

**Incidencia de *E. coli* O157 y *Salmonella* spp.
en queso semiseco y quesillo artesanal en seis
puntos de venta en Tegucigalpa**

María Fernanda Gaibor Orellana

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Incidencia de *E. coli* O157 y *Salmonella* spp.
en queso semiseco y quesillo artesanal en seis
puntos de venta en Tegucigalpa**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

María Fernanda Gaibor Orellana

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Incidencia de *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. en queso semiseco y quesillo artesanal en seis puntos de venta en Tegucigalpa

María Fernanda Gaibor Orellana

El consumo de quesos artesanales es una práctica muy común entre los hondureños. Sin embargo, la falta de inocuidad en la manufactura, almacenamiento y comercialización de estos productos los hace un riesgo potencial para la salud del consumidor. La incidencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* y *E. coli* O157 fue determinada en dos tipos de quesos artesanales comúnmente consumidos y comercializados en la ciudad de Tegucigalpa. Un total de 36 muestras fueron analizadas, 18 de quesillo y 18 de queso semiseco que fueron adquiridos en seis distintas queserías artesanales ubicadas en dos mercados populares en Tegucigalpa, Honduras. Microorganismos patógenos fueron detectados a través del método de detección molecular de 3M. La presencia de coliformes totales y *E. coli* se determinó a través de la metodología vaciado en placa. De las 18 muestras analizadas para semiseco, nueve fueron positivas para *E. coli* O157 y dos para quesillo. Para *Salmonella*, todas las muestras analizadas fueron negativas. El queso semiseco excedió los límites permisibles de patógenos, por lo tanto, lo convierte en un producto de riesgo para el consumo de los pobladores de Tegucigalpa. En el queso semiseco 11 de las muestras y cinco en quesillo se excedieron de los límites permitidos de coliformes totales. Para *E. coli*, 13 muestras excedieron el límite permitido. Tanto el queso semiseco como el quesillo, dos muestras sobrepasaron límites permisibles.

Palabras clave: Honduras, inocuidad, patógenos, productos lácteos.

Abstract. The consumption of artisan cheeses is a very common practice among Hondurans. However, the poor hygiene practices for manufacturing, storing and marketing these products makes them a potential risk for consumer. The incidence of pathogenic microorganisms such as *Salmonella* and *E. coli* O157 was determined in two types of artisan cheeses commonly consumed and marketed in the city of Tegucigalpa. A total of 36 samples were analyzed, 18 from quesillo and 18 from semidry cheese that were acquired in six different artisan retail cheese stores located in two popular markets in Tegucigalpa, Honduras. Pathogenic microorganisms were detected through a 3M molecular detection system. The presence of total coliforms and *E. coli* was determined through the plaque-cast methodology. Of the 18 samples analyzed for semidry cheese, nine were positive for *E. coli* O157 while for the quesillo only two samples were positive. For *Salmonella*, all samples tested were negative. The semidry cheese exceeded the permissible limits of pathogens; therefore, it becomes a product of risk for the consumption for the people in Tegucigalpa. In semi-dry cheese, 11 samples and five for quesillo exceeded the allowed limits of total coliforms. For *E. coli*, 13 samples exceeded in semi-dry cheese and in quesillo two samples passed the permissible limits.

Key words: Dairy products, food safety, Honduras, pathogens.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES	13
5. RECOMENDACIONES	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS	19

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Número de muestras a analizar.....	4
2. Incidencia de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157 en quesillo y queso semiseco.....	7
3. Comparación de incidencia de <i>E. coli</i> O157 de acuerdo a mercados.....	8
4. Comparación de recuentos de coliformes totales (Log UFC/g) por tipos de quesos	9
5. Recuento final de <i>E. coli</i> por tipos de queso (Log UFC/g)	10
6. Puntaje final de los establecimientos visitados según formato de inspección del Reglamento Técnico Centroamericano	11

Anexos	Página
1. Interacción de las variables estudiadas.....	19
2. Comparación de medias para recuentos de <i>E. coli</i> en tipos de queso semiseco y quesillo	19
3. Comparación de medias para recuentos de Coliformes totales en tipos de queso semiseco y quesillo.....	19
4. de <i>E. coli</i> O157 en quesillo en el mercado B	19
5. Valor de Chi- Cuadrado en quesillo del mercado B.....	20
6. Incidencia de <i>E.coli</i> O157 en queso semiseco de mercado A y B	20
7. Valor de Chi-cuadrado para queso semiseco en mercados A y B.....	20
8. Formato de Inspección adaptado del RTCA.	21

1. INTRODUCCIÓN

La producción de queso artesanal proveniente de leche sin pasteurizar es una práctica muy común de los habitantes de Honduras, específicamente en las zonas donde la producción de leche es eminente. La realización de este subproducto de la leche va desde las amas de casa para consumo inter-familiar, así como también la comercialización del mismo por productores(as) artesanos o de empresas pequeñas a nivel nacional con el fin de obtener retribuciones económicas.

El sector lácteo hondureño se divide en dos rutas: la primera, donde el 35% de la leche producida en el país es procesada de manera industrial, es decir, que lleva tratamientos térmicos para asegurar la inocuidad y la calidad de sus productos derivados. La segunda ruta donde el otro 65% de la leche es utilizada por plantas artesanales que no aplican procesos térmicos o de pasteurización a productos como queso, quesillo y crema, son comercializados en el mercado local y nacional (Cárcamo *et al.* 2014).

Los hogares hondureños tienen un consumo de más del 50% de quesos y similares, en su dieta diaria desde familias con pobreza extrema a familias pudientes. Los quesos son los productos lácteos de mayor consumo en las tres regiones, en la región central es consumido por más del 80% de los hogares y en las otras dos regiones por más del 65% de la población (Menchú y Méndez 2012).

