

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES MEDIANTE MÉTODOS TRADICIONALES Y DOS KITS RÁPIDOS

Lianet Jiménez^{1}, René Tejedo², Virginia Leyva³ y Maivis Hernández²*

¹*Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera a Guatao km 3 ½, La Habana, CP. 19200, Cuba.*

²*Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba.*

³*Instituto de Higiene, Microbiología y Epidemiología. La Habana. Cuba.*

E-mail: ljimenez@iiaa.edu.cu.

Recibido: 14-12-2020 / Revisado: 18-12-2020 / Aceptado: 28-12-2020 / Publicado: 06-01-2021

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica de quesos frescos artesanales se estudiaron 15 muestras de diferentes productores en las provincias Villa Clara y Artemisa. Para su estudio se emplearon los métodos tradicionales y dos kits de detección rápida. Se demostró que los conteos microbianos para las muestras analizadas estaban por encima de $1,5 \times 10^3$ UFC/g en los conteos de hongos filamentosos y levaduras, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*, lo que evidenció la deficiente calidad sanitaria de los productos. En cuanto a la presencia de patógenos, *Staphylococcus coagulasa* positiva presentó valores superiores a $1,5 \times 10^4$ UFC/g, representando un peligro al considerar su dosis infectiva. Para *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. los análisis resultaron negativos tanto por los métodos tradicionales como por el método rápido Reveal 2.0, pues los positivos encontrados fueron falsos ya que se comprobó por el sistema API 20E que las presuntas cepas aisladas correspondían a *Citrobacter freundii*, poniendo de manifiesto reacciones de antígenos cruzados entre Enterobacterias.

Palabras clave: quesos frescos artesanales, calidad microbiológica, métodos tradicionales, kits rápidos.

ABSTRACT

Evaluation of microbiological quality of artisanal fresh cheeses using traditional methods and two fast kits

In order to evaluate the microbiological quality of artisanal fresh cheeses, 15 samples from different producers in the Villa Clara and Artemisa provinces were studied. Traditional methods and two rapid detection kits were used for their study. The microbial counts for the analyzed samples were shown to be above 1.5×10^3 CFU/g in the counts of filamentous fungi and yeasts, thermotolerant coliforms and *Escherichia coli*, which evidenced the poor sanitary quality of the products. Regarding the presence of pathogens, *Staphylococcus coagulase* positive presented values higher than 1.5×10^4 CFU/g, representing a danger when considering its infective dose. For *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. the analyzes were negative by both the traditional methods and the Reveal 2.0 rapid method, since the positives found were false since it was verified by the API 20E system that the presumed isolated strains corresponded to *Citrobacter freundii*, showing reactions of crossed antigens between Enterobacteriaceae.

Keywords: fresh handmade cheeses, microbiological quality, traditional methods, rapid kits.

**Lianet Jiménez-Soto: Licenciada en Ciencias Alimentarias (IFAL, 2016). Se desempeña como Especialista en el Banco de Cepas de Levaduras en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Su línea de investigación está relacionada con productos prebióticos y probióticos.*

INTRODUCCIÓN

La leche y los productos lácteos constituyen una fuente abundante y accesible de nutrientes para la población a nivel mundial. El volumen del comercio internacional de productos derivados de la leche es considerable, se encuentra en continuo crecimiento y en un alto desarrollo (1). El queso es el derivado lácteo obtenido por coagulación de la leche u otros productos como la nata, la leche parcialmente desnatada, la nata de suero o la mezcla de varios de ellos, al que se le ha separado el suero. Este producto puede ser blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no, y puede o no estar recubierto (2).

