

Inocuidad microbiológica de quesillos comerciales y artesanales expendidos en Chillán

Microbiological safety of commercial and artisanal fresh cheeses sold in Chillán

ABSTRACT

Introduction: Fresh cheese is consumed because of its healthy, nutritional, and safety characteristics. These features become less relevant when appropriate preparation and storage conditions are not met. *Objective:* The objective was to evaluate the microbiological safety of commercial and artisanal fresh cheeses sold in the city of Chillán. *Methods:* A total of 80 fresh cheese samples were analyzed: 40 commercial (brands 1 and 2) and 40 artisanal (brands 3 and 4). Enterobacteriaceae (ENT) and Escherichia coli were quantified by NCh 2676 and 2636 (2002). Salmonella, Staphylococcus aureus, and Listeria monocytogenes used NCh 2675, 2671 (2002), ISO 11290-1 (1996 rev 2004), and were confirmed by PCR. Cronobacter spp was identified by multilocus sequence typing (MLST) using criteria from <http://www.pubmlst.org/cronobacter>. Furthermore, staff and sale hygiene requirements were identified with Sanitary Food Regulations (SFR) checklists. *Results:* Overall ENT medians were 30 000 000 UFC/g (2 000 000 – 300 000 000) and E. coli were 450 UFC/g NMP/g (33 – 1 100); there were no significant differences in counts for both brand and sale location indicators ($p>0.05$). Compliance with SFR hygiene requirements was 50%. Positivity of L. monocytogenes was 8.8%; Salmonella spp and S. aureus were not detected. Suspected Cronobacter spp strains were isolated and identified as Franconibacter helveticus. *Conclusions:* The evaluated fresh cheeses did not meet SFR microbiological criteria and were therefore not safe to eat. The presence of L. monocytogenes is clearly a health risk in hypersensitive population groups that consume this food.

Key words: Fresh cheese, Sanitary Food Regulations, microbiological safety, health risk, Listeria monocytogenes.

Moira Costa (1)
Jasna Retamal (1)
Alejandra Rodríguez (2)
Pamela Chavarría (2)
Julio Parra F (2)
Alejandra Contreras (3)
Stephen Forsythe (4)

(1) Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile

(2) Departamento de Nutrición y Salud Pública
Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile

(3) Laboratorio de Experimentación y Certificación de Alimentos, LECYCA,
Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile

(4) Pathogen Research Centre, School of Science and Technology,
Nottingham Trent University, Clifton Lane, Nottingham, UK.

Dirigir correspondencia a:

Dr.

Julio Parra Flores

Nutricionista

Magister en Salud Pública

Departamento Nutrición y Salud Pública

Universidad del Bío-Bío, sede Chillán

CP 3780000.

Tel: (56)42-2463107 - Fax 42-2463132

Email: juparra@ubiobio.cl

Este trabajo fue recibido el 27 de Octubre de 2015
y aceptado para ser publicado el 14 de Marzo de 2016.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un problema relevante de Salud Pública por su incidencia, severidad y costos asociados (1). Desde 1990 la FAO/OMS diseñaron programas preventivos para garantizar la inocuidad de los alimentos en pos de un adecuado comercio internacional y la protección de la salud de los consumidores (2).

La inocuidad de los alimentos se define como la garantía

de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan. Utilizando todas las medidas de higiene de los alimentos que sean necesarias para asegurar la inocuidad y la calidad en todas las fases de la cadena alimentaria (3). Siendo la inocuidad una característica no aplicable a simple vista, el consumidor no tiene modo de conocer esta cualidad en los alimentos sólo basándose en la apariencia del producto. Por ello, los reglamentos para el control de normas y códigos de

prácticas higiénicas constituyen un fundamento técnico y práctico de gran importancia para resguardar la salud de las personas (4).

En Chile, el Ministerio de Salud es el encargado de fiscalizar la industria alimentaria, mediante la aplicación del Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA). Este instrumento normativo incorpora medidas de control de la inocuidad de los alimentos en toda la cadena alimentaria así como la exigencia de implementación de programas como las Buenas Prácticas de Fabricación. Además, según criterios técnicos la implementación del sistema HACCP (Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control), el cual es reconocido internacionalmente y obligatorio en Chile desde el año 2006 (5).

Un alimento muy consumido en la población chilena por sus características saludables, nutritivas y de inocuidad es el quesillo. El consumo de este derivado lácteo buena fuente de proteínas de alto valor biológico y calcio llega a 8.4 kg/año por persona (6). Sin embargo, estas cualidades pierden relevancia si no se respetan condiciones adecuadas en su elaboración y almacenamiento. Estudios realizados en la ciudad de Chillán durante la década de los noventa en quesillo de elaboración industrial como artesanal, evidenciaron una deficiente calidad sanitaria, catalogándolos incluso de no aptos para el consumo humano (7,8).