El queso semi-seco se prepara con un 70% de leche entera y 30% de leche descremada, se le agrega cuajo líquido y se deja en reposo, se desuera y se agrega sal yodada y se vuelve a desuerar. Este tipo de queso tiene un proceso de prensado de dos días, eliminando el suero remanente de la cuajada. Por otra parte, el quesillo es elaborado con leche entera, se le adiciona el cuajo y se mezcla bien, después se le agrega suero ácido y se mezcla. Se deja en reposo y se hace presión con las manos para eliminar el suero. Se agrega sal yodada y se lleva a cocción. Se enfría y se sitúa en un recipiente plástico (Chi Ham y Revilla 2002).

Es muy común el consumo de estos productos artesanales por la población hondureña, que no es consciente de las consecuencias de consumir productos lácteos sin tratamientos térmicos. Las consecuencias están directamente relacionadas con microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 que han causado enfermedades transmitidas por alimentos registradas desde 1980 hasta 2013, específicamente por el consumo de quesos (Fox *et al.* 2017).

Escherichia coli, es una bacteria Gram-negativa no formadora de esporas. La mayoría de cepas de *E. coli* son inofensivas ya que viven en el tracto intestinal del humano y animales regulando la flora intestinal. Sin embargo, cepas de *E. coli* O157:H7 causan enfermedades

gastrointestinales como diarrea hemorrágica, y de 3-5% de los casos podría resultar en síndrome urémico hemolítico (Kornacki 2010). Este patógeno generalmente se transmite a través de heces y de alimentos como carne y leche, especialmente de ganado bovino (Sancak *et al.* 2015). Se ha indicado que aproximadamente 74,000 casos y 61 muertes son atribuibles a *E. coli* O157:H7 en los Estados Unidos, y muchos de estos brotes se han relacionado al consumo de alimentos como carne y leche cruda (Bedasa *et al.* 2018).

Salmonella es una bacteria Gram-negativa no formadora de esporas de la familia Enterobacteriaceae. Puede colonizar el tracto gastrointestinal de vertebrados, incluyendo ganado, animales salvajes, mascotas, y humanos, también puede vivir en ambientes en sedimentos de agua estancada (Abraham *et al.* 2012). Las fuentes más comunes de transmisión de salmonelosis son carne de pollo, huevos, frutas, vegetales, productos lácteos y mariscos (Arvanitakis 2010). Durante 1998-2001 se han reportado 90 casos de brotes de enfermedades por el consumo de queso provenientes de leche pasteurizada y sin pasteurizar, donde el 34% de los brotes fueron causados por *Salmonella* (Gould *et al.* 2014). Cada año se registran aproximadamente 42,000 casos de salmonelosis en los Estados Unidos. Como muchos casos no se diagnostican ni se reportan, es posible que el número real de infecciones sea mayor.

En el 2011, se midió la incidencia de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y toxina estafilocócica en dos tipos de quesos artesanales en México, donde analizaron 200 muestras de cada tipo de queso, de las cuales 92 fueron positivas para al menos un patógeno estudiado (Torres-Vitela *et al.* 2011). En Costa Rica en el año 2003, se detectó presencia de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en dos productos de origen animal, donde el último patógeno mencionado se encontró en leche cruda, siendo un riesgo potencial para la salud pública ya que se utilizará como materia prima para la fabricación de productos como el queso (Reuben *et al.* 2003).

Durante el periodo de 1999-2000 en el Laboratorio Central de Microbiología del Ministerio de Salud Pública en Honduras, se estudió la incidencia de *E. coli* O157:H7 en dos muestras de agua y una de queso artesanal, resultando negativa su incidencia para este último producto (Lagos *et al.* 2002). Sin embargo, en Honduras no existen estudios anteriores o recientes enfocados en la incidencia de patógenos en quesos artesanales y el riesgo de su consumo, que concientice a la población hondureña. Más aún a los productores de estos quesos para que establezcan criterios y estandarización de sus procesos para ofrecer alimentos inocuos. En este estudio se evaluarán, el queso semiseco y quesillo debido a que se consumen frecuentemente en Honduras. Considerando la problemática se establecieron los siguientes objetivos:

- Determinar la incidencia de las bacterias *E. coli* O157 y *Salmonella spp.* en quesos semiseco y quesillo artesanal en seis puntos de venta ubicados en Tegucigalpa.
- Determinar microorganismos indicadores como coliformes totales y *E. coli* en ambos productos.
- Evaluar las condiciones sanitarias de los puntos de venta y cómo afectan en la inocuidad de los productos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano (LMAZ) localizado en el complejo industrial del Departamento de Agroindustria Alimentaria, el valle de Yeguaré, 32 km al este de la ciudad de Tegucigalpa, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, C.A. Las muestras de este estudio se recolectaron de seis diferentes queserías en dos distintos mercados en la ciudad de Tegucigalpa: Mercados A y B. Queserías 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Para determinar el tamaño de muestra se determinó el universo del proyecto. Para esto se visitaron dos mercados en Tegucigalpa, los cuales se nombraron Mercado A y Mercado B. En el Mercado A se localizaron tres queserías: Quesería 1, 2 y 3 y en el Mercado B se seleccionaron otras tres queserías: 4, 5 y 6. Lo que indica un universo de 6 muestras, por lo tanto, se tomaron 6 muestras de quesillo y 6 de semiseco, dando un total de 12 muestras. Estas 12 muestras fueron tomadas una vez por semana por un lapso de tres semanas, resultando en 36 muestras a analizar. En cada visita se llevó a cabo una inspección visual de la higiene y sanidad de los establecimientos, así como también las Buenas Prácticas de Manufactura de los vendedores, siguiendo el formato de Inspección del RTCA 67.01.33:06. En la ecuación 1, se detalla cómo se determinó el número de muestras a analizar.

