

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos



Determinación de la prevalencia de *Escherichia coli* O157 en quesos no madurados no artesanales por medio de un sistema isotérmico de detección molecular.

Trabajo de graduación presentado por Anapaula Pérez Castillo para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería de Ciencias de los Alimentos

Guatemala
2013

Determinación de la prevalencia de *Escherichia coli* O157 en quesos no madurados no artesanales por medio de un sistema isotérmico de detección molecular.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos

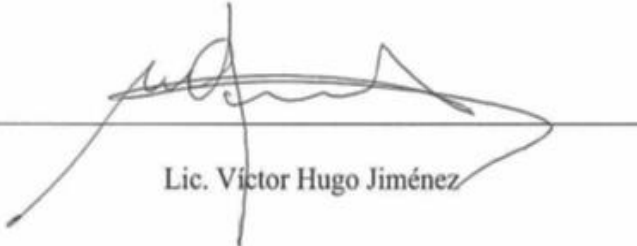


Determinación de la prevalencia de *Escherichia coli* O157 en quesos no madurados no artesanales por medio de un sistema isotérmico de detección molecular.

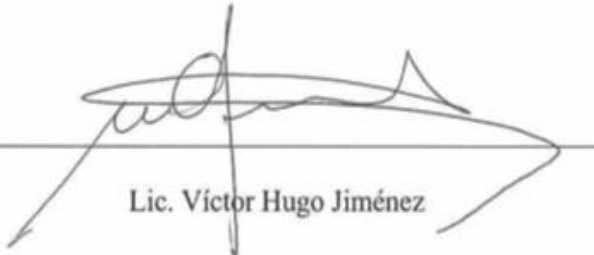
Trabajo de graduación presentado por Anapaula Pérez Castillo para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería de Ciencias de los Alimentos


Guatemala
2013

Vo. Bo. :

(f) 
Lic. Víctor Hugo Jiménez

Tribunal Examinador:

(f) 
Lic. Víctor Hugo Jiménez

(f) 
Lda. Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f) 
Lda. Patricia Palacios de Palomo

Fecha de aprobación: Guatemala, 3 de diciembre de 2013

PREFACIO

El presente trabajo surgió como una necesidad de validar las crecientes tecnologías desarrolladas para el análisis microbiológico de patógenos, como lo es *E.coli* O157:H7. Este tema se desarrolló gracias a que la empresa 3M, desarrollador del Sistema Isotérmico de Detección Molecular, prestara el equipo para la realización de la investigación.

Se decidió trabajar con este patógeno debido a que en Guatemala existen datos limitados sobre el mismo. Así mismo se escogió determinar la prevalencia en quesos no madurados debido que ha sido un vehículo implicado en brotes de *E.coli* O157:H7.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

Para realizar este trabajo recibí ayuda de muchas personas que hicieron que lograré mis objetivos con menor dificultad. Es por esto que agradezco principalmente a Dios por haberme dado la oportunidad de alcanzar esta etapa de mi vida. A mis padres y hermanos (Dany, Leo y Fer) por haberme apoyado a lo largo de mi vida, ya que sin ellos este logro no hubiese sido posible. Quiero agradecer a Carlos por su incondicional apoyo en todo momento. También agradezco a mi asesor por el tiempo y los conocimientos dedicados a este trabajo.

CONTENIDO

	Página
PREFACIO.....	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE ILUSTRACIONES.....	viii
RESUMEN.....	ix
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. MARCO TEÓRICO.....	4
A. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PATÓGENO.....	4
1. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS.....	4
2. SEROTIPIFICACIÓN.....	5
B. IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.....	5
1. INFECCIÓN.....	6
a. TOXINA.....	6
b. MECANISMO DE LA BACTERIA Y SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD.....	7
c. VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	9
d. TRATAMIENTO Y ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN.....	11
C. IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.....	11
D. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	15
1. MÉTODO TRADICIONAL.....	15
2. MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN.....	16
a. MÉTODOS BASADOS EN ÁCIDO NUCLEICOS....	17
b. MÉTODOS BASADOS EN REACCIONES INMUNOLÓGICAS.....	18
c. SISTEMA ISOTÉRMICO DE DETECCIÓN MOLECULAR.....	19
IV. JUSTIFICACIÓN.....	23
V. OBJETIVOS.....	24
A. GENERAL.....	24
B. ESPECÍFICOS.....	24
VI. METODOLOGÍA.....	25
A. TOMA DE MUESTRAS.....	25
B. ENRIQUECIMIENTO DE LA MUESTRA.....	26
C. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.....	26
D. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA DETECCIÓN	

	MOLECULAR.....	27
	E. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS.....	28
VII.	RESULTADOS.....	29
VIII.	DISCUSIÓN.....	33
IX.	CONCLUSIONES.....	36
X.	RECOMENDACIONES.....	37
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	38
XII.	ANEXOS.....	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Brotes de <i>E. coli</i> O157:H7 en lácteos.....	14
2. Comparación con el método PCR.....	20
3. Comparación con métodos basados en reacciones inmunológicas.....	21
4. Prevalencia de <i>E.coli</i> O157:H7 en quesos no madurados no arsanales en base a la zona de recolección de los mismos.....	29
5. Prevalencia de <i>E. coli</i> O157:H7 en quesos no madurados no artesanales en base a la marca	30
6. Prevalencia de <i>E. coli</i> O157:H7 en quesos artesanales.....	31
7. Batería para confirmación de <i>E. coli</i> O157:H7.....	32
8. Batería con características bioquímicas de <i>E.coli</i> de la muestra 6.....	32
9. Resultado de cada una de las muestras tomadas.....	42
10. Fecha de muestreo, Fecha de vencimiento del queso, Fecha de enriquecimiento y Fecha de análisis de las 96 muestras.....	44
11. Fecha de recolección, fecha de enriquecimiento y de análisis de los quesos artesanales	47

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustraciones	Página
1. Mecanismo de <i>E. coli</i> enterohemorrágica en el intestino.....	7
2. Historial natural del Síndrome Hemolítico.....	9
3. Vías de transmisión de <i>E. coli</i> O157:H7.....	10
4. Visión general del proceso isotérmico de detección.....	20
5. Ejemplo gráfica resultado positivo.....	48
6. Ejemplo gráfica resultado negativo.....	48

RESUMEN

Se llevó a cabo un muestreo de distintos tipos de quesos no madurados no artesanales en la ciudad de Guatemala, con el objeto de determinar la prevalencia de *E. Coli* O157:H7 en ambos casos. Para realizar el estudio se recolectaron 96 muestras en los distintos supermercados de las distintas zonas de la ciudad.

Así mismo se analizaron 8 quesos no madurados artesanales del mercado central de la zona 1 y del mercado La Villa de la zona 10 para determinar la prevalencia en estos productos.

Para la determinación de la prevalencia de *E. coli* O157:H7 se trabajó con un sistema isotérmico de detección molecular, que utiliza la amplificación continua y rápida del material genético y su posterior lectura por medio de bioluminiscencia.

Los resultados arrojaron que no hubo presencia de *E. coli* O157:H7 en las muestras no artesanales y en las muestras artesanales, el equipo dio resultados positivos pero no se pudo realizar la confirmación de los mismos.

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli O157 es una bacteria patógena que puede causar enfermedades severas como colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico y púrpura trombocitopenia trombótica (Marzocca *et al*, 2006). Productos lácteos como leche cruda, queso y yogur se han asociado con brotes y casos esporádicos de enfermedades debidas a la contaminación de *E. coli* enterohemorrágica (Civera *et al*, 2007: 231).

Debido a la dificultad metodológica que conlleva su diagnóstico tanto a nivel clínico como industrial, en Guatemala existen datos estadísticos limitados al respecto de este patógeno. Por eso el objetivo de este estudio es implementar el sistema isotérmico de detección molecular para determinar la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en quesos no madurados no artesanales. Así mismo se desea evaluar la funcionalidad del sistema y su aplicación en la industria láctea.

Previo al inicio de los análisis, se determinó la cantidad de muestras a evaluar, las cuales fueron 96 y el lugar donde se iba a realizar la recolección de las mismas (las distintas zonas de la ciudad capital de Guatemala). Así mismo a manera de comparación, se recolectaron 8 muestras de quesos artesanales, también de la ciudad de Guatemala. Esta se llevó a cabo con no más de 24 horas de antelación al análisis, sin perder la cadena de frío.

Se determinó que no hay prevalencia de *E.coli* O157:H7 en quesos no madurados no artesanales de la ciudad de Guatemala. En cuanto a las 8 muestras de quesos artesanales, el equipo dio resultados positivos pero no se logró la confirmación serológica de la bacteria. La confirmación bioquímica se llevó a cabo con agar violeta rojo bilis más MUG, agar Macconkey sorbitol y con una batería (TSI, LIA, SIM, Citrato y Urea). Ninguna colonia tomada dio los todos resultados característicos para *E.coli* O157:H7.

II. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia, los procesos de transformación de la leche han ido adaptándose a la demanda de alimentos, desarrollándose productos lácteos de diversos tipos de manufactura. La leche se procesa tanto para conservar el producto durante más tiempo como para variar sus opciones de consumo. De esta manera se fueron desarrollando los derivados lácteos tales como queso, yogurt, crema, mantequilla, helados y nata, que hoy en día componen uno de los más importantes grupos de alimentos consumidos en la dieta del ser humano (Aranceta, 2004: 9).

En Guatemala se consumen 366,000 toneladas anuales de leche de vaca de las cuales 40,000 toneladas son producidas dentro del país. La producción en el año 2000 de quesos frescos fue de 241,200 lb (Donado, 2007: 29). El mercado nacional de Guatemala de consumo de quesos es de 15.95 toneladas al año. El crecimiento del mercado de quesos durante el año 2010 fue de 5% y según previsiones, se espera un crecimiento sostenido del mercado del 2.5% anual hasta el año 2015. El 60% del queso que se consume en Guatemala procede de productores locales (Ibarzábal, 2011).

El mercado guatemalteco, según las estadísticas es un mercado creciente, realmente no existe el hábito de utilizar el queso en los platillos, pero a pesar de esto se observa una demanda constante. El queso es utilizado en un gran porcentaje por el consumidor industrial (hoteles, restaurantes, etc), el mercado de consumo para hogares es bajo pero creciente (Ibarzábal, 2011).

En Guatemala se han realizado poco estudios en los que se ha buscado la prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en los alimentos. Uno de los trabajos realizados fue la identificación de *E.coli* O157:H7 en verduras y frutas congeladas para exportación, las frutas y verduras analizadas fueron brócoli, mora, fresas, frambuesa, piña y melón. El resultado del estudio fue que en ninguna de las muestras tomadas se encontró *E.coli* O157:H7 (Castañeda, 200:3). En otros estudios, se analizó la prevalencia de dicha bacteria en carne de ventas callejeras en la zona 4 de la ciudad capital de

Guatemala (Figuroa, 2000:1); así como la presencia de dicho patógeno en leches obtenidas artesanalmente y distribuidas en lecherías de la cabecera de Chiquimula (Olivet, 2008:1). En ninguno de estos dos estudios se encontró *E.coli* O157:H7 (Figuroa, 2000:30) (Olivet, 2008:1). No se ha reportado estudios de la bacteria en quesos no madurados.

