Para los efectos de esta norma se debe cumplir con lo estipulado en la NSO 67.10.01:03 NORMA SALVADOREÑA PARA EL ETIQUETADO DE ALIMENTOS PREENVASADOS, en su última edición.



### **11.3 ETIQUETADO DE ENVASES PARA EL COMERCIO INSTITUCIONAL**

Las etiquetas para los quesos que se comercialicen institucionalmente deben llevar como mínimo la siguiente información:

- Nombre del producto
- Marca,
- Contenido neto
- Instrucciones para la conservación
- Número de lote
- Fecha de vencimiento
- Ingredientes en orden decreciente
- País de origen, nombre y la dirección del fabricante, envasador o distribuidor
- Registro sanitario REG. N° \_\_\_\_\_ D.G.S. El Salvador

### **12. EMBALAJE.**

Los embalajes deben cumplir con características sanitarias que no alteren la calidad e inocuidad del producto.

### **13 ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE.**

Las condiciones de almacenamiento y transporte cumplirán con normas técnicas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

## **14. APÉNDICE NORMATIVO**

### **14.1 NORMAS QUE DEBEN CONSULTARSE**

- NSO 67.10.01:03 ETIQUETADO GENERAL PARA ALIMENTOS PREENVASADOS.
- NSO 67.01.14:06 PRODUCTOS LÁCTEOS. NORMA GENERAL PARA EL QUESO. ESPECIFICACIONES.

### **14.2 DOCUMENTOS DE REFERENCIA**

- TECNOLOGÍA DE LA LECHE. Aurelio Revilla. 1ICA, San José, Costa Rica. 1985.
- REGLAMENTO PARA LA LECHE PASTEURIZADA Grado "A", Edición 2003 o en su última actualización. Agencia para Alimentos y Medicamentos Estados Unidos (FDA)

## **15. VIGILANCIA Y VERIFICACIÓN**

La vigilancia y verificación de esta norma es responsabilidad de el Ministerio de Agricultura y Ganadería, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social a través de sus respectivas dependencias y Defensoría del Consumidor.

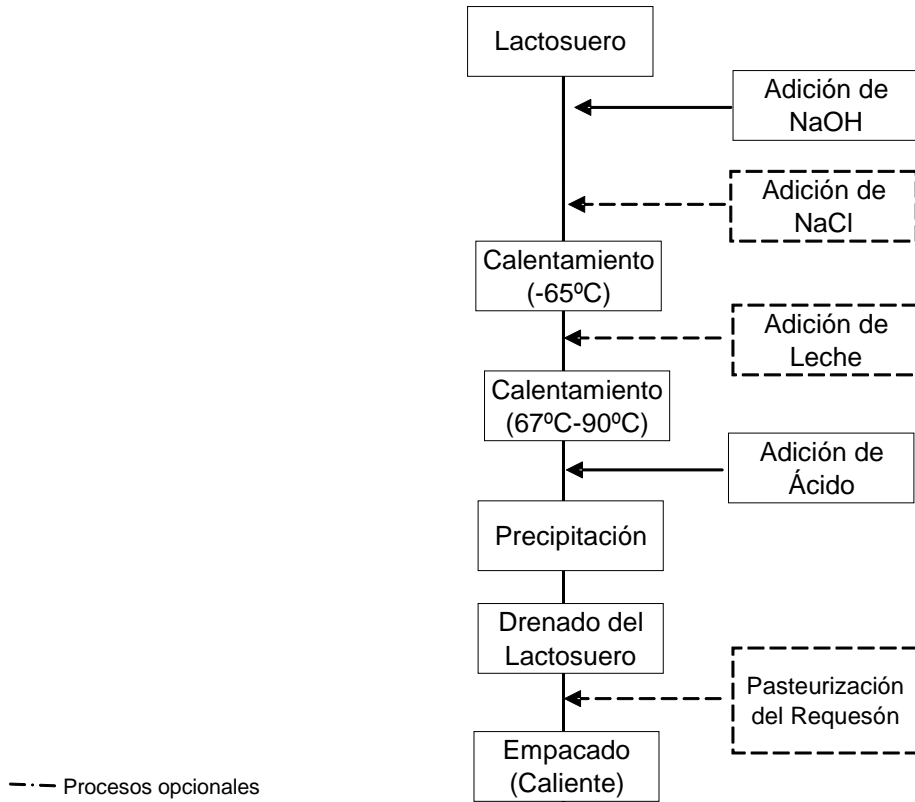
**--FIN DE NORMA--**

## **ANEXO No 2**

Listado de marca de requesón que se comercializan en los principales Supermercados de la Zona Metropolitana de San Salvador, que por razones de confidencialidad y ética profesional, se les ha asignado una codificación, la cual se define a continuación:

- Marca "A": Lactosa
- Marca "B": Petacones
- Marca "C": El Recreo
- Marca "D": El Jobo

### ANEXO No 3



**Figura No 2.** Diagrama en bloques del Proceso de Fabricación del Requesón

## **ANEXO No 4**

**Listado de las principales líneas Comerciales de Supermercados en el  
Área Metropolitana de San Salvador.**

## 1. Súper Selectos

1. 59 Av. sur entre Av. Olímpica y calle el progreso.
2. Paseo Gral. Escalón, Col. Escalón
3. 25 Av. Norte No1138
4. Av. Masferrer y 7ª calle Pte. Col. Lomas verdes
5. 1º calle Pte. y Av. Nte. No 216
6. Col. Los Ángeles, Soyapango
7. 27 calle Pte y 3ª Av. Norte, S.S.
8. Metro Sur, No 413
9. Paseo Gral. Escalón entre 77 y 79 Av. Sur, Col. Escalón.
10. Boulevard Constitución y Condominio Balam Acab.
11. Metrocentro Sexta Etapa
12. Calle ferrocarril, entre canal 6 y calle Palermo
13. 4ª Av. sur Boulevard del Ejercito
14. Mejicanos, final 5ª Av. Universitaria norte.
15. San Luis, Centro América
16. Metrópolis, Av. Bernal y calle Zacamil
17. Calle a Sta. Tecla y calle Ámbares. Col. Roma
18. Centro comercial autopista sur
19. Centro comercial Pericentro carretera Troncal del Norte Km 12
20. Zacamil, Centro Comercial Zacamil local No 10

21. 4ª Av. Sur y 4ª calle Ote. Local No 7
22. Col. México y Av. Diplomáticos Barrio San Jacinto
23. Av. Paleca y calle la Joya, Ciudad Delgado
24. Calle Ote. No 470 Distrito Comercial Central
25. 75 Av. Nte. y Paseo Gral. Escalón
26. Calle Rubén Darío y 5ª Av. Sur N° 411
27. Centro Comercia Zacamil, 2ª Calle Pte. Local N° 5
28. Final Paseo Gral. Escalón frente a Redondel Masferrer
29. Boulevard y Av. La Ceiba N° 7 Antiguo Cuscatlán
30. Apopa Km 12 ½ Carretera Troncal del Norte
31. Sta. Av. Norte y 1º calle Pte. N° 334
32. Barrio San Miguelito, 29ª calle Pte. Y 5ª Av. Norte
33. Boulevard Constitución y Calle a Motocross
34. Av. Olímpica y 59 Av. Sur N° 1104
35. Entrada a Tonacatepeque y calle Plan del Pino
36. Boulevard del Hipódromo y Av. Las Magnolias, San Benito
37. Av. Principal, Ex cine renovación Sta. Lucia
38. Calle a Huizucar entre pasaje Recinos y calle Constitución