$$n = \frac{Z^2 p*q*N}{Ne^2 + Z^2 p*q} \quad [1]$$

Donde:

N= Tamaño de población

N=Tamaño de muestras

p= probabilidad de ocurrencia

q=probabilidad de fracaso

Z= Nivel de confianza

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.5) * (1 - 0.5) * (6)}{(6)(0.05)^2 + (1.96)^2 (0.005) * (1 - 0.5)}$$

$$n = \frac{3.482 * 0.5 * 3}{(0.015 + 3.842) * 0.25}$$

$$n = \frac{5.763}{0.964} = 5.97$$

$n = 6$ quesos

Cuadro 1 Número de muestras a analizar

Mercado	Quesillo	Queso semiseco	Total
A	9	9	18
B	9	9	18
Total muestras	18	18	36

Preparación de muestras.

Las muestras tomadas en las distintas queserías en la ciudad de Tegucigalpa, fueron recolectadas y transportadas en una hielera, donde se tomó la temperatura justo después de la adquisición de las mismas. Al llegar al campus, las muestras fueron refrigeradas a 4 °C para su posterior análisis y preparación.

Para este experimento se utilizó el sistema de detección molecular de 3M para determinar la ausencia o presencia de patógenos, y el método de vaciado en placa para la detección de coliformes totales y *E.coli*.

Las muestras fueron catalogadas según la quesería, la zona de ubicación y el tipo de queso. Estas fueron tomadas en cada establecimiento un día de la semana, por tres semanas. Las muestras fueron ubicadas en una hielera con bolsas esterilizadas con hielo y un separador para evitar contacto del hielo y las muestras. Después se transportaron hasta el Laboratorio de Microbiología, localizado en Zamorano.

Determinación de coliformes totales y *E. coli*.

Para las muestras de queso semiseco y quesillo, se agregaron 90 ml de solución Buffer Fosfato a 10 gramos de muestra de alimento. Se llevó al stomacher (SEWARD 400 circulator) durante 60 segundos para su homogenización. Luego, se tomó 1 ml de la muestra homogenizada con una pipeta con filtro y se trasladó a un tubo con 10 ml de buffer fosfato. Se realizó una homogenización en vórtex (Weber Scientific BV1000) por 7 segundos y se tomó 1 ml que se trasladó al siguiente tubo con buffer fosfato. Se realizó este mismo procedimiento hasta realizar cinco diluciones. Después, se agregó 1 ml de

las diluciones en platos individuales para cada muestra. Se realizó el método de vaciado en placa utilizando 15 ml de Agar Bilis Rojo Violeta(Lote 109729B) y ABRV-MUG(lote 108798A). Los platos fueron llevados a incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ (Thermo Scientific 6850) por 24 horas. Luego de 24 ± 2 horas, se procedió a realizar el recuento de coliformes totales con un contador de colonias. Después de este procedimiento, se llevó a cabo el recuento de *E.coli* con la Lámpara UV (Spectroline UV USNF 365/254 nm).

MDS para *Salmonella* y *E.coli* O157.

Para las muestras de queso semiseco y quesillo se realizó un preenriquecimiento, donde se agregaron 225 ml de Agua Peptonada Bufferada(BPW) a 25 gramos de cada muestra dentro de bolsas esterilizadas. Se utilizó la misma proporción tanto para las muestras de *Salmonella* como las de *E. coli* O157. Luego las muestras de *Salmonella* fueron llevadas a incubar a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Thermo Scientific 6850) por un rango de 18 a 24 horas, y las muestras de *E.coli* O157 incluyendo H7 se incubaron a $41.5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fischer Scientific 13986127G) en un lapso de 18 a 24 horas. Para la realización de la detección molecular se siguió la metodología aprobada por la AOAC internacional para *Salmonella* y *E.coli* O157.

Análisis Estadístico.

En este experimento se realizó un análisis descriptivo univariado con los dos microorganismos patógenos detectados *Salmonella spp.* y *E. coli* O157. También se realizó la prueba de Chi- cuadrado para la incidencia de muestras positivas del patógeno presente. Para coliformes totales y *E. coli* se realizó una comparación de los recuentos para queso semiseco y quesillo utilizando un análisis de varianza y separación de medias DUNCAN y LS means para determinar la interacción entre los productos y los puestos de venta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este experimento fueron analizadas un total de 36 muestras; 18 muestras correspondientes a queso semiseco y 18 correspondientes a quesillo. Tres establecimientos fueron muestreados en dos distintos mercados ubicados en Tegucigalpa. Los lugares de muestreo fueron puntos de venta ya que no se dedican a la producción de los quesos.

De las 36 muestras analizadas, nueve muestras de queso semiseco y dos de quesillo fueron positivas para *E. coli* O157, mientras que para *Salmonella*, los resultados fueron negativos para ambos tipos de quesos. El queso semiseco tuvo la mayor incidencia de *E. coli* O157 ya que, de las 11 muestras positivas, nueve pertenecen a queso semiseco y dos conciernen a quesillo. De las 11 muestras positivas, el 64% fueron adquiridas en tres queserías ubicadas en el mercado B. El 36% restante fueron obtenidas en dos de los tres puntos de venta en el mercado A entre los meses de junio y julio.

En Honduras, el consumo de quesos artesanales es una práctica muy común, sin embargo, estos implican un riesgo potencial para sus consumidores habituales. Se denominan artesanales por la forma de fabricación de los productos, así como el tipo de materia prima utilizada. Los quesos elaborados de leche sin pasteurizar están asociados con brotes de enfermedades alimentarias (Romero *et al.* 2009).