Existe un estudio en Guatemala que indica la prevalencia de *E. Coli* O157:H7, en muestras de heces, realizadas en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de la zona 7, en donde fueron cultivadas 2210 muestras y se obtuvo un total de 257 positivos, por lo que podría suponerse que en los alimentos existe una prevalencia de esta bacteria (Olivet, 2008: 2).

III. MARCO TEÓRICO

A. Descripción general del patógeno

Desde el descubrimiento en 1885 por Theodor Escherich, *Escherichia coli* era considerada como una bacteria inofensiva. El hábitat normal es el tracto intestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a que normalmente está presente en altas concentraciones en las heces, durante mucho tiempo se ha utilizado como un organismo índice de posible contaminación fecal. Desde mediados de 1940, se ha acumulado pruebas de que ciertas cepas de *E. coli* causan diarrea, especialmente en bebés (Bibek, 2008: 294). Estas cepas han evolucionado a patógenas mediante la adquisición de factores de virulencia a través de plásmidos, bacteriófagos y otros (Lim, 2010:6).

Sin embargo, se indica actualmente que las cepas patógenas de *E. coli* son más de un tipo. Se subdividen en seis grupos en base a su capacidad de producir toxinas, para adherirse y para invadir las células epiteliales. Los grupos son: *E. coli* enterotoxigénico (ECET), *E. coli* enteropatógeno (ECEP), *E. coli* enteroinvasivo (ECEI), *E. coli* enterohemorrágico (ECHE), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* difusivamente adherente (ECDA) (Bibek, 2008: 295).

En 1982, una investigación realizada por el centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), encontraron dos brotes de diarrea severa con sangre, que llevó a la identificación de una cepa de *E.coli* que expresa el antígeno O 157 y el antígeno H7, que no habían sido previamente reconocido como un patógeno (Amstrong *et al*, 1996: 29).

1. Morfología y características. *E. coli* es una bacteria Gram-negativo, móvil, no esporulada y anaerobia facultativa, que en contraste con otras *E. coli* por lo general no fermenta el sorbito y no tienen actividad de glucoronidasa. Como otras *E. coli*, crece rápidamente de 30 a 42°C, y crece poco a 44-45°C y no crece a bajo de 10°C o por debajo. Se han identificado cepas resistentes a pH de 4.5 o por debajo de este (Bibek, 2008: 297).

Si bien *E. coli* no crecerá en las condiciones normales de las temperaturas de refrigeración usadas habitualmente en la industria alimentaria (3-7 °C), puede sobrevivir bien durante varias semanas con solamente la reducción de 0.5-1.5 ciclos logarítmicos en las poblaciones observadas durante 1 a 5 semanas (Bell, 1998:55).

2. Serotipificación. La serotipificación se basa en las diferencias antigénicas de la superficie de la célula bacteriana, es decir, los antígenos O (membrana externa), los antígenos H (flagelos) y los antígenos K (envoltura extracelular (cápsula)), donde éstos se hallan presentes. A partir de la década de 1920, se han llevado a cabo muchas más investigaciones sobre la diferenciación en serogrupos dentro de *E. coli* y a mediados de la década de 1940 se ideó un esquema que permitió dividir a *E. coli* en más de 170 serogrupos diferentes basados en los antígenos somáticos (O). Además, en la actualidad se admiten más de 50 antígenos flagelares (H) y aproximadamente 100 antígenos capsulares (K) que se usan para subdividir a *E. coli* en serotipos. En la actualidad, la diferenciación de los serogrupos y el serotipo junto con otros datos como el biotipo, el fagotipo y la producción de enterotoxina, puede diferenciar aquellas cepas capaces de producir enfermedades infecciosas en el hombre y en lo animales (Bell, 1998:4).

Varios serotipos de *E.coli* enterohemorrágico se asocian frecuentemente con enfermedades humanas como O26:H11, O91:H21, O111:H8, O157:NM y O157:H7. *E.coli* O157:H7 es el serotipo más frecuentemente aislado de EHEC de personas enfermas en Estados Unidos, Japón y el Reino Unido (Lim, 2010: 6).

B. Importancia en salud pública

La infección por *E.coli* O157:H7 es un importante problema de salud pública en América del Norte, Europa y otras partes del mundo. Aunque el total de casos de infecciones por este microorganismo son más bajos que los de otros agentes patógenos, las enfermedades causantes por *E.coli* O157:H7 han mostrado muchas mayores hospitalizaciones y mayores tasas de mortalidad (Lim, 2010: 9).

Se ha estimado que la infección de *E. coli* O157:H7 representa más de 20000 casos de enfermedad y ha resultado en la muerte de 250 personas cada año en Estados Unidos. En 1999, se reportaron un total de 38 brotes de infección por *E.coli* O157:H7 en los Estados Unidos. Los brotes se registraron en 30 estados y afectaron a 1897 personas. El Centro de Laboratorios para el Control de Enfermedades de Canadá informó de 1334 casos relacionados con *E. coli* O157:H7 en el año de 1995, lo que representa aproximadamente el 5% por 100,000 habitantes. Las tasa más altas de infección se registraron en Escocia, con 9.8 casos por cada 100,000 personas (Bach *et al*, 2002: 481).

1. Infección. La infección causada por *E.coli* O157:H7 puede presentar un amplio espectro clínico que van desde casos asintomáticos hasta la muerte. La mayoría de los casos inician con diarrea y una recuperación normal sin mayores complicaciones. Sin embargo, algunas personas desarrollan diarrea con sangrado o colitis hemorrágica de 1 a 3 días. En 5-10% de los casos de pacientes con colitis hemorrágica, la enfermedad puede progresar a Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) y a Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) (Lim, 2010: 9).

a. Toxina. *E. coli* O157:H7 produce verotoxinas (VT) o toxinas Shiga (Stx). Hay dos distintas toxinas shiga: Stx1 y Stx2. Una sola *E. coli* puede producir solamente Stx1, solamente Stx2 o ambas. La toxina se une a un receptor de glicolípido específica, globotriaosil ceramida (Gb3) situada en el intestino y en las células del riñón. La toxina es llamada verotoxina porque es una citotoxina que afecta las células Vero. La verotoxina bloquea la síntesis de proteínas lo que resulta en la muerte celular (Ray, 2008: 297).

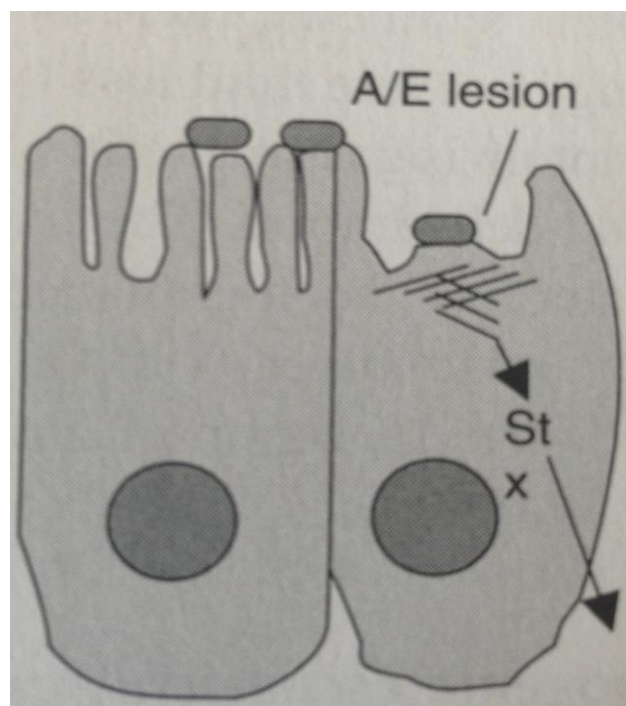
Todas las Stx constan de una sola subunidad A activa desde el punto de vista enzimático y de varias subunidades B, que se une al receptor celular específico (Gb3). Las células sensibles a las Stx poseen el receptor de toxinas globotriaosil ceramida (Gb3). Una vez en el interior de las células, la subunidad A se une y ésta inhibe la síntesis de proteínas. Las subunidades B forman pentámeros en asociación con una sola subunidad A, así son

responsables de la unión de la toxina a los receptores neutros de glucolípidos (Jay, 2000: 503).

b. Mecanismo de la bacteria y síntomas de la enfermedad.

Tras el consumo de alimentos contaminados, las bacterias colonizan primero el intestino mediante la adhesión a las células epiteliales. La proteína “intimina” produce la lesión A/E (adherencia y eliminación), esto se caracteriza por la desaparición de las microvellosidades y la adhesión bacteriana a la membrana de la célula epitelial (Lim, 2010: 17). La bacteria produce las toxinas que dañan las células epiteliales del colon (Ray, 2008: 297).

Ilustración No.1. Mecanismo de *E. coli* enterohemorrágica en el intestino



(Ray, 2008: 295).

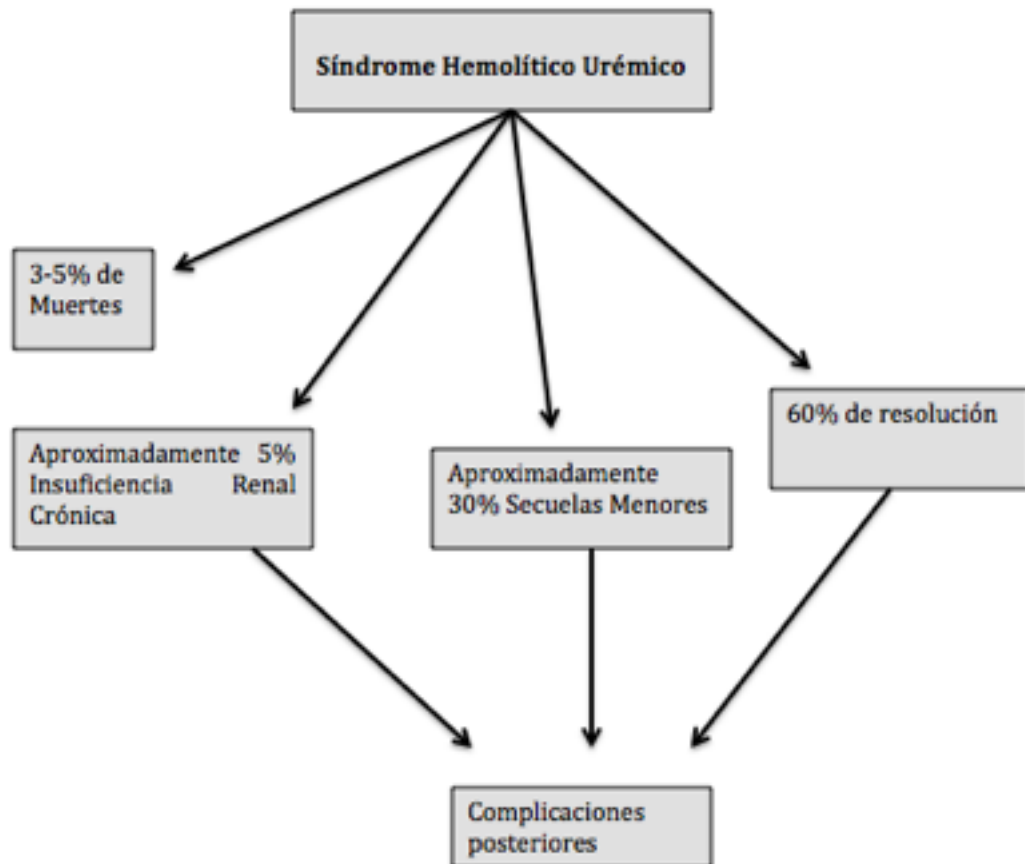
La toxina (Stx1 o Stx2) también es absorbida en el torrente sanguíneo y daña los pequeños vasos sanguíneos en el intestino, riñón y en el cerebro (Ray, 2008: 298). Los daños causados por la bacteria dan como resultado inicial la colitis hemorrágica que comienza con intensos calambres

abdominales dolorosos, diarrea groseramente sanguinolenta y vómito sin fiebre (Bell, 1998: 9).