De acuerdo con el RSA el quesillo debe ser elaborado con leche pasteurizada incluyendo los quesillos de fabricación artesanal. Ser enfriado a temperatura no superior a 5° Celsius inmediatamente después de su elaboración, manteniéndose a esta temperatura hasta su expendio (9). No cumplir este requisito importante de control de temperatura en cualquier parte de la cadena alimentaria, se entrega a los microorganismos un ambiente propicio para su proliferación (10). Los microorganismos indicadores de interés sanitario especificadas en el RSA para este alimento son *Escherichia coli* y *Enterobacteriaceae*. Además, de patógenos como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, los cuales han estado implicados como agentes etiológicos a nivel internacional en brotes de enfermedad relacionados con productos lácteos (10 - 13). *Cronobacter sakazakii* por su carácter ubicuo ha sido aislado en diversos alimentos dentro de los que se incluyen los quesos madurados y frescos (14, 15).

En Chile, no hay reportes de casos o brotes de enfermedad por *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* asociados al consumo de quesillos. *Cronobacter*, solo ha sido aislado en una planta de productos lácteos y en leche en polvo (16,17), ya que no es de control obligatorio en Chile. Sin embargo, *Listeria monocytogenes* ha sido aislado en quesos blandos (18) e involucrada en brotes con resultados fatales en años recientes sin tener información detallada de estos sucesos.

En 2014, se confirmaron por el Instituto de Salud Pública 60 casos de *Listeria monocytogenes* con una letalidad de 34%. Un 27% de estos casos estaban relacionados con el embarazo (madre y/o recién nacidos), 42% con adultos mayores y 20% a personas con enfermedades crónicas e inmunodeprimidos. Las principales complicaciones asociadas a este patógeno en adultos mayores son bacteriemia o meningitis, y alrededor del 21% de ellos mueren (19). En las mujeres embarazadas, la listeriosis es generalmente una enfermedad febril inespecífica, pero puede resultar en pérdida fetal, parto prematuro, sepsis neonatal y meningitis (20). Los alimentos involucrados en estos casos de listeriosis no difiere mucho de lo encontrando en otros países, siendo productos lácteos y quesos blandos los de mayor impacto (21).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la inocuidad microbiológica de quesillos comerciales y artesanales expendidos en Chillán durante junio a agosto del 2014 y verificar el cumplimiento de los requisitos de inocuidad establecidos en el RSA de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico de corte transversal durante el segundo semestre de 2014 en la ciudad de Chillán.

Muestreo: Se colectaron por duplicado 40 quesillos industriales (marca 1 y 2) expendidos en supermercados y 40 quesillos artesanales (marca 3 y 4) con expendio en el mercado de Chillán y elaborados con leche de vaca pasteurizada. Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Experimentación Control y Certificación de Calidad de los Alimentos (LECYCA) de la Universidad del Bío-Bío de Chillán.

Microorganismos indicadores: Se utilizó el recuento de microorganismos mesófilos aerobios (RAM), *Enterobacteriaceae* (ENT) y *Escherichia coli* (*E. coli*) según normas Chilenas (NCh 2659, 2676 y 2636 (2002) respectivamente.

Microorganismos patógenos: Se utilizaron como referencia los patógenos establecidos en el RSA que son *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, utilizando para su aislamiento las NCh 2675 (2002), ISO 11290-1 1996 rev 2004 y NCh 2671 (2002) respectivamente. Además de *Cronobacter* spp según la metodología descrita por Iversen and Forsythe (22).

Identificación de patógenos: Se realizó mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR) utilizando la metodología descrita por Liu y cols (23) para *Salmonella*, Aznar y Alarcón (24) para *Listeria monocytogenes* y Brizzio y cols (25) para *Staphylococcus aureus*. *Cronobacter* mediante Multilocus sequence typing (MLST) según la técnica descrita por Para y cols. (17), utilizando los productos secuenciados por MA-CROGEN, Korea e identificando con la base de acceso libre <http://pubmlst.org/cronobacter>.

Requisitos de higiene del personal y expendio: Se utilizó una lista de chequeo con los requisitos establecidos en el párrafo VI y VIII del RSA del año 2014.

Control de temperatura: Esta actividad se realizó con un termómetro de precisión infrarrojo marca MASTECH MS 6530 con un rango de -32 a 650°C con una precisión de 0.1°C. En los quesillos marca 1 y 2 se midió directamente en la vitrina de expendio y en las marcas 3 y 4 inmediatamente después de la compra.

Análisis estadístico: Para describir se usaron medidas de tendencia central, dispersión y posición en el caso de variables cuantitativas, y frecuencias absolutas y porcentajes para variables cualitativas. Para comparar se utilizó la prueba de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis utilizando el software STATA 12.0 con un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

Para los recuentos de RAM, 50% de las muestras de la marca 1 contenían 20 000 000 UFC/g (2 000 000 – 40 000 000), para la marca 2 de 20 000 000 UFC/g (10 000 – 50 000 000), en la marca 3 de 10 000 000 UFC/G (1 000 000 – 40 000 000) y para la marca 4 de 20 000 000 UFC/g (300 000 – 30 000 000) no existiendo diferencias significativas en el recuento por tipo de marca ($p=0.07$), ni lugar de expendio ($p=0.60$) (figura 1).