Del año 2007 al 2012, en los Estados Unidos se reportaron 81 brotes relacionados con leche sin pasteurizar, ocasionando 979 casos de enfermedades y 73 hospitalizaciones (CDC 2017). Asimismo, patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., y *Salmonella* no tifoidea han estado relacionadas con brotes por consumo de quesos fabricados con leche sin pasteurizar (Leong *et al.* 2014). A su vez, quesos provenientes de leche cruda han estado vinculados como medio de transmisión en brotes de enfermedades intestinales infecciosas, incluyendo *E. coli* O157:H7 (Honish *et al.* 2005).

Los resultados presentados en el cuadro 2, señalan el riesgo al que se expone la población hondureña al consumir este tipo de productos, como también la falta de aplicación de las recomendaciones de prácticas de higiene desde el ordeño, ya que microorganismos patógenos se pueden propagar directamente a través de la ubre. Otras fuentes de contaminación son las superficies de las granjas durante y antes del ordeño, aire y equipos (Sankac 2015). En otro estudio, se realizó un análisis epidemiológico luego de un brote causado por *E. coli* O157:H7 donde se determinó que la causa de contaminación provenía de las tuberías y de la envasadora de una planta de lácteos. Se determinó que la pasteurización inadecuada o la contaminación posterior a la pasteurización pudo haber causado el brote (Marek *et al.* 2004)

Cuadro 2 Incidencia de *Salmonella* y *E. coli* O157 en quesillo y queso semiseco

Tipo de queso	Patógeno	Total muestras	Muestras positivas*
Quesillo	<i>Salmonella</i>	18	0
	<i>E. coli</i> O157	18	2 (11%)
Queso semiseco	<i>Salmonella</i>	18	0
	<i>E.coli</i> O157	18	9 (50%)
Total	<i>Salmonella</i>	36	0
	<i>E.coli</i> O157	36	11 (31%)

*Presencia del patógeno en la porción analizada (25g)

La infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica puede ocurrir mediante la ingestión de alimentos que no han sido cocidos de manera apropiada, contaminadas con heces de bovino que contienen *E. coli* O157:H7 (Rasmussen y Casey 2001). Debido a que el ganado bovino ha estado implicado como el principal reservorio de *E. coli* O157:H7 (Elder *et al.* 2000). La presencia de este patógeno se debe a una mala práctica desde el manejo de los animales en granja hasta la comercialización del producto terminado.

El queso semiseco tuvo la mayor incidencia de este patógeno contrastando con la incidencia en quesillo (dos muestras positivas) ya que es un producto que no conlleva cocción en su proceso, por lo tanto, las probabilidades de la supervivencia de *E. coli* O157:H7 en el queso semiseco es mayor, ya que este patógeno crece a una temperatura óptima de 37 °C y máxima de 44 °C y no soporta pasteurización (Fox *et al.* 2017). Por otro lado, la incidencia de *E. coli* O157 en quesillo fue muy baja. Se detectaron dos resultados positivos, causado por una contaminación posterior a la cocción de la cuajada. La contaminación posterior se podría atribuir al reenvase del queso en condiciones sanitarias deficientes, almacenamiento del queso junto a productos cárnicos, uso de bolsas usadas como envase, empleo de utensilios sin lavar y manipulación del queso con las manos sin lavar (Kopper *et al.* 2009).

Los parámetros mencionados anteriormente fueron observados en cada una de las visitas en la adquisición de las muestras, donde todos los puntos de venta comercializaban otros productos además de queso. Tres de estos puntos de venta proveían otros productos de origen animal como carne de res cruda y embutidos, carne de pollo y huevos. Las dos muestras positivas para quesillo perteneciente al mercado B de la quesería 5 se encontraban en un mostrador de vidrio sin refrigeración junto a carne de res y embutidos crudos.

Salmonella es un patógeno asociado con enfermedades gastrointestinales y de ETA (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) en Centroamérica. Este patógeno en Costa Rica, ocupó el tercer lugar de causante de ETA en este país en el año 2006. No obstante, no se registran brotes por la incidencia de este *Salmonella* por el consumo de quesos en dicho país. Asimismo, en El Salvador no se encontró presencia de *Salmonella* en queso fresco artesanal, queso capita con loroco, queso morolique y cuajada (Kopper *et al.* 2009).

En Honduras, tampoco se encontró presencia de *Salmonella* en quesos frescos y quesos secos, pero sí se determinó una alta incidencia de microorganismos indicadores por la falta de medidas de higiene y saneamiento, causando susceptibilidad de estos productos a la proliferación de otros patógenos (Coello 2015).

Una de las causas de la presencia de *Salmonella* en quesos, es el uso de leche no pasteurizada para su fabricación, como es el caso de queso fresco o Mexican-style, causando 10 brotes en el periodo de 1998-2001 (Gould *et al.* 2014). No obstante, las enfermedades transmitidas por los alimentos debido a *Salmonella* fueron invariables en quesos fabricados de leche cruda (Fox *et al.* 2017).

La ausencia de este microorganismo en queso semiseco como en quesillo es justificable debido al salado y la cocción respectivamente. A pesar de que el queso semiseco no lleva algún tratamiento térmico, éste lleva un proceso de salado, lo que reduce la actividad de agua del alimento inhibiendo el crecimiento de *Salmonella*. Estudios revelan que el crecimiento microbiano decrece en presencia de cloruro de sodio, sin embargo, si las temperaturas son elevadas, este microorganismo será capaz de crecer cuando haya sal presente (El-Gazzar y Marth 1992).