Mientras que una gran parte de casos se resuelven sin grandes efectos nocivos, las complicaciones pueden resultar con el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) y enfermos adultos presentan síntomas de Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) en alrededor del 5% de los casos (Bach *et al*, 2002: 480). El SHU se caracteriza por diarrea sanguinolenta, insuficiencia renal aguda en niños, trombocitopenia, nefropatía aguda, convulsiones, coma y la muerte y el PTT se caracteriza por síntomas parecidos al SHU pero también fiebre, trastornos del sistema nervioso central, dolor abdominal, hemorragia gastrointestinal, coágulos de sangre en el cerebro y hasta la muerte (Bell, 1998: 9). Los síntomas ocurren de 3 a 9 días después de la ingesta y generalmente duran de 4 a 10 días (Ray, 2008: 298). Niños menores de 5 años, personas de la tercera edad y pacientes inmunocomprometidos son los más susceptibles al Síndrome urémico hemolítico, con una tasa de mortalidad de 3-5% (Bach *et al*, 2002: 480).

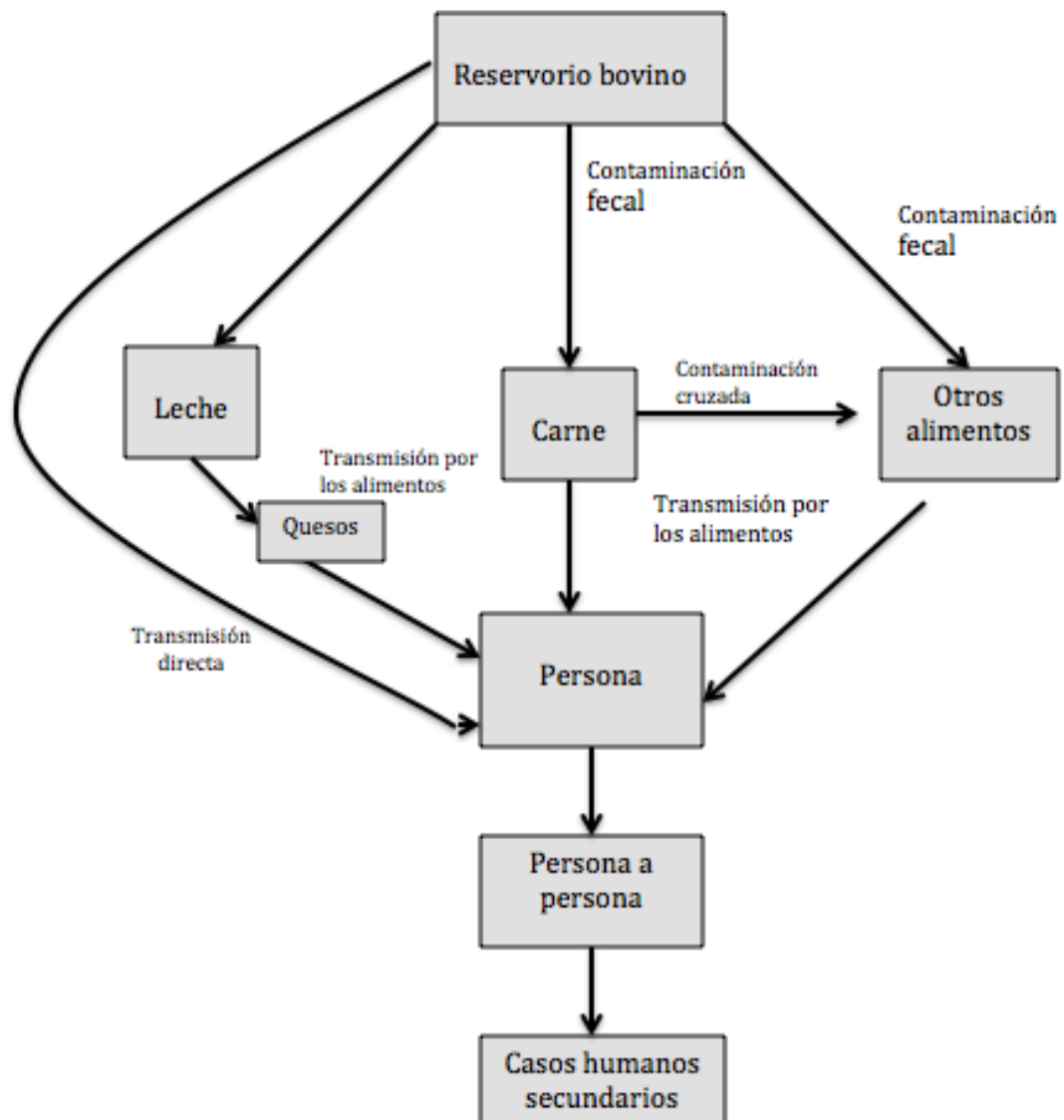
Las lesiones histopatológicas ocurren por interacción de la toxina shiga con las células endoteliales de los vasos sanguíneos, éstas se hincha y se desprenden. Simultáneamente se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, se oclucionan los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos (Rivas *et al*, 2008: 12)

Ilustración No. 2. Historial natural del Síndrome Hemolítico



Adaptado de (Rivas *et al*, 2008: 13)

c. Vías de transmisión. La ruta de transmisión más frecuente para la infección con *E. coli* O157:H7 es a través del consumo de alimentos y agua contaminados. Sin embargo, también se puede transmitir directamente de persona a persona. De 350 brotes reportados por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades desde 1982 hasta 2002, las vías de transmisión determinadas fueron por alimentos (52%), ruta desconocida (21%), de persona a persona (14%), transmitidas por el agua (9%) y el contacto con animales (3%). Estas diversas vías de transmisión pueden ser explicados por la dosis infecciosa tan baja (menor a 50 UFC) de *E. coli* O157:H7 (Lim, 2010: 11).

Ilustración No. 3. Vías de transmisión de *E. coli* O157:H7

Adaptado de (Amstrong *et al*, 1996: 30).

d. Tratamiento y estrategias de vacunación. Desde el descubrimiento de la bacteria, se ha aprendido mucho sobre los mecanismos patogénicos complejos elaborados por el grupo de organismos de *E.coli* enterohemorrágica. Sin embargo, todavía no existe un consenso claro sobre las estrategias de intervención en sujetos que sufren colitis hemorrágica y el Síndrome Hemolítico Urémico (Wilson, 2008: 43).

Varias estrategias para la terapia han sido estudiadas incluyendo el uso de antibióticos y la vacunación. Sin embargo, no existe un tratamiento específico para *E. coli* O157:H7 y el uso de antibióticos puede estar contraindicado (Lim, 2010: 10) ya que se ha encontrado que ciertos antibióticos promueven la liberación de mayores cantidades de la toxina Shiga (Wilson, 2008: 43).

A pesar de la evidencia (por medio de modelos) de que algunos antibióticos son beneficiosos, no hay una clara evidencia clínica de que los antibióticos ya sea aumente o reduzca el riesgo del desarrollo del síndrome hemolítico urémico en personas que sufren de colitis hemorrágica. Debido a lo ya mencionado, lo recomendado es que se evite la utilización de antibióticos hasta que haya evidencia clara de los tratamientos (Wilson, 2008: 43).

Teniendo en cuenta lo que se sabe sobre el papel central de las toxinas shiga en la enfermedad mediada por ECEH, las estrategias terapéuticas dirigidas a neutralizar estos factores de virulencia también valen la pena ser considerados. Los anticuerpos específicos de Stx, no han logrado disminuir la severidad de SHU en pacientes pediátricos pero las versiones más refinadas de estos materiales pueden llegar a ser más eficaces. (Wilson, 2008: 44).

C. Importancia en la industria láctea

Las enfermedades transmitidas por los alimentos, por consumo de lácteos generalmente se presentaban a escala local, normalmente ligados a un restaurante o a un evento social y era atribuido a un manejo inadecuado de los alimentos. Hoy en día debido a la distribución más efectiva de los alimentos, los brotes a menudo involucran productos alimenticios que son producidos centralmente y luego distribuidos, ocasionalmente también a otros países (Ryser, 2007: 309).

En cuanto a *E.coli* productor de verotoxinas, es bastante probable que los alimentos que satisfacen los criterios siguientes estén más implicados en brotes que otros:

- Ingredientes crudos de origen bovino
- Ingredientes crudos sometidos a contaminación directa o indirecta por fuentes bovinas (estiércol o agua)
- Ingredientes crudos no sometidos subsiguientemente a un tratamiento de destrucción bacteriana
- Productos sometidos a contaminación post-tratamiento
- Tratamientos que pueden permitir el crecimiento de *E.coli* O157:H7, si se halla presente.

(Bell,1998:18)

El consumo de carne de vacuno cocida ha sido considerado como la principal causa de esta infección, con frecuencia se han detectado *E. coli* O157:H7 y *E.coli* enterohemorrágica en el medio ambiente. Además, la leche cruda, así como el queso y yogur, también se han asociado con brotes y casos esporádicos de enfermedades debida a la contaminación de ECEH (Civera *et al*,2007: 231).

El tracto intestinal bovino es un depósito conocido de *E. coli* O157:H7, las heces que contienen el organismo pueden contaminar la leche y de esta forma contaminar los productos a base de este alimento como lo son los quesos. La contaminación con *E.coli* O157:H7 puede ser consecuencia de la pasteurización inadecuada de la leche cruda o contaminación después del proceso de pasteurización. En un brote de *E.coli* O157:H7 ocurrido en 1998 en Wisconsin, cuajadas de queso fresco fueron implicados como la fuente de la infección (Spano *et al*,2003: 73).

