

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

“Determinación de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7 en leches obtenidas artesanalmente  
y distribuidas en 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula”

Jackeline Reneé Olivet España

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, agosto de 2,008

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

“Determinación de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7 en leches obtenidas artesanalmente  
y distribuidas en 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula”

Informe Final de Tesis

Presentado por

Jackeline Reneé Olivet España

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, agosto de 2,008



## INDICE

	<b>Página</b>
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	
A. Generalidades	4
B. Características de la bacteria	6
C. Reservorios y fuentes	8
D. Alimentos implicados y transmisión	10
E. Patogénesis	11
F. Epidemiología	12
G. Leche	
1. Conceptos	15
2. Composición	15
3. La leche como vehículo de transmisión de agentes infecciosos	16
4. Zonas y locales destinados a la producción de leche	16
5. Ordeño	16
6. Almacenamiento y transporte de la leche	18
7. El sector lácteo en el municipio de Chiquimula	18
IV. Justificación	21
V. Objetivos	23
VI. Hipótesis	24
VII. Materiales y Métodos	
A. Universo	25
B. Muestra	25
C. Materiales	25
D. Procedimiento	26
E. Diseño estadístico	28
VIII. Resultados	29
IX. Discusión de Resultados	35
X. Conclusiones	38
XI. Recomendaciones	39
XII. Referencias	40

## I. RESUMEN

Se analizaron 30 leches obtenidas de manera artesanal provenientes de la cabecera departamental de Chiquimula, a las que se le realizó la determinación de *Escherichia coli* para comprobar si las leches analizadas eran aptas para el consumo humano. Además, se determinó si *Escherichia coli* O157:H7 se encontraba presente en la leche cruda analizada.

*E. coli* O157:H7 se encuentra típicamente en el ganado vacuno saludable, lo que hace difícil el control de este. Los bovinos parecen constituir la fuente principal de este agente patógeno, que es transmitido al hombre por el consumo de alimentos contaminados que derivan de esos, principalmente carne no cocida adecuadamente o leche cruda. Esta razón motivó a realizar el análisis de este patógeno en leche cruda obtenida artesanalmente en la cabecera departamental de Chiquimula, ya que en este lugar todavía se consume la leche en esa forma.

Las 30 muestras obtenidas se analizaron en dos fases o muestreos, en el primer muestreo se obtuvo 10/15 (67%) muestras no aptas para consumo humano ya que presentan *E. coli*, determinada por medio del método de tubos múltiples. En el segundo muestreo se comprobó que 14/15 (93%) muestras presentan *E. coli*, por lo que no son aptas para el consumo humano. A través del método de fermentación de sorbitol propuesto en el Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM) se realizó la determinación de *Escherichia coli* O157:H7 en las muestras recolectadas en los dos muestreos, en las cuales no se encontró dicha bacteria. Los resultados obtenidos en el análisis de 30 muestras de leche artesanal, comprueban que 10/15 lecherías del municipio de Chiquimula, que representa un 67% de las lecherías analizadas, distribuyen leche no apta para consumo humano ya que presenta *Escherichia coli* en los dos muestreos realizados, aunque no presenten *Escherichia coli* O157:H7 (42).

## II. INTRODUCCION

En la cabecera departamental de Chiquimula la leche de vaca obtenida artesanalmente, es uno de los principales alimentos que forman parte de la dieta de la población, siendo los niños y ancianos quienes la consumen mayormente.

A través de múltiples estudios se ha encontrado que algunas cepas de *Escherichia coli* causan enfermedades gastrointestinales que van desde diarrea leve y acuosa hasta un cuadro de diarrea sanguinolenta (1-7).

Entre las cepas de *Escherichia coli* que causan enfermedades gastrointestinales en el ser humano se encuentra *Escherichia coli* O157:H7 (1-2, 8). Esta cepa se encuentra asociada principalmente a diarrea sanguinolenta con dolor abdominal y es la cepa de *Escherichia coli* que se transmite en una mayor proporción por el consumo de alimentos o agua contaminada. La leche es un alimento al cual se le asocia en la transmisión de esta bacteria (9-12).

En Guatemala se han realizado estudios buscando la presencia de *Escherichia coli* O157:H7, uno de ellos estudió la prevalencia de esta bacteria en carne de ventas callejeras de la zona 4 del departamento de Guatemala (13); y el otro posteriormente, realizó una identificación de la bacteria mencionada en frutas y verduras congeladas para exportación (14). En ninguno de estos estudios se encontró *Escherichia coli* O157:H7 (13-14). No se han reportado aún, en Guatemala, datos que indiquen si la leche artesanal es apta para el consumo humano, utilizando como parámetro de evaluación recuentos de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

Solamente existe un estudio en Guatemala que indica la prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7, en muestras de heces, realizado en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) 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 existiera una prevalencia parecida (2, 15).

La finalidad de este estudio fue dar a conocer si *Escherichia coli* O157:H7 se presenta en leches artesanales distribuidas en la cabecera departamental de Chiquimula y además identificar si estas son aptas para el consumo humano por medio de la determinación de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal.

La determinación de *Escherichia coli* se realizó por la técnica de Tubos Múltiples o Número Más Probable y *Escherichia coli* O157:H7 por el método oficial para aislamiento de esta bacteria en alimentos, publicado en el Manual de Procedimientos Bacteriológicos (BAM), de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (16-19).

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una de las especies bacterianas mejor estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sujeto y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual está integrada por bacilos gram negativo no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de cloruro de sodio (NaCl), fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivo, oxidasa negativo, reductores de nitratos a nitritos. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos gram negativo identificados (1-2, 13, 15, 20-23).

*Escherichia coli* es miembro del género *Escherichia*. Incluye microorganismos generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son inhibidos por cianuro de potasio (KCN) e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Son ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y

decarboxilan la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de sus lipoproteínas, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación (5,6).

*E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del recién nacido, y establece con el hospedero una relación estable de mutuo beneficio. Como integrante de la microbiota normal del intestino del hombre y de muchos animales, se le considera un microorganismo indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros relacionados bajo la denominación de bacterias coliformes. Estas son enterobacterias que pertenecen al género *Escherichia* y a otros como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* o *Serratia*, y que tienen en común la capacidad de fermentar la lactosa en un lapso no mayor de 48 horas, con producción de ácido y gas. Son microorganismos de gran ubicuidad y capacidad de proliferación, y a la vez de fácil cultivo e identificación, y por lo tanto muy útiles como indicadores de contaminación, pero no son enteropatógenos como grupo (como tampoco lo es *E.coli*), y por lo tanto su presencia en alimentos, ambiente o pacientes no certifica la etiología de una infección intestinal o un brote de enfermedad transmitida por alimentos (ETA) (9, 23).