Para ENT, la mediana para las muestras de la marca 1 tenía 7 000 000 UFC/g (1 000 000 – 80 000 000), para la muestra 2

de 70 000 000 UFC/g (30 000 – 200 000 000), marca 3 de 10 000 000 UFC/g (100 000 – 40 000 000) y marca 4 de 3 000 000 UFC/g (60 000 – 30 000 000), no existiendo diferencias significativas en los recuentos por tipo de marca ($p=0,28$) y lugar de expendio ($p=0,19$) (figura 2).

Para *E. coli* 50% de las muestras de la marca 1 contenían 80 NMP/g (15 – 1 100), para la marca 2 de 50 NMP/g (0 – 1 100), marca 3 de 46 NMP/g (12- 1 100) y para la marca 4 de 250 NMP/g (6 – 1 100), no existiendo diferencias significativas en los recuentos por tipo de marca ($p=0,68$) y lugar de expendio ($p=0,56$) (figura 3).

Las temperaturas encontradas en los quesillos comerciales era de $8.3\pm 1.4^{\circ}\text{C}$ y los artesanales de $7.5\pm 1.3^{\circ}\text{C}$. Los manipuladores que trabajaban en el mercado en la venta de quesillos cumplían sólo 50% de los requisitos de higiene del personal exigidos en el RSA. Para la higiene en los lugares de expendio el cumplimiento fue 50% para ambos lugares (figura 4).

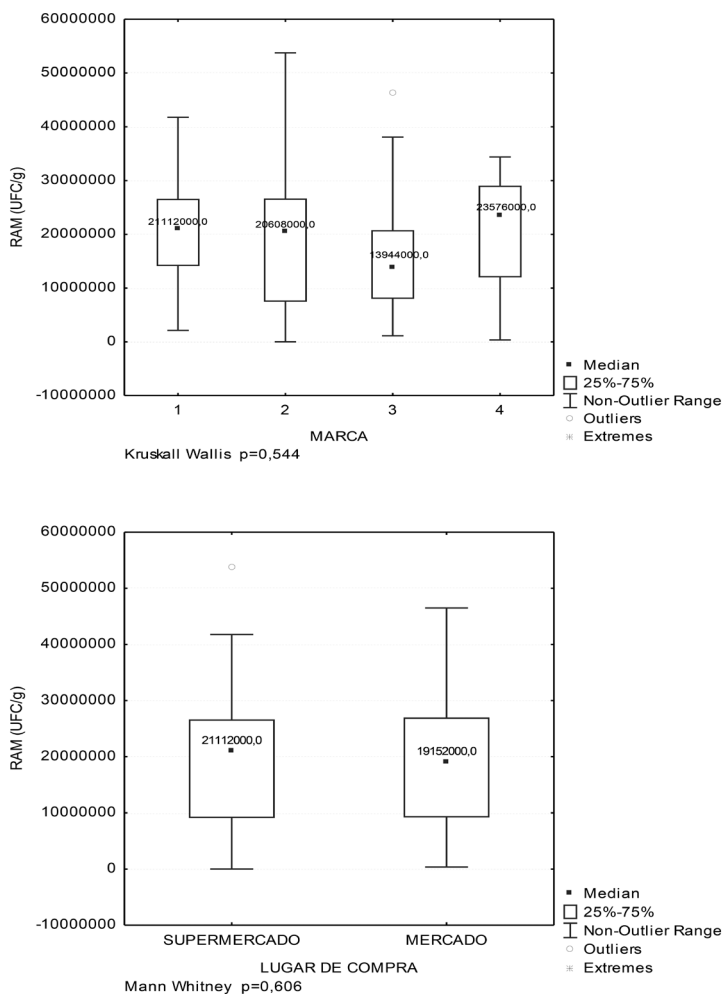
De las 80 muestras de queso analizadas sólo 7 (8.8%) fueron positivas a *Listeria monocytogenes*: 1 muestra en la marca 1 (5%), 3 en las marca 2 (15%) y 3 en la marca 4 (15%). No hubo positividad de *Salmonella* spp y las cepas presuntivas de *Staphylococcus aureus* fueron negativas por inmunoensayo y PCR (tabla 1). Se aislaron 8 cepas presuntivas de *Cronobacter* spp, en agar cromogénico DFI de las cuales 4 eran de la marca 2 y 4 de la marca 4. Todas fueron identificadas mediante MLST (perfil fusA 71) como *Franconibacter helveticus*, germen considerado hasta Julio de 2014 como *Cronobacter helveticus*.

DISCUSIÓN

El queso es un alimento reconocido como saludable por sus características nutritivas y de consumo frecuente en toda la población. Debe ser expendido en condiciones de refrigeración ya que por su humedad y nutrientes disponibles es susceptible a la contaminación y desarrollo microbiano, deterioro y por

FIGURA 1

Recuento de bacterias mesófilas aerobias (RAM) por marca y lugar de compra.



ello de riesgo para quien lo consume. Se recomienda adquirir este alimento en establecimientos autorizados, que cumplan con todas las normas higiénicas y sanitarias, incluyendo su fiscalización regular por las autoridades de salud.