## **2. Despensa de Don Juan**

1. Ciudad Delgado
2. Plaza Soyapango
3. Unicentro
4. Altavista
5. San Bartolo
6. Ayutuxtepeque
7. Terrazas
8. Las Victorias
9. Los Heroes
10. General Arce
11. Darío
12. San Benito
13. San Jacinto
14. Escalón Norte
15. Cumbres Escalón
16. La Cima
17. Centro Libertad



### **3. Europa**

1. Beethoven
2. Bernal
3. Hiper Europa
4. Europa Centro
5. Europa Merliot

### **4. Hiper Paiz**

1. Soyapango
2. Las Cascadas

**TOTAL: 62 Establecimientos**

**ANEXO No 5**  
**Material y Equipo**

**Material:**

- Agitadores de vidrio
- Asa bacteriológica
- Balones volumétricos de 50, 100, 500, 1000 mL
- Beaker de 30, 50, 100, 400, 600, 1000 mL
- Campanas de Durhan
- Embudo de vidrio tallo corto y largo
- Erlenmeyer de 125, 250, 1000 mL
- Frascos para diluciones
- Gradillas para tubos de ensayo
- Mechero Bunsen
- Micropipeta de 10 uL
- Pipeta de morh de 1.0 mL, 5.0 mL y 10.0 mL
- Pipetas volumétrica de 1.0 mL, 5.0 mL y 10.0 mL
- Placas de petri
- Portaobjetos
- Probetas de 10, 25, 50, 100, 500, 1000 mL
- Tubos de ensayo
- Tubos de hemólisis
- Varillas estériles en forma de "L"

**Equipo:**

- Autoclave
- Balanza Analítica
- Balanza Semianalitica
- Balanza Granataria
- Baño María.
- Cabina de flujo laminar
- Estufa
- Hot Plate
- Incubadora
- pHmetro

**ANEXO No 6**

**Reactivos y Medios de cultivos**

- 1. Nombre:** Agar Baird-Parker
- Composición (g/L):** Peptona de caseína 10.0; Extracto de carne 5.2; Extracto de levadura 1.0; Sodio piruvato 10.0; Glicina 12.0; Litio cloruro; Agar-agar 15.0. Aditivos: Emulsión de yema de huevo 50 mL, Potasio telurito 0.105 g; eventualmente Sulfametacina 0.05 g. Agua Destilada 1 Litro.
- Preparación:** Disolver 58 g/L, esterilizar al autoclave, enfriar a 50-45° C, añadir mezclando, 50 mL/L de emulsión de yema de huevo, 3 mL/L de solución al 3.5 % de potasio telurito y, eventualmente, 50 mg/L de sulfametacina. Verter en placas. pH: 6.8 + 0.2. El medio de cultivo completo, vertido en placas, ha de ser utilizado dentro de las 24 horas que siguen a su preparación.
- 2. Nombre:** Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)
- Composición (g/L):** Peptona 10 g; Lactosa 10 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g; Agar 15 g; Eosina Y 0.4 g; Azul de metileno 0.065 g; Agua destilada 1 Litro.
- Preparación:** Ebulle hasta disolver en 1 Litro de agua. Autoclavar 15 min. a 121°C. PH Final, 7.1 ± 0.2.

**3. Nombre:** Agar MacConkey

**Composición (g/L):** Proteosa, peptona o polipeptona 3 g; Peptona 17 g; Lactosa 10 g; Sales Biliares No. 3 o mezcla de sales biliares 1.5 g; NaCl 5 g; Rojo neutro 0.03 g; Cristal violeta 0.001 g; Agar 13.5 g; Agua destilada 1 Litro.

**Preparación:** Suspender los ingredientes y calentar con agitación hasta disolver. Ebulir 1-2 min. Autoclavar 15 min. a 121°. Enfriar a 45-50°C

**4. Nombre:** Agar SS (Agar para *Salmonella Shigella*)

**Composición (g/L):** Extracto de carne 5.0; Peptona de carne 5.0; lactosa 10.0; bilis de buey desecada 8.5; Citrato de sodio 10.0; tiosulfato de sodio 8.5; Citrato de hierro III 1.0; verde brillante 0.0003; rojo neutro 0.025; agar-agar 12.0

**Preparación:** Disolver 60 g/L y verter en placas. No esterilizar. pH 7.0±0.1

**5. Nombre:** Agar Triple Azúcar Hierro

**Composición (g/L):** **Medio 1:** Polipeptona 20 g; NaCl 5 g; Lactosa 10 g; Sucrosa 10 g; Glucosa 1 g; Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

0.2 g; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.2 g; Fenol rojo 0.025 g Agar 13 g;  
Agua destilada 1 Litro.

**Medio 2:** Extracto de carne 3 g; Extracto de levadura  
3 g; Peptona 15 g; Proteosa Peptona 5 g; Glucosa 1  
g; Lactosa 10 g; Sucrosa 10 g; FeSO<sub>4</sub> 0.2 g NaCl 5 g;  
Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.3 g; Fenol rojo 0.024 g; Agar 12 g; Agua  
destilada 1 Litro

**Preparación:**

Suspender los ingredientes del Medio 1 en Agua  
destilada, mezclar vigorosamente, y calentar  
ocasionalmente. Ebulir por 1 min. para disolver los  
ingredientes. Llenar 1/3 de tubos de 16 x 150 mm  
manteniendo condiciones aeróbicas. Autoclavar el  
Medio 1 por 15 min. a 118°C. Preparar el Medio 2 de  
la misma manera que el Medio 1, excepto que  
Autoclavar 15 min. a 121°C. Antes que el medio  
solidifique, colocar los tubos en posición para obtener  
una inclinación de 4-5 cm. pH Final, 7.3 ± 0.2 para el  
Medio 1 y 7.4 ± 0.2 para el Medio 2.

**6. Nombre:** Agar Trypticosa Soya

**Composición (g/L):** Trypticosa Peptona 15 g; Fitona Peptona 5 g; NaCl 5  
g; Agar 15 g; Agua destilada 1 Litro.



**Preparación:** Calentar agitando hasta disolver el medio, ebulir por 1 min. Autoclavar 15 min. a 121°C. pH Final, 7.3 ± 0.2.

**7. Nombre:** Búfer Fosfato pH 7.2

**Composición (g/L):** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 34 g; Agua destilada 500 mL.

**Preparación:** Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1 N. Aforar a 1 Litro con Agua destilada. Esterilizar 15 min. a 121°C. Almacenar en el refrigerador.

**8. Nombre:** Caldo Cerebro Corazón

**Composición (g/L):** **Medio 1:** Caldo de cerebro, infusión de 200 g; Corazón de vaca, infusión de 250 g; Pectosa proteasa 10 g; NaCl 5 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g; Dextrosa 2.0 g; Agua destilada 1 Litro.

**Medio 2:** Infusión de Cerebro corazón 6.0 g; Tejido péptico digerido de animal 6.0 g; NaCl 5.0 g; Dextrosa 3.0 g Pancreática digestiva de gelatina 14.5 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g; Agua destilada 1 Litro.

**Preparación:** Disolver los ingredientes del **Medio 1** en agua destilada ligeramente caliente. Suspender los ingredientes del **Medio 2** en Agua destilada y ebulir

por 1 min. hasta disolver completamente.. Autoclavar 15 min. a 121°C. pH Final,  $7.4 \pm 0.2$ .