La bacteria *Escherichia coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por esta bacteria no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por patógenos que se transmiten

por vía feco-oral de persona a persona o a través del agua y alimentos (24, 25).

Existen cepas de *E. coli* capaces de producir un amplio espectro de enfermedades, como infección urinaria, septicemia, meningitis o enfermedad diarreica. Los tipos causantes de diarrea se clasifican en: enterotoxigénico (ETEC), enteropatogénico (EPEC), enteroagregativo (EAaggEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC) y de adherencia difusa (DAEC) (4, 24, 26-28).

#### B. Características de *Escherichia coli* O157:H7

Su nombre se origina del antígeno somático (O) e identificado como 157 y el séptimo antígeno flagelar (H) identificado. El antígeno (O) se deriva de la pared celular y el (H) del flagelo, que se encuentra solamente en especies móviles (4, 6-7).

*E.coli* O157:H7 ó *E.coli* O157 no móvil, pertenece al grupo de *E.coli* enterohemorrágicas, sin constituir la única variedad serológica que integra el grupo. Otras enterohemorrágicas que han afectado a personas en varios países son las serovariedades O26:H11, O111:H8, O103:H2, O113:H21 y O104:H21 (4, 25, 28).

Estudios dirigidos hacia la caracterización de *E. coli* serotipo O157:H7 revelan que los marcadores bioquímicos de dicho patógeno son significativamente diferentes a los de *E. coli* genérico. *E. coli* O157:H7 es diferente a otros tipos de *E.coli*, no solo desde el punto de vista clínico y epidemiológico sino que en algunas características bacteriológicas. Una combinación de las reacciones a  $\beta$ -glucoronidasa, sorbitol, rafinosa y dulcitol puede separar preliminarmente este serotipo

del resto de los *E. coli* (25). Estos análisis incluyen una reacción negativa para la  $\beta$ -glucoronidasa y sorbitol, y una reacción positiva para el análisis de rafinosa y dulcitol. La fermentación de sucrosa fue observada en el 87% de las cepas de *E. coli* O157:H7, en contraste a las de *E. coli* que solo fermentaron un 42-54%. La mayoría de las cepas (87%) fermentan dulcitol y sucrosa en un periodo de 24 horas, mientras que el 89% no fermentaron ramnosa en este periodo de tiempo (6, 28). Se ha reportado que *E. coli* es un bacilo gram negativo que fermenta lactosa, que tiene la capacidad de producir  $\beta$ -glucoronidasa, y cerca del 96% producen esta enzima. *E. coli* O157:H7 es la excepción ya que ésta no fermenta sorbitol. Desde este punto de vista, el sorbitol puede utilizarse como agente en un medio diferencial para la detección de otros patógenos como *Escherichia hermannii*. Ésta no solo es  $\beta$ -glucoronidasa negativo sino que es incapaz de fermentar sorbitol como *E. coli* O157:H7. En adición esta cepa ha reaccionado con el antisuero O157, lo que puede llevar fácilmente a confundir con el serotipo O157:H7. La diferencia entre ambos tipos de *E. coli* es que en medios de cultivos diferenciales de sorbitol como el antisuero-sorbitol H7 y sorbitol-MacConkey arrojan resultados de coloración diferente, siendo las colonias de *E. hermannii* de color amarillo y colonias típicas de *E. coli* O157:H7 de color rosa pálido (25).

*E. coli* O157:H7 produce factores citotóxicos a células Vero las cuales se les han nombrado Verotoxinas o toxinas Shiga, esto por su similitud a la toxina Shiga que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1. Este patógeno produce cantidades elevadas de dichas toxinas. Además existen otros serogrupos de *E. coli* que producen Verotoxinas (25). Se ha descubierto la existencia de al menos dos VT-I y VT-II, las cuales son estructuralmente similares (29). Estudios sobre el efecto de la temperatura en la producción de toxinas comprobaron que no hay efecto

alguno en la síntesis de la toxina. En otro estudio la producción de la toxina ocurrió a temperaturas de 10°, 12° y 37°C. Por otra parte una cantidad menor de toxina se detectó a una temperatura de 21°C. Información epidemiológica indica que las complicaciones de enfermedades tales como el Síndrome Urémico Hemolítico y la Púrpura Trombótica Trombocitopénica son mayormente asociadas a la Verotoxina tipo II. La producción de toxinas varía con el medio de cultivo, tipo de alimento, temperatura, pH y concentración de oxígeno. En adición a las verotoxinas, este patógeno tiene un plásmido de gran tamaño, siendo esta característica de gran ayuda en la identificación de la cepa patogénica. La presencia del patógeno en los bovinos al momento de la matanza, marca una gran necesidad en incorporar estrategias para minimizar estos problemas antes o durante este proceso (30, 31).

Estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 crece en un amplio rango de temperatura. El mismo puede sobrevivir a temperaturas de congelación y rangos de pH desde 4.4 a 9. La temperatura óptima de crecimiento del patógeno es 37°C, aunque se ha observado crecimiento a temperaturas de 7 a 44.5° C. El proceso de pasteurización o cocción adecuada del alimento a 70° C por 2 minutos elimina el patógeno (6, 10).

### C. Reservorios y fuentes

El patógeno se encuentra típicamente en el ganado vacuno saludable, lo que hace difícil el control de este. Se ha demostrado que el 75% del ganado lechero y el 63% de ganado vacuno de engorde son positivo para *E. coli* O157:H7 (8, 27, 31).

La prevalencia del patógeno puede ser menor o mayor dependiendo de la época del año. Se ha comprobado que la época de mayor incidencia de enfermedades en humanos asociadas a este patógeno ocurre durante los meses de verano, la misma época que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en las heces del ganado bovino es mayor (32).

El tiempo promedio en el cual este patógeno se mantiene en el sistema gastrointestinal de los rumiantes es de 30 días, aunque en algunos animales la bacteria puede estar presente hasta un año o más. Los factores que contribuyen a la presencia de la bacteria en rumiantes se desconocen, pero se discute la habilidad de la misma al colonizar un sitio en particular en el sistema gastrointestinal. Estudios han demostrado que el colon es el lugar en el sistema gastrointestinal donde principalmente se aloja el patógeno en rumiantes adultos (27).