La principal materia prima de interés en relación con *E.coli* O157:H7 es la propia leche. Los factores clave que controlan la posibilidad de contaminación en esta fase incluyen la salud del animal y las precauciones higiénicas durante el ordeño. La contaminación por el animal es muy probable que aparezca de dos zonas: en primer lugar, por infección de la

ubre y diseminación de los organismos a la leche y en segundo lugar, por contaminación fecal de las superficies externas de la ubre. Por lo tanto son de especial importancia las zonas que contactan directamente con la ubre, que incluyen el material de la sala de ordeño, utilizando procedimiento de descontaminación apropiada. El control eficaz de la temperatura de la leche es de suma importancia ya que impedirá el crecimiento de las bacterias (Bell,1998: 93)

Además de la contaminación de la materia prima también es importante admitir que con frecuencia la leche cruda es transportada a los sitios de fabricación en camiones de leche a granel y después se almacena en silos para leche. Existen oportunidades importantes para que la contaminación y la contaminación cruzada se transmitan a los lotes posteriores de leche cruda. El diseño higiénico y la construcción del equipo de transporte y de almacenaje junto con las normas de limpieza y de higienización eficaces son decisivos para interrumpir toda cadena de contaminación (Bell,1998: 95)

Cuadro No.1. Brotes de *E.coli* O157:H7 en lácteos

Año	Lugar	No. Personas afectadas	No. Personas hospitalizadas	No. muertes	Fuente
2012	Oregón, Estados Unidos	21	4	0	Lácteos, leche cruda
2012	Estados Unidos	12	2	desconocido	Lácteos, leche cruda
2011	California, Estados Unidos	5	3	desconocido	Lácteos, leche cruda
2011	Washington, Estado Unidos	3	3	0	Lácteos, leche cruda
2010	California, Arizona, Colorado, Nevada	40	48	0	Lácteos, quesos
2010	Minesota, Oregón, Washington, Vermont	8	2	desconocido	Lácteos, quesos con leche sin pasteurizar
2010	Minesota, Estados Unidos	15	4	desconocido	Lácteo, leche sin pasteurizar
2009	Washington, Estados Unidos	3	0	0	Lácteo, leche sin pasteurizar
2006	Idaho, Estados Unidos	4	0	0	Lácteo, leche sin pasteurizar
2005	Washington, Estados Unidos	18	5	0	Lácteo, leche sin pasteurizar
2004	Estados Unidos	3	2	0	Queso a base de leche sin pasteurizar
2003	Estados Unidos	3	0	0	Leche sin pasteurizar
1998	Wisconsin, Estados Unidos	55	25	0	Lácteo, leche sin pasteurizar

(Clark, 2013).

D. Métodos de diagnóstico.

1. Método tradicional. Métodos convencionales han incluido la siembra, el cultivo y el uso de las pruebas bioquímicas. Con respecto a *E.coli* O157:H7, la detección se ha llevado a cabo por medio del uso del agar sorbitol MacConkey (SMAC), que consiste en sales biliares, una de carbohidratos, sorbitol y un indicador. Si O157:H7 se encuentra presente, las colonias incoloras aparecerán mientras que otras enterobacterias se mostrarán como colonias de color rosa. Los caldos de enriquecimiento que contienen peptona, vancomicina, cefixima, cefsulodina y telurito de potasio también se utilizan para la detección del organismo, proporcionando nutrientes que permiten a los organismos específicos para producir más colonias. Además de la separación y detección inmunomagnética (Deisingh, 2004: 420).

Las muestras se colocan sobre medios líquidos para el aislamiento de *E.coli* pero el número de organismos objetivos es bajo y el enriquecimiento de medios líquidos mejora la recuperación. Como se mencionó anteriormente el medio de enriquecimiento usados son agua tamponada con peptona la cual es suplementada para suprimir el crecimiento de organismos Gram positivos, *Aeromonas spp* y *proteus spp*. También se utiliza el caldo de soja tripticasa modificado (mTSB) o el caldo de *E. coli* modificado con novobiocina (mEC+n). La incubación óptima para minimizar el crecimiento excesivo de otros organismos es 24 horas a 41-42°C para productos lácteos. Los caldos enriquecidos se deben precalentar para impedir que los organismos sufran un choque por frío y ralenticen su crecimiento inicial (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004: 1212).

Se ha utilizado la separación inmunomagnética como técnica de concentración selectiva para mejorar el aislamiento de *E. coli* O157H7 donde la cantidad de organismos es baja. Partículas paramagnéticas con anticuerpos anti-lipopolisacárido (LPS) se mezclan con la muestra de prueba. Las partículas paramagnéticas con bacteria ligada se separan del sobrenadante por un campo magnético y después del lavado se ponen sobre

agar selectivo y se incuban durante 18 horas a 37°C para aislar las colonias sospechosas. La recuperación puede estar afectada por la relación bola-organismo, el caldo enriquecido usado y el problema de adsorción no específica de *E. coli* a las bolas magnéticas (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004: 1212).

Como se menciona anteriormente el agar MacConkey que contienen 1% de D-sorbitol en lugar de lactosa (SMAC) es un medio útil sobre el que crece *E. coli* que no fermenta el sorbitol en pequeñas colonias redondas blanco-grisáceas. Para distinguir *E. coli* O157:H7 no productor de beta-glucuronidasa se utilizan medios que contengan glucurónidos cromogénicos o fluorogénicos. La hidrólisis de MUG por actividad beta-glucuronidasa produce un compuesto fluorescente visible bajo luz ultravioleta. La adición de 0.1 g/litro de 5-bromo-4-cloro-3-indoxyl-beta-D-glucurónido (BCIG) a SMAC diferencia las colonias blancas de *E. coli* O157:H7 de las colonias azul verdosas de los organismos positivos a la betaglucuronidasa y negativos al sorbitol. Se pueden encontrar medios cromogénicos y fluorogénicos disponibles comercialmente (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004:1213).

Se debe confirmar bioquímicamente que las colonias que crecen sobre medios son *E. coli*. Los antígenos "O" somáticos y los "H" flagelares se identifican serológicamente, y para confirmar la virulencia, tiene que demostrarse que los organismos son productores de verotoxinas (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004: 1214).

2. Métodos rápidos de detección. Un método rápido se puede definir como cualquier enfoque dando resultados comparables en menos tiempo. Los beneficios potenciales de los métodos rápidos incluyen: reducción de la probabilidad de que el producto contaminado sea lanzado a la venta, hay una reducción de los costos de trabajo y almacenamiento de los productos pendientes de los resultados microbiológicos y mayor tiempo en la estantería de productos aprobados para la venta (Ryser, 2007: 258).

a. Métodos basados en ácidos nucleicos. La disponibilidad de completar la secuencia del genoma ha proporcionado nuevos conocimientos sobre características moleculares. Los métodos basados en ácidos nucleicos son: Reacción en cadena de la polimerasa, microarrays de ADN, hibridación in situ fluorescente y bacteriófagos recombinantes (Ryser, 2007: 259)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): este método combina los principios de la hibridación de ácidos nucleicos complementarios con los de la replicación de ácidos nucleicos que se aplican repetidas veces. El método convencional comprende ciclos repetitivos cada uno incluye tres reacciones secuenciales que implica la desnaturalización del ácido nucleico objetivo, hibridación (apareamiento) del cebador con el ácido nucleico objetivo de cada cadena simple y extensión del dúplex cebador (Bailey, 2007: 127).

- Desnaturalización del ácido nucleico: se logra por calentamiento a 94°C, que hace que se separen la doble hebra del ADN en dos filamentos ya que los enlaces de hidrógeno se rompen a esta temperatura (Bailey, 2007: 128).
- Hibridación del cebador: los cebadores son secuencias cortas de ácidos nucleicos que se seleccionan para que se hibriden de manera específica con un ácido nucleico en particular. Los cebadores se diseñan para ser utilizados en pares, cuando el par de cebadores se mezcla con el ADN diana desnaturalizado, un cebador se aparea con un sitio específico en un extremo de la secuencia de una cadena diana mientras que el otro cebador lo hace con un sitio específico en el extremo opuesto. La hibridación se lleva a cabo a 55-65°C (Bailey, 2007: 128).
- Extensión del dúplex cebador-objetivo: el cebador-objetivo proporciona el molde necesario que permite que la polimerasa agregue nucleótidos a los extremos 3' de cada cebador y se produzca por extensión una secuencia complementaria del molde diana. La polimerasa *Taq* es la enzima que suele usarse para la extensión del cebador que se produce a 72 °C. Se utiliza esta enzima debido a su capacidad de

funcionar a temperaturas elevadas y de resistir la temperatura de desnaturalización durante varios ciclos (Bailey, 2007: 129).

Los ensayos de PCR convencionales requieren manipulaciones múltiples que incluyen la amplificación inicial del ácido nucleico objetivo, la detección del producto amplificado por electroforesis y la confirmación por medio de quimioluminiscencia. Desde hace poco se dispone de pequeños instrumentos automatizados que combinan la amplificación del ADN objetivo con la capacidad de detectar el ácido nucleico diana amplificado (se elimina el tiempo necesario para la detección del producto amplificado) (Bailey, 2007: 131).

Errores que pueden afectar a la especificidad de la prueba final se puede introducir en varios puntos durante el desarrollo de la PCR. Los alimentos contienen una serie de componentes que pueden interferir con la reacción de PCR. Estos inhibidores de la PCR incluyen proteínas, grasas, compuestos polifenólicos y nucleasas que degradan el cebador (Ryser, 2007:261).

b. Métodos basados en reacciones inmunológicas. Los métodos inmunoquímicos utilizan antígenos y anticuerpos como herramientas para detectar microorganismos. Los antígenos son sustancias extrañas, habitualmente proteínas o hidratos de carbono que estimulan la producción de otras proteínas, denominadas anticuerpos. Los anticuerpos se unen a los antígenos y ayudan a eliminar el agente infeccioso. Los antígenos pueden formar parte de la estructura física del patógeno, como la pared celular bacteriana o pueden ser un producto químico generado por la bacteria (Bailey, 2007: 147).

Existen diversos métodos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión de antígeno con el anticuerpo:

- Técnicas de aglutinación: se hacen visibles por la aglutinación que producen los anticuerpos cuando el antígeno forma parte o se ha unido artificialmente a la superficie de glóbulos rojos, plaquetas, leucocitos, etc.

- Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo: el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo por la fluorescencia emitida (Peña, 2003).
- Técnicas de radioinmunoensayo: en esta técnica el anticuerpo se une a un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo a través de la radiactividad emitida (Peña, 2003).
- Técnicas de precipitación: se requiere que el antígeno y anticuerpo se encuentren en un medio fluido en el que sea posible la precipitación del complejo (Peña, 2003).
- Técnica de enzimoimmunoensayo: también se conoce como ELISA. La identificación del complejo, se lleva a cabo por medio del empleo de enzimas bien unidas al antígeno o al anticuerpo que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble (Peña, 2003).