Dentro de la gama de productos lácteos elaborados, los quesos frescos artesanales son los que cuentan con mayor número de microorganismos patógenos al momento de ser comercializados, por esta razón se le asocia con mayor frecuencia con brotes de intoxicaciones alimentarias (3). Numerosos estudios realizados a nivel mundial coinciden en que la calidad sanitaria de estos alimentos es deficiente pues así lo evidencian los recuentos de microorganismos indicadores, encontrándose en la mayoría de los casos por encima de los valores normados (4, 5). Se debe en gran medida, a que el desconocimiento de los factores que determinan la calidad y que garantizan la inocuidad de los quesos, ha sido uno de los principales problemas a los que la quesería artesanal se ha enfrentado. También han sido causa frecuente de diversas enfermedades transmitidas por alimentos cuando son consumidos después de estar expuestos a condiciones no apropiadas durante su proceso de elaboración o en el almacenamiento. Los microorganismos más asociados a la contaminación de estos quesos y que se consideran entre las principales causas de ETA son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, entre otros (6). Durante la elaboración de este producto es posible que muestren una gran variabilidad composicional y sensorial, una limitada conservación y que estén propensos a contaminaciones que pueden afectar su inocuidad. En Cuba no existen normativas que establezcan en que condiciones higiénico-sanitarias se deben producir y comercializar estos alimentos, solo existe oficialmente la Instrucción 01:91 del Ministerio de Salud Pública y no se aplica en la actualidad. Se refiere a los requisitos sanitarios mínimos para la producción de queso con leche cruda donde se define que no es apto para el consumo humano y que se entrega a la industria para su posterior transformación (7).

En Cuba, en los últimos años se han realizado estudios dirigidos a evaluar la calidad higiénico-sanitaria de la elaboración artesanal de quesos frescos en diferentes provincias por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de quesos frescos artesanales de dos provincias mediante métodos tradicionales y dos kits rápidos para la detección de *Listeria* spp. y *Salmonella* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 15 muestras de quesos frescos artesanales pertenecientes a productores de dos provincias (Artemisa y Villa Clara). El análisis de microorganismos indicadores de calidad sanitaria y de microorganismos patógenos se realizó según las normas correspondientes: Coliformes termotolerantes NC 1096:2015 (8); *Escherichia coli* NC ISO 16649-2:2013 (9); Hongos filamentosos y levaduras NC ISO 6611/IDF 94:2013 (10); *Staphylococcus aureus* NC ISO 6888-1:2003 (11); *Listeria monocytogenes* UNE-EN-ISO-11290-1=1997(A1=2005) (12); *Salmonella* NC ISO 6579:2008 (13). Se utilizaron dos kits rápidos de la compañía Neogen Reveal 2.0 para la detección de *Listeria* spp. (14) y *Salmonella* spp. (15) donde se siguieron las indicaciones del productor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a los indicadores de calidad todas las muestras de Villa Clara estuvieron fuera de los límites de aceptabilidad según la NC 585 (16). Las muestras procedentes de Artemisa comparadas con las de Villa Clara tuvieron mejores resultados para algunos de los indicadores analizados, aunque todas las muestras tenían deficiente calidad microbiológica (Tabla 1). Los resultados de coliformes termotolerantes y *E. coli* denotan una pésima calidad sanitaria en estos productos y un incumplimiento de las buenas prácticas de higiene en el proceso de elaboración pues son indicadores de contaminación fecal principalmente *E. coli* (17). En un estudio en Tuzupán (Puebla, México), se analizaron 100 muestras de queso artesanal donde el promedio de carga microbiana fueron bacterias aerobias mesófilas $7,5 \times 10^6$ UFC/g; coliformes fecales $8,4 \times 10^2$ NMP/g y *E. coli* $2,5 \times 10^2$ NMP/g (18). También se analizaron 95 muestras de quesos frescos artesanales procedentes de seis provincias del país, excepto Villa Clara y Artemisa, se obtuvieron resultados similares a los de este estudio para los indicadores (7).

La Tabla 2 muestra que, para el recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva, la mayoría de las muestras analizadas dieron valores mayores de $1,5 \times 10^4$ UFC/g, la mayor incidencia fue por *Staphylococcus* coagulasa positiva con 51,6 % de positividad y concentraciones superiores a $1,5 \times 10^4$ UFC/g (7). En otros estudios de *S. aureus* en quesos artesanales, los conteos resultaron mayores de 1×10^3 UFC/g para todas las muestras (19) y de 39 muestras de queso fresco artesanal se obtuvo 87,2 % de positividad a *S. aureus* (20). *S. aureus* cuando está en cantidades superiores a 1×10^5 UFC/g es capaz de producir una enterotoxina termolabile (21, 22) por lo que su presencia en alimentos se considera un riesgo para la salud humana.