La presencia de *Salmonella* en quesillo fue negativa (Cuadro 2). Aunque la leche utilizada en la producción de este producto no es pasteurizada, durante la elaboración del quesillo se realiza una cocción de la cuajada hasta llegar una temperatura interna de 70 °C por un lapso de 30 a 40 minutos lo que podría eliminar microorganismos patógenos como *Salmonella*. Esta bacteria se caracteriza por su sensibilidad al calor y alta acidez. Esta sensibilidad a menudo es la base del procesamiento de alimentos utilizado para controlar la presencia de microorganismos (FDA 2011).

En el queso semiseco en ambos mercados (A y B), no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) para la incidencia de *E. coli* O157 (Cuadro 3), ya que el total de muestras positivas en ambos mercados fueron similares. En cambio, en el quesillo hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) en el mercado B ya que las únicas muestras positivas fueron adquiridas en un punto de venta ubicado en dicho mercado.

Cuadro 3. Comparación de incidencia de *E. coli* O157 de acuerdo a mercados.

Mercado	Tipo de producto	Frecuencia	Valor de Chi-Cuadrado	Probabilidad
A	Queso semiseco	4	0.111	<0.739
B	Queso semiseco	5	0.111	<0.739
B	Quesillo	2	0.000	.

Recuento de coliformes totales. Se observó diferencia significativa ($P=0.002$) para el factor tipo de queso (Quesillo y Queso semiseco), en el cual se presentó mayor incidencia de coliformes totales en quesos semiseco (Cuadro 4). Sin embargo, para el factor tipo de mercado y quesería no se mostró diferencia significativa. Por consiguiente, la interacción de estos factores de igual forma no presentó diferencia significativa.

Cuadro 4. Comparación de recuentos de coliformes totales (Log UFC/g) por tipos de quesos

Tipo de queso	Mercado A ^ξ	Mercado B
Quesillo	1.22 ± 0.44^b	2.39 ± 1.50^b
Queso semiseco	3.92 ± 1.75^a	3.48 ± 0.93^a
CV ^Ω	37	63
CV ^Ψ	45	27

^ξ Límite máximo para coliformes totales es de 2.6 Log UFC/g para quesos frescos, no madurados y requesón del RTCA

^{ab} Letras distintas denotan diferencia significativa entre tipos de queso ($P<0.05$)

^ξNo existe diferencia significativa entre mercados

^Ω CV (%)=Coeficiente de variación de quesillo

^Ψ CV (%)= Coeficiente de variación de queso semiseco.

Los resultados de coliformes totales y *E. coli* señalan que en promedio todas las muestras para *E. coli*, excedieron el límite permitido establecido por el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) para quesos frescos, no madurados y requesón (Cuadro 3). En el mismo cuadro se detalla el límite máximo para *E. coli* perteneciente a la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad, para los alimentos y bebidas de consumo del Perú, puesto que para coliformes fecales en el RTCA solo se encuentra límite máximo permitido en agua envasada mas no en quesos.

Del total de las 36 muestras analizadas, 16 muestras (44%) muestras exceden del límite permisible para coliformes totales y el restante 20 (56%) se encuentran dentro de los límites. De las 16 muestras, 11 muestras pertenecen a queso semiseco y cinco a quesillo. Para el recuento total de *E. coli*, de las muestras analizadas, 15 muestras (42%) muestras exceden el límite permisible para *E. coli*, donde 13 muestras pertenecen a queso semiseco y dos a quesillo. Es importante recalcar que estas muestras fueron recolectadas en los meses más calurosos del año, lo que promueve el crecimiento tanto de los microorganismos indicadores como de *E. coli* O157:H7, coincidiendo en diversos estudios que revelan que la incidencia aumenta en los meses más calurosos del año (Brown *et al.* 1997).

La detección de coliformes en productos terminados incluyendo queso, se ha utilizado tradicionalmente para indicar si un producto ha sido manufacturado bajo condiciones no higiénicas (Trmčić *et al.* 2016). Entre estas condiciones se encuentran la falta de cadena de frío durante el transporte y el contacto directo del producto con el piso, la cual fue observada en las visitas realizadas en uno de los puntos de venta. Además, las deficientes condiciones de venta observadas como la falta de refrigeración de los productos, la falta de uso de equipo de protección personal del vendedor, la utilización de utensilios en mal estado y la

exposición de los productos al aire libre probablemente promovieron la proliferación de los microorganismos indicadores.

Las muestras del mercado A presentaron temperaturas menores a las muestras del mercado B, siendo las temperaturas para queso semiseco y quesillo del mercado A, 26.4 y 27.1 °C, respectivamente. Por otro lado, en el mercado B, la temperatura promedio para queso semiseco y quesillo fue de 34 °C para ambos. La temperatura de almacenamiento es un factor importante para el crecimiento bacteriano, este puede cambiarse continuamente en diversas circunstancias como el transporte, la exhibición al por menor y el almacenamiento en el hogar (Kim *et al.* 2014). Debido a que los productos no son refrigerados, se encuentran constantemente en la zona de peligro (4 °C y 60 °C), causando el crecimiento de microorganismos patógenos (USDA 2013). Otro factor que influye en los recuentos de coliformes totales, es el uso de leche sin pasteurizar, ya que los géneros *Escherichia*, *Enterobacter* y *Hafnia* son más comunes en quesos fabricados con leche cruda que aquellos fabricados con leche pasteurizada (Trmčić *et al.* 2011).

Recuento de *E. coli*. Se observó diferencia significativa (P= 0.008) para el factor tipo de queso (Quesillo y Queso semiseco). Se identificó con mayor recuento final los quesos de la categoría semiseco (Cuadro 5). Por otro lado, no se observó diferencia significativa entre los mercados (A y B).