En nuestro estudio utilizamos indicadores microbianos como el recuento de aerobios mesófilos (RAM), Enterobacteriaceae (ENT) y *Escherichia coli* (*E. coli*) los cuales nos proporciona una información útil de las condiciones de higiene durante la elaboración del queso, posterior manipulación o sugerencia de conservación inadecuada del producto (26). En Chile, no se exige el análisis de RAM para el queso, aun cuando a nivel internacional esta prueba es muy utilizada como indicador en la industria láctea. Debido a que al grupo de bacterias mesófilas pertenece la mayoría de la flora que se encuentra en la leche, principalmente las bacterias lácticas, que crecen en un amplio rango de temperatura y logrando su multiplicación a partir de los 5°C como temperatura mínima.

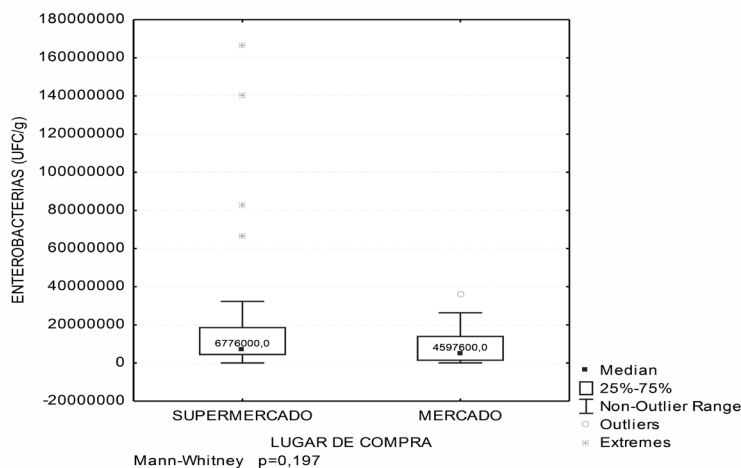
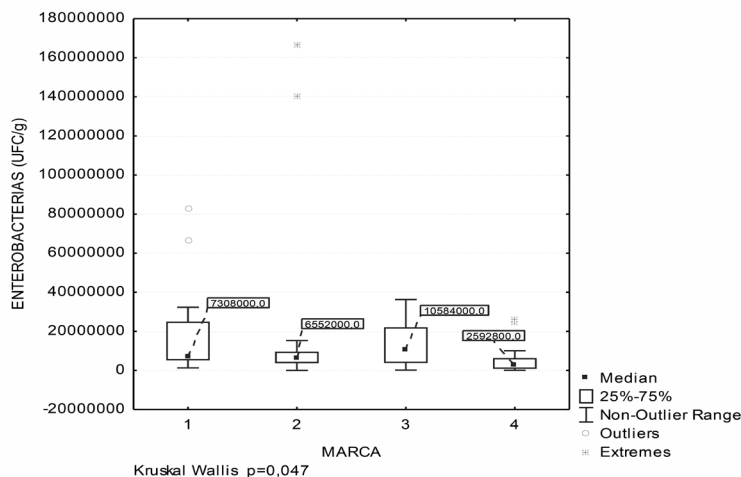
Es por ello que la inmediata refrigeración a temperaturas de 4 a 5°C se hace fundamental para asegurar la calidad del producto (27). Es necesario destacar que de las marcas evaluadas una de ellas exhibe en su etiqueta que el producto es elaborado bajo la norma HACCP.

Para RAM, todas las marcas obtuvieron recuentos por sobre 100 000 UFC/g y hasta 50 000 000 UFC/g, no existiendo diferencias significativas por marca o tipo de queso ($p>0.05$). Delgado y Maurtua (28), en un estudio similar hecho en Perú encontraron recuentos elevados de este indicador e informando que aunque muchas de estas bacterias son propias de la fermentación de la leche encontrar parámetros muy altos indicarían contaminación durante la manipulación del producto y por ende un deterioro precoz en su vida útil.

Para ENT encontramos que todas las marcas analizadas obtuvieron recuentos por sobre el límite máximo establecido en el Reglamento Sanitario de los Alimentos de 10 000 UFC/g,

FIGURA 2

Recuento de Enterobacterias por marca y lugar de compra de quesillos.