De las 15 muestras de queso fresco artesanal analizadas por el método Neogen Reveal 2.0 para la detección de *Listeria* spp. no se obtuvo resultado positivo ocurriendo lo mismo por el método tradicional, lo que constata la ausencia de *Listeria* spp. por ambos métodos. De las 15 muestras analizadas por el método Neogen Reveal 2.0 para la detección de *Salmonella* spp., se encontraron dos muestras procedentes de Villa Clara débiles positivas y un positivo franco (Fig. 1). En un trabajo reportado no se aisló *L. monocytogenes* pero si se obtuvo aislamiento de *Listeria* spp. (18,9 %) (7).

De 83 muestras de queso elaborados en la zona de Colonia, Uruguay, se obtuvieron resultados que indicaron ausencia de *L. monocytogenes* en todas las muestras analizadas (23). En el análisis de 60 muestras de quesos expendidos en cuatro mercados principales de la ciudad de Cuenca (México), el aislamiento de *L. monocytogenes* resultó negativo (24). La ausencia de esta bacteria en las muestras de quesos analizadas puede deberse al almacenamiento sin envasar al aire libre, lo cual aumenta la desecación de la superficie externa de los quesos por pérdida de humedad, disminuyendo la supervivencia de estos microorganismos (25). En el caso de la determinación de *Salmonella* spp. a partir de los resultados positivos se realizaron otras pruebas bioquímicas tradicionales, además de complementarias como API 20E. Los resultados obtenidos en Reveal 2.0 resultaron falsos positivos, ya que se demostró que las colonias lactosa negativa sugestiva de *Salmonella* pertenecían a *Citrobacter* spp., lo cual se verificó mediante el kit API 20 E y cuyo resultado final fue *Citrobacter freundii* con 99,9 % de probabilidad.

En estos resultados hay que tener en cuenta que el género *Salmonella* tiene una estructura antigénica similar al resto de las Enterobacterias aunque es frecuente la

Tabla 1. Indicadores de calidad sanitaria

No. de muestra	Provincia	Coliformes termotolerantes (UFC/g)	Hongos (UFC/g)	Levaduras (10^3 UFC/g)	<i>E. Coli</i> (UFC/g)
462	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	< 10	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$
463	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	< 10	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$
464	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	< 10	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$
666	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	< 10	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$
667	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	< 10	$> 1,5$	Ausencia
668	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	< 10	$> 1,5$	Ausencia
897	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	$> 1,5 \times 10^3$	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$
898	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	$> 1,5 \times 10^3$	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$
899	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^3$	$> 1,5 \times 10^3$	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$
586	Artemisa	$> 1,5 \times 10^4$	$> 1,5 \times 10^3$	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^4$
587	Artemisa	< 10	< 10	$> 1,5$	< 10
781	Artemisa	$> 1,5 \times 10^3$	Presencia en 10	$> 1,5$	Ausencia
782	Artemisa	$> 1,5 \times 10^3$	Presencia en 10	$> 1,5$	Ausencia
967	Artemisa	$7,5 \times 10^2$	$8,5 \times 10$	$> 1,5$	< 10
968	Artemisa	$> 1,5 \times 10^3$	< 10	$> 1,5$	$> 1,5 \times 10^3$

Tabla 2. Recuento de *Staphylococcus coagulasa* positiva

No. de muestra	Procedencia	Resultado (UFC/g)
462	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
463	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
464	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
666	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
667	Villa Clara	$< 10^2$
668	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
897	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
898	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
899	Villa Clara	$> 1,5 \times 10^4$
586	Artemisa	$> 1,5 \times 10^4$
587	Artemisa	$> 1,5 \times 10^4$
781	Artemisa	$> 1,5 \times 10^4$
782	Artemisa	$> 1,5 \times 10^4$
967	Artemisa	$6,3 \times 10^3$
968	Artemisa	$> 1,5 \times 10^4$