- 9. Nombre:** Caldo EC
- Composición (g/L):** Triptosa o Tripticasa 20 g ; Sales Biliares No 3, 1.5 g; Lactosa 5 g ;  $K_2HPO_4$  4 g;  $KH_2PO_4$  1.5 g; NaCl 5 g; Agua destilada 1 Litro.
- Preparación:** Distribuir porciones de 8 mL en tubos de 16 x 150 mm conteniendo tubos de fermentación invertidos de 10 x 75 mm Autoclavar 15 min. a 121°C. pH Final,  $6.9 \pm 0.2$ .

- 10. Nombre:** Caldo Lauril Sulfato Tripticasa
- Composición (g/L):** Triptosa o Tripticasa 20 g; Lactosa 5 g;  $K_2HPO_4$  2.75 g; NaCl 5 g; Lauril sulfato de sodio 0.1 g; Agua destilada 1 Litro.
- Preparación:** Distribuir porciones de 10 mL en tubos de 20 x 150 mm conteniendo tubos de fermentación invertidos de 10 x 75 mm. Autoclavar 15 min. a 121°C. pH Final,  $6.8 \pm 0.2$ .

<b>11. Nombre:</b>	Caldo Tetracionato
<b>Composición (g/L):</b>	<b>Base del caldo tetracionato:</b> Polipeptona 5 g; Sales biliares 1 g ; Carbonato de calcio 10 g Tiosulfato de sodio pentahidratado 30 g ; Agua destilada 1 Litro <b>Solución de yodo-yoduro de potasio:</b> Yoduro de potasio 5 g, yodo 6 g; Agua destilada estéril 20 mL <b>Solución verde brillante:</b> Verde brillante seco y estéril 0.1 g; Agua destilada estéril 100 mL
<b>Preparación:</b>	Suspender los ingredientes en 1 Litro de Agua destilada, mezclar y Calentar a ebullición. No Autoclavar. Enfriar a menos de 45°C. Almacenar a 5-8°C. pH Final, $8.4 \pm 0.2$ . Disolver el yoduro de potasio en 5 mL de Agua destilada estéril. Adicionar el yodo y mezclar hasta disolver. Diluir a 20 mL. El día de uso, agregar 20 mL de solución de yodo-yoduro de potasio y 10 mL de solución verde brillante a 1 Litro de base del caldo. Resuspender el precipitado con agitación y transferir asépticamente porciones de 10 mL a tubos estériles. No recalentar el medio después de la adicción de las soluciones de I <sub>2</sub> -KI y de verde brillante.

- 12. Nombre:** Medio Rappaport-Vassiliadis
- Composición (g/L):** **Base del caldo:** Triptona 5 g; NaCl 8 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.6 g; Agua destilada 1L
- Solución de Cloruro de Magnesio:**  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  400 g; Agua destilada 1 Litro
- Solución de oxalato verde de malaquita:** Oxalato verde de malaquita 0.4 g; Agua destilada 100 mL.
- Preparación:** Para preparar el medio completo, combinar 1000 mL de base del caldo, 100 mL de solución de cloruro de magnesio, y 10 mL de solución de oxalato verde de malaquita (Volumen total para completar el medio es 1110 mL) Refrigerar 4-8 °C.
- 13. Nombre:** Reactivo de Kovacs
- Composición:** *p*-Dimetilaminobenzaldehido 5.0 g; Alcohol isoamilico 75 mL; Ácido clorhídrico concentrado 25 mL
- Preparación:** Disolver el *p*-aminobenzaldehido en alcohol isoamilico, y agregar lentamente ácido clorhídrico. Almacenar a 4 °C.
- 14. Nombre:** Reactivo de Vogues Proskauer
- Composición:** Solución Alcohólica al 5 % de alfa naftol: alfa naftol 5.0 g, agua c.s.p. 100 mL.

Solución al 40 % de Hidróxido de Potasio: 40.0 g de hidróxido de potasio; Agua c.s.p. 100 mL.

**Preparación:**

Solución Alcohólica al 5 % de alfa naftol: Disolver el alfa naftol en alcohol etílico y llevar a volumen.

Solución al 40 % de Hidróxido de Potasio: Disolver el Hidróxido de potasio en agua libre de dióxido de carbono, y llevar a volumen.

**15. Nombre:**

Solución de Agua Oxigenada al 3%

**Composición:**

Agua oxigenada 3 mL; Agua c.s.p. 100 mL

**Preparación:**

Mezclar el agua oxigenada con el agua y llevar a volumen. Preparar antes de usar.

**16. Nombre:**

Solución Indicadora de Rojo de Metilo

**Composición:**

Rojo de metilo 0.1 g; Alcohol etílico al 95 % 300 mL.

**Preparación:**

Disolver el Rojo de Metilo en alcohol y llevar a volumen.

## ANEXO No 7

Etiqueta para Identificar a las muestras de Requesón recolectadas en los diferentes Supermercados de la zona metropolitana de San Salvador.

<b>No de Muestra:</b>	_____
<b>Fecha:</b>	_____
<b>Marca de Requesón:</b>	_____
<b>Presentación:</b>	_____
<b>Fecha de Vencimiento:</b>	_____
<b>Temperatura de almacenamiento:</b>	_____
<b>Supermercado:</b>	_____
<b>Analista:</b>	_____
<b>Observaciones:</b>	_____
	_____

**ANEXO No 8**

**Selección y Conteo de las Colonias**

### **Cuando en la placa no se observa crecimiento de colonias**

Si en las placas inoculadas no se observa crecimiento de colonias, se reporta como < 10 UFC/g.

### **Cuando en la placa hay entre 30 – 300 colonias**

Si hay dos placas con la misma dilución:

Contar ambas placas y sacar el promedio y multiplicar por el factor de dilución

ejemplo:

Dilución 1:100

Placa N°1 = 20 colonias

Placa N°2 = 40 colonias

$$\frac{20 + 40}{2} = 30 \times 100 = 3,000 \text{ UFC/ml.}$$

Si en una de las placas no se puede contar, se desechan y se cuenta la que tiene menos inculo.

### **Cuando el número de colonias es menor de 30.**

Contar la placa con la menor dilución y reportar como menos de 30 colonias por dilución.

Si se ha utilizado una dilución 1:1000 y se ha contado 10 colonias se reporta 10,000 col/mL.



**Cuando el número de colonias es superior a 300**

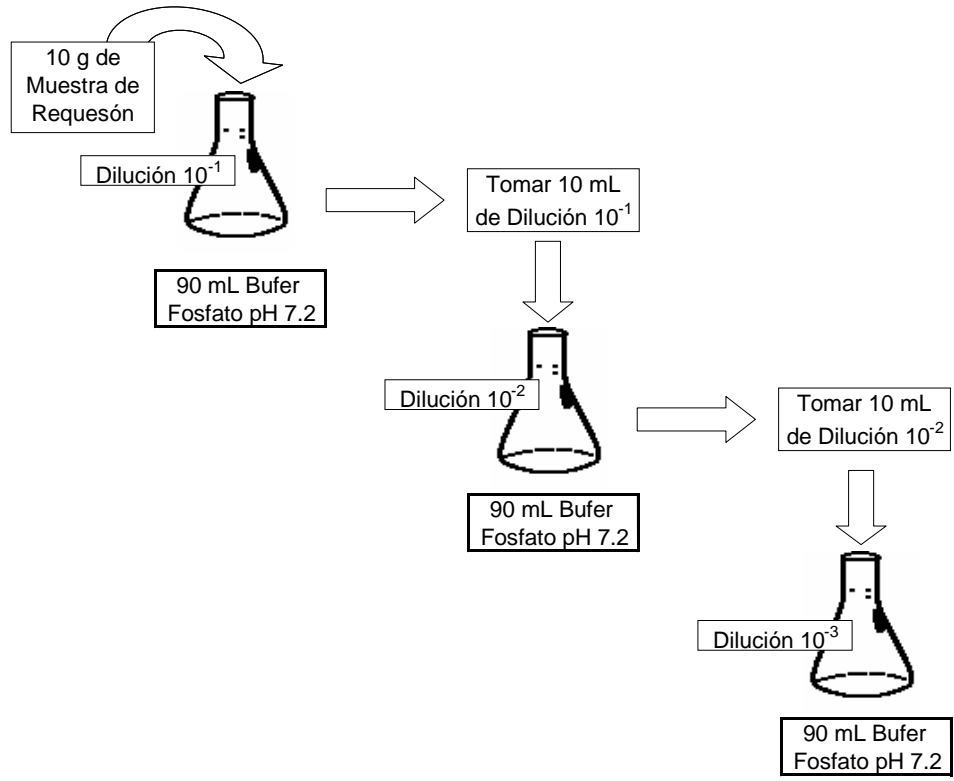
Si hay 10 o menos colonias por  $\text{cm}^2$ , sumar las colonias de 7 cuadros horizontales y 6 cuadros verticales (no contar el mismo cuadro), multiplicar por 5 y por la dilución correspondiente.

