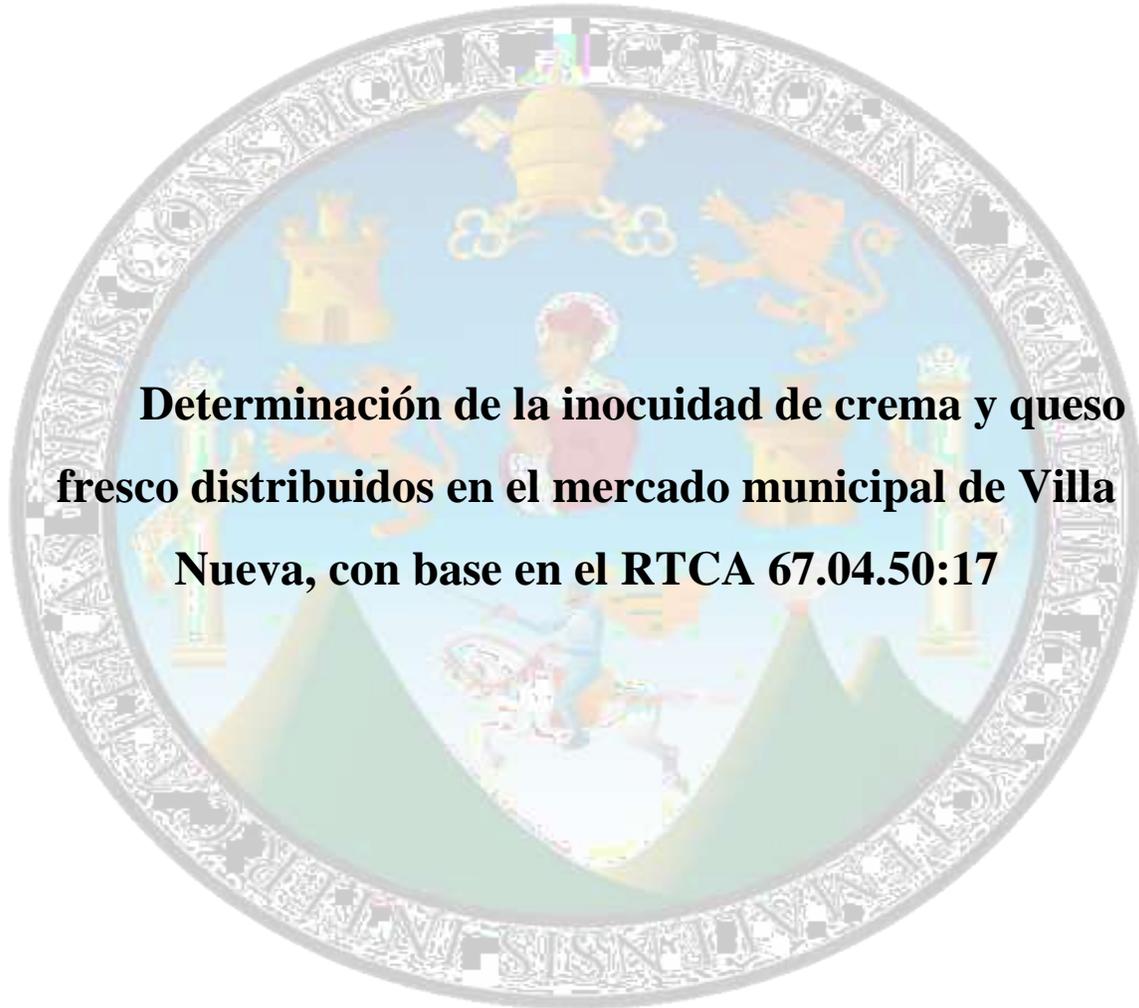


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



Determinación de la inocuidad de crema y queso fresco distribuidos en el mercado municipal de Villa Nueva, con base en el RTCA 67.04.50:17

Stephany Irazema Velasquez De Leon

Química Bióloga

Guatemala, marzo de 2023

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



Determinación de la inocuidad de crema y queso fresco distribuidos en el mercado municipal de Villa Nueva, con base en el RTCA 67.04.50:17

Informe de Tesis

Presentado por

Stephany Irazema Velasquez De Leon

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, marzo de 2023

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Miembros de Junta Directiva

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Decano en funciones
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Carmen Amalia Rodríguez Ortiz	Vocal IV
Br. Paola Margarita Gaitán Valladares	Vocal V
Licda. Bessie Abigail Orozco Ramírez	Secretaria

AGRADECIMIENTOS

- A Dios
- Por permitirme la oportunidad de existir y realizar todo lo que he hecho hasta el día de hoy.
- A mis padres
- Por el amor, motivación, esfuerzo y apoyo incondicional para poder cumplir esta meta.
- A mi hermano
- Por su ejemplo. Por estar conmigo, apoyarme y comprenderme. Eres el mejor, te quiero.
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala
- Mi alma máter. Gracias por la preparación académica, concientización, experiencias y momentos inolvidables.
- Al Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-
- Gracias Licenciado Sergio y don Julio por permitirme trabajar con ustedes, enseñarme y apoyarme durante esta investigación.
- A mis amigos
- Gracias por estar y coincidir. Por su apoyo y por todos los momentos compartidos.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	3
	A. Derivados lácteos	3
	1. Generalidades	3
	2. Importancia en la dieta	3
	3. Proceso de elaboración	4
	4. Microbiología	6
	5. Peligros para la salud del consumidor	7
	6. El sector lácteo en Guatemala	7
	B. Parámetros microbiológicos	8
	1. <i>Escherichia coli</i>	8
	2. <i>Listeria monocytogenes</i>	9
	3. <i>Salmonella</i> spp.	9
	4. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
IV.	JUSTIFICACIÓN	11
V.	OBJETIVOS	12
	A. Objetivo general	12
	B. Objetivos específicos	12
VI.	HIPÓTESIS	13
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
	A. Universo	14
	B. Muestra	14

C. Materiales	14
1. Materiales de campo	14
2. Materiales de laboratorio	14
3. Equipo de Laboratorio	15
4. Medios y Reactivos	16
5. Recursos biológicos	17
D. Métodos	17
1. Toma de muestra	17
2. Obtención de datos por análisis microbiológico de muestras	17
3. Análisis estadístico	20
VIII. RESULTADOS	22
IX. DISCUSIÓN	29
X. CONCLUSIONES	34
XI. RECOMENDACIONES	35
XII. REFERENCIAS	36
XIII. ANEXOS	40

I. RESUMEN

Los derivados lácteos de mayor consumo en Guatemala son el queso fresco y la crema y son considerados alimentos altamente perecederos. El consumo de alimentos de origen animal conlleva un factor de riesgo debido a que son medios de transporte de diferentes tipos de microorganismos. Se conocen al menos 200 microorganismos implicados en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), entre ellos: *Escherichia coli* patogénica, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, los cuales son utilizados como parámetros de los criterios microbiológicos de inocuidad para la crema y el queso fresco según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:17 ICS 67.050 1^{ra}Revisión. ALIMENTOS. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS.

El objetivo de esta investigación fue la determinación de la presencia o ausencia de microorganismos en la crema y el queso fresco distribuidos en el mercado municipal de Villa Nueva, la cual se llevó a cabo mediante diferentes métodos, dependiendo del microorganismo a evaluar: número más probable, detección en placa utilizando medios de cultivo selectivos y/o diferenciales, y confirmación con pruebas bioquímicas o pruebas rápidas. Por medio de estos procedimientos se realizó los análisis de los parámetros que establece el RTCA para la crema y el queso fresco, evaluando su cumplimiento. *Escherichia coli* se aisló en el 87% de las muestras analizadas superando los límites permitidos en el reglamento, por lo que no se aceptaron estas muestras debido a que no cumplen con los criterios de inocuidad. Se aisló *Staphylococcus aureus* en el 42% de las muestras analizadas, siendo su incidencia mayoritariamente en las muestras de crema. Respecto a los análisis de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., no se aislaron estos microorganismos por lo que se reportó como ausencia.

II. INTRODUCCIÓN

El queso fresco y la crema son los derivados lácteos de mayor consumo en Guatemala debido a su precio accesible, agradable sabor, alto valor nutricional y fácil incorporación en diferentes platillos guatemaltecos. Estos alimentos presentan un corto periodo de vida de anaquel por lo que las condiciones en las que es almacenado deben ser las apropiadas para evitar la proliferación de microorganismos. Así mismo, el proceso de elaboración es un punto importante, por ello, tanto las grandes como las pequeñas empresas productoras de lácteos deben implementar y ejecutar adecuadamente el proceso de pasteurización, Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) y las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para reducir los niveles de riesgo biológico que se puede conferir al consumidor y verificar si los productos se están elaborando en condiciones sanitarias adecuadas (Ramirez & Vélez, 2012).

En Guatemala se utiliza el Reglamento Técnico Centroamericano [RTCA] 67.04.50:17 ICS 67.050 1ra revisión para la determinación de la inocuidad microbiológica por medio de la verificación de los parámetros establecidos en el mismo. Los microorganismos utilizados como parámetros de los criterios microbiológicos de inocuidad para la crema y el queso son: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Reglamento Técnico Centroamericano -RTCA-, 2018).

El diseño de muestreo es probabilístico, consistió en 4 repeticiones que se realizó según el tiempo de intercambio entre cada lote, cada repetición constó de 5 muestras por producto (crema, queso en hoja y queso en bandeja), finalizando el muestreo con 60 muestras por parámetro microbiológico, es decir, un total de 240 análisis. Respecto al análisis, se utilizó las metodologías indicadas en el RTCA. Con estos análisis se determinó si el queso fresco y la crema distribuidos en el mercado municipal de Villa Nueva cumplían con los criterios microbiológicos establecidos en el RTCA.

III. ANTECEDENTES

A. Derivados lácteos

1. *Generalidades*

De acuerdo con su estado de maduración, los quesos frescos necesitan un periodo de 6 días a diferencia de los quesos madurados que necesitan un tiempo mayor de 70 días. Por ello, el tiempo de caducidad de los quesos frescos es menor. Entre las características del queso se puede mencionar su alto contenido de humedad, proteínas y calcio, este alimento posee un corto periodo de vida de anaquel, por lo que debe ser almacenado bajo las condiciones adecuadas. Son clasificados como alimentos altamente perecederos debido a que factores como la temperatura, humedad, condiciones del proceso, el inadecuado almacenamiento y las alteraciones provocadas por microorganismos contribuyen a que fácilmente entren en un estado de descomposición (Aranceta & Serra, 2005; Lanchipa & Sosa, 2003; Ramirez & Vélez, 2012).