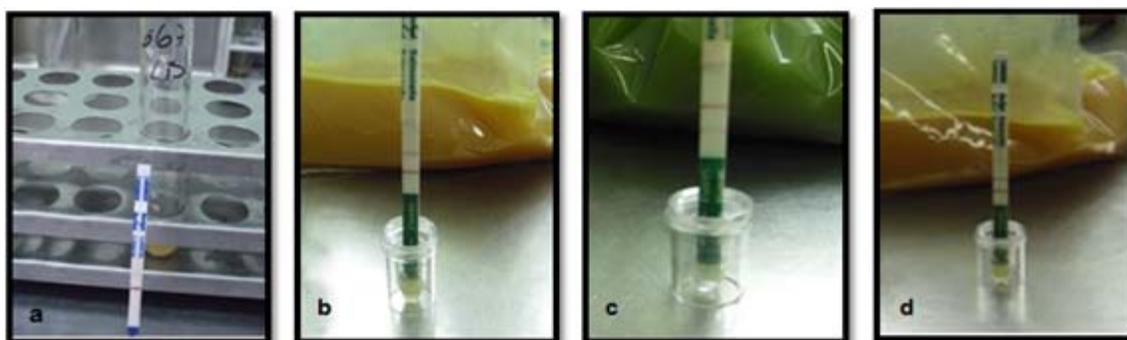


Fig 1. Determinación de *Listeria* y *Salmonella*. a: negativo de *Listeria*; b, c: débil positivo para *Salmonella*; d: positivo franco.

reactividad cruzada entre los géneros que están muy relacionados (ej., *Salmonella* con *Citrobacter*, *Escherichia* con *Shigella*) (26).

En Cuba se realizó un trabajo en la provincia de Sancti Spíritus, donde no se aisló *Salmonella* spp. en 75 muestras de leche cruda y quesos frescos artesanales (27). También de 83 muestras de queso elaborados en la zona de Colonia, Uruguay, los resultados indicaron ausencia de *Salmonella* (28). *Salmonella* es una de las bacterias de mayor importancia en el queso, debido a que puede presentarse en el alimento por contaminación a partir de manos del ordeñador, heces de los ani-

males, contaminación del equipo de ordeño, aguas contaminadas o por deficiente tratamiento térmico en la materia prima (29).

En este trabajo no se obtuvieron resultados positivos para *Salmonella*, lo que llama la atención pues a pesar de la mala calidad higiénico sanitaria que han demostrado los quesos por la presencia de *Staphylococcus coagulasa* positiva, hongos filamentosos y levaduras, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*, no se aisló *Salmonella*, lo que se debe a que el tamaño de muestra del estudio no fue representativo.

CONCLUSIONES

Los recuentos de microorganismos indicadores: coliformes termotolerantes, *E. coli*, hongos y levaduras y de *Staphylococcus coagulasa* positiva en las muestras de quesos provenientes de ambas provincias cubanas estuvieron por encima de los valores permisibles lo que manifestó la deficiente calidad sanitaria de estos productos. El método Neogen Reveal 2.0 demostró su eficacia al no encontrarse falsos negativos en los análisis de las muestras en correspondencia con los

resultados obtenidos mediante los métodos tradicionales estandarizados. No se demostró presencia de *Listeria* spp. ni *Salmonella* spp. en las muestras de quesos analizadas tanto por los métodos tradicionales como por el kit Reveal 2.0. Mediante el sistema API 20E las presuntas cepas de *Salmonella* spp. aisladas resultaron ser identificadas como *Citrobacter freundii* con 99,9 % de probabilidad, lo que está relacionado con la presencia de antígenos cruzados entre esta Enterobacteria y *Salmonella* spp.