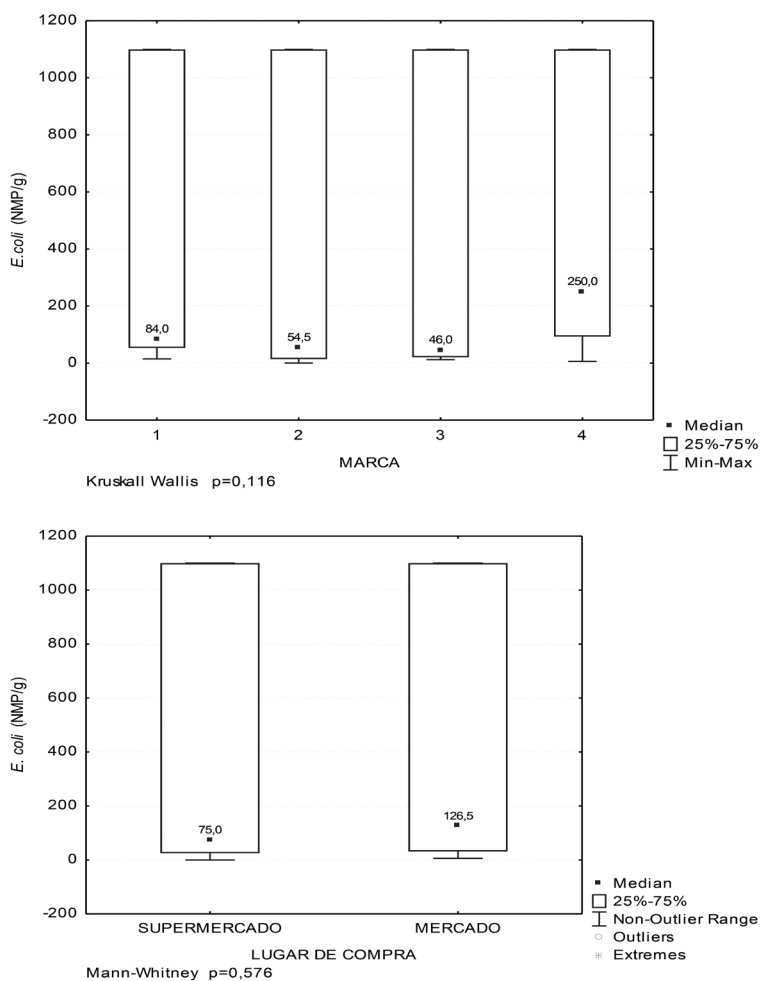
llegando incluso a valores de 100 000 000 UFC/g. Si bien es cierto que esta familia de bacterias constituye un grupo diverso y reciben el nombre de Enterobacteriaceae por ser parte de la flora intestinal normal tanto de animales como humanos, no implican necesariamente la presencia de materia fecal en el alimento. Más bien, indicarían contaminación post proceso térmico siendo uno de los principales factores no mantener la cadena de frío del producto (27). La alta positividad a ENT en nuestro estudio es compatible con la presencia de varios microorganismos oportunistas y patógenos asociados a enfermedad en niños en diversas publicaciones (17). Por lo que estos hallazgos deben ser analizados en términos del riesgo asociado al consumo en consideración que estos alimentos son parte de la dieta de niños y adultos mayores, del escaso control que estarían realizando las empresas productoras y la autoridad de salud responsable en nuestro país.

Se encontró *E. coli* en todas las marcas de queso y en

algunas con recuentos mayores a 1100 MNP/g. Recuentos muy elevados si los comparamos con lo establecido en la normativa nacional, catalogándolos como productos no aptos para el consumo humano debido a que este indicador señala presencia de materia fecal. La *E. coli* se elimina mediante proceso térmico y su hallazgo en este alimento nos puede indicar un tratamiento inadecuado o que la contaminación fue posterior, durante el envasado, transporte o comercialización. Los hallazgos de este estudio son similares a lo encontrado en Venezuela por Rodríguez y cols (26), que plantean el riesgo de encontrar algunas cepas de *E. coli* productoras de toxinas en el queso y por ello un riesgo importante a la salud del consumidor.

No se pudo establecer asociaciones significativas entre los recuentos de Enterobacteriaceae, *E. coli* y RAM con respecto a la marca y lugar de procedencia del producto ($p > 0.05$). Tampoco entre el recuento del queso elaborado bajo norma

FIGURA 3

Recuentos de *Escherichia coli* por marca y lugar de compra de quesillos

HACCP y las otras 3 marcas evaluadas. Sólo pudimos apreciar diferencias cuantitativas en los valores máximos de Enterobacteriaceae y RAM en los quesillos procedentes de supermercado comparados con los adquiridos en el mercado municipal, lo que puede estar asociado al recambio constante del producto por el poco espacio de almacenamiento.

De las 80 muestras analizadas 7 (8.8%) arrojaron positividad para *Listeria monocytogenes* lo que es un claro riesgo de enfermedad, secuela y causa de muerte en grupos inmunosuprimidos. Esta situación es preocupante ya que a Mayo de 2015 se han confirmado 20 casos con una letalidad de 41%, concentrándose en la madre y recién nacido con 23%, adultos mayores con 45% y enfermedades crónicas con tratamiento de inmunosupresión con 27% de los casos (29). Es importante mencionar que los estudios de prevalencia de este patógeno en productos lácteos listos para el consumo como el quesillo o quesos blandos son escasos en Chile. En

2001, Cordano y Rocourt (30) reportaron una prevalencia de 0.8% en quesos blandos evaluados en Chile. La misma autora reportó una prevalencia de 25% pero en ensaladas listas para el consumo en el retail (31).