Ciertas propiedades hacen que los anticuerpos sean adecuados para la detección de células vivas. Estas incluyen la capacidad de algunos anticuerpos para unirse a componentes presentes sólo en las células vivas. (Ryser, 2007: 264). El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es el ensayo de anticuerpos más utilizado para la detección de patógenos en los alimentos, el éxito de este ensayo depende de la especificidad del anticuerpo. (Janzten *et al*, 2006: 240).

En comparación con métodos de detección basados en la amplificación de ADN, los métodos basados en anticuerpos son poco sensibles. Los anticuerpos pueden sufrir de considerable reactividad cruzada, y la expresión de antígenos puede variar bajo diferentes condiciones del cultivo o como resultado de estrés ambiental. Los genes que codifican para determinados antígenos pueden ser adquiridos de especies estrechamente relacionadas a través de la transferencia lateral (Ryser, 2007: 264).

c. Sistema Isotérmico de detección molecular. El sistema Isotérmico de detección molecular utiliza cebadores específicos para reconocer distintas regiones del genoma y utiliza la polimerasa *Bst* para proporcionar la amplificación continua y rápida del material genético. Iones

pirofosfato, productos de la reacción de amplificación y APS se convierten enzimáticamente en ATP por medio de la ATP-Sulfurilasa. El ATP reacciona con las luciferasas para producir luz, la cual es detectada indicando la presencia del ADN de un organismo objetivo. Tanto la amplificación como la detección ocurren simultáneamente durante la fase exponencial lo cual proporciona resultados en tiempo real (3M Departamento de Seguridad Alimentaria, 2011)

Ilustración No.4. Visión general del proceso isotérmico de detección



Cuadro No.2. Comparación con el método PCR.

	Amplificación isothermal de ADN	PCR(Reacción en cadena de la polimerasa)
Enzima	<i>Bst</i> ADN polimerasa	<i>Taq</i> ADN polimerasa.
Desnaturalización del ADN	Desplazamiento de hebra	Calor
Temperatura de reacción	Isotérmica (60°C)	Ciclos repetitivos de calentamiento e enfriamiento. Desnaturalización(94°C) y replicación del ADN (55°C después 72°C)
Amplificación	Continua	Cíclica
Detección	Luz bioluminicente	Luz fluorescente

(3M Departamento de Seguridad Alimentaria, 2011).

Cuadro No.3. Comparación con métodos basados en reacciones inmunológicas.

	Amplificación isothermal de ADN	Métodos basados en reacciones inmunológicas.
Objetivo	Ácido nucleico (ADN)	Proteína
Reacción	Amplificación exponencial de material genético	Etapas de unión de anticuerpos y el antígeno
Detección	Bioluminiscencia	Colorimetría o fluorescencia
Instrumento	automatizado	Maual, semiautomático y automatizado
Interpretación de los resultados	Automatizado	Interpretación visual o automatizada

(3M Departamento de Seguridad Alimentaria, 2011).

El método isotérmico de detección molecular es un método que provee alta exactitud ya que utiliza cebadores específicos resultando en una amplificación más eficiente, la polimerasa *Bst* es menos susceptible a ser inhibida por sustancias encontradas en los alimentos comparada con otras polimerasas, la amplificación se da en condiciones isotérmicas, la detección se produce durante la fase exponencial de la amplificación lo que mejora la especificidad y la detección por bioluminiscencia tiene una mejor relación señal/ruido que la fluorescencia y no es afectada por las interferencia de fluoroforos que pueden estar presentes en algunos alimentos (por ejemplo en colorantes de alimentos) (3M Departamento de Seguridad Alimentaria, 2011).

Es un método rápido y simple ya que la bioluminiscencia proporciona una detección en tiempo real de la amplificación del ADN, la ADN polimerasa es tolerante al ADN de baja calidad que permite una preparación de las muestras más simple y menos pasos y debido a la bioluminiscencia el sistema de detección molecular ofrece el uso único de una codificación de color para diferenciar los ensayos de distintos patógenos (3M Departamento de Seguridad Alimentaria, 2011).

Los resultados positivos presuntivos se informan en tiempo real mientras que los resultados negativos se muestran después de que el análisis se ha completado. El sistema ofrece un solo paso de enriquecimiento y transferencia mínima posterior al enriquecimiento, lo que hace que la prueba de patógenos sea más simple y más rápida (3M Departamento de Seguridad Alimentaria, 2011).

IV. JUSTIFICACIÓN

Escherichia coli O157:H7 es una bacteria patógena que puede causar enfermedades severas y aunque el total de casos de infecciones por este microorganismo es baja (Lim, 2010: 9), la tasa de mortalidad que produce la bacteria en niños, personas de la tercera edad y pacientes inmunocomprometido es bastante elevada (Olivet, 2008:21). Por esta razón es de suma importancia determinar si existe la prevalencia de la bacteria en los productos lácteos (quesos frescos no artesanales) de venta en Guatemala.

La importancia del estudio radica en conocer si en Guatemala circula esta patógeno debido que es una bacteria de alto grado de patogenicidad. Esto lleva a pensar en la importancia de obtener alimentos aptos para el consumo por medio de la verificación, para que de esta manera se realicen acciones correctivas y evitar que las personas consuman el alimento y por ende evitar enfermedades.

Para las empresas de lácteos productoras de quesos no madurados es una garantía mostrar que su producto está libre de microorganismos patógenos como lo es *E.coli* O157:H7. Los métodos microbiológicos tradicionales pueden tardar varios días en brindar resultados, por lo que la utilización de un sistema isotérmico molecular eliminaría esta dificultad además de brindar resultados confiables.

Las bajas concentraciones de *E.coli* O157:H7 halladas en alimentos responsables de brotes, determina la necesidad de utilizar métodos altamente sensibles (Roldán *et al*, 2007: 114). Es por esto que el sistema isotérmico de detección molecular es ideal para realizar la determinación del microorganismo.

V. OBJETIVOS

A. General

Determinar la prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en quesos no madurados no artesanales producidos y distribuidos en la ciudad de Guatemala por medio de un sistema isotérmico de detección molecular.

B. Específicos

- Determinar la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en quesos no madurados no artesanales producidos en Guatemala.
- Evaluar la funcionalidad del sistema isotérmico de detección molecular y su aplicación en la industria láctea.
- Contribuir a la generación de datos estadísticos de *E. Coli* O157:H7 en Guatemala.

VI. METODOLOGÍA

El trabajo y los análisis se llevaron a cabo en los meses de agosto y septiembre del año 2013. Todo el procedimiento para llevar a cabo los análisis se trabajaron en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

Para el número de muestras, se utilizó la fórmula estadística para el caso de poblaciones infinitas

$$N = \frac{z^2 pq}{e^2}$$

En donde:

Z= nivel de confianza al 99.9%

pq= varianza de la población

e= error muestral

$$N = \frac{3.29^2 * 0.002 * 0.998}{0.015^2} = 96$$

A. Toma de muestras

Las muestras fueron recolectadas en tiendas de conveniencia y supermercados de manera aleatoria de las distintas zonas de la ciudad de Guatemala. Estas zonas fueron: 1, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19 y 21. Además se tomaron 8 muestras de quesos artesanales en el mercado central y en la 8va avenida de la zona 1 y en el mercado La Villa de la zona 10.

Las muestras se trasladaron en cadena de frío (hielera) al laboratorio de microbiología de la Universidad del Valle, las mismas se refrigerarán y se procesarán para realizar la detección.

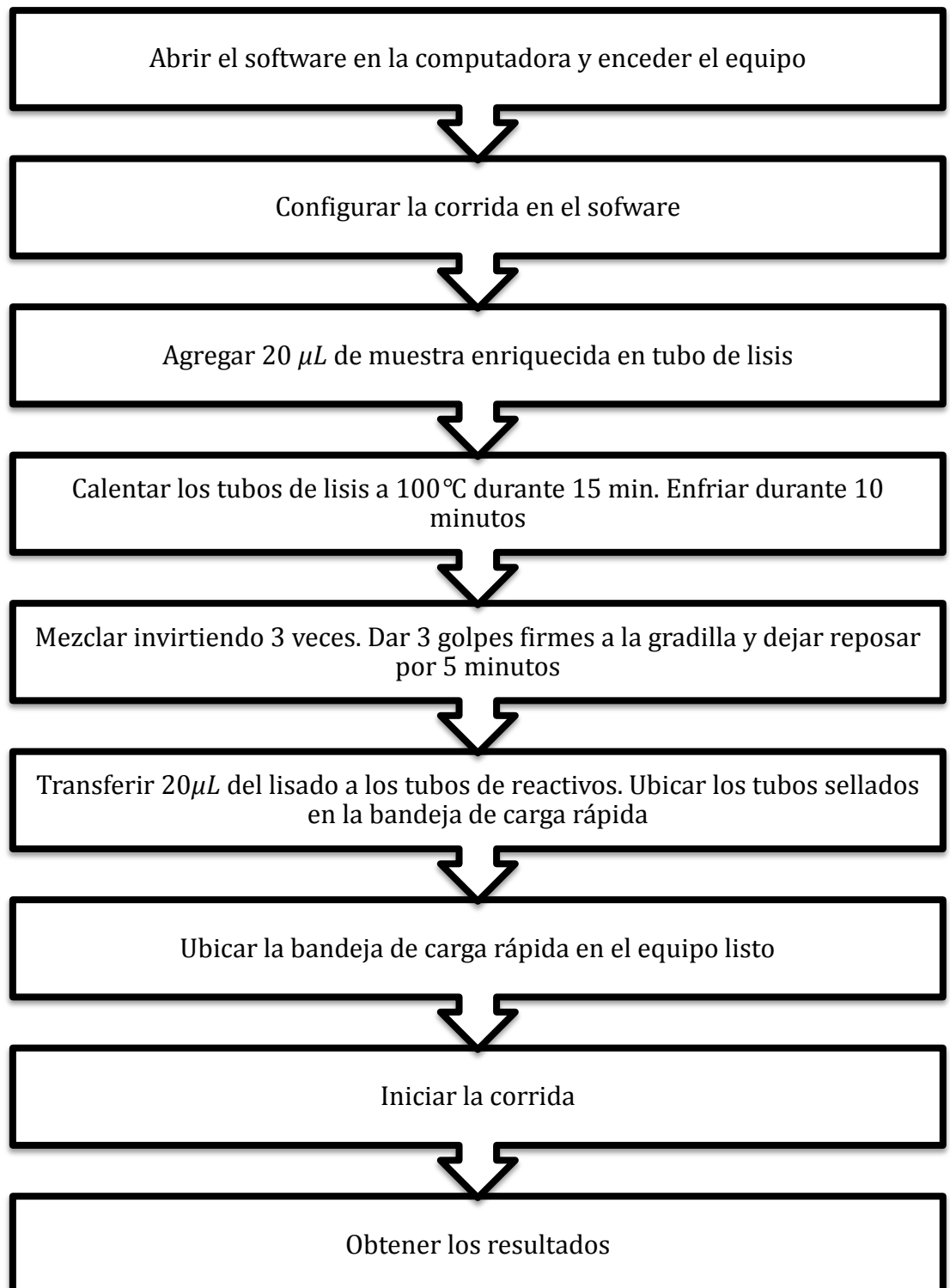
Los tipos de quesos no madurados que se analizaron fueron: queso fresco, queso fresco light, queso con 8% de grasa, queso de capas, queso panela, queso panela ahumado, queso cottage, queso ricota y requesón. Los quesos analizados fueron de 8 distintas marcas producidas en Guatemala.