La mayor incidencia de *E. coli* O157:H7 se encuentra en el ganado vacuno joven, de acuerdo a una investigación realizada en Wisconsin en 1996 (33). El uso de antibióticos puede alterar la microbiota de bovinos y permitir que el patógeno se multiplique en el tracto digestivo. Además de permitir que *E. coli* O57:H7 adquiera resistencia a antibióticos tales como la estreptomicina, sulfisoxazole y tetraciclina, permite que tenga una ventaja competitiva sobre la microbiota normal. Se ha reportado un aumento en *E. coli* O157:H7 resistentes a antibióticos en humanos (33). Se ha comprobado que la administración de niveles subterapéuticos de antibióticos en animales puede ser un factor que contribuya a la resistencia de este patógeno a los medicamentos indicados en los humanos (33).

Otro factor que puede ayudar a la distribución del patógeno en el ambiente son las aves silvestres ya que durante el vuelo estas pueden

esparcir el patógeno a grandes distancias, al llevar partículas de heces en las plumas o patas. Esto convierte estas aves en un peligroso vehículo de transmisión (32). La dieta del animal y los cambios en la misma son otros factores que pueden influir para que el patógeno persista (33).

Los bovinos parecen constituir la fuente principal de este agente patógeno, que es transmitido al hombre por el consumo de alimentos contaminados, como carne, leche y los productos que de ellos se derivan. La infección puede también resultar de una contaminación fecal del agua y de varios alimentos, o de una contaminación cruzada durante la preparación de los mismos (6, 10-11, 34).

#### D. Alimentos implicados y transmisión

Investigaciones de brotes han demostrado que *E. coli* O157:H7 puede ser transmitido por alimentos, agua o transmisión de persona a persona, por la vía fecal-oral (35). Productos de origen bovino, tales como carne no cocida adecuadamente o leche cruda han sido asociados a este patógeno (9, 17, 20-21). La contaminación con dicho patógeno en alimentos no asociados a este puede producir contaminación cruzada con productos o superficies que contenían la bacteria (12, 34).

También se ha documentado la infección vehiculada por carne de pavo, salami, leche, yoghurt, mayonesa, ensaladas, vegetales crudos y agua. La transmisión de persona a persona también ha sido demostrada. La dosis infectante mínima es baja; se estima entre  $10^2$  y  $10^3$  bacterias por gramo o mililitro del alimento (36).

## E. Patogénesis

Los factores implicados en la patogénesis de *Escherichia coli* O157:H7 son:

1. Adherencia a los enterocitos del colon mediante una fimbria específica, codificada por un plasmido de virulencia (37).
2. Adherencia íntima, con alteración del citoesqueleto de la célula hospedero, que está mediada por la proteína de membrana externa intimina, codificada por genes cromosomales y el intercambio de señales implicadas en este fenómeno (37).
3. Producción de citotoxinas, las cuales a nivel local producen inhibición de la síntesis proteica y daño celular directo, lo que da como resultado necrosis hemorrágica de las vellosidades intestinales, con escasa infiltración de polimorfonucleares y que explica la diarrea con sangre. Estas toxinas se traslocan a nivel de la mucosa hacia el torrente sanguíneo, y puede unirse a receptores GB3 presentes en la membrana de glóbulos rojos, a nivel del endotelio renal, plaquetas y Sistema Nervioso Central (SNC), produciendo daño sistémico que se traduce clínicamente en el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), que se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, fallo renal agudo y trombocitopenia (30-31, 37).
4. Otros factores de virulencia: toxina EAST 1 (toxina termoestable de cepas enteroagregativa), enterohemolisina, mecanismo de transporte de hierro, LPS (lipopolisacárido) (37).

ECEH puede producir desde infecciones asintomáticas, cuadros de diarrea acuosa (10% de los casos), hasta el cuadro clásico de diarrea con sangre y moco (90% de los casos), la que es precedida por 1 a 2 días de deposiciones acuosas, dolor abdominal, fiebre de corta evolución y vómitos. El periodo de incubación es de 3 a 4 días, y el cuadro de diarrea con sangre se prolonga por 4 a 10 días. La excreción bacteriana posterior a la resolución del episodio se mantiene por 17 a 20 días (31-32, 37).

Las complicaciones se presentan en un 5 a 10% de los casos, y corresponden a prolapso rectal, apendicitis, intususpección, cistitis hemorrágica, colecistitis, y alteraciones del SNC, siendo el SHU la complicación más severa y que se observa hasta en un 7% de los casos según lo observado en situaciones de un brote. La letalidad varía en diferentes series entre 1 al 10%. El pronóstico se relaciona directamente con la cuantía del daño intestinal, cuando este es más intenso se libera una mayor cantidad de toxinas (diarrea con sangre) y se caracteriza por iniciarse 2 a 14 días después del comienzo de la diarrea, con palidez de piel y mucosas, oliguria y edema, y hemorragias cutáneas (2, 22, 30).

## F. Epidemiología

Se ha descrito como un patógeno emergente, aunque no se sabe si previamente había sido subdiagnosticada o es verdaderamente un patógeno nuevo. Se describió por primera vez en un brote de gastroenteritis en Estados Unidos de América, con presentación de cuadros de diarrea con sangre y de SHU, a comienzo de los años 80. En este brote, se demostró tanto en los pacientes como en la carne de hamburguesas de una cadena de restaurantes de comida rápida, la presencia de *E. coli* serogrupo O157, serotipo H7. Actualmente se han

descrito 10 serogrupos y 55 serotipos de ECEH, pero los más comunes son O157:H7, O26:H11, O26:H32, O111:H8 y O111:H30 (38-40).

ECEH es una causa poco frecuente de diarrea en Latinoamérica (2 a 3% del total de episodios), pero es causa importante de diarrea con sangre. Se presenta generalmente en forma de casos esporádicos, y también pueden ocurrir brotes, lo cual se ha documentado mejor en países industrializados que mantienen programas de vigilancia de estas infecciones (23).

Tiene una incidencia estacional con un aumento de casos en primavera y verano. En Chile es la primera causa de diarrea con sangre en niños menores de 5 años (38%), y es el principal agente etiológico de SHU (91%). La tasa de SHU en Chile es de 3.0 – 4.2 por 100.000 casos. Argentina presenta la tasa más alta del mundo de SHU asociado a ECEH, con 21.7 por 100.000 casos. En ambos países, a menudo los serotipos más frecuentemente aislados en diarrea son diferentes a O157:H7, pero éste es el que más se asocia a la aparición de SHU (38-40).