La crema es una sustancia líquida, viscosa, color blanco amarillento, con textura variable (dependiendo de su contenido de grasa) y con un pH entre 6.3 y 6.8. Se obtiene de la leche al separar la grasa por medio de efectos físicos, químicos o mecánicos como el reposo o la centrifugación. Los tipos de crema varían dependiendo al uso o propósito, porcentaje de grasa y tratamiento térmico utilizado para su producción (Velasquez, 2008).

2. *Importancia en la dieta*

En general, la leche es un alimento importante en la dieta debido a los nutrientes que aporta. La leche posee de 2.6 a 3.2 por ciento de proteína, su principal proteína es la caseína la cual contiene todos los aminoácidos esenciales y no esenciales (Alvarado, 2011).

El consumo de queso aporta significativamente un porcentaje de calorías, proteínas y minerales (anexo 1). Es considerado una fuente de proteína relativamente más económica

en comparación con la carne y es una fuente significativa de calcio y fósforo (Ramírez & Vélez, 2012).

La crema es la materia grasa y la fase acuosa de la leche. En la fase acuosa se encuentran los nutrientes hidrosolubles y en la grasa se encuentran vitaminas liposolubles A, D, E y K, esto debido a que la grasa es el medio de transporte para estas vitaminas. Además, comparado con otras grasas es una buena fuente de energía, aproximadamente 1 gramo de grasa equivale a 9 calorías y es un tipo de grasa altamente emulsificador, contiene ácidos grasos de cadena corta en su mayoría lo que facilita su digestión. Sin embargo, estas vitaminas se encuentran en pequeñas cantidades por lo que se aconseja que la leche sea fortificada con vitamina A y D (Correa & Cortés, 2016).

Una porción de 100 gramos de queso contiene 55 gramos de agua, 17.50 gramos de proteína, 20.10 gramos de grasa y 783 miligramos de calcio, comparado con la crema que contiene 57.71 gramos de agua, 2.05 gramos de proteína, 37 gramos de grasa y 65 miligramos de calcio. Siendo la crema el derivado lácteo con mayor porcentaje de grasa y agua, pero menor contenido de proteínas y calcio, comparado con el queso (anexo 1).

3. Proceso de elaboración

Según el gran libro del queso (2019), el queso artesanal es elaborado por un artesano, es decir, es elaborado a mano y siguiendo las técnicas tradicionales de la quesería, con leche de diversas explotaciones vecinas. El artesano puede trabajar solo o tener un equipo de hasta diez personas. El queso y la crema suele producirse con leche cruda. Para obtener tanto queso como crema de calidad se deben realizar todos los procesos de la mejor manera posible. Tanto el proceso de ordeño como todas las manipulaciones posteriores deben ser realizadas en las condiciones de higiene adecuada.

Para la elaboración del queso artesanal se utiliza leche entera de vaca, la cual debe calentarse a fuego lento hasta alcanzar una temperatura de 55°C, luego se deja enfriar a 35°C. Al tener la leche lista se procede a la preparación del queso que consiste en 3 pasos

que son: el cuajado de la leche, tratamiento de la cuajada para separar el agua, y el salado. Para el paso del cuajado se debe agregar el cuajo que contiene la enzima renina, quimosina o fermento lab, que es preparada del cuarto estómago de la vaca y que coagula la caseína. Se añade 1 cucharada de CaCl y una cucharada de ácido cítrico. Se deja en reposo a 25°C durante una hora. Para el tratamiento de la cuajada para separar el agua se corta en pequeños cubos el cuajo y se coloca en un colador y se deja escurrir, luego se utilizan lienzos o mantas para separar el coágulo del suero, el queso fresco es de alto contenido acuoso por lo que no se elimina por completo la humedad del coágulo. Luego se procede al salado que consiste en amasar el queso en una mesa o tabla limpia y se añade cloruro sódico (sal), esto contribuye a sazonar, regula la humedad por separación del agua y previene el desarrollo de microorganismos perjudiciales, por último, se coloca en los recipientes definitivos, ya sea bandeja plástica o envueltos en hojas de plátano (De León, Campos, & Díaz, 2016).

El proceso de producción de crema empieza con el descremado de la leche que puede llevarse a cabo mediante diferentes procesos, la manera artesanal de obtener la crema es dejando reposar la leche para separar la grasa que contiene, este procedimiento es conocido como “cuchareo” (Guillén, 2021) y se debe a la densidad de la grasa de leche, por ser inferior a los otros componentes se mantiene en la parte superior lo que facilita su recolección por medio de un cucharón, sin embargo, este tipo de proceso requiere una mayor manipulación por parte del artesano lo que conlleva mayor riesgo de contaminación, algunos productores prefieren la centrifugación mediante el uso de una descremadora eléctrica, con esto se obtiene un mayor porcentaje de producto, además, la descremadora tiene la función de clarificar y depurar la crema eliminando posibles impurezas del producto, agregado de que esta metodología da como resultado un producto con menor carga microbiológica. Por último, se refrigera a 2 °C para mejorar su consistencia (Castillo, 2016).

4. Microbiología

La leche de forma inherente contiene microorganismos por el hecho de ser extraída de la vaca, pero además puede contaminarse durante los múltiples procesos a los que es sometida antes de ser consumida. Por ello la importancia de las adecuadas prácticas sanitarias para evitar la contaminación de la leche con microorganismos patógenos y así obtener un bajo contenido bacteriano que se verá reflejado en una mejor conservación de la leche. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en la leche son patógenos o de deterioro, existen también algunas clases que proporcionan beneficios como lo son las bacterias del ácido láctico (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*), bacterias de proteólisis y cuajada de la leche (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *S. liquefaciens*) y los microorganismos específicos para la elaboración de queso (*S. thermophilus*, *L. lactis*), para el queso fresco no se requiere de otros microorganismos, en comparación con otros quesos que requieren un proceso de curación en el que bacterias o mohos específicos intervienen en su olor, sabor y conservación (Boor, Wiedmann, Murphy, & Alcaine, 2017).

Para determinar la inocuidad microbiológica de los alimentos en Guatemala se utiliza el Reglamento Técnico Centroamericano [RTCA] 67.04.50:17 ICS 67.050 1ra revisión, el cual tiene como objeto “establecer los parámetros microbiológicos de la inocuidad de los alimentos y sus límites de aceptación para el registro sanitario y la vigilancia en los puntos de comercialización” (RTCA, 2018).

Para verificar si un alimento cumple con los parámetros establecidos por el RTCA se deben analizar una serie de criterios microbiológicos de inocuidad que definen la aceptabilidad de un producto basado en la ausencia o en la cantidad de microorganismos por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote. Con el objetivo de priorizar los análisis microbiológicos, basados en la probabilidad que estos pueden causar un daño a la salud, se clasifican en tipos, siendo la crema y el queso alimentos tipo A: “que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tiene una alta probabilidad de causar daño a la salud” (RTCA, 2018).

Los microorganismos utilizados como parámetros de los criterios microbiológicos de inocuidad para la crema y el queso son: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (RTCA, 2018).

5. Peligros para la salud del consumidor

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un problema de salud pública que también repercute económicamente en las naciones. Son más de 250 enfermedades que se transmiten a través de los alimentos y su incidencia va en aumento debido a la globalización del mercado de alimentos, las nuevas formas de transmisión y el incremento de la resistencia bacteriana. Las infecciones humanas causadas por diferentes agentes patógenos, entre ellos *Escherichia coli* patogénica, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, son causantes de un gran número de muertes a nivel mundial (Palomino, González, Pérez & Aguilar, 2018).

Así como cualquier otro tipo de alimento, la leche y los productos lácteos pueden provocar enfermedades. En el sector lechero los peligros microbiológicos son un importante problema de inocuidad y más siendo la leche un medio ideal para el crecimiento bacteriano. Son diferentes los factores que pueden afectar la calidad de la leche, no solamente los peligros microbiológicos, sino también peligros químicos por los aditivos, detergentes utilizados en el equipo, desinfectantes para los pezones de las vacas, antiparasitarios, antibióticos, herbicidas, plaguicidas y fungicidas. Además de las diferentes zoonosis que pueden ser transmitidas por las vacas enfermas, las más comunes relacionadas con el consumo de la leche son: listeriosis, salmonelosis, brucelosis, tuberculosis y leptospirosis (FAO, 2021).

6. El sector lácteo en Guatemala

Según el ministerio de economía de Guatemala la tendencia para los años 2018-2022 en la proyección de ventas de queso sin procesar es 0.6% mayor al porcentaje de

ventas del queso procesado (anexo 2). Para el año 2017, la distribución de ventas de queso al por menor tuvo un porcentaje del 98.9% de los cuales el 83.7% son ventas por canal tradicional, es decir, mercados y tiendas de barrio (Ministerio de Economía, 2019).

En estudios realizados por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá - INCAP- demostró que el 65% de la leche producida en un año era vendida en forma de leche fluida y cruda, el resto era procesada por pequeñas empresas artesanales, que en su mayoría forman parte del sector informal de economía, empleando personal sin capacitación formal y comercializando la mayor parte del producto en la ciudad de Guatemala y sus municipios, como Villa Nueva (De León, Campos, & Díaz, 2016)

B. Parámetros microbiológicos

1. Escherichia coli

Forma parte de la familia de enterobacterias, se clasifica como bacteria Gram negativo aerobia facultativa y se replica rápidamente en condiciones óptimas de crecimiento. El tracto intestinal de los seres humanos es parte de su hábitat y llega al medio ambiente a través de las heces o los efluentes de aguas residuales. Por ello, la presencia de este microorganismo en agua o alimentos es indicador de contaminación fecal (Jing, y otros, 2017).