B. Enriquecimiento de la muestra

Pesar 25 g de la muestra, precalentar el caldo de enriquecimiento BPW ISO (Agua peptonada ISO). Combinar 225mL del medio enriquecido con la muestra, homogenizar por 2 minutos e incubar a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas (3M seguridad Alimentaria, 2011)

C. Determinación de la sensibilidad del método

Para determinar la sensibilidad del métodos se utilizó una cepa de *E. coli* O157:H7 la cual se inoculó en una muestra de queso para observar que el equipo si detectaba la bacteria. También se llevaron a cabo diluciones de la cepa para reducir la cantidad de unidades formadoras de colonia y así observar si eran detectadas. La dilución que se inoculaba se sembraba en agar VRB+mug para contar las colonias.

D. Diagrama de flujo de la detección molecular

(3M seguridad Alimentaria, 2011)

E. Confirmación de resultados positivos

Para llevar a cabo la confirmación se utilizó agar violeta rojo bilis más MUG, agar MacConkey sorbitol y una batería de Agar triple azúcar y hierro (TSI), Agar lisina hierro (LIA), SIM, citrato y urea.

VII. RESULTADOS

En el estudio se recolectaron un total de 96 muestras de quesos no madurados no artesanales de 8 distintas marcas (A, B, C, D, E, F, G, y H). Los tipos de quesos recolectados fueron queso fresco, queso fresco light, queso con 8% de grasa, queso de capas, queso panela, queso panela ahumado, queso cottage, queso ricota y requesón. De estas muestras enriquecidas y analizadas no se encontró ninguna muestra con contaminación de *E.coli* O157:H7.

Cuadro No. 4. Prevalencia de *E.coli* O157:H7 en quesos no madurados no artesanales en base a la zona de recolección de los mismos.

Zona	Cantidad de muestras	Tipos de queso	Resultado
1	6	Queso de capas, queso fresco y queso fresco descremado	Negativo
5	6	Queso de capas, queso fresco y panela	Negativo
6	6	Queso fresco, queso de capas y panela	Negativo
18	6	Queso fresco descremado, queso de capas, panela y queso fresco light	Negativo
11	12	Queso cottage, queso fresco, queso fresco light, panela, queso de capas y queso cremoso	Negativo
9	6	Queso de capas, queso fresco, queso descremado y cottage	Negativo
10	6	Queso fresco y queso de capas	Negativo
13	6	Queso de capas dietético, queso de capas, fresco y queso especial 8% grasa	Negativo
15	6	Queso de capas, queso fresco light, panela, queso fresco y queso especial 8% de grasa	Negativo
7	6	Queso especial 8% de grasa, queso fresco, queso de capas, queso descremado y feta	Negativo
17	12	Queso especial 8% grasa, queso de capas, queso fresco, queso panela, queso cremoso, queso descremado y panela ahumado	Negativo
12	6	Queso fresco, requesón, queso especial 8% grasa, queso ricota, panela y panela ahumado	Negativo
21	6	Queso fresco light, queso ricotta, queso fresco, queso de capas y queso cremoso	Negativo

Cuadro No.5. Prevalencia de *E. coli* O157:H7 en quesos no madurados no artesanales con base a la marca.

Marca	Cantidad de muestras	Tipos de queso	Resultados
A	14	Queso de capas, queso cremoso, queso de capas dietético y queso especial 8% grasa	Negativo
B	16	Queso fresco, queso de capas y requesón	Negativo
C	13	Queso de capas y queso fresco descremado	Negativo
D	20	Queso de capas, queso fresco, queso panela y queso panela ahumado	Negativo
E	13	Queso fresco, queso de capas, queso fresco light y queso panela	Negativo
F	7	Queso de capas, queso fresco, queso fresco especial y queso ricotta	Negativo
G	12	Queso panela, queso fresco, queso cottage y queso feta	Negativo
H	1	Queso ricotta	Negativo

Durante el estudio también se evaluaron ocho muestras de quesos artesanales, recolectados en el mercado central de la zona 1, en 8ava avenida de la zona 1 y en el mercado La Villa de la zona 10.

Cuadro No.6. Prevalencia de *E.coli* O157:H7 en quesos artesanales

No. Muestra	Lugar de recolección	Tipo de queso	Resultado
1	mercado z.10	Queso Fresco	Negativo
2	8va avenida z. 1	Queso Fresco	Negativo
3	Mercado centra	Queso Fresco	Negativo
4	Mercado central	Queso de capas	Negativo
5	Mercado central	Queso Fresco	Negativo
6	Mercado central	Queso de capas	Negativo
7	mercado z.10	Queso fresco	Negativo
8	mercado z.10	Queso fresco	Negativo

Debido a que el equipo arrojó 4 quesos con resultados positivos, se realizó una confirmación bioquímica. La misma se llevó a cabo con agar violeta rojo bilis más MUG, agar Macconkey sorbitol y con una batería (TSI, LIA, SIM, Citrato y Urea). Ninguna colonia tomada dio todos los resultados característicos para *E.coli* O157:H7. De cada una de las muestras con resultados positivos, se tomaron colonias que dieron sorbitol y MUG negativo para realizar la batería bioquímica. A continuación, en la Tabla No. 7 se presenta un ejemplo de los resultados de la batería para las colonias de cada muestra.

Cuadro No. 7. Batería para confirmación de *E. coli* O157:H7

Muestra	TSI	LIA	SIM	Citrato	Urea
2	K/A, ++	R/A, ++	H ₂ S positivo	positivo	positivo
3	K/A, -+	R/A, --	H ₂ S positivo	Positivo	No se llevó a cabo
5	A/A, -+	R/A, -+	H ₂ S positivo	positivo	positivo
6	K/A, -+	R/A, ++	H ₂ S positivo	positivo	positivo

Nota:

K/A, ++= base/ácido, con gas y con ácido sulfhídrico

A/A, -+= ácido/ácido, sin gas y con ácido sulfhídrico

R/A, ++= rojo/ácido, con gas y con ácido sulfhídrico

R/A, -- = rojo/ácido, sin gas y sin ácido sulfhídrico

Una de las colonias tomadas de la muestra seis dio resultados en la batería bioquímica característicos de *E. coli* pero esta colonia era MUG positivo (no característico de *E.coli* O157:H7)

Cuadro No. 8 Batería con características bioquímicas de *E.coli* de la muestra 6.

Muestra	TSI	SIM	Citrato	Urea
6	A/A, +-	Indol positivo	Negativo	Negativo

VIII. DISCUSIÓN

La finalidad del estudio fue determinar la presencia de *E.coli* O157:H7 en quesos no madurados no artesanales de venta en la ciudad de Guatemala por medio de un sistema isotérmico de detección molecular.

El sistema isotérmico de detección molecular es un método que utiliza cebadores para lograr una amplificación del material genético. Para llevar a cabo esta amplificación se utiliza una polimerasa que es menos susceptible a ser inhibida por sustancias en el alimento, a pesar de esto puede ser que sí se inhiba, debido a esto se corrieron las matrices de los diversos quesos utilizados. Esto se colocaban con material genético para determinar que la polimerasa no fuera inhibida.

En ciertas corridas se obtuvo que las muestras de quesos necesitaban más inspección, debido a que el equipo detectaba unidades relativas de luz en los últimos minutos de la corrida. Esto se pudo deber a que en los 20 μ L se tomó parte de la resina que contenía material no genético, ya que se volvieron a analizar las muestras y los resultados fueron negativos.

Se inocularon varias muestras de queso con *E. Coli* O157:H7 para determinar la sensibilidad del equipo automatizado. Se realizaron diluciones de la bacteria y se sembró en agar VRB + MUG para observar la cantidad de colonias que se estaban inoculando en la muestra. El equipo detectó 100 UFC, 20 UFC y 1 UFC.

Según los resultados obtenidos de las 96 muestras de quesos no madurados no artesanales de las diferentes zonas de la ciudad de Guatemala, no se demostró la prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7. Esto se debe a que la prevalencia de la bacteria en general es baja, además de que en la industria de lácteos la leche utilizada para la fabricación de quesos lleva un proceso de pasteurización que evita una alta carga microbiana y por ende se evita *E.coli* O157:H7. Es necesario saber que no sólo la pasteurización hace posible obtener un queso sin *E. coli* O157:H7, también se debe tener en cuenta la materia prima, el proceso en general, el manejo

de la leche, el manejo del producto terminado y las buenas prácticas de manufactura.

En cuanto a las muestras de quesos artesanales, el equipo arrojó 4 resultados positivos. Las 4 muestras se enriquecieron y se analizaron de nuevo para verificar el resultado. En la repetición de dichas muestras presuntamente positivas, solamente la muestra número 3 se obtuvo como positiva. La posible explicación de esto es que la cantidad de *E. coli* O157:H7 era poca y que en el segundo análisis no se tomara muestra contaminada o que se perdiera la bacteria.

Debido a que el resultado del sistema de detección molecular es un resultado presuntivo, se realizaron análisis para confirmar los mismos. Para esto se utilizó el agar violeta rojo bilis más Mug (VRB + MUG) debido a que *E. coli* O157 no tiene actividad de glucoronidasa (Bibek, 2008: 297). También se utilizó el agar MacConkey Sorbitol ya que la bacteria, por lo general, no fermenta el sorbitol en contraste con otras *E. coli* (Bibek, 2008: 297). Varias de las colonias aisladas fue negativo el VRB y para el MacConkey Sorbitol.

Luego de esto se procedió a realizar una batería para confirmar que la colonia aislada era *E.coli*. La batería utilizada fue Agar triple azúcar y hierro (TSI), Agar lisina hierro (LIA), SIM, citrato y urea. Al utilizar la batería bioquímica se determinó que las bacterias no eran *E. coli*. Solamente la colonia 5 de la muestra 6 si era una *E. coli*, pero dio como resultado positivo al VRB más Mug lo que hizo concluir que no era una *E.coli* O157:H7, que tenía actividad de glucoronidasa.

Los resultados obtenidos llevan a suponer que de la muestra que se obtuvo resultados dos veces positivos por medio del sistema isotérmico, se perdió la bacteria o hubo bacterias que no se picaron que pudieron ser *E.coli* O157 pero que no se analizaron.