La infección por *E. coli* verotoxigénica parece ser de distribución universal, pero su prevalencia solamente se conoce con cierto detalle en los Estados Unidos, Canadá, Argentina y Europa Occidental, ya que en el resto de países no ha sido estudiada sistemáticamente (23, 38).

En Costa Rica, en febrero-marzo 1996, el Hospital Nacional de Niños informó de cuatro casos de síndrome hemolítico urémico, en menores de dos años de edad, con antecedentes de ingestión de carne de pollo, hamburguesas y tortas de carne. Se aisló *E. coli* O157:H7. Los pacientes no tenían vinculación entre si y residían en comunidades alejadas unas de otras. No se ha registrado otros casos (23).

El Centro para el Control de Enfermedades (CDC) estima que en Estados Unidos de América se presentan cada año de 10,000 a 20,000 casos de diarreas por este agente, de 73,000 casos de infección se reportan 61 muertes. Además reportó para el año 1996 una incidencia de 2.7, para 1997 de 2.3, 1998 de 2.8, 1999 de 2.1 y 2.9 en el 2000. Para el año 1999 reportó una incidencia de 4.57 por 100,000 en niños de 1-4 años (23).

En Japón, desde finales de mayo, en Hiroshima y Oakayama, y más recientemente en Sakay cerca de Osaka, se han presentado más de 5,000 casos con seis defunciones por *E.coli* O157:H7 (23).

No existen datos a cerca de la incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos en Guatemala, solamente existe un estudio que indica la prevalencia de esta bacteria, en muestras de heces, realizado en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) zona 7, en donde fueron cultivadas 2210 muestras de heces y se obtuvo un total de 257 coprocultivos positivos (15).

En Guatemala no se han reportado datos de estudios que determinen coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* en leche de origen artesanal (no pasteurizada). A nivel mundial, en Colombia, se han realizado estudios en donde se utilizaron los recuentos de coliformes como indicadores de calidad de leche cruda, encontrando que la presencia de coliformes sirve como evaluador del grado de limpieza de las manos de operarios, limpieza y desinfección de la piel de los pezones y pezoneras (40).

## G. Leche

### 1. Conceptos

#### a. Leche

Es el producto integro no adulterado ni alterado y sin calostro, del ordeño regular higiénico, completo e interrumpido de las hembras mamíferas.

#### b. Leche artesanal

Es la leche obtenida de manera artesanal y distribuida para su consumo crudo.

#### c. Leche cruda

Leche que no ha sido llevada a una temperatura mayor de 40°C (41).

#### d. Sala de ordeño

Establecimiento destinado a la obtención de leche mediante ordeño manual o mecánico (41).

### 2. Composición

Los principales componentes de la leche son agua, grasa, proteína y lactosa (29). Del 80-85% de la proteína existente en la leche se halla en forma de caseínas, el resto lo constituyen las proteínas del suero de leche como lo son la beta-lactoglobulina y alfa-lactalbúmina, y proteínas procedentes de la sangre tales como la seroalbúmina y las inmunoglobulinas.

La composición de la leche varía de acuerdo a la raza de la vaca de la cual proviene dicha leche (29). La leche posee constituyentes antimicrobiales como la lactoferrina, conglutinina y el sistema de

lactoperoxidasa, además de bacteriocinas que producen otros microorganismos presentes en la leche cruda (42).

### 3. La leche como vehículo de transmisión de agentes infecciosos

Su elevada actividad de agua, su pH mediano (6.4-6.6) y su abundante aporte de nutrientes hacen de la leche un excelente medio para el crecimiento microbiano (29).

### 4. Zonas y locales destinados a la producción de leche

Las zonas y locales destinados a la producción de leche son de dos tipos, uno es en fincas en donde se tiene una cantidad grande de cabezas de ganado bovino destinado a la producción de leche, y otro son las viviendas en donde se tiene una cantidad mínima de cabezas de ganado, que van desde una hasta diez aproximadamente (43).

### 5. Ordeño

Las instalaciones para el ordeño deben contar con condiciones higiénico-sanitarias, estructura y equipo que permitan garantizar la inocuidad de la leche y además cumplir con:

- a. Los corrales de espera y las salas de ordeño deben tener piso cementado de fácil limpieza con un desnivel no más del uno por ciento (1%) hacia el drenaje que permita evacuar excrementos y aguas de lavado.
- b. Las salas de ordeño deben contar con paredes con un mínimo de altura de un metro y medio (1.50 metros) de color claro. Los techos, contruidos de material que permita su limpieza y

- que garantice la inocuidad de la leche. Deberán contar con condiciones adecuadas de ventilación e iluminación.
- c. Contar con agua potable o fuente de agua apta para consumo humano, para realizar actividades de lavado y desinfección.
  - d. Contar con servicios sanitarios y duchas para el personal, los cuales deberán estar separados de la sala de ordeño.
  - e. Contar con lavamanos en el servicio sanitario y en la sala de ordeño.
  - f. Mantener un control de limpieza y desinfección del equipo de ordeño, herramientas, utensilios y de protección personal.
  - g. El estiércol procedente de los corrales de espera y otras áreas de la sala de ordeño debe ser removido y evitar ser colocado en las cercanías de las instalaciones de la sala de ordeño. El sistema empleado para el tratamiento y disposición del mismo, deberá hacerse mediante un método físico, biológico, y en caso de utilizar químicos, deben ser aprobados y que no causen daño al medio ambiente.
  - h. Contar con un área específica para tarimas de material inoxidable y de fácil limpieza para la colocación de los tambos o bidones lavados y desinfectados que se utilizan para el transporte de leche cruda.
  - i. Mantener registros actualizados de controles de buenas prácticas de ordeño (44).
  - j. Mantener un programa de control de plagas.
  - k. Mantener implementado el manual de buenas prácticas pecuarias y de ordeño.
  - l. Mantener control de limpieza y desinfección de equipo de protección personal.
  - m. Mantener registros actualizados de la cantidad, fecha de ingreso y egreso de leche de la sala de ordeño.

- n. Mantener registros actualizados de control de las lecturas de temperatura de la leche en los tanques térmicos.
- o. Los recipientes y maquinaria utilizados en la recolección, enfriamiento, filtración y almacenamiento de leche, deben ser de acero inoxidable (44).

## 6. Almacenamiento y transporte de la leche

El área de almacenamiento de leche cruda debe cumplir con:

- a. Independencia de otras áreas y uso exclusivo para este fin.
- b. Piso cementado de fácil limpieza con un desnivel un máximo del uno por ciento (1%) hacia el drenaje para evacuar agua de limpieza y residuos de leche (44).
- c. Paredes y techos construidos de material que permita su limpieza y no sea fuente de contaminación de la leche, así como las condiciones adecuadas de ventilación e iluminación.