Cuadro 5. Recuento final de *E. coli* por tipos de queso (Log UFC/g)

Tipo de queso	Mercado A ^ξ	Mercado B
Quesillo	0.70 ± 0 ^b	0.90 ± 0.38 ^b
Queso semiseco	1.96 ± 1.09 ^a	1.46 ± 0.76 ^a
CV ^Ω	0	42
CV ^Ψ	56	52

^ξLímite máximo para *E. coli* es de <1 Log UFC/g los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad, para los alimentos y bebidas de consumo del Perú.

^{ab} Letras distintas denotan diferencia significativa entre tipos de queso (P<0.05)

^ξNo existe diferencia significativa entre mercados

^Ω CV (%)=Coeficiente de variación de quesillo

^Ψ CV (%)= Coeficiente de variación de queso semiseco.

Debido a que *E. coli* es una bacteria prevalente en el tracto intestinal del ganado, y se asume que hay una correlación entre los coliformes fecales y la presencia de otros patógenos, éste microorganismo puede introducirse en el tanque refrigerado de la leche, por la secreción intramamaria o por vía de contaminación fecal de la ubre o el equipo de ordeño (Van Kessel *et al.* 2004).

En las inspecciones realizadas durante los muestreos, se evaluaron las condiciones del establecimiento como alrededores, tipo de ventilación, abastecimiento de agua, drenajes, instalaciones sanitarias, el estado de los equipos y utensilios, prácticas higiénicas y envasado entre otras (Cuadro 6).

Cuadro 6. Puntaje final de los establecimientos visitados según formato de inspección del Reglamento Técnico Centroamericano

Mercado	Quesería	Puntaje Final ^Φ
A	1	26
	2	19
	3	40
B	4	15
	5	25
	6	3

De acuerdo a ficha de inspección adaptada de Prácticas de Principios Generales de Higiene de los Alimentos RTCA.

^ΦHasta 60 : Condiciones inaceptables. Considerar cierre

71-80: Condiciones regulares. Necesario hacer correcciones

81-100: Buenas condiciones. Hacer correcciones

De acuerdo al cuadro 4, los establecimientos del mercado B obtuvieron los puntajes más bajos en la inspección, por lo tanto, aunque el queso se ha demostrado con menos recuentos en el mercado A, las condiciones deficientes de venta se considera un factor relevante que promueve a que el queso tenga una recontaminación, incluso después del tratamiento térmico de la cuajada.

Durante las tres visitas realizadas, se observaron las condiciones de higiene de cada uno de los establecimientos de venta de quesos, usando una ficha de inspección adaptada de Buenas Prácticas de Manufactura, para fábrica de alimentos y bebidas procesados del RTCA, para observar el cumplimiento o incumplimiento de las mismas. En el mercado A, la quesería 2 tuvo menor puntaje, mientras que en el mercado B, las queserías 4 y 6 fueron las de menor puntaje.

Al momento de la adquisición de los quesos, los vendedores no utilizaban guantes, redcilla o gabacha, asimismo además de manipular los alimentos, manipulaban el dinero. Los comerciantes realizaban los cortes de los quesos con un solo cuchillo, este se encontraba expuesto al ambiente, sucio y no se realizaba limpieza ni desinfección entre los distintos quesos. No se observó lavado de manos antes ni después de la manipulación de los alimentos.

Los establecimientos visitados se encargan de la comercialización de los quesos mas no de la producción. Los comerciantes adquieren los quesos a un distribuidor proveniente de Olancho o Danlí, los distribuidores transportan los quesos en camiones sin refrigeración. Esto podría significar que más de una quesería podría comercializar queso proveniente de la misma materia prima y del mismo lugar de procesamiento. Por lo tanto, si los quesos se encuentran contaminados con patógenos, estos se diseminarán en todos los puntos de venta que adquieren los productos.

La frecuencia de compra de los quesos oscila entre dos días por semana y una vez por semana. Esto significa que no todo el queso es fresco, además de que se mantiene varios

días en exposición al aire libre, porque la única protección de estos productos es un mostrador de vidrio que permanece abierto la mayor parte del tiempo. El quesillo, no se almacena en refrigeración ya que daña la calidad sensorial del mismo formándose una capa amarillenta y dura en su superficie. El queso semiseco tampoco lo mantienen en refrigeración. Este último es el preferido por los compradores, especialmente de restaurantes debido a su contenido de sal y la cantidad de suero es menor, por ende, pierde menos peso que el quesillo.

4. CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de *E. coli* O157 en queso semiseco en cinco de los seis puntos de venta muestreados en el estudio. En cambio, este patógeno solo se encontró en quesillo en uno de los seis puntos de ventas.
- El queso semiseco presentó coliformes totales y *E. coli* en los seis puntos de venta muestreados. El quesillo presentó coliformes totales en los seis puntos de venta, pero solo un punto de venta presentó *E. coli*.
- Ninguno de los establecimientos de los cuales se obtuvo los quesos cumplía con las Prácticas de Principios Generales de Higiene de los Alimentos del Reglamento Técnico Centroamericano

5. RECOMENDACIONES

- Realizar este estudio en otros tipos de quesos artesanales hondureños como queso fresco, queso fresco con chile y cuajada.
- Determinar la presencia de otros microorganismos de importancia en los productos lácteos como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.
- Conducir este tipo de estudio en los lugares de origen de cada uno de los quesos artesanales para obtener mayor información de los antecedentes de contaminación, tanto de la leche como del queso.