Son diferentes los factores que influyen en el crecimiento y la supervivencia de este microorganismo. La temperatura es el factor más importante, dentro del tracto intestinal crece a 36-40 °C mientras que en el medio ambiente puede sobrevivir a una temperatura menor de 30 °C. La disponibilidad de agua es fundamental para el crecimiento, por ello, en ambientes húmedos la concentración de *E. coli* puede ser mayor. Respecto a la disponibilidad de nutrientes, *E. coli* tiene la versatilidad en la adquisición de energía, puede degradar varios tipos de sustratos de carbono y absorberlo eficientemente de diferentes fuentes (Jang, y otros, 2017).

2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un patógeno transmitido por los alimentos causante de listeriosis, que en personas inmunodeprimidas es altamente letal. Este microorganismo también puede provocar otras enfermedades como septicemia, meningitis e infección fetal, también es conocido por causar aborto en mujeres embarazadas que se encuentran infectadas. Su transmisión se produce principalmente a través de la ingesta de alimentos contaminados, como la leche y sus derivados, por ejemplo, queso fresco y crema. Otro tipo de transmisión es por el contacto con animales infectados, conocido como zoonosis (Databio, 2016).

Es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, mide de 0.4 a 0.5 x 0.2 a 2 μm , no ramificados, con uno a cinco flagelos peritricos, gracias a estos flagelos *Listeria* presenta una movilidad característica en forma de sombrilla en medio SIM, con una dosis mínima infectiva de 10^7 y 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) en hospedadores sanos, y 0.1 y 10^6 en hospedadores con elevado riesgo de infección. Respecto a su bioquímica, es catalasa positivo, oxidasa negativo, Voges-Proskauer y rojo de metilo positivo, hidrolizan la esculina y el hipurato, pero no la urea ni la gelatina, no produce indol ni ácido sulfhídrico. La fermentación de la maltosa y de la lactosa es variable y lenta (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014).

3. *Salmonella spp.*

La mayoría de las infecciones se adquieren por el consumo de alimentos contaminados, entre ellos, los productos lácteos son los más frecuentes. Este microorganismo se encuentra asociado a enfermedades diarreicas. Su patogenia se basa en la invasión de las células M que se encuentran en el intestino delgado (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014).

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativo, anaerobios facultativos con un tamaño de 0,3 a 1 μm x 1,0 a 6,0 μm . Presenta flagelos peritricos lo que facilita su movilidad. Su metabolismo es fermentativo y oxidativo,

produce ácido y en ocasiones gas al fermentar la glucosa, es catalasa positivo, oxidasa negativo, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen H₂S, ureasas negativo, no desaminan fenilalanina y son tetrionato reductasas. Crecen a un pH entre 6,6 y 8,2, no toleran altas concentraciones de sal y es destruida a las temperaturas de pasteurización de la leche (Parra, Durango & Máttar, 2002).

4. *Staphylococcus aureus*

Forma parte de la microbiota normal de la piel humana y de las superficies de las mucosas. Estos microorganismos pueden sobrevivir en superficies secas y se dispersan con facilidad por partículas de polvo debido a su capa de peptidoglucano. *S. aureus* se disemina de persona a persona, ya sea por contacto directo o por medio de fómites contaminados (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2014). Para los humanos hay 2 especies importantes que son *S. epidermidis*, especie no pigmentada frecuente en la piel y en las membranas mucosas, y *S. aureus*, especie con pigmento amarillo. Ambas son oportunistas. Las infecciones graves por estafilococos se observan en pacientes inmunosuprimidos.

Respecto a la microbiología y bioquímica de *S. aureus*, son cocos Grampositivo, no esporulados de unos 0,8-1,0 µm de diámetro, catalasa positivo, coagulasa positivo, producen leucocidina (proteína que destruye los leucocitos) y enterotoxina A (asociada a enfermedades transmitidas por alimentos). La enterotoxina A es un superantígeno que determina una forma de envenenamiento alimenticio. Al consumir alimentos contaminados, esta toxina estimula las células T ocasionando una respuesta masiva, con resultado de diarrea aguda, pero de corta duración y vómitos por la intoxicación alimenticia (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009).

IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son de las causas más frecuentes de brotes reportados a nivel nacional, en 2018 y 2019 se reportaron 760,043 y 819,403 casos de ETA respectivamente. Estos datos representan unas tasas de 4,390 personas que enfermaron por cada 100,000 habitantes durante el 2018 y 4,632 durante el 2019 con un predominio en su mayoría, en los menores de 5 años, de los cuales el grupo etario más afectado son los infantes de 2 a 11 meses de edad (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social -MSPAS-, 2019a)

El MSPAS en 2019 indicó que la mayor parte de las intoxicaciones alimentarias en el país fueron a causa del consumo de lácteos contaminados (MSPAS, 2019a; MSPAS, 2019b). De los derivados lácteos, el queso y la crema representan el mayor índice de producción y consumo a nivel nacional, según las estadísticas agropecuarias de productos lácteos (MSPAS, 2019c).

La importancia de determinar la presencia o ausencia de microorganismos en queso fresco y crema producidos de forma artesanal y distribuidos en el mercado municipal de Villa Nueva, radica en que la mayoría de las habitantes del país consumen quesos elaborados con leche no pasteurizada y en condiciones higiénicamente precarias por lo que el riesgo de contaminación por bacterias aumenta (MSPAS, 2019b).

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la presencia o ausencia de microorganismos en la crema y el queso fresco distribuidos en el mercado municipal de Villa Nueva, basado en los parámetros establecidos en el RTCA 67.0450:17.

B. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de *Escherichia coli* en crema y queso fresco distribuido en el mercado municipal de Villa Nueva.
2. Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en crema y queso fresco distribuido en el mercado municipal de Villa Nueva.
3. Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en crema y queso fresco distribuido en el mercado municipal de Villa Nueva.
4. Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en crema y queso fresco distribuido en el mercado municipal de Villa Nueva.
5. Establecer si el queso fresco y la crema analizados cumplen con los criterios descritos en el RTCA 67.04.50:17.

VI. HIPÓTESIS

La crema y queso fresco distribuidos en los locales del Mercado Concepción cumplen con los criterios microbiológicos establecidos en el RTCA 67.04.50:17.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Ventas de distribución de productos lácteos al por menor en el Mercado Concepción de Villa Nueva, Guatemala.

B. Muestra

- Crema
- Quesos frescos en sus dos presentaciones, bandeja plástica y hoja de plátano.

C. Materiales

1. *Materiales de campo*

- Computadora portátil
- Impresora
- Hojas papel bond
- Pliegos de papel Kraft
- Cuaderno de anotaciones
- Lapiceros
- Marcadores
- Calculadora
- Hielera
- Hielo
- Bolsas plásticas
- Etiquetas
- Tijeras

2. *Materiales de laboratorio*

- Guantes desechables
- Mascarilla
- Bata

- Portaobjetos
- Erlenmeyer esterilizados de 250 mL y 500 mL
- Cajas de Petri
- Bolsas estériles
- Papel toalla
- Algodón
- Pipetas graduadas y esterilizadas, 1 mL con 0.01 mL de graduación; 5 y 10 mL con 0.1 mL de graduación.
- Varillas de vidrio en L
- Asas de nicromo en argolla y en punta
- Paletas de madera
- Tapones para tubos
- Tubos estériles

3. Equipo de Laboratorio

- Microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X)
- Balanza; capacidad de 120 g, sensibilidad de 0.01g
- Incubadora, 30 y 35 °C
- Refrigeradora de laboratorio, $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Cámara Quebec para conteo de colonias
- Estufa con agitador magnético
- Autoclave
- Campana bacteriológica
- Homogeneizador
- Agitador vortex
- Pinzas

4. Medios y Reactivos

Escherichia coli

- Agua peptonada al 0.1%
- Agar Chromocult® coliformes
- TSI (agar hierro triple azúcar)
- LIA (agar Lisina hierro)

Listeria monocytogenes

- Caldo de enriquecimiento de Listeria (LEB)
- Listeria Agar Ottaviani and Agosti (ALOA)
- Pruebas rápidas Singlepath® L'mono

Salmonella spp

- Caldo de enriquecimiento Salmosyst®
- Tabletas de suplemento de Salmosyst®
- XLD (agar xilosa lisina desoxicolato)
- HE (agar Hektoen entérico)
- SS (*Salmonella-Shigella*)
- TSI (agar hierro triple azúcar)
- LIA (agar lisina hierro)
- Pruebas rápidas Singlepath® *Salmonella*

Staphylococcus aureus

- Agua peptonada al 0.1%
- Agar Baird-Parker
- Agar Manitol sal
- Agar TS (Tripticasa soya)
- Plasma coagulasa con EDTA
- Agua oxigenada
- Reactivos para tinción de Gram

5. Recursos biológicos

- 20 muestras de queso fresco en bandeja plásticas
- 20 muestras de queso fresco en hoja de plátano
- 20 muestras de crema de leche

D. Métodos

1. Toma de muestra

Se realizó 5 muestreos, cada muestreo constó de 4 muestras por producto (queso fresco en hoja, queso fresco en bandeja y crema) de los locales de productos lácteos en el mercado municipal de Villa Nueva (4 locales), siendo 12 muestras por muestreo, obteniendo 60 muestras en total de los 5 muestreos. Las muestras obtenidas fueron transportadas al Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR- donde fueron procesadas y analizadas. A cada muestra se le realizó diferentes análisis microbiológicos evaluando los 4 parámetros descritos en el RTCA 67.04.50:17 (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.), obteniendo un total de 240 análisis.

2. Obtención de datos por análisis microbiológico de muestras

Metodología para la determinación de *Escherichia coli*

Se pesó 25 gramos de muestra y se homogeneizó en 225 mL de agua peptonada buferada, el agua peptonada buferada es un medio de enriquecimiento no selectivo utilizado para diluir muestras de alimentos, contiene peptona de carne, cloruro de sodio y agua, en general, es un medio nutritivo con la capacidad de reparar la viabilidad de bacterias maltratadas, es muy usado para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* y *Salmonella* (Gil, 2019). Se realizó diluciones (1:10, 1:100 y 1:1,000) y a partir de ellas se inoculó 1 mL en placas con agar Chromocult coliformes, este medio contiene sales biliares y propionato que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivo y microorganismos acompañantes; la detección de *E. coli* es mediante la combinación de los sustratos cromogénicos: Salmon β -D-GAL que se escinde por la β -D-galactosidasa (característico de los coliformes) y el sustrato X- β -D-glucorónido que se escinde por la enzima β -D-

glucoronidasa (característica de *E. coli*) produciendo una coloración violeta oscuro. Se inoculó el medio mediante el método de vertido, se trabajó por duplicado agregando 1 mL de cada dilución a cada caja de Petri, luego se agregó el medio. Se incubó por 24 horas a 35 °C aeróbicamente. Se reportó el recuento de colonias características y se realizaron los cálculos para cada placa (Merck, 2010).