Para el transporte de la leche cruda debe contarse con:

- a. Sistema de refrigeración que permita mantener la leche cruda a una temperatura de 2 a 10 grados centígrados.
- b. Cuando el medio de transporte no cuente con sistema de refrigeración, es necesario que esté provisto de una estructura que proteja el producto de cualquier fuente de contaminación y de los rayos solares (44).

## 7. El sector lácteo en el municipio de Chiquimula.

El municipio de Chiquimula, limita al norte con el municipio de Zacapa, al sur con los municipios de San José La Arada y San Jacinto; al este con los municipios Jocotán, San Juan Ermita y San Jacinto y al

oeste con los municipios de San Diego y Cabañas, Zacapa. Su extensión territorial es de 372 kilómetros cuadrados. La ciudad se encuentra a una altura de 423.86 m.s.n.m. Latitud 14° 47' 58", longitud 89° 32' 37", su clima es tropical seco (45).

Según la Cámara de Productores de Leche de Guatemala, las principales regiones productoras de este alimento en el país son la Región Sur-Oriente (37%), Nor-Oriente (19%), Central (16%) y otras regiones (28%), correspondiendo Chiquimula a la región Nor-oriente (46).

En Guatemala el 92% del ganado bovino se encuentra en fincas y el otro 8% en viviendas. En el departamento de Chiquimula, según el censo agropecuario realizado en el año 2003 por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGA), el 94% se encuentra en fincas y el 6% en viviendas. Además, se estima que en este departamento hay aproximadamente 50,000 cabezas de ganado bovino, de las cuales el 71% son hembras (47).

El ordeño en algunas lecherías en el municipio de Chiquimula se lleva a cabo dos veces al día, por la mañana y por la noche. La obtención de leche en establos se realiza de forma manual, ya que se trata de una pequeña cantidad de bovinos. La temperatura oscila entre 20-30°C en invierno, y en verano puede llegar hasta 40°C. La leche obtenida del ordeño matutino es distribuida en el día y la obtenida en el ordeño nocturno es almacenada en la mayoría de lugares sin refrigeración para distribuirla el día siguiente.

La leche es almacenada en recipientes de aluminio con tapadera hasta su distribución. Esta leche se distribuye en los mismos recipientes

y transportada en automóvil hasta el lugar donde será distribuida al consumidor<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Datos obtenidos mediante observaciones realizadas por la tesista.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

En el departamento de Chiquimula, un gran porcentaje de la población distribuye leche cruda, como fuente principal de ingresos; sin conocimiento de buenas prácticas de manufactura, ni de procesos de pasteurización, lo que incide en la mala calidad del producto, ya que no está sujeta a ningún tipo de control de calidad representando un riesgo para la población que la consume diariamente (9).

La leche es un producto accesible a los consumidores de bajos recursos, y representa una fuente de proteínas relativamente barata, sin embargo, la mala calidad higiénica de ésta expone a los consumidores a riesgos de infección muy altos, debido a que es un excelente medio para el crecimiento bacteriano, teniendo consecuencias dramáticas para la población al verse expuesta a enfermedades ligadas a su situación de pobreza, lo que debilita sus defensas naturales frente a estas infecciones (29).

A pesar de que la incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 es muy baja, la tasa de mortalidad que produce la bacteria en pacientes afectados es bastante elevada (1-10%) (2,22,30), lo que aumenta la importancia de encontrar un vehículo de transmisión de la bacteria en el municipio de Chiquimula.

En Guatemala existen datos que indican que *Escherichia coli* O157:H7 es asociada a patologías gastrointestinales (15). Se han realizado investigaciones en este país, que evalúan la presencia de esta bacteria en alimentos como carne, frutas y vegetales, no habiéndose obtenido aún resultados positivos (13-14).

Ya que *Escherichia coli* O157:H7 es un patógeno importante para la salud pública y que las investigaciones que se han llevado a cabo para conocer el vehículo transmisor de la misma no han tenido resultados positivos en este

país (13-14), es necesario realizar la determinación de la bacteria en leche cruda, para conocer si este alimento es un vehículo transmisor de la misma en el municipio de Chiquimula.

Además se hace necesario establecer la presencia de *Escherichia coli* como indicador de la calidad sanitaria de la leche analizada en el mismo municipio.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de leche obtenidas artesanalmente y distribuidas en 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula.

### B. Específicos

1. Demostrar la presencia de *E. coli* O157:H7 en leche artesanal proveniente del municipio de Chiquimula.
2. Comprobar a través de la presencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 que las leches muestreadas y distribuidas artesanalmente no son aptas para el consumo humano.

## VI. HIPÓTESIS

Por ser un estudio descriptivo, transversal, no se formula hipótesis.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

Leches de vaca obtenidas artesanalmente y distribuidas en la cabecera departamental de Chiquimula.

### B. Muestra

Treinta muestras de leche artesanal correspondientes a 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula, analizando 2 muestras por lechería.

### C. Materiales

#### 1. Equipo

- a. Asa de nicromo en argolla
- b. Asa de nicromo en punta
- c. Autoclave
- d. Campana bacteriológica
- e. Estufa
- f. Hielera eléctrica
- g. Horno
- h. Incubadora 35-37°C
- i. Mechero Bunsen
- j. Pipeteador
- k. Refrigeradora 2-5°C

#### 2. Cristalería

- a. Beakers de 100 y 250 mL
- b. Erlenmeyers 100, 250, 500 mL
- c. Frascos Masson estériles
- d. Pipetas serológicas 1, 5 y 10 mL
- e. Probetas de 10 y 100 mL
- f. Tubos de ensayo con tapón de rosca de 10 cm de alto

### 3. Medios de Cultivo y Reactivos

- a. Agua peptonada al 0.1%
- b. Agar MacKonkey sorbitol, modificado con telurito de potasio y cefixime (TC SMAC)
- c. Agua destilada
- d. Alcohol al 70%
- e. Caldo bilis verde brillante
- f. Caldo de enriquecimiento para *E. coli* enterohemorrágica
- g. Caldo *E. coli*
- h. Caldo lauril sulfato
- i. Prueba de aglutinación en látex, para *E. coli* O157:H7

### 4. Otros

- a. Cajas de petri plásticas simples estériles
- b. Recipientes de plástico estériles

## D. Procedimiento

### 1. Recolección de muestras

Se tomaron dos muestras de cada una de las 15 lecherías según el plan de muestreo reconocido internacionalmente y definido por la ICMSF (48). Se muestreó aproximadamente 250 mL de leche que fueron vertidos en un recipiente plástico estéril y se transportó posteriormente en una refrigeradora eléctrica de automóvil hacia la ciudad de Guatemala según norma CODEX CAC/CRP 57-2004 (49).