Es importante contar con los antisueros para realizar una confirmación, ya que no se puede asegurar la prevalencia de esta bacteria sin antes realizar la confirmación bioquímicamente de las colonias que crecen sobre los medio por medio de estos antisueros (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004: 1214).

Es importante monitorear el patógeno debido a que por ejemplo los producto crudos o poco cocidos de carne de vacuno es el vehículo más frecuentemente implicados en brotes de *E. coli* O157:H7, así mismo es importante monitorear el patógeno en otros producto tales como los queso debido a que la bacteria puede desarrollar tolerancia al ácido y encontrarse en los mismos

Los productos lácteos, entre estos los quesos; son alimentos que son consumidos por personas que tienen mayor probabilidad de contraer enfermedades; como lo son niños, ancianos y personas inmunocomprometidas. Es por lo que la presencia de *E. coli* O157 debe ser nula en los productos. Debe tomarse en cuenta que una mala práctica, un mal tratamiento de pasteurización o un mal manejo de la materia prima favorecería a la bacteria.

Es importante tomar en cuenta la necesidad de que los productos estén libres de este patógeno, debido a que hoy en día no existe antibiótico que puede atacar a la bacteria ya que en ciertos casos parece incrementar el riesgo del paciente a HUS. Además de provocar la liberación de las toxinas dentro del organismo de las personas.

IX. CONCLUSIONES

- La prevalencia de *E. coli* O157:H7 en 96 muestras de quesos no madurados no artesanales que se venden en la ciudad de Guatemala fue del 0%.
- El sistema isotérmico de detección molecular es apto y funcional para ser utilizado en la industria láctea.
- En algunas de las muestras de queso artesanales se obtuvieron resultados presuntivos positivos, pero estos no se lograron confirmar.

X. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo un muestreo de otros tipos de lácteos, para observar la prevalencia en ellos.
- Realizar visitas a las distintas plantas de lácteos para observar procesos de producción de quesos en Guatemala.
- Determinar la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en quesos no madurados artesanales.
- Utilizar antisueros para lograr una confirmación en su totalidad de *E.coli* O157:H7.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aranceta, J y Serra.LI. 2004. *Leche, Lácteos y Salud*. España. Editorial Médica Panamericana. 155 págs.
2. Bailey y Scott. 2007. *Diagnóstico Microbiológico*. Doceava Edición. España. Editorial Médica Panamericana. 1027 págs.
3. Bach, S et al. 2002. «Transmission and control of Escherichia coli O157:H7 - A review » Canadian Journal of Animal Science 82: 475-490.
4. Bibek, Ray y A. Bhunia. 2008. *Fundamental food microbiology*. 4ta edición. Florida, CRC Press. 492 págs.
5. Castañeda, Nelly. 2000. «Identificación de Escherichia coli O157:H7 en verduras y frutas congeladas para exportación » Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 62 págs.
6. Civera, T et al. 2007. «Survey on the presence of enterovirulent Escherichia coli, including E.coli O157, in cheese manufactured in the italian alpine region » Revista Ital. J.Food. Sci 19 (2): 229-238.
7. Clark, Marler. 2013. *Foodborne Illness Outbreak Database*. Encontrado en: <http://www.outbreakdatabase.com/>
8. Charles, Wilson. 2008. *Microbial Food Contamination*. 2da edición. Florida, CRC Press. 607 págs.
9. Chris, Bell y A. Kyriakides. 1998. *E. coli, una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos*. España. Aditorial Acribia, S.A. 234 págs.
10. Deisingh, A y M. Thompson. 2004. «Strategies for the detection of Escherichia coli O157:H7 in foods» Revista Journal of Applied Microbiology 96: 419-429
11. Donado, Marco. 2007. «Estudio para puesta en marcha de una planta procesadora de lácteos en La Máquina, Suchitepéquez.» Universidad de San Carlos de Guatemala. 80 págs.

12. Figueroa, Claudia. 2000. «Frecuencia de Escherichia coli O157:H7 en carne que se expende en ventas callejeras aledañas al mercado de la terminal, ubicado en la zona 4 de la ciudad capital de Guatemala» Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 44 págs.
13. Gregory, Amstrong et al. 1996. «Emerging Foodborne Pathogens: Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world » Revista Epidemiologic Reviews 18(1):29-51
14. James, Jay. 2000. *Microbiología moderna de los alimentos*. 6ta edición. España. Editorial Acribia, S.A. 615 págs.
15. Janzten, M et al. 2006. « Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using comercial methods: form chromogenig media to real-time PCR » . Spanish Journal of Agricultural Research 4(3): 235-247
16. Ji, Lim; J. Yoon y C. Hovde. 2010. «A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157». Revista J Microbiol Biotechnol 20(1): 5-14
17. Julen, Ibarzábal. 2011. *El mercado de los quesos en Guatemala*. Instituto Español de Comercio Exterior. Encontrado en: <http://www.icex.es/icex/cma/contentTypes/common/records/mostrarDocumento/?doc=4522437>
18. Manuel, Moragas y P. Busto. 2010. Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados (superficies, aguas piscinas, aire, subproductos etc) y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. Encontrado en: http://www.osakidetza.euskadi.net/r85-20432/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/recopilacionNormasMicrobiologicas2010_c.pdf

19. Marta, Rivas *et al.* 2008. Manual de Procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Centro regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del sur. Encontrado en:
<http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=IhI1ApW7G8c%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>
20. Marzocca, M *et al.* 2006. «Detección de *Escherichia coli* O157 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas » Revista argentina de microbiología 38(1).
21. Olivet, Jackeline. 2008. «Determinación de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7 en leches obtenidas artesanalmente y distribuidas en 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula » Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 44 págs
22. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. *Escherichia coli* Verocitotoxigénica. Quinta edición. Volumen II. 1261 págs. Encontrado en:
http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.13_Escherichia_coli_verocitotoxigenica_ruth.pdf
23. Peña, Jose. 2003. Inmunologiaonline, Métodos basados en la unión Ag-Ac. Universiad de Córdoba y Sweden Diagnosticas. España. Encontrado en: <http://www.uco.es/investiga/grupos/inmunologia-molecular/>
24. Ryser, Elliot y Marth, Elmer. 2007. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Tercera Edición. Estados Unidos. CRC Press, Taylor & Francis Group. 873 págs.
25. RTCA. 2009. *Alimentos. Criterios Microbiológicos para la inocuidad de alimentos.* 36 págs. Encontrado en:

https://members.wto.org/crnattachments/2008/tbt/CRI/08_0979_00_s.pdf

26. Roldán, M *et al.* 2007. «Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de producto cárnico y leche » Revista Argentina de Microbiología 39: 113-119
27. Spano, G. *Et al.* 2003. «Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufactura of Mozzarella cheese » Revista Letters in Applied Microbiology 36: 73-76.
28. 3M Departamento de Seguridad Alimentaria. 2011. Sistema 3M de Detección Molecular. Encontrado en:
<http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/MDS.pdf>

XII. ANEXOS

Cuadro No.9 Resultados de cada una de las muestras tomadas

No. Muestra	Marca	Tipo de queso	Resultado
1	A	Queso de capas	Negativo
2	B	Queso fresco	Negativo
3	C	Queso de capas	Negativo
4	D	Queso de capas	Negativo
5	C	Queso fresco descremado	Negativo
6	D	Queso fresco	Negativo
7	D	Queso de capas	Negativo
8	B	Queso fresco	Negativo
9	D	Queso fresco	Negativo
10	E	Queso fresco	Negativo
11	F	Queso de capas	Negativo
12	G	Queso panela	Negativo
13	G	Queso fresco	Negativo
14	A	Queso de capas	Negativo
15	D	Queso fresco	Negativo
16	E	Queso fresco	Negativo
17	D	Queso panela	Negativo
18	B	Queso de capas	Negativo
19	C	Queso fresco descremado	Negativo
20	E	Queso de capas	Negativo
21	E	Queso fresco	Negativo
22	A	Queso de capas	Negativo
23	G	Queso panela	Negativo
24	E	Queso fresco light	Negativo
25	G	Queso cottage	Negativo
26	B	Queso fresco	Negativo
27	D	Queso fresco	Negativo
28	E	Queso fresco light	Negativo
29	G	Queso fresco	Negativo
30	G	Queso Panela	Negativo
31	B	Queso de capas	Negativo
32	G	Queso panela	Negativo
33	D	Queso fresco	Negativo
34	E	Queso fresco	Negativo
35	A	Queso de capas	Negativo
36	A	Queso cremoso	Negativo
37	C	queso de capas	Negativo

Continuación Cuadro No.9

No. Muestra	Zona	Marca	Tipo de queso	Resultado
38	9	B	Queso fresco	Negativo
39	9	C	Queso fresco descremado	Negativo
40	9	D	Queso de capas	Negativo
41	9	G	Queso cottage	Negativo
42	9	D	Queso fresco	Negativo
43	10	D	Queso fresco	Negativo
44	10	D	Queso de capas	Negativo
45	10	B	Queso de capas	Negativo
46	10	C	Queso fresco	Negativo
47	10	F	Queso fresco	Negativo
48	10	F	Queso de capas	Negativo
49	13	A	Queso de capas dietético	Negativo
50	13	D	Queso de capas	Negativo
51	13	D	Queso fresco	Negativo
52	13	G	Queso fresco	Negativo
53	13	F	Queso fresco especial	Negativo
54	13	B	Queso de capas	Negativo
55	15	E	Queso de capas	Negativo
56	15	E	Queso fresco light	Negativo
57	15	G	Queso panela	Negativo
58	15	C	Queso fresco descremado	Negativo
59	15	B	Queso fresco	Negativo
60	15	A	Queso especial	Negativo
61	7	B	Queso fresco	Negativo
62	7	C	Queso de capas	Negativo
63	7	E	Queso de capas	Negativo
64	7	C	Queso fresco descremado	Negativo
65	7	A	Queso de capas	Negativo
66	7	G	Queso feta	Negativo
67	19	A	Queso especial 8% grasa	Negativo
68	19	D	Queso de capas	Negativo
69	19	C	Queso de capas	Negativo
70	19	D	Queso panela ahumado	Negativo
71	19	F	Queso fresco	Negativo
72	19	B	Queso de capas	Negativo
73	17	C	Queso de capas	Negativo
74	17	A	Queso especial 8% grasa	Negativo
75	17	B	Queso de capas	Negativo
76	17	B	Queso fresco	Negativo
77	17	D	Queso de capas	Negativo
78	17	D	Queso panela	Negativo
79	17	A	Queso de capas	Negativo
80	17	E	Queso fresco	Negativo