6. LITERATURA CITADA

Abraham A, Al-Khadi S, Assimon S, Beaudry C, Benner R, Bennet R, Binet R, Cahill S, Burkhardt W, Chen Y, Day J, Deeds J, DeGrasse S, DePaola A, Feng P, Foley S, Fry F, Granade R, Hait J, Hammack T, Hartman G, Jones J, Kase J, Lampel K, Myers M, Nayak R, Nsofor O, Orlandi P, Pawar R, Schlessner J, Sharma S, Stewart D, Tallent S, Trucksess M, Zhang G, Ziobro G. 2012. Handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins; [accessed 2018 Jun 25]. <https://www.fda.gov/downloads/food/foodsafety/foodborneillness/>

Arvanitakis C. 2010. Detection of bacteria, viruses, parasites and fungi. Perugia, Italy: [publisher unknown]; [accessed 2018 Jul 9]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-8544-3_6.

Bedasa S, Shiferaw D, Abraha A, Moges T. 2018. Occurrence and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* O157:H7 from food of animal origin in Bishoftu town, Central Ethiopia. *International Journal of Food Contamination*. 5(1):2. <https://doi.org/10.1186/s40550-018-0064-3>. Doi: 10.1186/s40550-018-0064-3.

Brown C, Harmon B, Zhao T, Doyle M. 1997. Experimental *E. coli* O157:H7 carriage in calves; [accessed 2018 Septiembre 12]. 63:27–32. <http://sci-hub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168298/>.

Cárcamo J, Bonilla G, Ordóñez W, Guzmán R (2014): Estudio de caracterización de la situación actual de las plantas artesanales y semi-industriales de productos lácteos en el valle de Comayagua y La Paz. Available online at <https://aldubiochoa.files.wordpress.com/2015/02/situacion-actual-de-las-procesadoras.pdf>, checked on 6/25/2018.

Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2011. *Salmonella* - guidance for industry: measures to address the risk for contamination by *Salmonella* species in food containing a pistachio-derived product as an ingredient. [Place unknown]: Center for Food Safety and Applied Nutrition; [updated 01/26/2018; accessed 2018 Aug 19]. en. <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Salmonella/ucm273482.htm>.

Central Disease of Control. 2017. Outbreak Studies | Raw Milk | Food Safety | CDC. Atlanta: U.S Department of Health and Human Services; [updated 2017 Jan 1; accessed 2018 Aug 18]. <https://www.cdc.gov/foodsafety/rawmilk/rawmilk-outbreaks.html>.

Chi Ham, L, Revilla A.2002.Productos lácteos elaborados de forma artesanal[Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras.18p

Coello A. Junio-Agosto/2015. Investigación aislamiento e identificación de *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, y *Listeria monocytogenes* en quesos artesanales distribuidos en el Municipio Distrito Central, Honduras. Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Centro de Estudios y Control de Contaminantes. 63 p; [accessed 2018 Aug 19]. http://www.miambiente.gob.hn/media/adjuntos/pdf/CESCCO/2017-08-21/21%3A59%3A52.238235%2B00percentage3A00/Informe_Final_Lacteos_2015.pdf.

El-Gazzar FE, Marth EH. 1992. Salmonellae, Salmonellosis, and dairy foods: a review. *Journal of Dairy Science*; [accessed 2018 Agosto 19]. 75(9):2327–2343. Doi: 10.3168/jds. S0022-0302(92)77993-4.

FDA (Food and Drug Administration). 2002.BAM 4: Enumeración de *Escherichia coli* y las bacterias coliformes [internet]. Estados Unidos. Actualización: 2017/11/13. [consultado:2017/11/13].<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm><https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.html>.

Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. 2017. Pathogens in cheese and foodborne illnesses. In: Boston, MA: Springer. *Fundamentals of cheese science*.p.681-713https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-7681-9_19.

Gould LH, Mungai E, Behravesh CB. 2014. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathogens Disease*; [accessed 2018 Aug 18]. 11(7):545–551.

Honish L, Gerry P, Hislop N, Chui L, Kwalewska-Grochowska K, Trottier L, Kreplin K, Zazulak I. 2005. An outbreak of *E.coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health*; [accessed 2018 Agosto 18]. 96:182–184.

Kim K, Lee H, Gwak E, Yoon Y. 2014. Kinetic behavior of *Escherichia coli* on various cheeses under constant and dynamic temperature; [accessed 2018 Sep 11]. 27(7):1013–1018. en. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093577/>.

Kopper G, Calderon G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 194 p. <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>.

Kornacki JL. 2010. Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food-processing environment. New York, NY: Springer New York. 198 p. ISBN: 978-1-4419-5517-3; [accessed 2018 Jun 25]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4419-5518-0.pdf>.

Lagos A, Morales M, Castillo R. 2002. *Escherichia coli* O157:H7 patógeno emergente en Honduras; [accessed 2018 Sep 13]. (70):21–23. <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2002/pdf/Vol70-1-2002-6.pdf>.

Leong WM, Geier R, Engstrom S, Ingham S, Ingham B, Smukowski M. 2014. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* on cheese during extended storage at 25°C. *J Food Prot.* 77(8):1275–1288. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-047.

Marek P, Nair MKM, Hoagland T, Venkitanarayanan K. 2004. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized cheddar cheese whey. *International Journal of Food Microbiology.* 94(1):1–7. Doi: 10.1016/S0168-1605(03)00331-3.

Menchú M MH. 2012. Análisis de la situación alimentaria en Honduras; [accessed 2018 Jun 25]. http://www.incap.int/index.php/es/publicaciones/doc_view/662-honduras-informe-analisis-de-situacion-alimentaria.

Rasmussen MA, Casey TA. 2001. Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle; [accessed 2018 Sep 12]. 27:57–73. <http://cyber.sci-hub.tw/MTAuMTA4MC8yMDAxNDA5MTA5NjcwMQ==/rasmussen2001.pdf>.

Reuben A, Treminio H, Arias ML, Chaves C. 2003. Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*; [accessed 2018 agosto 18]. 53(4):389–392.