La información a cerca de los locales, zonas, la forma de obtención de la leche, además de la forma en que se

transporta y almacena, se obtuvo por medio de la observación en diferentes lugares en donde se produce leche en el departamento de Chiquimula.

## 2. Proceso analítico

- a. De las dos muestras tomadas de cada lechería, una se llevó al Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos, LAFYM, en donde se realizó la determinación de *Escherichia coli* por el método de tubos múltiples basado en el Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM) método recomendado para análisis microbiológico de leche, según norma COGUANOR 34 046 h23 (16, 18).
- b. La segunda muestra tomada de cada lechería se llevó a un Laboratorio privado situado en el municipio de Chiquimula, para la determinación de *E. coli* O157:H7 que se realizó de la siguiente manera: se midió 25 mL de la leche y se mezclaron con 225 mL del caldo de enriquecimiento para *E. coli* enterohemorrágica y se incubó por 24 horas a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  (16).
- c. Después de la incubación, se agregaron 0.1 mL del caldo que contenía la muestra, sobre el agar Mackonkey sorbitol telurito cefixime. Se sembró por duplicado.
- d. Se incubaron las cajas por 16-24 hrs. A  $35-37^{\circ}\text{C}$ .
- e. Se buscó colonias sorbitol negativo (color neutral o gris), con un centro grisáceo y de 1-2 mm de diámetro.
- f. Se tomó una colonia sorbitol negativo y se colocó sobre una gota de la prueba de látex de *E. coli* O157:H7.
- g. Se mezcló por unos minutos, rotando la lámina.

- h. Se observó la aglutinación para confirmar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 (16, 17).

## E. Diseño estadístico

### 1. Muestra

Treinta muestras de leche artesanal correspondientes a 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula, analizando 2 muestras por lechería con una diferencia en tiempo de una semana, aumentando así la probabilidad de encontrar la bacteria sujeto de investigación. Las 15 lecherías fueron elegidas al azar.

### 2. Diseño del estudio

Descriptivo transversal por conveniencia.

### 3. Tipo de muestreo

No probabilístico

### 4. Variables de Interés

a. Determinación de *E. coli*

b. Determinación de *E. coli* O157:H7

### 5. Análisis de resultados

a. Porcentaje de leches muestreadas no aptas para el consumo humano por presencia de *E. coli*.

b. Porcentaje de muestras con presencia de *E. coli* enterohemorrágica.

## VIII. RESULTADOS

En 10/15 muestras se comprobó la presencia de *Escherichia coli*, lo que indica, que un 67% de las muestras analizadas no es apta para consumo humano (tabla 1, gráfico 1), sin embargo en ninguna de las 15 muestras de leche artesanal analizada se encontró *Escherichia coli* O157:H7.

**Tabla No. 1** Resultados obtenidos durante el primer muestreo de la investigación.

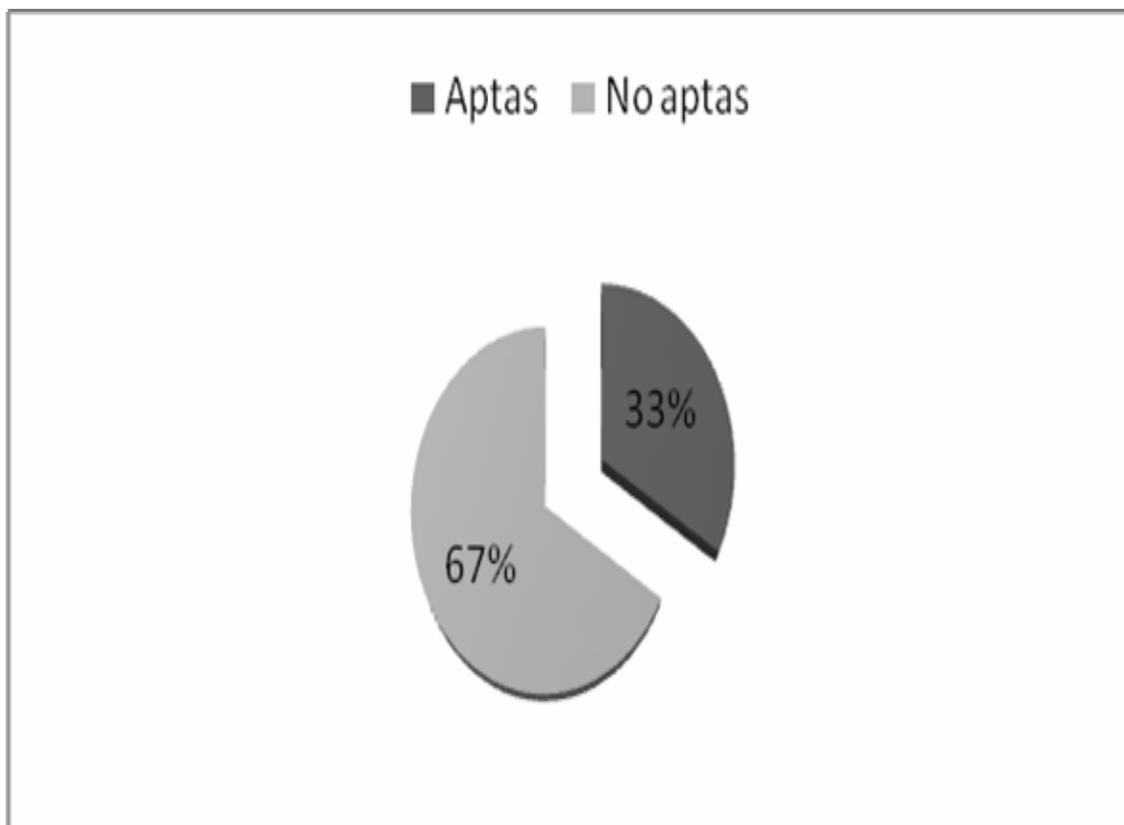
No. de muestra	Recuento Coliformes Totales (NMP/mL)	Recuento Coliformes Fecales (NMP/mL)	Recuento <i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)*	Presencia/Ausencia de <i>Escherichia coli</i> O157:H7**
1	2,400	20	20	Ausente
2	2,400	2,400	2,400	Ausente
3	460	<3	<3	Ausente
4	2,400	2,400	2,400	Ausente
5	15	<3	<3	Ausente
6	43	<3	<3	Ausente
7	<3	<3	<3	Ausente
8	2,400	2,400	2,400	Ausente
9	2,400	2,400	2,400	Ausente
10	2,400	2,400	2,400	Ausente
11	1,100	28	28	Ausente
12	4	4	4	Ausente
13	<3	<3	<3	Ausente
14	15	9	9	Ausente
15	1,100	210	210	Ausente

\*Resultados igual o mayor a 3 NMP/mL, indican presencia de *Escherichia coli*.