Díaz y cols (32) en una investigación realizada en provincia de Trujillo, Perú encontró 3,3% de presencia de *L. monocytogenes* en 60 muestras analizadas de quesillo. Barancelli y cols (33) en quesos producidos en Brazil 3.4% y Moscalewski y cols (34) 6.7% en quesos elaborados en el mismo país. Todos los estudios concluyen la necesidad de implementar medidas higiénicas y sanitarias estrictas para disminuir el riesgo que representa la presencia de este patógeno para la salud en poblaciones de riesgo como lo son las embarazadas, adultos mayores, niños, y personas inmunosuprimidas cuando consumen alimentos listos para el consumo como es el quesillo (35).

Aún cuando hubo recuentos muy elevados de Enterobacteriaceae y *E. coli*, en ninguna de las muestras analizadas

FIGURA 4

Cumplimiento promedio de requisitos de higiene del personal y lugares de expendio de quesillos según el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile.

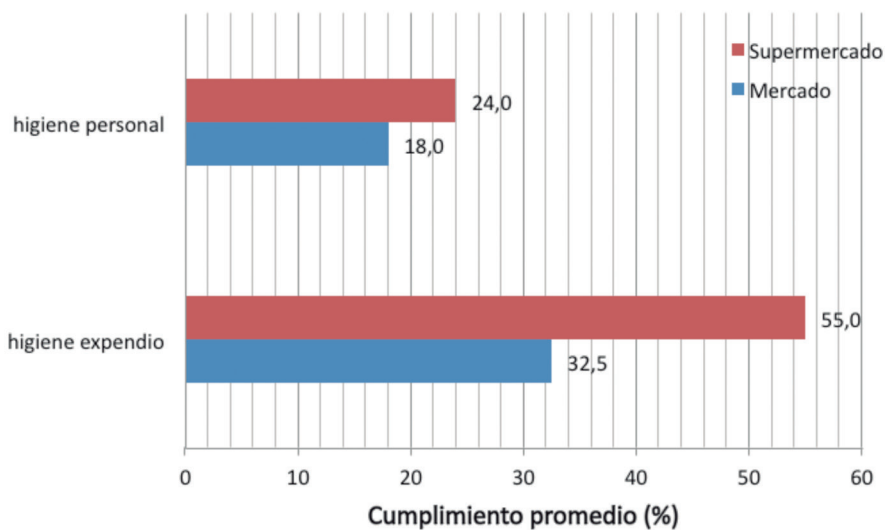


TABLA 1

Positividad de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Cronobacter* y *Staphylococcus aureus* según marca de quesillos.

Marca	n	Positividad							
		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Cronobacter</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%
1	20	1	5	0	0	0	0	0	0
2	20	3	15	0	0	0	0	0	0
3	20	3	15	0	0	0	0	0	0
4	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	80	7	8.8	0	0	0	0	0	0

tanto en supermercado como en el mercado municipal, se comprobó la presencia de Salmonella. Aspectos como la manipulación de dinero y la venta de huevos con manchas fueron frecuentes estando esto prohibido en el RSA. La negatividad de Salmonella puede estar explicada por la influencia de una excesiva población que se acumula con el tiempo en el sustrato, el agotamiento de nutrientes esenciales, la formación de metabolitos secundarios tóxicos o la reducción del espacio biológico disponible (36).

En relación a los requisitos de higiene en el lugar de expendio y del personal establecidos en el reglamento sanitario estos eran inadecuados, lo que se manifestaba con un incorrecto almacenamiento, conservación y manipulación del queso. Se observó que la temperatura encontrada cuando el queso se vendía estaba muy por encima de los 5 grados Celsius permitidos por el RSA, aspecto que lamentablemente el consumidor no puede determinar a simple vista. Era de esperar que los cumplimientos en estos aspectos de higiene fueran diferentes considerando el origen de los quesillos, lo que no ocurrió. Para los 2 quesillos de marca comercial su cumplimiento promedio fue 40% y para los 2 de tipo artesanal fue 25%. Díaz y cols (32) encontraron en su estudio realizado en Perú que solo 28% de los vendedores de quesillos aplican buenas prácticas de manipulación, 70% de los vendedores presentaban condiciones sanitarias no aceptables y 74% de los ambientes y enseres utilizados eran no aceptables; lo que predisponía según este autor a que los quesos frescos sufrieran una contaminación cruzada por riesgo biológico en perjuicio del consumidor. Una solución puede ser el uso de guantes desechables al momento de vender los quesillos principalmente los artesanales, ya que los guantes servirían como una barrera de contaminación hacia los alimentos (37) de virus y bacterias patógenas al ser las manos un vehículo de transmisión de contaminación directa (38). Adoptar medidas para una adecuada higiene del manipulador es fundamental para asegurar la inocuidad del queso, ya que por ejemplo en un estudio realizado en Chile por Figueroa y cols (39) 34% de los manipuladores que preparaban alimentos estaban colonizados por *S. aureus* del cuales 54% de las cepas eran enterotoxigénicas.