Metodología para la determinación de *S. aureus*

Se pesó 25 gramos de muestra y se homogeneizó en 225 ml de agua peptonada estéril (APE) al 0.1%. Se realizó diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) y por cada dilución se transfirió 0.5 mL de suspensión a una caja de agar Baird Parker, se esparció la muestra con una varilla en L, se realizó la siembra de cada dilución por duplicado. Se incubó 48 horas a 37 °C aeróbicamente. Este medio contiene cloruro de litio y telurito que inhibe el crecimiento de microbiota acompañante, mientras que el piruvato y la glicina estimula selectivamente el crecimiento de *Staphylococcus*. Las colonias características de *Staphylococcus* se observan opacas debido a la yema de huevo, se forma un halo alrededor de ellas por la lipólisis y proteólisis producidas por las lipasas y proteasas, la reducción de telurito a telurio produce colonias de un color negro en las colonias. Las colonias sospechosas se sembraron en manitol sal, medio apto solo para microorganismos tolerantes a la sal, como *Staphylococcus*, la degradación del manitol a ácido se evidencia con un cambio de color del medio de rojo a amarillo (Merck, 2010). Se sembraron las muestras de las placas positivas de manitol sal en agar TS (Tripticasa Soya) para realizar las pruebas confirmatorias: catalasa, coagulasa y Gram. La prueba de catalasa se utiliza para confirmar que el microorganismo sospechoso posea la enzima catalasa la cual se evidencia al convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba de coagulasa permite diferenciar a *S. aureus* de otros *Staphylococcus*, se basa en evidenciar la capacidad de producir la enzima extracelular que coagule el plasma y se realiza inoculando la muestra en 0.5 mL de plasma. Por último, en el Gram se observa bacterias Gram positivo con un diámetro de 0.5 a 1.5 μ . La agrupación de las bacterias es en forma de racimos de uvas (Zendejas, Avalos, & Soto, 2014).

Metodología para la determinación de *L. monocytogenes*

Se pesó 25 gramos de muestra y se homogeneizó en 225 mL de caldo LEB (Listeria Enrichment Broth), se incubó 48 horas a 30°C aeróbicamente. Luego, se pipeteó 0.1 mL del caldo en agar ALOA (Listeria Agar Ottaviani and Agosti) y se realizó el estriado para la identificación de las colonias. ALOA es un medio selectivo para el aislamiento de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. en alimentos. Contiene el compuesto cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosas, el cual detecta la β -glucosidasa, enzima común en *Listeria*. Las colonias se observan de un color verdeazuladas, en el caso de *L. monocytogenes* se observa un halo opaco alrededor de la colonia (Merck, 2010).

Metodología para la determinación de *Salmonella* spp.

Se pesó 25 gramos de muestra y se homogeneizó en 225 mL de caldo Salmosyst®. Se incubó por 6 – 8 horas a 35 °C. Se transfirió 10 mL del cultivo a tubos estériles, estos tubos fueron el preenriquecimiento de la muestra. Luego, se agregó una tableta de suplemento Salmosyst® a los tubos de preenriquecimiento y se dejó reposar por 30 minutos. Se agitó vigorosamente y se incubó por 18 – 22 horas a 35 °C. Esto fue el enriquecimiento de la muestra. Pasado el tiempo de incubación se estrió en agar XLD (xilosa, lisina y desoxicolato) y en Hektoen. En el medio XLD la degradación de la xilosa, lactosa y sacarosa acidifica el medio provocando que el indicador rojo de fenol vire su color a amarillo, *Salmonella* no es capaz de lograr este viraje por lo que el medio permanece sin cambio de color cuando este microorganismo está presente. El sulfuro está indicado por el tiosulfato y la sal de hierro (III), que reaccionan para formar un precipitado de sulfuro de hierro negro en las colonias. Las colonias de *Salmonella* se observan translúcidas, a veces se observa con un centro negro. En comparación con otros medios de cultivo, Hektoen tiene la ventaja de dar altos rendimientos en el crecimiento de *Salmonella* e inhibir los microorganismos acompañantes. La presencia de sulfuro se evidencia por un color negro en las colonias el cual se produce por el indicador de tiosulfato y sal de hierro. La mezcla de sales biliares inhibe el crecimiento de la mayoría de los microorganismos acompañantes. Las colonias de *Salmonella* se observan de un color azul verdoso, con o sin centro negro (Merck, 2010).

Las colonias sospechosas en los medios de cultivo XLD y Hektoen se confirmaron por medio de pruebas bioquímicas, en este caso se utilizó tubos de TSI (triple azúcar hierro), LIA (Lisina descarboxilasa) y pruebas rápidas Singlepath® *Salmonella*. En los tubos de TSI la degradación del azúcar acompañado de la producción de ácido es detectada por el indicador de pH rojo de fenol, el cual cambia su color de rojo-anaranjado a amarillo. En alcalinización este medio conserva su color. El tiosulfato es reducido a sulfuro de hidrógeno por diferentes especies de bacterias, el sulfuro de hidrógeno reacciona con la sal de hierro para dar sulfuro de hierro negro. Para pruebas positivas de *Salmonella* se espera un tubo con fondo color amarillo o negro, indicativo que fermentó la glucosa y además produjo H₂S, la superficie sin cambio de color (permanecerá de color rojo) debido a que *Salmonella* no fermenta lactosa ni sacarosa (Merck, 2010). La prueba de LIA es útil para diferenciar microorganismos, en especial *Salmonella*, por descarboxilación/desaminación de lisina y producción de ácido sulfhídrico. Por medio del indicador de azul de bromocresol se observa un cambio de color a amarillo cuando se acidifica el medio y permanecerá violeta en condiciones básicas. Las cepas típicas de *Salmonella* producen un fondo alcalino (violeta) y en la mayoría de los casos producción de H₂S (International Standard, 2002). Las pruebas rápidas Singlepath® *Salmonella*, son pruebas de detección inmunológica realizada a partir de un cultivo enriquecido y selectivo. Es una prueba inmunocromatográfica basada en anticuerpos marcados con oro. Es un dispositivo de flujo lateral de un solo paso, el cual proporciona el resultado de presencia / ausencia dentro de los 20 minutos posteriores al enriquecimiento de la muestra (Millipore Sigma, 2021).

3. Análisis estadístico

Este estudio se trabajó con una muestra total de 20 productos por tipo de derivado lácteo analizado (queso fresco en hoja, queso fresco en bandeja y crema). De los cuales, en su mayoría, no cumplieron con los límites establecidos en el RTCA. De las muestras de queso fresco en hoja 15 muestras no cumplieron, de queso en bandeja plástica 19 muestras no cumplieron y de crema todas las muestras no cumplieron con los parámetros de calidad microbiológicos. Con los resultados obtenidos se realizó el análisis de prueba de hipótesis binomial, con un diseño de muestreo probabilístico o aleatorio lo que significa que “la

probabilidad de selección de un sujeto a estudio “x” es independiente de la probabilidad que tienen el resto de los sujetos que forman parte de la población blanco” (Otzen & Manterola, 2017). Para esta investigación la hipótesis nula y alterna tienen una probabilidad esperada del 50% de ser aceptada o rechazada. Siendo la hipótesis nula con una $p = 0.5$, es decir, no se cumple con los parámetros de calidad que establece el RTCA según el tipo de alimento analizado. La hipótesis alterna con una $p > 0.5$ indica que se cumple con los parámetros de calidad en más del 50%, no aleatoriamente. Se realizó el cálculo del valor de p usando la distribución binomial.

VIII. RESULTADOS

En este estudio se evaluó la carga bacteriológica del queso y la crema artesanal que se vende en el Mercado Municipal de Villa Nueva. Se realizaron 5 muestreos, cada muestreo consistió en 4 muestras por producto más vendido (queso fresco en hoja de plátano, queso fresco en bandeja plástica y crema) siendo un total de 12 muestras por muestreo, a cada muestra se le realizó las pruebas necesarias para la determinación de los 4 parámetros descritos en el RTCA 67.04.50:17, los cuales son: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*. Realizando 48 análisis por muestreo, finalizando el estudio con un total de 240 análisis.

Por medio de pruebas confirmatorias (catalasa, coagulasa y Gram) se confirmó la presencia o ausencia de *S. aureus* en las muestras donde se obtuvo un crecimiento de los tubos de inoculación inicial y de los medios de Baird Parker.

Para los parámetros de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. según el RTCA se reporta como presencia o ausencia dependiendo si se aisló las bacterias antes mencionadas en los 25 gramos de muestra evaluados. En este estudio no se aisló *Listeria monocytogenes* ni *Salmonella* spp., reportando como ausencia para los análisis realizados al queso fresco en hoja de plátano, queso fresco en bandeja plástica y crema.

En el primer muestreo (Tabla 1), 1 de las 12 muestras analizadas cumplieron con los límites permitidos para los cuatro parámetros que evalúa el RTCA, en la cual se obtuvo valores menores a 100 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) para el queso fresco y valores menores a 10 UFC/g para la crema respecto a la determinación de *S. aureus*, valores menores a 10 UFC/g para *E. coli* y ausencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. en las muestras de queso fresco y crema. El parámetro de *E. coli* fue el que presentó la mayor cantidad de UFC/g, obteniendo hasta 7.2×10^4 UFC/g. El 33% (4 de 12) de las muestras analizadas para *S. aureus* y el

100% (12 de 12) de las muestras analizadas para *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. cumplieron con los límites establecidos en el RTCA para el queso fresco y la crema.