\*\*Debe estar ausente por ser un microorganismo patógeno.

Fuente: Resultados obtenidos en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos.

**Gráfico No. 1** Porcentaje de muestras aptas y no aptas para consumo humano por presencia de *Escherichia coli*, en el primer muestreo de la investigación.



Fuente: Resultados obtenidos en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos.

En la segunda fase de la investigación, 14/15 muestras analizadas presentan *Escherichia coli*, lo que indica que el 93% de estas muestras no son aptas para el consumo humano (tabla 2, gráfico 2), no encontrándose *Escherichia coli* O157:H7 en las muestras analizadas.

**Tabla No. 2** Resultados obtenidos durante el segundo muestreo de la investigación

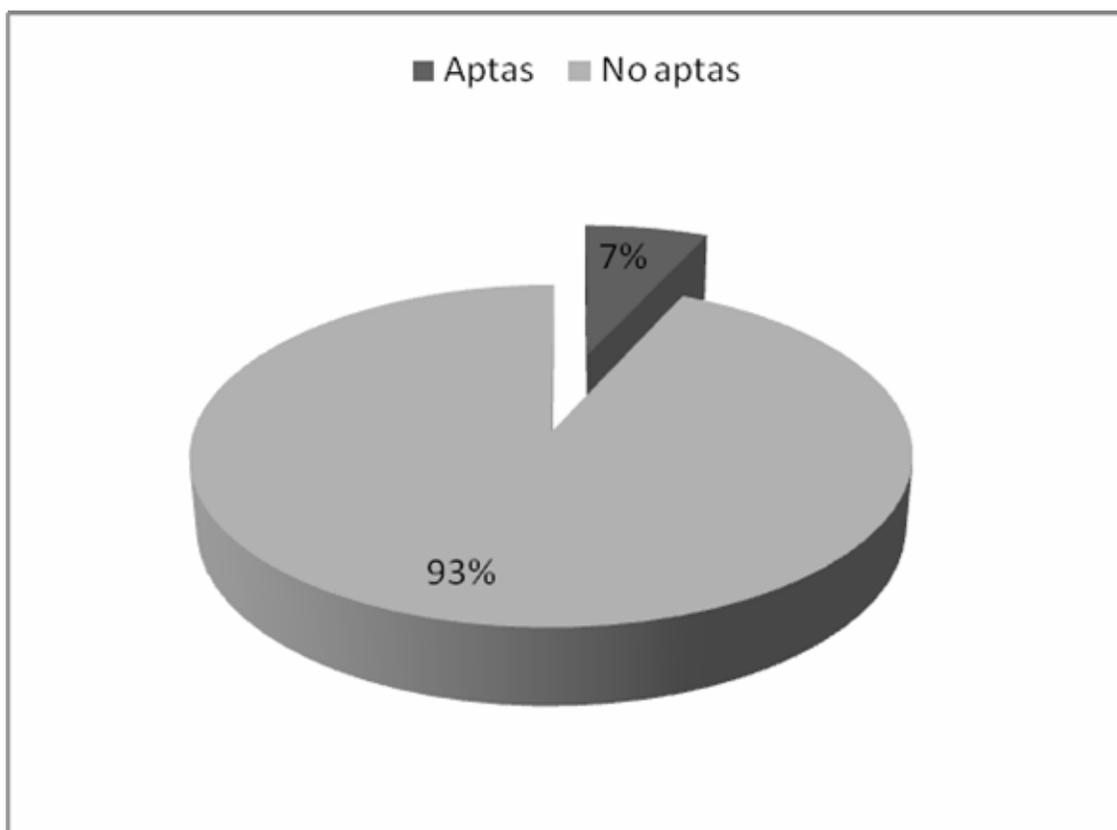
No. de muestra	Recuento Coliformes Totales (NMP/mL)	Recuento Coliformes Fecales (NMP/mL)	Recuento <i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)*	Presencia/Ausencia de <i>Escherichia coli</i> O157:H7**
1	2,000	1,000	1,000	Ausente
2	2,000	2,000	2,000	Ausente
3	2,000	2,000	2,000	Ausente
4	2,000	1,000	1,000	Ausente
5	2,000	20	20	Ausente
6	1,000	<3	<3	Ausente
7	2,000	200	200	Ausente
8	2,000	2,000	2,000	Ausente
9	2,000	2,000	2,000	Ausente
10	2,000	2,000	2,000	Ausente
11	1,000	500	500	Ausente
12	500	500	500	Ausente
13	9	9	4	Ausente
14	2,000	2,000	2,000	Ausente
15	2,000	2,000	2,000	Ausente

\*Resultados igual o mayor 3 NMP/mL, indican presencia de *Escherichia coli*.

\*\*Debe estar ausente por ser un microorganismo patógeno.

Fuente: Resultados obtenidos en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos.

**Gráfico No. 2** Porcentaje de muestras no aptas para consumo humano por presentar *Escherichia coli*, en el segundo muestreo de la investigación.



Fuente: Resultados obtenidos en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos.

De las 30 muestras analizadas en los dos muestreos, 24 presentaron *Escherichia coli*, comprobando que el 80% de las muestras analizadas, *no* son aptas para el consumo humano (tabla 1 y 2).