Romero PA, Leiva G, Cruz J, Santos A. 2009. Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas; [accessed 2018 Sep 12]. 8:111–119. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v8n1/v8n1a11.pdf>.

Sancak YC, Sancak H, Isleyici O. 2015. Presence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in raw milk and Van herby cheese. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.* 59(4):511–514. Doi: 10.1515/bvip-2015-0076.

Torres-Vitela MR, Mendoza-Bernardo M, Castro-Rosas J, Gomez-Aldapa CA, Garay-Martinez LE, Navarro-Hidalgo V, Villarruel-López A. 2012. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcal* enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *J Food Prot*; [accessed 2018 Aug 17]. 75(1):79–84. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-258.

Trmčić A, Chauhan K, Kent DJ, Ralyea RD, Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M. 2016. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science*; [accessed 2018 agosto 20]. 99(8):6105–6120. eng. doi:10.3168/jds.2016-11112.

USDA (United States Department of Agriculture) 2013. La zona de peligro.[internet]. Washington.[consultado 2018 Sept 10]. https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7e84f612-6928-4660-a615-c77fbbc2464c/Danger_Zone_SP.pdf?MOD=AJPERES

Van Kessel JS, Karns JS, Gorski L, McCluskey BJ, Perdue ML. 2004. Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and Fecal Coliforms in Bulk Tank Milk on US Dairies. *Journal of Dairy Science*; [accessed 2018 Sep 12]. 87(9):2822–2830. <http://backup.sci-hub.tw/1828/6b91d8ccd93fee5cc6a855c8526081f/10.3168@jds.S0022-03020473410-4.pdf>. doi:10.3168/jds.S0022-0302 (04)73410-4.

7. ANEXOS

Anexo 1 Interacción de las variables estudiadas

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
MERCADO	1	0.19921344	0.19921344	0.37	0.5474
QUESO	1	7.39840000	7.39840000	13.74	0.0008
QUESO*MERCADO	1	1.09900278	1.09900278	2.04	0.1631
QUESERIA	1	0.50373038	0.50373038	0.94	0.3409

Anexo 2 Comparación de medias para recuentos de *E. coli* en tipos de queso semiseco y quesillo

Duncan Grouping	Mean	N	QUESO
A	1.7060	18	SS
B	0.7993	18	Q

Anexo 3 Comparación de medias para recuentos de Coliformes totales en tipos de queso semiseco y quesillo

Duncan Grouping	Mean	N	QUESO
A	3.6993	18	SS
B	1.8102	18	Q

Anexo 4 Incidencia de *E. coli* O157 en quesillo en el mercado B

MERCADO	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
B	2	100.00	2	100.00

Anexo 5 Valor de Chi- Cuadrado en quesillo del mercado B

**Chi-Square Test
for Equal Proportions**

Chi-Square	0.0000
DF	0
Pr > ChiSq	.

Anexo 6 Incidencia de E.coli O157 en queso semiseco de mercado A y B

MERCADO	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
A	4	44.44	4	44.44
B	5	55.56	9	100.00

Anexo 7 Valor de Chi-cuadrado para queso semiseco en mercados A y B

**Chi-Square Test
for Equal Proportions**

Chi-Square	0.1111
DF	1
Pr > ChiSq	0.7389

Anexo 8 Formato de Inspección adaptado del RTCA.

Puntaje: 0: No cumple con el requerimiento 0.5: Cumple con al menos un requerimiento 1: Cumple con dos de los requerimientos 2: Cumple con todos los requerimientos.	Total: 9 puntos	Total: 6.5 puntos	Total: 13.5 puntos	Total: 5 puntos	Total: 8.5 puntos	Total 1 puntos
Quesería	1	2	3	4	5	6
Edificio						
Alrededores						
a.-Limpios	0.5	0.5	1	0	0.5	0
b.-Ausencia de focos de contaminación	0.5	0.5	1	0	0	0
Diseño						
a.-Protección en puertas y ventanas contra insectos y roedores y otros contaminantes	1	0	2	1	1	0
b.-Área específica para vestidores y para ingerir alimentos	0	0.5	0.5	0	0	0
Ventilación adecuada						
a.-Ventilación adecuada	1	1	2	0	1	0
Abastecimiento de agua						
a.-Abastecimiento suficiente de agua potable	2	2	2	2	2	0
b.-Instalaciones apropiadas para almacenamiento y distribución de agua potable	1	1	1	1	1	0
Drenajes						
a.-Sistemas e instalaciones de desagüe y eliminación de desechos adecuados	2	0	2	0	2	0
Instalaciones sanitarias						
a.-Servicios sanitarios limpios, en buen estado y separados por sexo	0	0	0	0	0	0
Instalaciones para lavarse las manos						
a.-Lavamanos con abastecimiento de agua caliente y/o fría	0	0	0	0	0	0
b.-Jabón líquido, toallas de papel o secadores de aire y rótulos que indican lavarse las manos.	0	0	0	0	0	0
Equipo y utensilios						
a.-Equipo adecuado para el proceso	0	0	0	0	0	0
b.-Equipo en buen estado	0	0	0	0	0	0
Prácticas higiénicas						
a.-El personal que manipula alimentos utiliza ropa protectora ,cubrecebas, cubre barba(cuando proceda),mascarilla y calzado adecuado	0	0	0	0	0	0
Envasado						
a.-Material para envasado almacenado en condiciones de sanidad y limpieza	1	1	1	1	1	1
b.-Material para envasado específicos para el producto e inspeccionado antes del uso.	0	0	1	0	0	0
Almacenamiento y distribución						
a.-Materias primas y productos terminado almacenados en condiciones apropiadas	0	0	0	0	0	0