Si hay más de 10 colonias por  $\text{cm}^2$  sumar las colonias de 4 cuadros diferentes tomados a su elección, divide entre 4 y multiplique por 65 y por la dilución correspondiente.

**Cuando en la placa se observa colonias incontables**

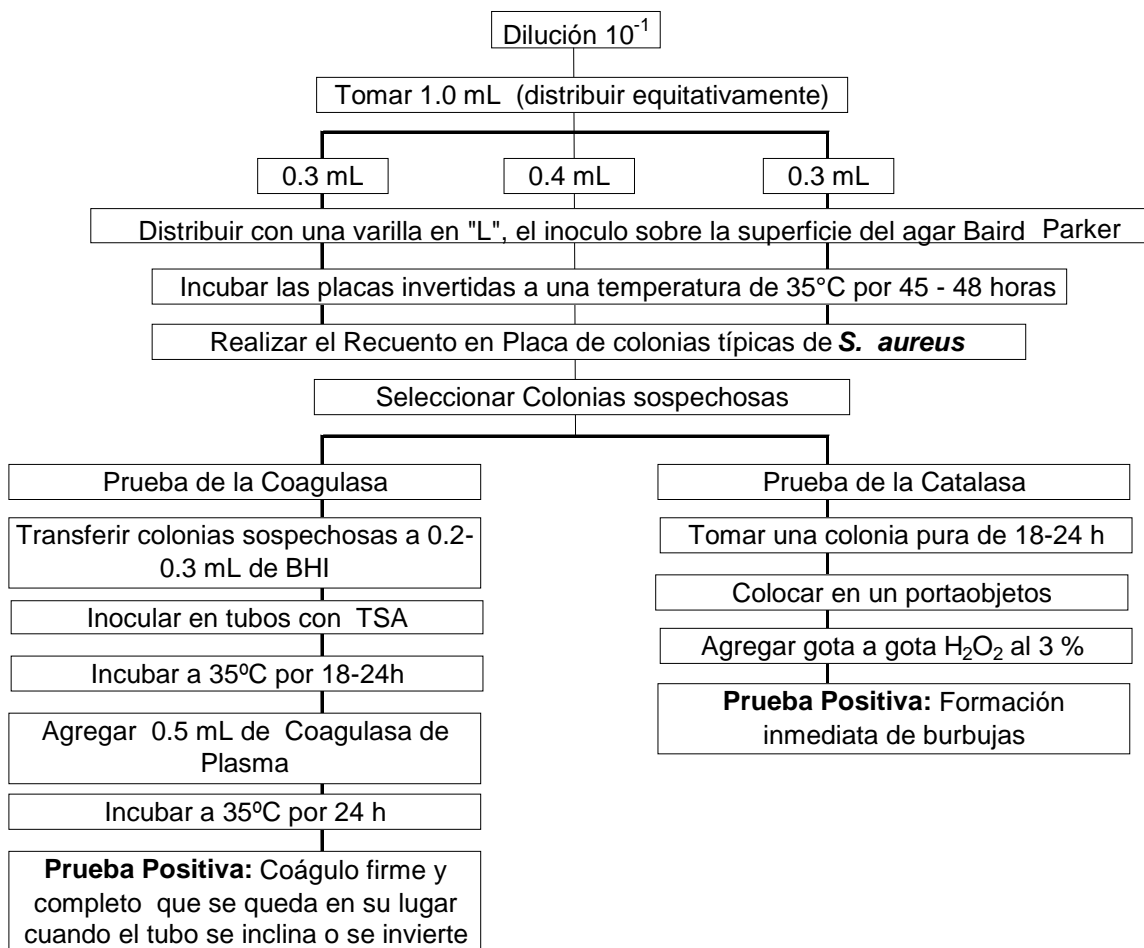
Si hay un crecimiento excesivo de colonias en cualquiera de las diluciones, se reporta como  $> 6,500 \text{ UFC/g}$  por la dilución mayor.

## ANEXO No 9



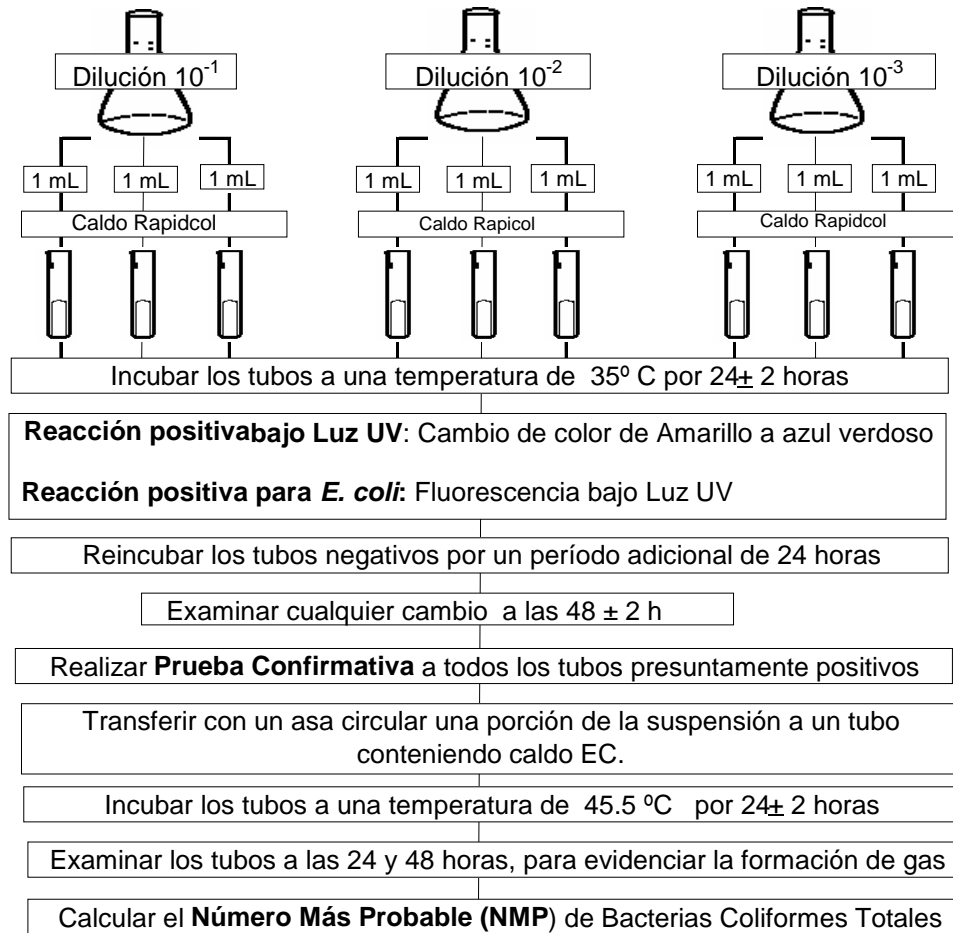
**Figura No 3.** Esquema de dilución de la muestra.