Como conclusión se puede señalar que los quesillos comercializados en supermercados y mercado municipal en la comuna de Chillán de acuerdo a los resultados microbiológicos no son aptos para el consumo humano. Además, aunque el queso sea fabricado con mayor tecnificación (quesillo industrial) y bajo norma HACCP como lo publicita una de las marcas, no asegura su inocuidad si no existe un estricto control por parte de la empresa. Estos resultados indican el no apego a normas de inocuidad en la producción de queso y son un llamado de alerta a las empresas productoras y a la autoridad de salud responsable de asegurar la producción de alimentos sanos y seguros para una nutrición adecuada de la población.

RESUMEN

Introducción: El queso es un alimento muy consumido en la población por sus características nutritivas y de inocuidad. Sin embargo, estas cualidades pierden relevancia si no se respetan condiciones adecuadas en su elaboración y almacenamiento. **Objetivo:** Evaluar la inocuidad microbiológica de quesillos comerciales y artesanales expendidos en Chillán. **Metodología:** Se analizaron 80 muestras de queso: 40 comerciales (marca 1 y 2) y 40 artesanales (marca 3 y 4). Se cuantificó Enterobacteriaceae (ENT) y *Escherichia coli* mediante las NCh 2676 y 2636 (2002). *Salmonella*, *Staphylococcus*

aureus y *Listeria monocytogenes* utilizando NCh 2675, 2671 (2002) e ISO 11290-1: 1996 (rev 2004) y confirmadas por PCR. *Cronobacter* spp por medio de multilocus sequence typing (MLST) con criterios de <http://www.pubmlst.org/cronobacter>. Los requisitos de higiene del personal y expendio con listas de chequeo de acuerdo al RSA. Resultados: Las medianas globales de ENT fueron 30 000 000 UFC/g (2 000 000 – 300 000 000) y para *E. coli* de 450 UFC/g NMP/g (33 – 1 100), no existiendo diferencias significativas en los recuentos para ambos indicadores por marca y lugar de expendio ($p>0.05$). El cumplimiento de requisitos de higiene del personal y expendio fue 50%. La positividad de *L. monocytogenes* fue 8.8%, no detectando *Salmonella* spp y *S. aureus*. Se aislaron 8 cepas sospechosas de *Cronobacter* spp las que fueron identificadas como *Franconibacter helveticus*. Conclusiones: Los quesillos evaluados no cumplen los criterios microbiológicos del RSA no siendo aptos para el consumo. La presencia de *L. monocytogenes* es un claro riesgo de salud en grupos de población hipersensible que consumen este alimento.

Palabras clave: Quesillo, Reglamento Sanitario de los Alimentos, inocuidad microbiológica, *Listeria monocytogenes*.

Agradecimientos: A la Universidad del Bío-Bío, Chile (proyecto DIUBB 143720 y GI 152920), Escuela de Nutrición y Dietética y al laboratorio de experimentación y certificación de alimentos (LECYCA) de la Universidad del Bío-Bío, por su apoyo en la ejecución de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schlundt J, Toyofuku H, Jansen J, Herbst SA. Emerging foodborne zoonoses. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*. 2004; 23; 513-533.
2. Pires S, Vieira A, Perez E, Lo Fo Wong D, Hald T. Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. *Int J Food Microbiol*. 2012; 152: 129-138.
3. FAO-OMS. Recommended International Code of Practice: General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP-1-1969. Rev 1997-2003. p1-6.
4. Ministry of Health of Chile. Department of Health Statistics and Information (DEIS) Foodborne Diseases. Available at: <http://www.deis.cl/estadisticas-eta/>. Accessed 10 Oct 2014.
5. Ministry of Health of Chile. Food Health Regulations DS 977. Editorial Gala. p222.
6. Esnaola V. Office of Agrarian Studies and Policies (ODEPA) Ministry of Agriculture. Cheese 2013: production, imports, and consumption on the increase. 2013. www.odepa.gob.cl. Accessed 10 June 2015.
7. Arriagada A. Identification of *Staphylococcus* spp. in artisanal fresh cheese sold in the open market of the city of Chillán Market. Chile: Universidad del Bío-Bío, Faculty of Education, Department of Education Sciences; 1992.
8. Sandoval R, Villa J. Identification of bacterial flora in an authorized external brand of fresh cheese found in the city of Chillán: Universidad del Bío-Bío, Faculty of Education, Department of Education Sciences; 1993.
9. Ministry of Health of Chile. General Technical Regulation N° 97 for the preparation of artisanal cheese. 2007.
10. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos E. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*. 2010; 21 (6): 805-815.
11. Araújo V, Pagliares V, Queiroz M, Freitas-Almeida A. Oc-