Tabla 1. Primer muestreo

Tipo de muestra	Parámetro				Criterio ¹
	<i>E. coli</i> [UFC/g]	<i>S. aureus</i> [UFC/g]	<i>L. monocytogenes</i> [por cada 25g]	<i>Salmonella</i> spp. [por cada 25g]	
Queso en hoja de plátano	250	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	250	250	Ausencia	Ausencia	NC
	<10	<10	Ausencia	Ausencia	C
	250	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Queso en bandeja plástica	7.3 x10 ³	2.5 x10 ³	Ausencia	Ausencia	NC
	3.4 x10 ⁴	2.5 x10 ³	Ausencia	Ausencia	NC
	6.0 x10 ⁴	2.5 x10 ³	Ausencia	Ausencia	NC
	6 x10 ³	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Crema	250	240	Ausencia	Ausencia	NC
	250	240	Ausencia	Ausencia	NC
	1.1 x10 ³	240	Ausencia	Ausencia	NC
	7.0 x10 ⁴	240	Ausencia	Ausencia	NC

¹El criterio se cataloga como: Cumple (C) o No Cumple (NC); ver anexo no. 3.

Fuente: Datos obtenidos en fase experimental en el Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, USAC.

El segundo muestreo (Tabla 2) no cumplió con los criterios microbiológicos para el registro sanitario (anexo 3) descritos en el RTCA, esto debido a los valores de *E. coli*, de los cuales, las 12 muestras analizadas superaron los límites establecidos en el RTCA, con valores desde 3.6x10³ hasta mayores de 5.7x10⁶. Para el parámetro de *S. aureus* 9 de las 12 muestras analizadas presentaron valores dentro de los límites (100 UFC/g para quesos frescos y 10 UFC/g para crema). Por último, no se obtuvo crecimiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. por lo que se reportó como ausencia en los 25 gramos de muestra analizados. Es importante enfatizar que para que una muestra pueda ser considerada microbiológicamente aceptable bajo el RTCA, esta debe cumplir los cuatro parámetros, es decir, tanto los resultados de *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. deben presentar recuentos de carga microbiológica

menores o igual al límite permitido, de lo contrario, la muestra se rechaza en su totalidad. Como lo que se observa en la tabla 2, que a pesar de que los resultados obtenidos para *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. se encuentran, en su mayoría, dentro de los límites, estas muestras presentan altas cargas microbiológicas de *E. coli*, por lo que se rechaza en su totalidad los análisis realizados a esa muestra, reportando bajo el criterio de “no cumple” que según el RTCA (anexo 3) se considera inaceptable cuando la muestra de alimento supera los límites permitidos para cada parámetro evaluado según el subgrupo de alimento al que pertenece, es decir, no cumplió con el criterio microbiológico de inocuidad.

Tabla 2. Segundo muestreo

Tipo de muestra	Parámetro				Criterio ¹
	<i>E. coli</i> [UFC/g]	<i>S. aureus</i> [UFC/g]	<i>L. monocytogenes</i> [por cada 25g]	<i>Salmonella</i> spp. [por cada 25g]	
Queso en hoja de plátano	>5.7x10 ⁶	240	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	240	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ⁴	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Queso en bandeja plástica	4.1x10 ⁴	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	3.6x10 ³	240	Ausencia	Ausencia	NC
	4x10 ³	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Crema	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC

¹El criterio se cataloga como: Cumple (C) o No Cumple (NC); ver anexo no. 3.

Fuente: Datos obtenidos en fase experimental en el Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, USAC.

Para el tercer muestreo realizado (Tabla 3), 1 de las 12 muestras analizadas cumplió con los criterios microbiológicos para el registro sanitario (anexo 3), siendo la muestra de queso fresco en hoja de plátano. *E. coli* presentó los mayores valores de UFC/g (>5.7x10⁶) en 3 de las 12 muestras analizadas, seguido por *S. aureus* (1.2x10³), por último, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. no presentaron crecimiento de dichos microorganismos por lo que se reportó como ausencia.

Tabla 3. Tercer muestreo

Tipo de muestra	Parámetro				Criterio ¹
	<i>E. coli</i> [UFC/g]	<i>S. aureus</i> [UFC/g]	<i>L. monocytogenes</i> [por cada 25g]	<i>Salmonella spp.</i> [por cada 25g]	
Queso en hoja de plátano	>5.7x10 ⁶	240	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ³	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	<10	<10	Ausencia	Ausencia	C
	<10	460	Ausencia	Ausencia	NC
Queso en bandeja plástica	1.9x10 ⁵	43	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	240	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	2.9x10 ⁴	93	Ausencia	Ausencia	NC
Crema	2.5x10 ³	23	Ausencia	Ausencia	NC
	2.0 x10 ⁴	23	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ³	1.2x10 ³	Ausencia	Ausencia	NC
	1.4x10 ⁵	23	Ausencia	Ausencia	NC

¹El criterio se cataloga como: Cumple (C) o No Cumple (NC); ver anexo no. 3.

Fuente: Datos obtenidos en fase experimental en el Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, USAC.

En el cuarto muestreo (Tabla 4), 2 de 12 muestras analizadas cumplieron con los criterios microbiológicos para el registro sanitario, siendo éstas pertenecientes al tipo de queso fresco en hoja de plátano, sin embargo, 2 de 4 muestras de este tipo presentaron valores mayores de 5.7x10⁶ UFC/g para el parámetro de *E. coli*, no obstante, éstas sí cumplieron con los límites para *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* Respecto a las muestras de queso fresco en bandeja plástica las 4 muestras presentaron valores mayores a 1.2x10⁴UFC/g para el parámetro de *E. coli*, de las cuales, una presentó un valor de 240 UFC/g para el parámetro de *S. aureus*, siendo estos valores superiores a los límites establecidos por el RTCA para dichos parámetros. En este muestreo no se aisló *L. monocytogenes* ni *Salmonella spp.* por lo que se reportó como ausencia.

Tabla 4. Cuarto muestreo

Tipo de muestra	Parámetro				Criterio ¹
	<i>E. coli</i> [UFC/g]	<i>S. aureus</i> [UFC/g]	<i>L. monocytogenes</i> [por cada 25g]	<i>Salmonella spp.</i> [por cada 25g]	
Queso en hoja de plátano	<10	<10	Ausencia	Ausencia	C
	<10	<10	Ausencia	Ausencia	C
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Queso en bandeja plástica	2.5x10 ³	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ⁴	240	Ausencia	Ausencia	NC
	1.2 x10 ⁴	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	5.1x10 ⁴	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Crema	2.5x10 ⁴	23	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ⁴	23	Ausencia	Ausencia	NC
	250	1.2x10 ³	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ⁴	<10	Ausencia	Ausencia	NC

¹El criterio se cataloga como: Cumple (C) o No Cumple (NC); ver anexo no. 3.

Fuente: Datos obtenidos en fase experimental en el Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, USAC.

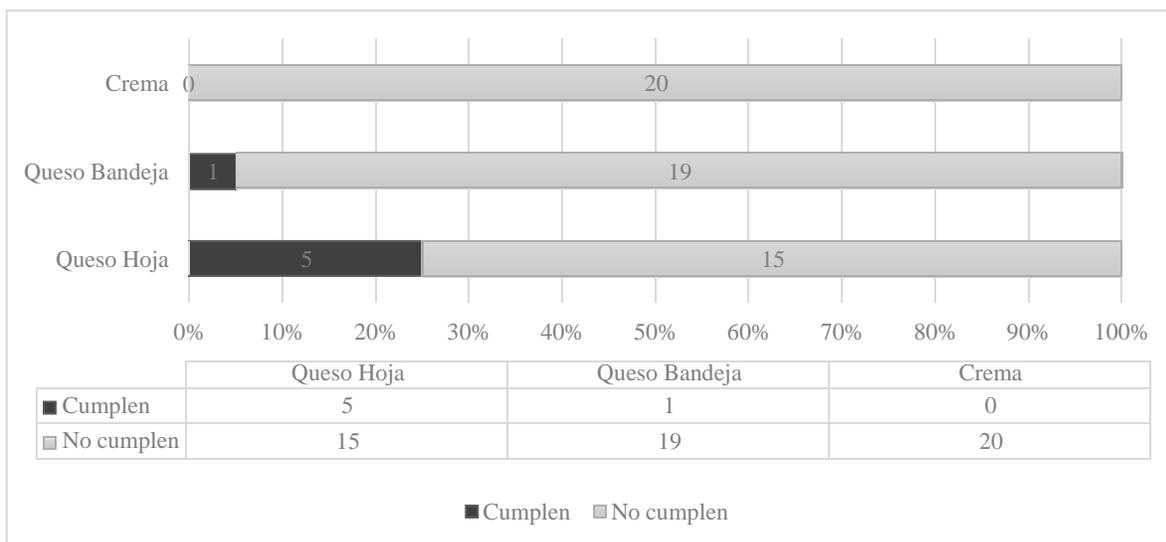
En el quinto muestreo (Tabla 5), 3 de las 12 muestras analizadas cumplieron con los límites establecidos, siendo dos muestras del tipo queso fresco en hoja de plátano y una muestra de queso fresco en bandeja plástica. *E. coli* fue el parámetro microbiológico con los mayores resultados de UFC/g presentando valores mayores de 5.7x10⁶, la presencia de *E. coli* durante este estudio fue recurrente en los cinco muestreos, seguido de la presencia de *S. aureus*, aunque en una menor proporción. En el quinto muestreo 9 de 12 muestras (75%) cumplieron con los límites establecidos por el RTCA, siendo las muestras de crema las que presentaron una mayor cantidad de UFC/g con valores superiores al límite permitido. Los resultados obtenidos para *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* fueron consistentes en todo el estudio, obteniendo ausencia en la determinación de estos microorganismos.