## ANEXO No 10



**Figura No 4.** Determinación de *Staphylococcus aureus* (UFC/g)

## ANEXO No 11



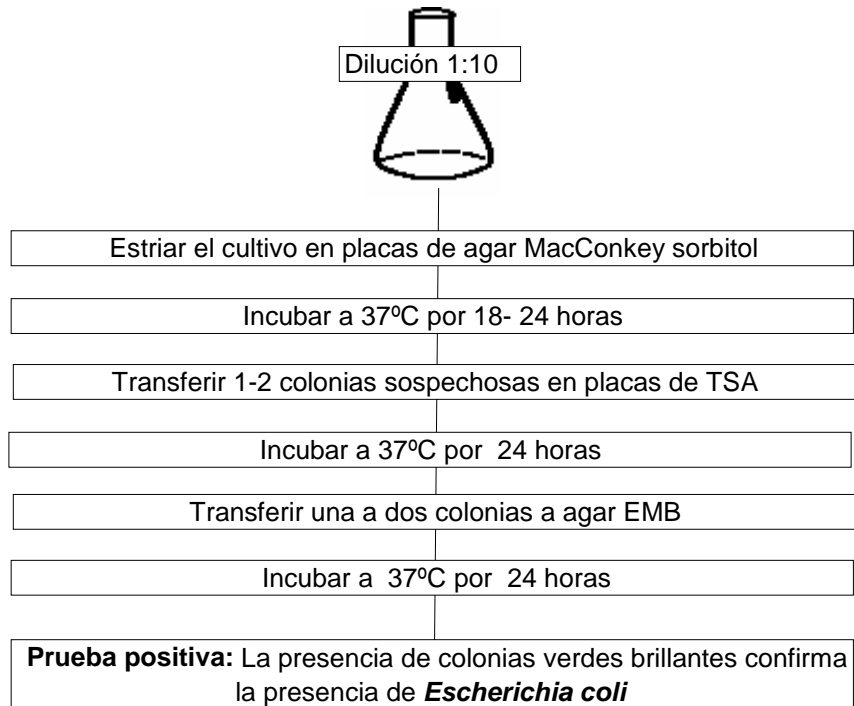
**Figura No 5.** Recuento de Coliformes Fecales (NMP/g)

## ANEXO No 12

**Tabla N° 30.** Para 3 tubos cada uno con 0.1, 0.01, y 0.001 g de inoculo, el NMP por gramo y 95 por ciento de intervalo de confianza <sup>(11)</sup>

Tubos Positivos			NMP/g	Conf. lim.		Tubos Positivos			NMP/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto	0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