REFERENCIAS

1. CODEX-STAN-283-4. Norma General para el Queso. Comisión del Codex Alimentarias; 2013.
2. Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (OMS/FAO). Codex Alimentarius: Leche y productos Lácteos. Roma. FAO/OMS; 2007. pp. 275.
3. Vázquez N, Duran L, Sánchez C, Acevedo I. Zootecnia Tropical. Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores. Estado Lara, Venezuela; 2012.
4. Silva G, Reséndiz M, Hernández Z, Pérez A, Pérez B. El queso fresco artesanal de vaca: Calidad bacteriológica. En: Memorias, XI Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos; 2010 Nov 17-19; Joao Pessoa-Paraiba, Brazil; 2010.
5. Espinosa L. Evaluación sanitaria del queso fresco artesanal en el Ejido Chihuahua, la Trinitaria, Chapas. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2015.
6. Acevedo I, García O, Vargas D. Evaluación de la calidad bacteriológica por método Rida R Counten quesos tipo mozzarella de búfala artesanal. Rev Col Méd Vet Estado Lara 2013; 6(2):39-45.
7. Martínez A. Calidad higiénico-sanitaria de los quesos frescos artesanales producidos en seis provincias de Cuba. Cuba: Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez; 2015.
8. NC 1096:2015. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de coliformes termotolerantes. Conteo de las colonias obtenidas a 44 °C. Técnica de placa vertida. Cuba; 2015.
9. NC ISO 16649-2:2013. Microbiología de alimentación humana y animal. Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* â-Glucoronidasa positiva. Parte 2: Técnica de conteo de colonias a 44 °C usando 5-bromo-4-cloro-3-indoxil â-D-Glucorónico. Cuba; 2013.
10. NC ISO 6611/IDF 94:2013. Leche y productos lácteos. Enumeración de unidades formadoras de colonias de hongos filamentosos y levaduras. Técnica de conteo de colonias a 25°C. Cuba; 2013.
11. NC ISO 6888-1:2003. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de *Staphylococcus coagulasa* positiva. Cuba; 2003.
12. UNE-EN_ISO_11290-1=1997(A1). Microbiología de los alimentos para consumo y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte1: Método de detección. Modificación 1: Modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión. España; 2005.
13. NC ISO 6579:2013. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal- Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp- Método de referencia (ISO 6579:2002, IDT). Cuba; 2008.
14. Neogen Reveal 2.0 for *Listeria*. Lansing, Neogen; 2013.
15. Neogen Reveal 2.0 for *Salmonella*. Lansing, Neogen; 2013.
16. NC-585:2015. Contaminantes microbiológicos en Alimentos. Requisitos sanitarios. Cuba; 2015.
17. Rosengren Å, Fabricius A, Guss B, Sylvén S, Lindqvist R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. Int J Food Microbiol 2010; 144 (2):263-9.
18. Reséndiz M, Hernández Z, Ramírez H, Pérez A. El queso fresco artesanal de la canasta básica y su calidad sanitaria en Tuzapán, México. Actas Iberoam Conserv Anim 2012; 2:253-5.
19. Barrios H. Evaluación y mejoramiento de la calidad microbiológica de queso fresco a base de leche no pasteurizada, elaborado artesanalmente y comercializado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 2006.

20. Cristóbal D, Maurtua D. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. Panam Salud Pública 2001; 3(14).
21. Jay JM. Fermentation and fermented dairy products. Modern Food Microbiology. Berlin: Springer. Sixth Edition; 2000.
22. Hill B, Smythe B, Lindsay D, Shepherd J. Microbiology of raw milk in New Zealand. Int J Food Microbiol 2012; 157(2):305-8.
23. Barneche M, Villagrán M. Evaluación de la calidad Higiénico-Sanitaria de quesos artesanales de pasta dura elaborados en la zona de Colonia, Uruguay: Universidad de la República; 2012.
24. García M. Determinación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco expendido a granel en los mercados de Cuenca. Cuenca: Universidad del Azuay; 2014.
25. Novak P, Vera M, Dallagnol A, Pucciarelli A. Evaluación de *Listeria monocytogenes* y calidad microbiológica en quesos frescos de producción artesanal. Tecnol Láct Latinoam 2013; N° 79:52-5.
26. Katime A. Reacción de Widal - interpretación clínica. Panam Infectol 2006; 8(2):40-4.
27. Ledesma ML, Hernández JE, Hurtado E, Hernández Y, Martín E. Diagnóstico sobre la calidad microbiológica y tecnología de producción de quesos frescos artesanales comercializados en la provincia Sancti Spíritus, 2005.
28. García M. Determinación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco expendido a granel en los mercados de Cuenca. Cuenca: Universidad del Azuay; 2014.
29. Albarracín F, Sarmiento P, Carrascal A, Mercado M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. Bistua 2006; 4(2):30-41.