Tabla 5. Quinto muestreo

Tipo de muestra	Parámetro				Criterio ¹
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp.</i>	
	[UFC/g]	[UFC/g]	[por cada 25g]	[por cada 25g]	
Queso en hoja de plátano	<10	<10	Ausencia	Ausencia	C
	>5.7x10 ⁶	23	Ausencia	Ausencia	NC
	<10	<10	Ausencia	Ausencia	C
	>5.7x10 ⁶	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Queso en bandeja plástica	<10	93	Ausencia	Ausencia	C
	320	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	6.4x10 ²	<10	Ausencia	Ausencia	NC
	4.7x10 ⁴	<10	Ausencia	Ausencia	NC
Crema	7.2 x10 ⁴	240	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ³	23	Ausencia	Ausencia	NC
	>5.7x10 ⁶	23	Ausencia	Ausencia	NC
	2.5x10 ⁴	<10	Ausencia	Ausencia	NC

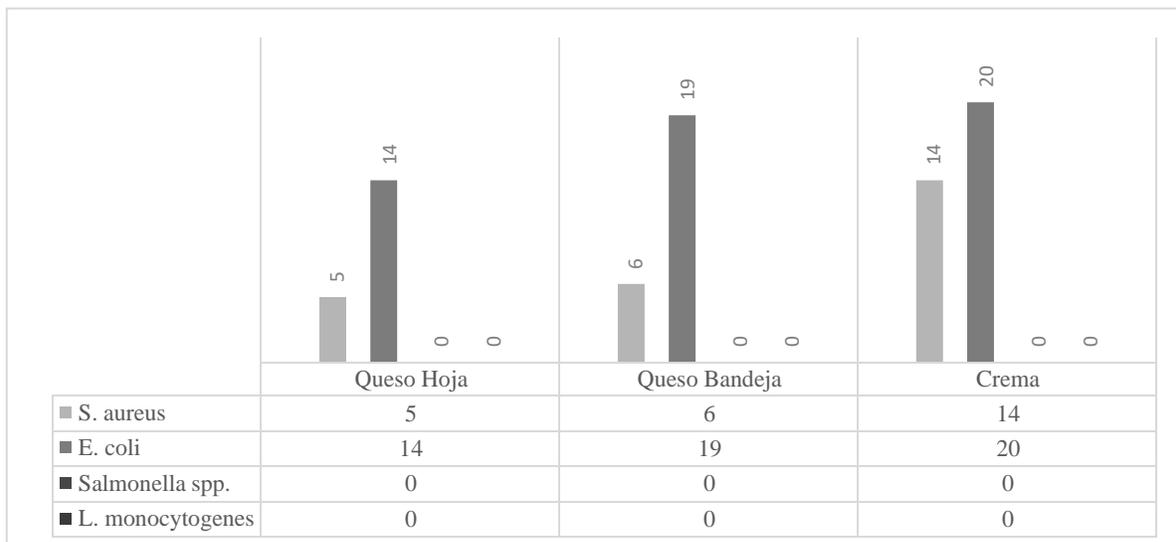
¹El criterio se cataloga como: Cumple (C) o No Cumple (NC); ver anexo no. 3.

Fuente: Datos obtenidos en fase experimental en el Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, USAC.



Gráfica 1. Cumplimiento del Reglamento Técnico Centroamericano según tipo de producto.

Al realizar el análisis de resultados agrupando por el tipo de producto (gráfica 1), la crema fue la que presentó el menor número de muestras que cumplieron (0%), seguido del queso en bandeja (5%) y el queso en hoja (25%).



Gráfica 2. Incumplimiento del Reglamento Técnico Centroamericano según tipo de microorganismo.

El incumplimiento por producto se debe a los resultados obtenidos de *E. coli* en cada muestra (gráfica 2), los cuales fueron de 14 para el queso en hoja, 19 para el queso en bandeja y 20 para la crema.

Con base en el número de ensayos que cumplieron el reglamento, la prueba de hipótesis binomial indicó que ningún producto cumple significativamente, en la gráfica 1 se indican los resultados para queso en hoja ($p = 0.979$), queso en bandeja ($p > 0.999$) y crema ($p > 0.999$), los tres valores de p fueron mayores de 0.05 por lo que no se rechazó la hipótesis nula.

IX. DISCUSIÓN

En las tablas 1.6 y 1.9 del RTCA 67.04.50:17 (Anexo 3) pertenecientes al grupo 1 de leche y productos lácteos, y subgrupos de alimentos crema ácida y queso fresco, respectivamente, se clasifican estos alimentos en el tipo A, lo que significa que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la va que dirigida, tiene una alta probabilidad de causar daño. El objetivo de clasificar los alimentos es para priorizar los análisis microbiológicos para el registro y la vigilancia de estos. Los análisis microbiológicos realizados en estos alimentos fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. (RTCA, 2018).

En general, el microorganismo con mayor incidencia durante este estudio fue *E. coli*, el cual fue aislado en el 87% del total de las repeticiones realizadas, en este microorganismo se observó una mayor tendencia en la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de alimento (UFC/g), con valores mayores de 5.7×10^6 , seguido de *S. aureus*, aislado en un 42% del total de las repeticiones, con una tendencia de hasta 2.5×10^6 UFC/g, en comparación con los microorganismo *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. los cuales no se aislaron en ninguno de los muestreos realizados (gráfica 1 y 2).

Respecto al aislamiento de *E. coli*, en el primer muestreo (tabla 1), las muestras de crema presentaron la mayor cantidad de UFC/g (7.0×10^4), seguido de las muestras de queso fresco en bandeja plástica con valores de 6.0×10^4 UFC/g. En el segundo muestreo (tabla 2), se encontraron valores mayores a 3.6×10^3 UFC/g en todas las muestras, por lo que se rechazó el resto de los análisis realizados debido a que este muestreo no cumplió con los criterios microbiológicos para el registro sanitario descritos en el RTCA (anexo 3). En el tercer muestreo (tabla 3), en los tres productos analizados se encontraron muestras con valores mayores a 2.5×10^3 , de las 12 muestras analizadas solamente 2(17%) cumplieron con los límites establecidos. El cuarto muestreo (tabla 4) se reportó el queso fresco en hoja de plátano con la mayor cantidad de UFC/g ($>5.7 \times 10^6$) en 2 de las 4 muestras analizadas,

mientras que en el queso fresco en bandeja plástica y en la crema, en su mayoría, presentaron valores de 2.5×10^3 UFC/g. En el quinto muestreo el 17% cumplió con los límites establecidos para la determinación de *E. coli* siendo las muestras de crema las que presentaron la mayor cantidad de muestras que no cumplen con los límites, seguido de las muestras del tipo queso fresco en bandeja plástica.

La presencia de *E. coli* es indicativo de contaminación fecal, por lo que se relaciona tanto fisiológica como taxonómicamente con microorganismos patógenos de dicho origen. Las ventas o locales de lácteos del Mercado Concepción utilizan como método de conservación la refrigeración, los locales se encuentran separados entre sí por paredes y todos los locales se encuentran en el área de comedores. Estas son algunas de las fortalezas detectadas para estos puntos de ventas, en otras investigaciones que han sido realizadas en los mercados es común que entre los puntos críticos observados es la mala conservación de los alimentos debido a que estos son expuestos a temperatura ambiente para poder ser visualizados por los compradores, la mala distribución de los locales dentro del mercado y la presencia de diferentes tipos de animales como perros, gatos, ratas y cucarachas, los cuales son transportadores de enfermedades y microorganismos.

La alta contaminación por *S. aureus* se debe a varios factores, entre ellos la mala higiene, manipulación desde el ordeño y conservación de la leche, la nula o deficiente pasteurización, y los procedimientos de elaboración, transporte y comercialización de los derivados lácteos. *S. aureus* es destruido a altas temperaturas, como las utilizadas durante la cuajada durante la elaboración de los quesos frescos, sin embargo, las condiciones precarias durante la producción artesanal son causantes de la contaminación por *S. aureus* posterior al periodo de cocción de la cuajada (Pérez, 2014). Para este estudio no se tomó en consideración los posibles puntos de contaminación como variables de exclusión/inclusión, sino que se adquirieron los productos como consumidor final, es decir, de una manera aleatorizada y sin influir en la elección del producto adquirido, evaluando el producto terminado que consume la población que adquiere estos tipos de productos lácteos en el Mercado Concepción de Villa Nueva.

Para la determinación de *S. aureus*, se realizó las pruebas confirmatorias: Gram (positivo), catalasa (positivo), coagulasa (positivo) y manitol sal (viraje de rojo a amarillo), a las muestras que presentaron crecimiento en el medio de cultivo Baird Parker. La identificación de *S. aureus* en Baird Parker es el estándar de oro, este medio de cultivo contiene emulsión de telurito yema de huevo, el cual es necesario para el buen crecimiento de las cepas de *S. aureus*, quienes reducirán el telurito a telurio provocando una coloración de color negro, característico de las colonias de estafilococos en este medio de cultivo. Además, en este medio se puede observar la proteólisis de las proteínas de la yema de huevo, lo que da como resultado un halo transparente alrededor de la colonia, característico y específico de las cepas de *Staphylococcus aureus* (Rakotovao, Randriatsarafara, Milasoanjara, & Ranaiivosoa, 2019).

Del total de las muestras analizadas en este estudio, del tipo queso fresco en hoja de plátano el 70% fueron resultados negativos, queso fresco en bandeja plástica el 55% fueron resultados negativos y de crema el 30% fueron resultados negativos. El primer y quinto muestreo (tabla 1 y 5) fueron los que presentaron la mayor cantidad de muestras dentro de los límites permitidos (<100 UFC/g para queso fresco y <10 UFC/g para crema), en comparación con el segundo, tercer y cuarto muestreo (tabla 2,3 y 4) que presentaron la menor cantidad de muestras que cumplían con el límite.

Sobre los análisis realizados en las muestras para la determinación de *Listeria monocytogenes* los resultados fueron ausencia del microorganismo en los 25 gramos de muestra analizados (tabla 1, 2, 3, 4 y 5). A pesar de que en este estudio no se aisló *L. monocytogenes* no se puede descartar su presencia en el establecimiento u otros sitios de muestreo no evaluados, ya que es una bacteria muy resistente, ubicua, que sobrevive y se multiplica en ambientes poco favorables como las bajas temperaturas de la refrigeración, condiciones de acidez y salinidad, y en ambientes con escasez de oxígeno. Por lo que es sumamente importante las correctas prácticas de higiene y

manipulación a lo largo de todo el proceso de elaboración, transporte y comercialización del queso fresco y la crema (De León, Campos, & Díaz, 2016). En Guatemala, el nivel de tolerancia para los alimentos que requieren la determinación de *L. monocytogenes* de cero, por lo que, respecto a esta determinación, el queso fresco y crema que se expenden en el Mercado Concepción de Villa Nueva cumple con este parámetro, sin embargo, basado en el RTCA para el queso fresco y crema es necesario que cumpla con los límites establecidos para todos los parámetros evaluados.