## ANEXO No 13



**Figura No 6.** Determinación de *Escherichia coli* (UFC/g)

ANEXO Nº 14

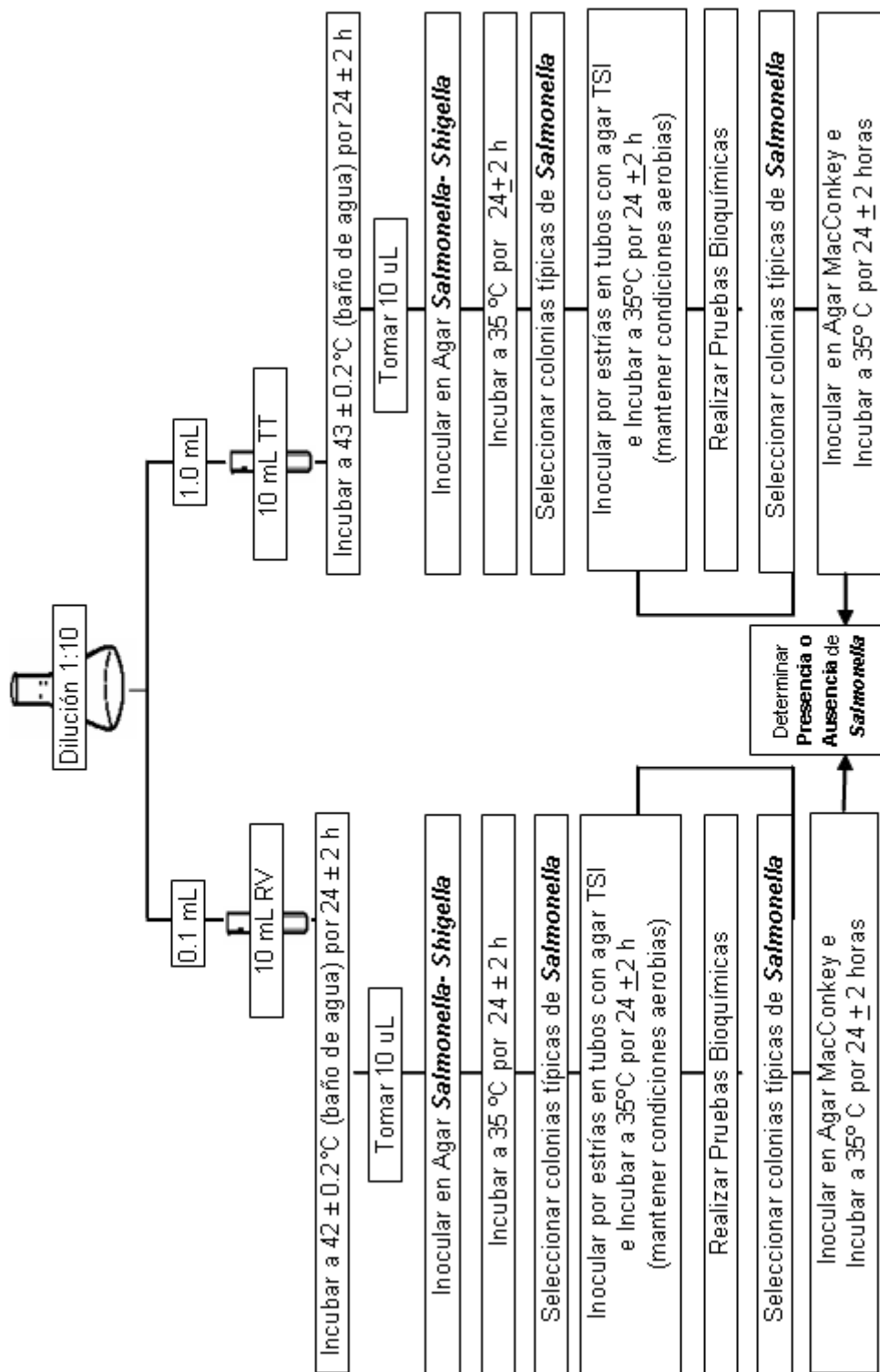


Figura No 7. Determinación de *Salmonella* en 25 g

## **ANEXO No 15**

**Imágenes Tomadas Durante el Desarrollo de la Parte Experimental**





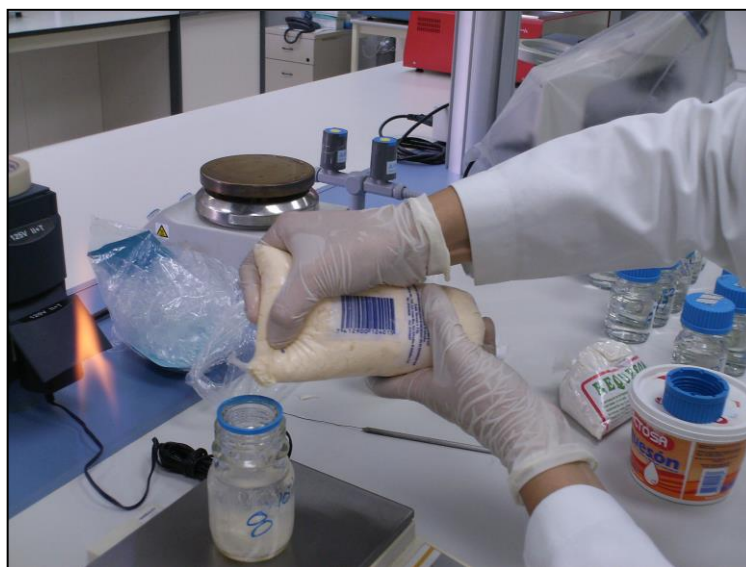
**Figura No 8.** Muestras de requesón trasladadas en cadena de frío al laboratorio (en hielera). A un lado, en el estante, parte de los medios, reactivos y material estéril, utilizados en la práctica.



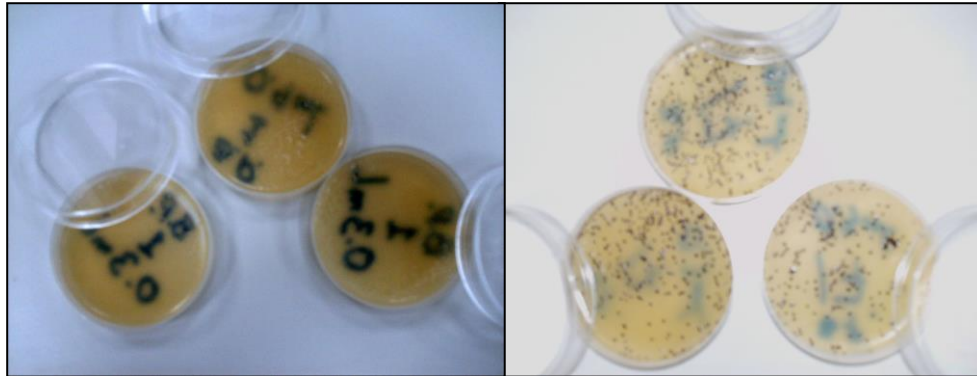
**Figura No 9.** Muestras de requesón de cada marca con su número asignado para el análisis microbiológico.



**Figura No 10.** Pre-tratamiento de la muestra, en forma aséptica, usando un algodón impregnado de alcohol y frotando el empaque original de la misma.



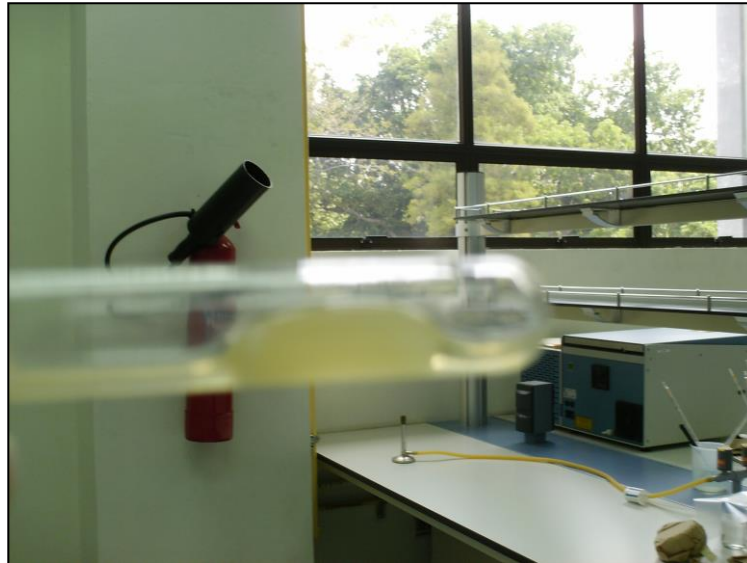
**Figura No 11.** Pesado en forma aséptica de la muestra, para preparar cada una de las diluciones.



**Figura No 12.** La figura de la izquierda evidencia ausencia de colonias de *Staphylococcus aureus* en medio Agar Baird Parker. La figura de la derecha evidencia la presencia de colonias de *Staphylococcus aureus*.



**Figura No 13.** Presencia de colonias incontables (color negro azabache) de *Staphylococcus aureus* en medio Agar Baird Parker.



**Figura No 14.** Prueba auxiliar de la coagulasa, que evidencia un firme y completo coagulo que se queda en el lugar cuando el tubo se inclina, considerado positivo para *Staphylococcus aureus*.

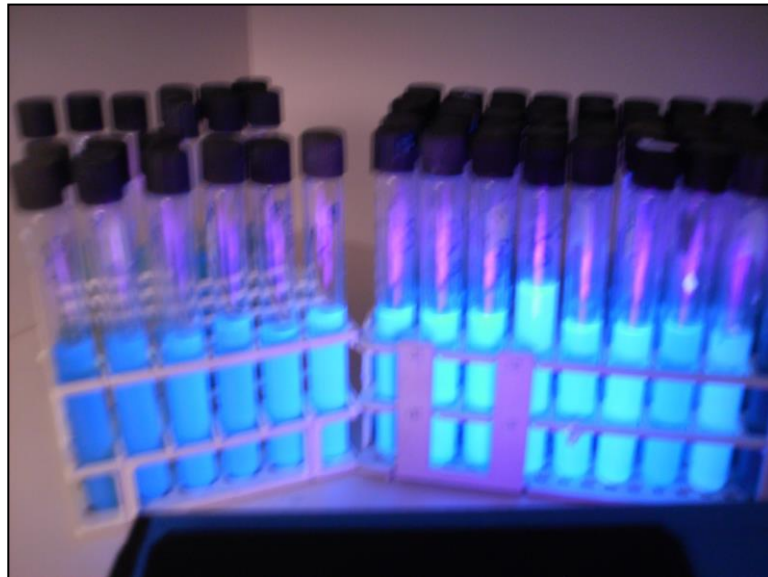


**Figura No 15.** Tubos con cambio de color en el medio (verde azulado) y sin cambio de color en el medio (amarillo) en la prueba presuntiva para Coliformes fecales.