- currence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Applied Microbiol.* 2002; 92: 1172–1177.
12. Haeghebaert S, Sulem P, Deroudille L, Vanneroy-Adenet E, Bagnis O, Bouvet P, et al. Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France 2001. *Eurosurveillance.* 2003; 8:151–56
 13. Lianou A, Sofos J. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments *J Food Prot.* 2007; 70: 2172–98
 14. El-Sharoud W, O'Brien S, Negredo C, Iversen C, Fanning S, Healy B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol.* 2009; 9(24):1-9.
 15. Beuchat L, Kim H, Gurtler J, Lin L, Ryu J, Richards G. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int J Food Microbiol.* 2009; 136: 204–213.
 16. Saéz M, Llanos S, Tamayo R. First isolation of de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) in powdered milk formula produced in Chile. *Rev Chil Salud Púb.* 2012; 16(1):11-5.
 17. Parra J, Oliveras L, Rodriguez A, Riffo F, Forsythe S. Risk of *Cronobacter sakazakii* contamination in powdered milk for infant nutrition. *Rev Chil Nutr.* 2015; 42 (1): 83-89.
 18. Cordano A, Rocourt J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *Int J Food Microbiol.* 2001; 70 (1-2): 175–8.
 19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks – United States, 2009–2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2013; 62: 448–52
 20. Heiman K, Garalde V, Gronostaj M, Jackson K, Beam S, Joseph L, Saube A, Ricotta E, Waechter H, Wellman A, Adams-Cameron M, Ray G, Fields A, Chen Y, Datta A, Burrell L, Sabol A, Kucerova Z, Tress E, Metz M, Leblanc P, Lance S, Griffin M, Tauxe R and Silk B. Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012. *Epidemiol Infect.* 2015; 1-11.
 21. Ministry of Health of Chile. Department of Epidemiology. Report on the situation of *Listeria monocytogenes*, Chile, 2014. Accessed 30 September 2015. <http://epi.minsal.cl/vigilancia-epidemiologica/enfermedades-de-notificacion-obligatoria/listeria2015>.
 22. Iversen C, Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.* 2004; 21: 771-6.
 23. Liu T, Liljebjelke K, Bartlett E, Hofraice C, Sanchez S, Maurer J. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *J Food Prot.* 2002; 65:1227-32.
 24. Aznar R, Alarcón B. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a comparison of published primers. *Syst Appl Microbiol.* 2002; 25:109-19.
 25. Brizzio A, Tedeschi F, Zalazar F. Multiple PCR strategy for the simultaneous molecular characterization of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in isolates of foodborne outbreaks. *Biomedica.* 2013;33: 122-7.
 26. Rodríguez C, Caldas L, Ogeerally P. Sanitary quality of "telita" type artisanal cheese. *Upata, Bolívar State, Venezuela.* *Rev Soc Venezol Microbiol* 2009; 29:98-102.
 27. Likar K, Jevšnik. Cold chain maintaining in food trade. *Food Control.* 2006; 17(2); 108–13.
 28. Delgado R, Maurtua D. Bacteriological evaluation of fresh artisanal cheese sold in Lima, Peru and the presumed bactericidal action of *Lactobacillus* spp. *Rev Panam Salud Pub.* 2003; 14 (3); 158-64.
 29. Ministry of Health of Chile. Department of Epidemiology. Report on the situation of *Listeria monocytogenes*, Chile, 2015. Accessed 30 September 2015. <http://epi.minsal.cl/vigilancia-epidemiologica/enfermedades-de-notificacion-obligatoria/listeria2015>.
 30. Cordano A, Rocourt J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *Int J Food Microbiol.* 2001; 70(1-2):175-8.
 31. Cordano A, Jacquet C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *Int J Food Microbiol.* 2009; 132(2-3):176-9.
 32. Diaz M, Chávez M, Saucedo E. *Listeria monocytogenes* in fresh milk and cheese as a vehicle for transmitting human listeriosis in the Province of Trujillo, Peru. *Rev Cien Tecnol.* 2013; 9 (2); 23-38.
 33. Barancelli G, Camargo T, Reis C, Porto E, Hofer E, Oliveira C. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Manufacturing Plants from the Northeast Region of Sao Paulo, Brazil. *J Food Prot.* 2011; 74 (5):816-9.
 34. Moscalewski W, Da Silva P, Bastos C, Pontarolo R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. *Braz J Phar Sc.* 2008; 44(2):289-95.
 35. Lianou A, Sofos J. A Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *J Food Prot.* 2007; 70(9): 2172-2198.
 36. Fernández Escartín E. 2008. *Microbiology and Food Safety.* ED. Universidad Autónoma de Querétaro. Mexico. 2nd Edition. ISBN: 970-92630-0-5. p967.
 37. Todd E, Greig J, Bartleson C, Michaels B. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part. 4. Infective doses and pathogen carriage. *J. Food Prot.* 2008; 70:2339-73.
 38. Todd E, Greig J, Bartleson C, Michaels B. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part. 3. Factors contributing to the outbreak and description of outbreak categories. *J. Food Prot.* 2007; 70:2199-217.
 39. Figueroa G, Navarrete P, Caro M, Troncoso M, Faúndez G. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. *Rev Med Chil.* 2002; 130:859-64.