Continuación Cuadro No.9

No. Muestra	Zona	Marca	Tipo de queso	Resultado
81	17	A	Queso cremoso	Negativo
82	17	C	Queso descremado	Negativo
83	17	D	Queso panela ahumado	Negativo
84	17	F	Queso de capas	Negativo
85	12	B	Queso fresco	Negativo
86	12	B	Requesón	Negativo
87	12	A	Queso especial 8% grasa	Negativo
88	12	F	Ricotta	Negativo
89	12	E	Queso panela	Negativo
90	12	D	Queso panela ahumado	Negativo
91	21	E	Queso fresco light	Negativo
92	21	H	Ricotta	Negativo
93	21	G	Queso fresco	Negativo
94	21	C	Queso de capas	Negativo
95	21	B	Queso de capas	Negativo
96	21	A	Queso cremoso	Negativo

Cuadro No.10.Fecha de muestreo, Fecha de vencimiento del queso, Fecha de enriquecimiento y Fecha de análisis de las 96 muestras

No. Muestra	Fecha recolección	Tipo de queso	Fecha vencimiento	Fecha enriquecimiento	Fecha de análisis
1	18/08/13	de Capas	3/09/13	20/08/13	21/08/13
2	18/08/13	fresco	18/09/13	20/08/13	21/08/13
3	18/08/13	de Capas	13/09/13	20/08/13	21/08/13
4	18/08/13	de Capas	22/08/13	20/08/13	21/08/13
5	18/08/13	fresco descremado	13/09/13	20/08/13	21/08/13
6	18/08/13	fresco	22/08/13	20/08/13	21/08/13
7	18/08/13	de capas	22/08/13	20/08/13	21/08/13
8	18/08/13	fresco	6/09/13	20/08/13	21/08/13
9	18/08/13	fresco	30/08/13	20/08/13	21/08/13
10	18/08/13	fresco	7/09/13	20/08/13	21/08/13
11	18/08/13	de capas	23/08/13	20/08/13	21/08/13
12	18/08/13	panela	27/08/13	20/08/13	21/08/13
13	20/08/13	fresco	27/08/13	21/08/13	22/08/13
14	20/08/13	de capas	27/08/13	21/08/13	22/08/13
15	20/08/13	fresco	3/09/13	21/08/13	22/08/13
16	20/08/13	fresco	7/09/13	21/08/13	22/08/13
17	20/08/13	panela	26/08/13	21/08/13	22/08/13
18	20/08/13	de capas	31/08/13	21/08/13	22/08/13
19	20/08/13	fresco descremado	6/09/13	21/08/13	22/08/13
No. Muestra	Fecha recolección	Tipo de queso	Fecha de vencimiento	Fecha de enriquecimiento	Fecha de análisis
20	20/08/13	de capas	4/09/13	21/08/13	22/08/13
21	20/08/13	fresco	7/09/13	21/08/13	22/08/13
22	20/08/13	de capas	27/08/13	21/08/13	22/08/13
23	20/08/13	panela	6/09/13	21/08/13	22/08/13
24	20/08/13	fresco light	8/09/13	21/08/13	22/08/13
25	25/08/13	cottage	20/09/13	26/08/13	27/08/13
26	25/08/13	fresco	25/09/13	26/08/13	27/08/13
27	25/08/13	fresco	10/09/13	26/08/13	27/08/13
28	25/08/13	fresco light	8/09/13	26/08/13	27/08/13
29	25/08/13	fresco	10/09/13	26/08/13	27/08/13
30	25/08/13	Panela	17/09/13	26/08/13	27/08/13
31	25/08/13	de capas	14/09/13	26/08/13	27/08/13
32	25/08/13	panela	17/09/13	26/08/13	27/08/13
33	25/08/13	fresco	8/09/13	26/08/13	27/08/13
34	25/08/13	fresco	7/09/13	26/08/13	27/08/13
35	25/08/13	de capas	10/09/13	26/08/13	27/08/13

Continuación Cuadro No.10

No. Muestra	Fecha recolección	Tipo de queso	Fecha de vencimiento	Fecha de enriquecimiento	Fecha de análisis
36	25/08/13	Queso cremoso	13/09/13	26/08/13	27/08/13
37	26/08/13	de capas	11/09/13	27/08/13	28/08/13
38	26/08/13	fresco	13/09/13	27/08/13	28/08/13
39	26/08/13	fresco descremado	8/09/13	27/08/13	28/08/13
40	26/08/13	de capas	5/09/13	27/08/13	28/08/13
41	26/08/13	cottage	6/09/13	27/08/13	28/08/13
42	26/08/13	fresco	5/09/13	27/08/13	28/08/13
43	26/08/13	fresco	6/09/13	27/08/13	28/08/13
44	26/08/13	de capas	5/09/13	27/08/13	28/08/13
45	26/08/13	de capas	7/09/13	27/08/13	28/08/13
46	26/08/13	fresco	19/09/13	27/08/13	28/08/13
47	26/08/13	fresco	31/08/13	27/08/13	28/08/13
48	26/08/13	de capas	31/08/13	27/08/13	28/08/13
49	27/08/13	de capas dietético	16/09/13	28/08/13	29/08/13
50	27/08/13	de capas	5/09/13	28/08/13	29/08/13
51	27/08/13	fresco	1/09/13	28/08/13	29/08/13
52	27/08/13	fresco	10/09/13	28/08/13	29/08/13
53	27/08/13	fresco especial	2/09/13	28/08/13	29/08/13
54	27/08/13	de capas	6/09/13	28/08/13	29/08/13
55	27/08/13	de capas	18/09/13	28/08/13	29/08/13
56	27/08/13	fresco light	20/09/13	28/08/13	29/08/13
57	27/08/13	panela	19/09/13	28/08/13	29/08/13
58	27/08/13	fresco descremado	26/09/13	28/08/13	29/08/13
59	27/08/13	fresco	20/09/13	28/08/13	29/08/13
60	27/08/13	Queso, 8 % de grasa	6/09/13	28/08/13	29/08/13
61	2/09/13	fresco	6/10/13	3/09/13	4/09/13
62	2/09/13	de capas	14/09/13	3/09/13	4/09/13
63	2/09/13	de capas	18/09/13	3/09/13	4/09/13
64	2/09/13	fresco descremado	28/09/13	3/09/13	4/09/13
65	2/09/13	de capas	16/09/13	3/09/13	4/09/13
66	2/09/13	feta	7/09/13	3/09/13	4/09/13
67	2/09/13	Queso, 8% grasa	15/09/13	3/09/13	4/09/13
68	2/09/13	de capas	12/09/13	3/09/13	4/09/13
69	2/09/13	de capas	22/10/13	3/09/13	4/09/13
70	2/09/13	panela ahumado	15/09/13	3/09/13	4/09/13

Continuación Cuadro No.10

No. Muestra	Fecha recolección	Tipo de queso	Fecha de vencimiento	Fecha de enriquecimiento	Fecha de análisis
71	2/09/13	fresco	7/09/13	3/09/13	4/09/13
72	2/09/13	de capas	5/10/13	3/09/13	4/09/13
73	4/09/13	de capas	8/09/13	5/09/13	6/09/13
74	4/09/13	Queso 8% grasa	20/09/13	5/09/13	6/09/13
75	4/09/13	de capas	14/10/13	5/09/13	6/09/13
76	4/09/13	fresco	14/10/13	5/09/13	6/09/13
77	4/09/13	de capas	9/09/13	5/09/13	6/09/13
78	4/09/13	panela	13/09/13	5/09/13	6/09/13
79	4/09/13	de capas	20/09/13	5/09/13	6/09/13
80	4/09/13	fresco	19/09/13	5/09/13	6/09/13
81	4/09/13	Queso cremoso	20/09/13	5/09/13	6/09/13
82	4/09/13	Queso descremado	19/09/13	5/09/13	6/09/13
83	4/09/13	panela ahumado	22/09/13	5/09/13	6/09/13
84	4/09/13	de capas	9/09/13	5/09/13	6/09/13
85	15/09/13	fresco	10/10/13	16/09/13	18/09/13
86	15/09/13	Requesón	11/10/13	16/09/13	18/09/13
87	15/09/13	Queso 8% grasa	30/09/13	16/09/13	17/09/13
88	15/09/13	Ricotta	Sin fecha	16/09/13	17/09/13
89	15/09/13	panela	4/10/13	16/09/13	17/09/13
90	15/09/13	panela ahumado	19/09/13	16/09/13	17/09/13
91	15/09/13	fresco light	28/09/13	16/09/13	17/09/13
92	15/09/13	Picotta	11/10/13	16/09/13	17/09/13
93	15/09/13	fresco	17/09/13	16/09/13	17/09/13
94	15/09/13	de capas	13/10/13	16/09/13	17/09/13
95	15/09/13	de capas	19/10/13	16/09/13	17/09/13
96	15/09/13	Queso cremoso	4/10/13	16/09/13	17/09/13

Cuadro No.11 Fecha de recolección, fecha de enriquecimiento y de análisis de los quesos artesanales.

No. Muestra	Lugar de recolección	Tipo de queso	Fecha de recolección	Fecha de enriquecimiento	Fecha de análisis
1	mercado z.10	Queso Fresco	23/09/13	23/09/13	24/09/13
2	8va avenida z. 1	Queso Fresco	23/09/13	23/09/13	24/09/13
3	Mercado centra	Queso Fresco	23/09/13	23/09/13	24/09/13
4	Mercado central	Queso de capas	23/09/13	23/09/13	24/09/13
5	Mercado central	Queso Fresco	23/09/13	23/09/13	24/09/13
6	Mercado central	Queso de capas	23/09/13	23/09/13	24/09/13
7	mercado z.10	Queso fresco	23/09/13	23/09/13	24/09/13
8	mercado z.10	Queso fresco	23/09/13	23/09/13	24/09/13

Ilustración No.5. Ejemplo gráfica resultado positivo

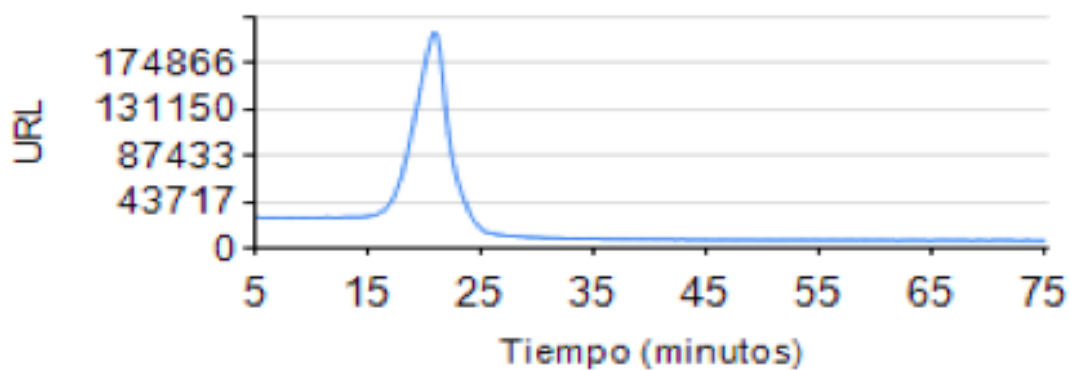


Ilustración No.6. Ejemplo gráfica resultado negativo