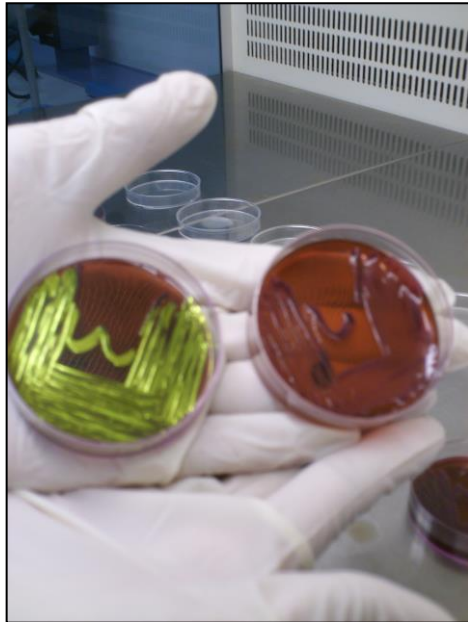




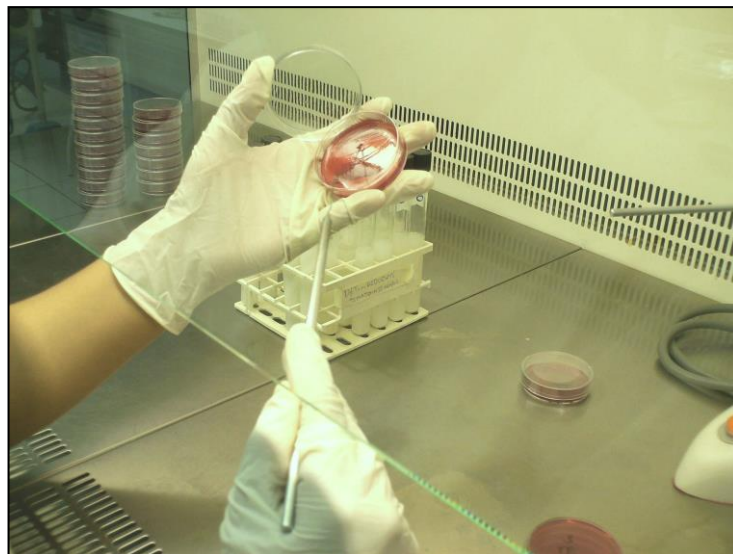
**Figura No 16.** Desplazamiento de la campana de Durhan y formación de gas en medio EC indicando un resultado positivo en la prueba confirmativa para Coliformes fecales



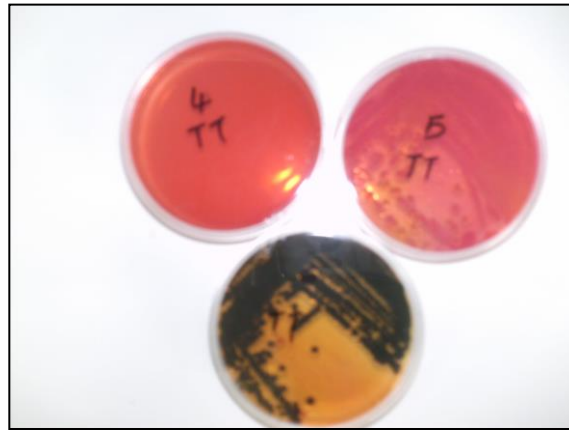
**Figura No 17.** Tubos con fluorescencia en el medio Rapicold, que indica la presencia de *Escherichia coli*.



**Figura No 18.** En la placa de la izquierda se observa en el medio EMB colonias verde brillantes, que indican la presencia de *Escherichia coli*. En la placa de la derecha no se observan colonias características de *Escherichia coli* en el medio.



**Figura No 19.** Estriado en placas conteniendo agar *Salmonella-Shigella*.



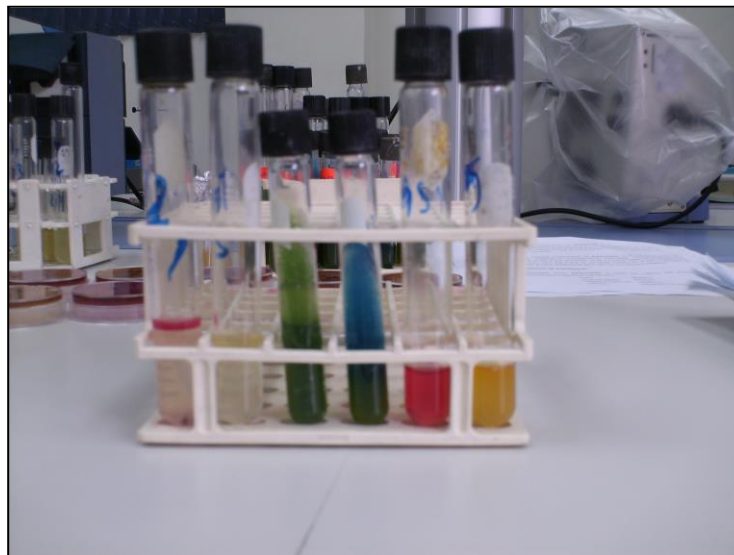
**Figura No 20.** Placas de Agar *Salmonella-Shigella*. En la placa de la parte superior izquierda se observa la ausencia de colonias, en la placa de la derecha, se observa la presencia de colonias con morfología no típica de *Salmonella* y en la placa de abajo se observa la presencia de colonias típicas de *Salmonella*.



**Figura No 21.** Prueba positiva en TSI, indicando presencia de *Salmonella*: R/A (Ácido/Alcalino), producción de sulfuro de hidrógeno y producción de gas.



**Figura No 22.** Inoculación en cámara de flujo laminar de las pruebas bioquímicas para los cultivos sospechosos de *Salmonella*.



**Figura No 23.** Pruebas bioquímicas: Indol positivo y negativo, Citrato negativo y positivo, Rojo de metilo positivo y negativo.





**Figura No 24.** Pruebas bioquímicas positivas para *Salmonella*: Indol negativo, Rojo de metilo positivo, Vogues Proskahuer negativo y Citrato positivo.

## **ANEXO No 16**

### **Guía de Alimentación y Nutrición para Adolescentes**



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL  
DIRECCIÓN DE REGULACIÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD  
UNIDAD DE ATENCIÓN INTEGRAL EN SALUD DE ADOLESCENTES

# GUÍA DE ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN PARA ADOLESCENTES



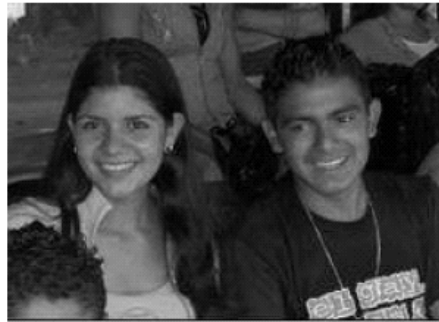
El Salvador Octubre 2007

## V. GUÍAS DE ALIMENTACIÓN RECOMENDADAS

Las guías de alimentación que a continuación se presentan servirán de base para brindar recomendaciones del tipo de alimentos y las cantidades que deben consumir los(as) adolescentes. Las guías de alimentación se han dividido en: Adolescente hombre y mujer, Adolescente embarazada, Adolescente lactante, Adolescente deportista y Adolescente con VIH/SIDA.

### 1. ADOLESCENTE HOMBRE Y MUJER

- Leche entera, descremada o Incaparina: 2 tazas al día
- Carne, pescado o pollo: 2 onzas al día
- Queso o requesón: 4 cucharadas o 1 onza
- Huevo: 1 unidad 3 veces por semana
- Fruta: 1 porción 4 veces al día (de 1/2 taza)
- Verdura: 1/2 taza al día
- Panes, tortillas y cereales: 11 unidades pequeñas al día
- Mantequilla o margarina: 1 a 2 cucharaditas al día



### 2. ADOLESCENTE EMBARAZADA

- Leche entera, descremada o Incaparina: 3 tazas al día (8 onzas c/u)
- Carne, pescado o pollo: 1 porción 4 onzas al día
- Queso o requesón: 4 cucharadas o 1 onza al día
- Huevo: 1 unidad al día
- Fruta: 1 porción 4 veces al día (de 1/2 taza c/u)
- Verdura: 3 o más porciones al día (de 1/2 taza c/u)
- Panes, tortillas y cereales: 11 unidades pequeñas al día
- Mantequilla o margarina: 1 a 2 cucharaditas al día