Por último, sobre la determinación de *Salmonella* spp. el resultado reportado fue ausencia en los 25 gramos de muestra analizada (tabla 1, 2, 3, 4 y 5), este microorganismo no se aisló en ninguno de los muestreos realizados, sin embargo, estos quesos siguen siendo un riesgo para la salud del consumidor por los resultados positivos de microorganismos indicadores de contaminación, por lo que no se puede descartar la presencia de otros microorganismos causantes de infecciones intestinales (Velasquez, 2008). Además, la microbiota presente en el queso fresco y la crema permite la diversidad de microorganismos, tanto beneficiosos como patógenos. Los microorganismos beneficiosos o también llamados probióticos ejercen una acción positiva sobre el consumidor. Los patógenos producirán enfermedades y son un riesgo para el consumidor, así mismo, causan un rápido deterioro del alimento (Merchán, Pineda, Cárdena, & González, 2018).

En Latinoamérica se estima que los patógenos más frecuentes en el queso fresco son *S. aureus* (43.71%) y *E. coli* (18.51%), y los menos frecuentes son *L. monocytogenes* (16.26%), *Salmonella* spp. (11.66%) y *Clostridium perfringens* (8.37%). *C. perfringens* es un patógeno anaerobio que suele aislarse del agua, del suelo, del polvo y de los alimentos, según otras investigaciones realizadas, la prevalencia de este microorganismo en queso fresco es escasa, sin embargo, también se ha reportado entre los principales microorganismos causantes de brotes (Merchán, Pineda, Cárdena, & González, 2018).

El análisis de calidad de cada producto evaluado en esta investigación se basó

en el cumplimiento de los cuatro parámetros establecidos en el RTCA, según el tipo de alimento evaluado. Se evaluó el éxito o fracaso de cada repetición, considerando éxito al cumplimiento del reglamento en su totalidad, siendo del 25% para el queso de hoja, 5% para el queso en bandeja y del 0% para la crema (gráfica 1). La mayor parte de las muestras fueron rechazadas debido a la cantidad de UFC/g de *E. coli*, microorganismo presente en la mayoría de las muestras, datos que se confirman en la gráfica de incumplimiento del reglamento según microorganismo (gráfica 2), en el cual se evidencia que este microorganismo estaba presente en el 70% de las muestras de queso de hoja, 95% de las muestras de queso de bandeja y 100% de las muestras de crema.

Se obtuvo una $p > 0.05$ para cada producto analizado, por lo que se concluye que no se cumple con los parámetros de calidad microbiológicos evaluados para cada producto, ya que el cumplimiento se da en forma aleatoria o no mayor al 50%. Los resultados estadísticos obtenidos demuestran el incumplimiento del reglamento respecto a las muestras analizadas, por lo que la crema y queso fresco distribuidos en los locales del Mercado Concepción no cumplen con los criterios microbiológicos establecidos en el RTCA 67.04.50:17.

X. CONCLUSIONES

1. En el 87% de las muestras analizadas se confirmó la presencia de *Escherichia coli*, con resultados mayores a 10 UFC/g, superando el límite permitido en el RTCA.
2. Se aisló *Staphylococcus aureus* en el 42% de las muestras analizadas, con resultados mayores a 10 UFC/g para la crema y mayores a 100 UFC/g para el queso fresco, superando el límite permitido en el RTCA.
3. No se aisló *Listeria monocytogenes*, determinando la ausencia de este microorganismo en las muestras de crema y queso fresco.
4. No se aisló *Salmonella* spp., determinando la ausencia de este microorganismo en las muestras de crema y queso fresco.
5. El queso fresco y la crema distribuidos en el mercado Concepción de Villa Nueva no cumple con los criterios microbiológicos de inocuidad descritos en el RTCA 67.04.50:17.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios en mercados aledaños al mercado Concepción de Villa Nueva para determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en muestras de derivados lácteos.
2. Por medio de las autoridades del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA), realizar evaluaciones microbiológicas que aseguren que la leche utilizada en los derivados lácteos es producida en condiciones libres de contaminación biológica, física o química. Así mismo, que dichas autoridades velen por el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), ordeño, almacenamiento y transporte de las muestras de parte de las plantas o unidades de producción.
3. Crear personal constantemente capacitado sobre las correctas técnicas de trabajo, las BPM, bioseguridad y limpieza.

XII. REFERENCIAS

- Alvarado, T. (2011). *Alimentación y nutrición*. Perú: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.
- Aranceta, J., & Serra, L. (2005). *Leche, lácteos y salud*. España: Medica Panamericana.
- Arispe, M., Callizaya, M., Yana, A., Mendoza, M., Mixto, K., Valdez, B., . . . Torrico, B. (2019). Importance of the general examination of urine, in the preliminary diagnosis of pathologies of renal and systemic urinary routes, in apparently healthy women. *Rev. Cs. Farm y Bioq.* 7(1).
- Boor, K., Wiedmann, M., Murphy, S., & Alcaine, S. (2017). A 100-Year review: Microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science.* 100(12), 9933-9951.
- Castillo, R. (9 de Marzo de 2016). *Derivados Lacteos*. Obtenido de <http://derivadoslacteos.com/crema-de-leche/elaboracion-de-crema-de-leche-pasterizada>
- Cercenado, E., Cantón, R., Morosini, M., & Torres, C. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos*. Seimc.
- Correa, S., & Cortés, F. (2016). *Propuesta de mejora para el proceso de producción de crema de leche en productos naturales de La Sabana Alquería S.A.* Bogotá: Fundación Universidad de América.
- Databio. (2016). *Listeria monocytogenes*. Obtenido de <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Listeria+monocytogenes+2017.pdf/208c08ac-07fb-4d57-8012-dd77d138d9e1?version=1.0&t=1531401632545#:~:text=Listeria%20monocytogenes%20pertenece%20a%20la,temperaturas%20entre%2020%C2%BAC%20y%2025%C2%BAC>.
- De León, A., Campos, L., & Díaz, D. (2016). *Determinación de Listeria monocytogenes en productos lácteos artesanales (queso fresco, crema y requesón) que se expenden en la cabecera departamental de Jutiapa, Guatemala*. Universidad de San Carlos, Guatemala: Seminario de investigación Química Biológica.

- FAO. (2021). *Portal lácteo*. Obtenido de <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/peligros-para-la-salud/es/>
- Gil, M. (2019). *Agua peptonada: fundamento, preparación y usos*. Obtenido de Lifeder: <https://www.lifeder.com/agua-peptonada/>
- Guillén, S. (2021). *Implementación del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control para la mejora de calidad en la producción primaria de leche fresca*. Universidad San Ignacio Loyola, Perú: Tesis Ingeniero Industrial.
- Instituto Nacional de Estadística -INE-. (2018). *XII Censo Nacional de Población y VII de Vivienda 2018*. Obtenido de <https://www.censopoblacion.gt/graficas>
- International Standard ISO 6579. (2002). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the detection of Salmonella spp.* Obtenido de http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf
- Lanchipa, L., & Sosa, Y. (2003). *Evaluación de la carga microbiana patógena en la elaboración del queso fresco en el Distrito de Tacna*. Tesis de graduación, Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. España: Pearson educación.
- Menchú, T., & Alfaro, H. (2012). *Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)*. Organización Panamericana de la Salud (OPS).
- Merck. (2010). *Microbiology Manual*. Alemania.
- Ministerio de Economía. (2019). *Industria de queso fresco en Guatemala*. Obtenido de https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/queso_fresco_en_guatemala_-_kerry.pdf%20Consultado%20el%2015.09.20
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia. (2019a). *Boletín de la semana epidemiológica departamento de epidemiología semana No. 23-2019*. Obtenido de http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202019/Boletines%202019/BOLETIN_SEMEPI%20_23.pdf

- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2019b). *Alerta Epidemiológica VIGEPI No. 05*. Obtenido de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202019/Alertas/Alerta%20Intoxicaciones.pdf>
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2019c). *Boletín de la semana epidemiológica. Departamento de Epidemiología semana No. 52-2019*. Obtenido de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202019/Boletines%202019/BOEPISE52.pdf>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica*. España: Elsevier.
- Ostinelli, M., Basan, M., & Maciel, S. (2010). *Red INTA de laboratorios de SAV*. Obtenido de https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-muestreo_agua.pdf
- Otzen, T., & Manterola, C. (2017). Técnicas de muestreo sobre una población a estudio. *Int. J. Morphol*, 35(1), 227-232.
- Palomino, C., & González, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev. peruana de medicina experimental y salud pública*. 31(3).
- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *MVZ Córdoba* 7(2), 187-200.
- Pérez, A. (2014). *Determinación de la presencia de Staphylococcus aureus y Escherichia coli O157:H7, en quesos frescos artesanales expendidos en mercados municipales de la capital de Guatemala (Tesis de pregrado)*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2017). Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature review microbiology* 16, 32-46.
- Ramirez, C., & Vélez, J. (2012). *Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad*. Facultad de Ingeniería de Alimentos. México: Universidad de las Américas de Puebla.
- Reglamento Técnico Centroamericano -RTCA-. (2018). *Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos*. RTCA 67.04.50:17.

- Rodríguez, J., Borrás, L., Pulido, M., & García, D. (2015). Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja, Colombia. *Rev. Cubana de Higiene y Epidemiología*, 53(3).
- Roset, R. (2019). *El gran libro del queso*. Barcelona: Integral.
- Sierra, L., & Vargas, S. (2014). *Estudio de la resistencia antimicrobiana en cepas de Staphylococcus aureus aislados durante el año 2013 en una clínica de tercer nivel en la ciudad de Bogotá*. Pontifica Universidad Javeriana.
- Universidad de Jaén. (s.f). *Estudios correlacionales*. Obtenido de <http://www4.ujaen.es/~eramirez/Descargas/tema5>
- Velasquez, B. (2008). *Determinación de Salmonella spp en queso fresco y de capas producido artesanalmente y distribuido en el mercado La Terminal zona 4*. Tesis de grado, Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Biomed*, 25, 129-143.

XIII. ANEXOS

Anexo No. 1. Tabla de composición de queso fresco y crema en una porción de 100 gramos.