### 3. ADOLESCENTE LACTANTE



- Leche entera, descremada o Incaparina: 4 tazas al día (8 onzas c/u)
- Carne, pescado o pollo: 1 porción de 3 a 4 onzas al día
- Queso, requesón o huevo: 4 cucharadas o 1 onza o 1 unidad al día
- Fruta: 4 porciones al día (de 1/2 taza c/u)
- Verdura: 3 o más porciones al día (de 1/2 taza c/u)
- Panes, tortillas y cereales: 14 unidades pequeñas al día
- Mantequilla o margarina: 1 a 2 cucharaditas al día

#### 4. ADOLESCENTE CON ACTIVIDAD FÍSICA MODERADA

- Leche descremada o Incaparina: 3 tazas al día (8 onzas c/u)
- Carne, pescado o pollo: 1 porción de 4 onzas al día
- Queso, requesón o huevo: 4 cucharadas o 1 onza o 1 unidad al día
- Fruta: 4 porciones al día
- Verdura: 3 o más porciones al día
- Panes, tortillas y cereales: 14 unidades al día
- aceite o margarina: 1 a 2 cucharaditas al día



#### 5. ADOLESCENTE CON VIH/SIDA

- Leche entera, descremada o Incaparina: 3 tazas al día (8 onzas c/u)
- Carne, pescado o pollo: 1 porción de 4 onzas al día
- Queso, requesón o huevo: 4 cucharadas o 1 onza o 1 unidad al día
- Fruta: 4 porciones al día
- Verdura: 3 o más porciones al día
- Panes, tortillas y cereales: 14 unidades al día
- aceite o margarina: 2 a 3 cucharaditas al día

## VI. EJEMPLOS DE MENÚ

### 1. PARA LA Y EL ADOLESCENTE:

#### DESAYUNO

- 1 Taza (8 onzas) de leche o Incaparina o yogurt
- Huevo o 1 onza de queso o 4 cucharadas de requesón
- 3 cucharadas soperas de Frijoles sin grasa
- 1/3 de plátano o 1 tamal pequeño o 1/2 taza de cereal simple o 1 pan cake pequeño
- 2 tortillas o panes pequeños

#### ALMUERZO

- 3 onzas de carne de res, pollo o pescado
- 1/2 Taza de arroz o macarrones o papa sin grasa
- 1Taza de ensalada o verduras cocidas
- 2 Tortillas o panes pequeños
- 1 Porción de fruta (1/2 taza)

#### CENA

- 1 Taza (8 onzas) de leche o de Incaparina
- 3 cucharadas de frijoles o papas guisadas
- 1 Huevo o 1 onza de queso o 4 cucharadas de requesón
- 2 Tortillas pequeñas

#### REFRIGERIO AM

- 1/2 taza de fruta

#### REFRIGERIO PM

- 1 porción de fruta o 1/2 taza de fruta ó 1 fruta pequeña

## 2. ADOLESCENTE EMBARAZADA

### DESAYUNO

- 1 Taza (8 onzas) de leche o Incaparina o yogurt 1
- Huevo duro o tibio
- 3 cucharadas soperas de frijoles sin grasa o
- 1/3 Plátano cocido o 1 pan cake
- 2 Panes o tortillas
- 1/2 Taza de fruta

### ALMUERZO

- 3 onzas de pollo o carne o pescado
- 3 cucharadas soperas de arroz o macarrones o 1 papa pequeña
- 1 Taza de ensalada o 1/2 taza de verduras cocidas
- 2 Tortillas
- 1/2 Taza de fruta 8 onzas de refresco natural

### CENA

- 1 Taza de leche o poleada o arroz en leche
- 1 onza de queso o 4 cucharadas de requesón
- 3 cucharadas soperas de frijoles o
- 3 cucharadas de papas guisadas
- 1 Tortilla
- 1/2 Taza de ensalada o vegetales cocidos

### REFRIGERIO AM

- 1 taza de fruta

### REFRIGERIO TARDE

- 1 taza de frutas

### REFRIGERIO NOCHE

- 1 taza de leche o incaparina (1 vaso de 8 oz)

### 3. ADOLESCENTE LACTANTE

#### DESAYUNO

- 1 Taza de leche con azúcar o atol de Incaparina
- 4 cucharadas soperas de frijoles sin grasa
- 1 huevo o 1 porción de queso fresco
- 2 Panes o tortillas
- 1/2 taza de fruta

#### ALMUERZO

- 3 onzas de pollo o carne de res, pescado o queso
- 3 cucharadas soperas de arroz o macarrones o papas
- 1 Taza de ensalada fresca o 1/2 taza de verduras cocidas o guisadas
- 2 Tortillas pequeñas
- 1/2 taza de fruta

#### CENA

- 1 Taza de leche con azúcar o Incaparina
- 1 onza de queso fresco o
- 4 cucharadas de requesón
- 3 cucharadas soperas de casamiento sin grasa
- 1/2 taza de vegetales salteados o guisados
- 1 tortilla pequeña

#### REFRIGERIO AM

- 1 licuado de leche o de incaparina con frutas, sin azúcar

#### REFRIGERIO PM

- 1 pan con queso o requesón
- 1 vaso de jugo de frutas natural



#### 4. ADOLESCENTE CON ACTIVIDAD FISICA MODERADA

##### DESAYUNO

- 1 Taza de leche con azúcar o atol de Incaparina
- 4 cucharadas soperas de frijoles sin grasa
- 1 huevo o 1 porción de queso fresco
- 2 Panes o tortillas
- 1/2 taza de fruta

##### ALMUERZO

- 3 onzas de pollo o carne de res, pescado o queso
- 3 cucharadas soperas de arroz o macarrones o papas
- 1 Taza de ensalada fresca o 1/2 taza de verduras cocidas o guisadas
- 2 Tortillas pequeñas
- 1/2 taza de fruta

##### CENA

- 1 Taza de leche con azúcar o Incaparina
- 1 onza de queso fresco o
- 4 cucharadas de requesón
- 3 cucharadas soperas de casamiento sin grasa
- 1/2 taza de vegetales salteados o guisados
- 1 tortilla pequeña

##### REFRIGERIO AM

- 1 licuado de leche o de incaparina con frutas, sin azúcar

##### REFRIGERIO PM

- 1 pan con queso o requesón
- 1 vaso de jugo de frutas natural

## 5. ADOLESCENTE CON VIH/SIDA

### DESAYUNO

- 1 Taza de leche hervida o Incaparina (8 onzas)
- 1 Huevo picado con vegetales
- 4 cucharadas soperas de frijoles colados sin grasa
- 1/2 Plátano en gloria o 1 pan cake con miel
- 1 Tortilla o 1 pan francés

### ALMUERZO

- 3 onzas de pollo o carne o pescado bien cocidos
- 4 cucharadas de arroz o macarrones o papas guisadas
- 1/2 Taza de vegetales salteados
- 2 Tortillas o 2 panes
- 1/2 Taza de fruta

### CENA

- 1 Taza de leche hervida o poleada o arroz en leche
- 1 onza de queso o 4 cucharadas de requesón
- 4 cucharadas soperas de casamiento
- 1 Tortilla
- 1/2 Taza vegetales cocidos

### REFRIGERIO AM

- 1 vaso de 8 oz de jugo de naranja natural
- 1 pan con mantequilla o crema

### REFRIGERIO TARDE

- 1 taza de horchata de incaparina (8 oz)
- 1 porción de pan dulce

### REFRIGERIO NOCHE

- 1 Taza de 8 onzas de avena o de atol de Incaparina