Nutriente	Queso	Crema
Agua % ¹	55	57.71
Energía Kcal ²	264	345
Proteína g ³	17.50	2.05
Grasa total g	20.10	37
Carbohidratos g	3.30	2.79
Calcio mg	783	65
Fosforo mg ⁴	375	62
Hierro mg	1.30	0.03
Riboflavina mg	0.43	0.11
Niacina mg	0.15	0.04
Vitamina C mg	0	1
Vitamina A mg	420	411
Ácidos grasos monoinsaturados g	--	10.69
Ácidos grasos poliinsaturados g	--	1.37
Ácidos grasos saturados g	--	23.03
Colesterol mg	--	137
Potasio mg	--	75
Sodio mg	--	38
Zinc mg	--	0.23
Magnesio mg	--	7
Vitamina B12	--	0.18

Fuente: Menchú, T. & Alfaro, H. (2012). *Tabla de composición de alimentos de Centroamérica*. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Organización Panamericana de la salud (OPS).

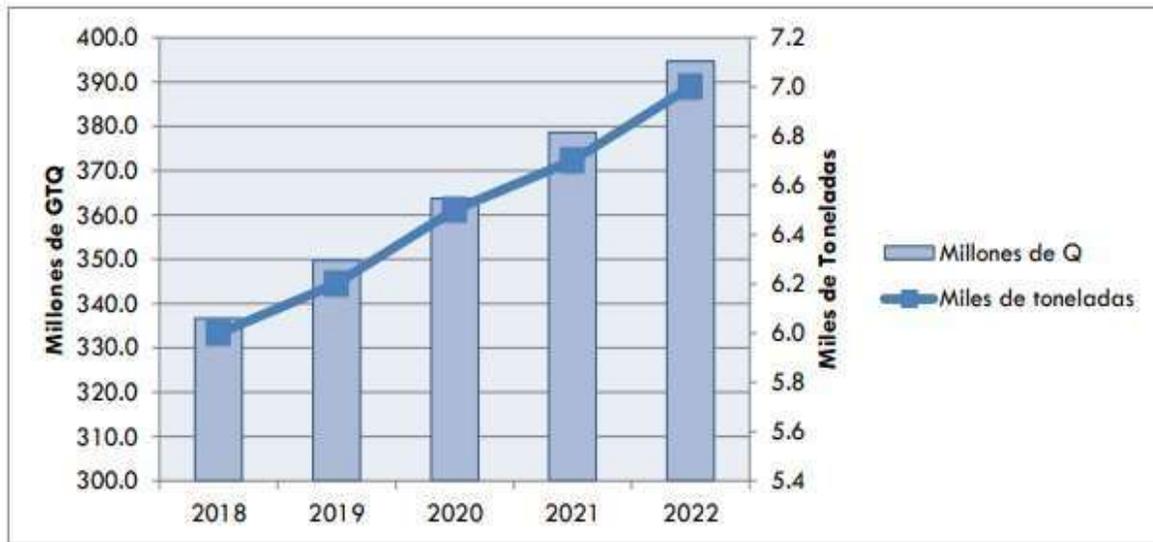
¹ % = porcentaje.

² kcal = kilocalorías.

³ g = gramos.

⁴ mg = miligramos.

Anexo No. 2. Gráfica de proyección de queso fresco en Guatemala. Años 2018 – 2022.



Fuente: Ministerio de Economía. (2019). Industria de queso fresco en Guatemala. Obtenido de: https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/queso_fresco_en_guatemala_-kerry.pdf Consultado el 15.09.20

En el 2017 Guatemala registra ventas de Q325.7 millones para el queso fresco, con un crecimiento del 7.1% versus el año 2016. Como se observa en la gráfica, se estima una proyección de ventas de queso en Guatemala para el periodo 2018 al 2022 del 2.7% (Ministerio de economía, 2019).

Anexo No. 3. Criterios microbiológicos para registro sanitario

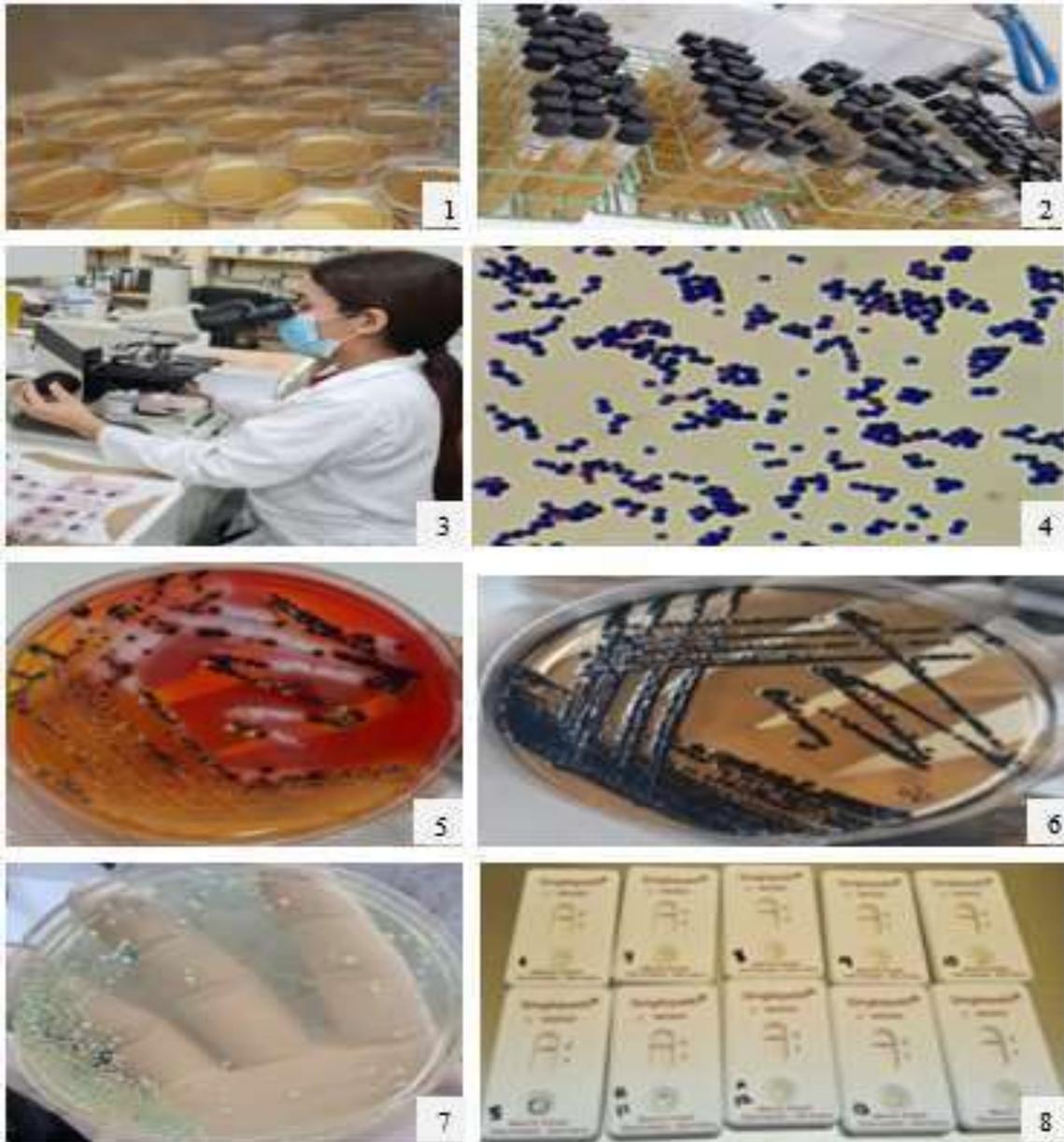
1.6. Subgrupo del alimento: crema dulce, crema ácida (natilla), crema batida, sus mezclas de producto lácteo con aceite o grasa vegetal comestible y similares.			
Parámetro	Categoría	Tipo de alimento	Límite Permitido
<i>Salmonella</i> spp.	10	A	Ausencia/25 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	8		10 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	N/A		< 3 NMP/g o < 10 UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	10		Ausencia/25 g

1.9. Subgrupo del alimento: quesos frescos, no madurados, requesón, sus mezclas de producto lácteo con aceite o grasa vegetal comestible y similares.			
Parámetro	Categoría	Tipo de alimento	Límite Permitido
<i>Escherichia coli</i>	6	A	10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	8		10 ² UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	10		Ausencia/25 g
<i>Salmonella</i> spp.	10		Ausencia/25 g

NOTA 1. En el caso de Panamá, se aplicará el siguiente criterio microbiológico para el *Staphylococcus aureus*: m = 10 UFC/g.

Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano -RTCA-. (2018). *Alimentos. Criterios Microbiológicos para la inocuidad de los alimentos*. RTCA 67.04.50:17.

Anexo No. 4. Imágenes de la fase experimental



Nota: 1. Preparación de los medios de cultivo utilizados durante la fase experimental. 2. Tubos de agua peptonada para la determinación de *S. aureus*. 3. y 4. Observación de Cocos Gram positivo de muestra de *S. aureus*. 5. y 6. Medio XLD y SS para la determinación de *Salmonella* spp. 7. y 8. Medio ALOA y pruebas rápidas para la determinación de *Listeria monocytogenes*.



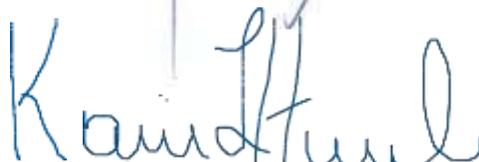
Stephany Irazema Velasquez de Leon

Autora



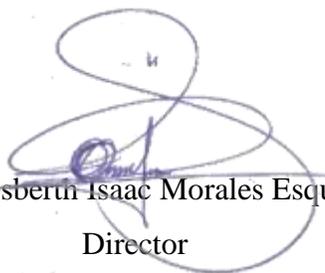
M.Sc. Sergio Alfredo Lickes

Asesor



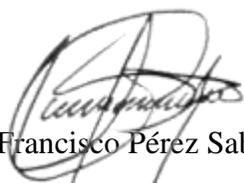
Dra. Karin Larissa Herrera Aguilar

Revisora



M. Sc. Osberin Isaac Morales Esquivel

Director



Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Decano en funciones