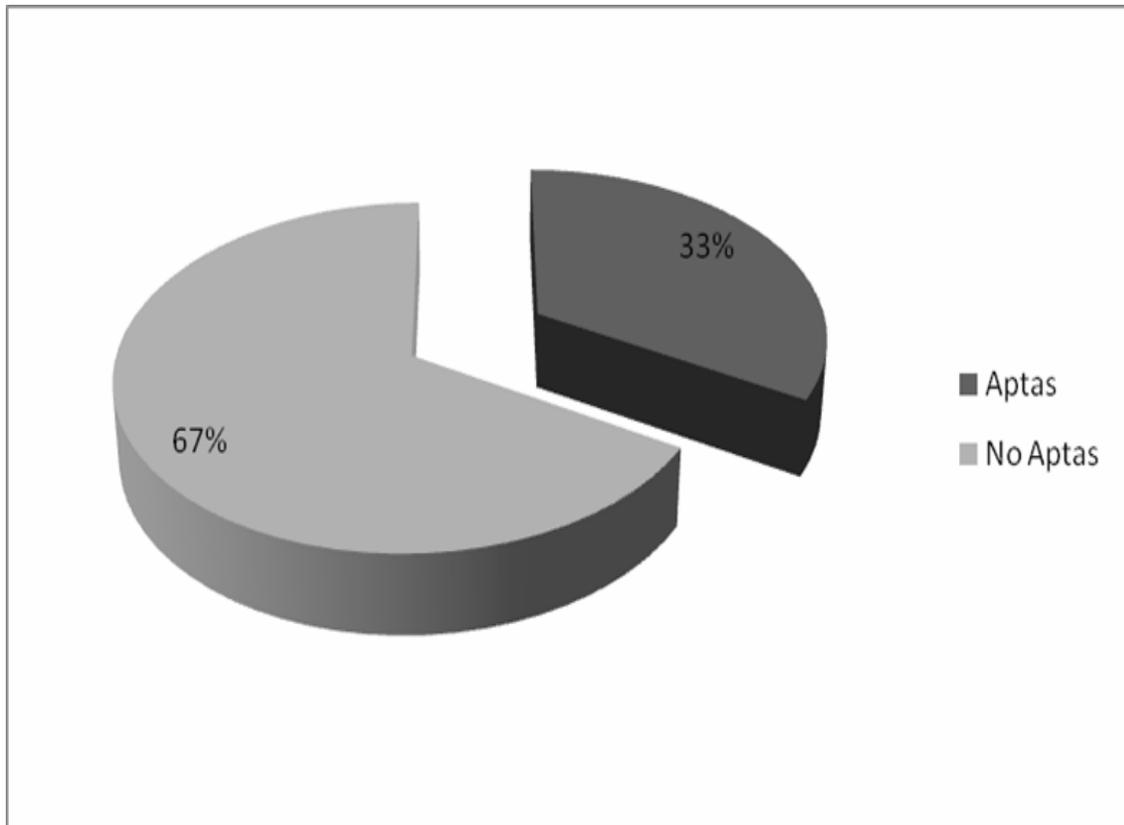
10/15 (67%) lecherías distribuyen leche artesanal no apta para el consumo humano (tabla 3, gráfico 3).

**Tabla No. 3** Número de muestras no aptas para el consumo humano por lechería analizada.

<b>No. de Lechería</b>	<b>No. de Muestras No Aptas</b>
1	2
2	2
3	1
4	2
5	1
6	0
7	1
8	2
9	2
10	2
11	2
12	2
13	1
14	2
15	2

Fuente: Resultados obtenidos en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos.

**Gráfico No. 3** Porcentaje de lecherías que distribuyen leche artesanal no apta para consumo humano por presentar *Escherichia coli*.



Fuente: Resultados obtenidos en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos.

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

En el primer muestreo se comprobó, que 10/15 muestras no son aptas para el consumo humano ya que poseen un valor mayor a 3 NMP/mL de *Escherichia coli*. Según la FDA en el Bacteriological Analytical Manual, valores mayores a 3NMP/mL indican presencia de la bacteria analizada (tabla 1), lo que demuestra que el 67% de las muestras se encuentran contaminadas con *E. coli* (gráfico 1). En el segundo muestreo se obtuvo 14/15 leches contaminadas con *E.coli* , lo que comprueba que el 93% por ciento de las leches analizadas no son aptas para consumo (tabla 2, gráfico 2).

Los resultados obtenidos en el análisis de 30 muestras de leche artesanal en dos muestreos realizados, comprueban que 10/15 lecherías del municipio de Chiquimula, que representa un 67% de las analizadas, distribuyen leche no apta para consumo humano ya que presentan *Escherichia coli* aunque no *Escherichia coli* O157:H7. Según ANMAT en su Guía de interpretación de resultados microbiológicos en alimentos (47), indica que un sitio distribuye alimentos no aptos para el consumo, siempre y cuando se compruebe la presencia del microorganismo indicador de contaminación fecal en dos muestras obtenidas en el sitio a analizar. En la presente investigación se comprobó un número mayor de muestras contaminadas durante el segundo muestreo (tabla 3, gráfico 3, 42).

Calderón, A. *et al.* (40), expone que algunos coliformes son comunes en las heces del hombre y otros animales, pero otros se encuentran comúnmente en el suelo, agua y semillas; por lo que presentan poco o ningún valor para indicar la calidad microbiológica de la leche, por esa razón se utiliza *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal, debido a la asociación cercana de esta bacteria con las heces fecales (2, 20, 26).

Según Hayes, M. *et al.* (26), si la leche cruda presenta *Escherichia coli*, no debe de ser consumida, debido a que esta bacteria puede ser cualquiera de las *E. coli* causantes de diarrea, por lo que el consumo de la leche contaminada con cualquiera de estas bacterias causaría serios daños a la población consumidora (20, 24, 28, 47).

Ellner, R. (9), indica que alrededor del mundo se utiliza como criterio para indicar la calidad microbiológica de la leche cruda, el recuento de microorganismos aerobios mesófilos (18, 34, 35). La Comisión del Codex Alimentarius (46) establece que el recuento de aerobios es utilizado principalmente para clasificar en categoría A, B y C la leche cruda, según los valores que presenten en el análisis, y así poder distribuirla como materia prima, para productos como yogurt y quesos (16). La razón por la que solamente se utiliza este análisis para indicar calidad microbiológica a nivel mundial, es que existen normas para el consumo humano de leche cruda que especifica que por ninguna razón debe consumirse leche sin un tratamiento térmico previo (46). Por tanto, no existe normativa que incluya los valores de *Escherichia coli* como criterio para indicar calidad microbiológica de la leche a nivel mundial, sin embargo, en el municipio de Chiquimula, esta leche cruda se consume diariamente, por lo que se determina la necesidad, de que las normativas en materia de alimentos que rigen nuestro país sean más estrictas en el consumo del mismo.

Según los resultados obtenidos de las 30 muestras de leche analizadas en el municipio de Chiquimula, no se demostró la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 (tabla 1 y 2). Según Hayes M, *et al.* (26), la ausencia del patógeno en las muestras analizadas se debe a factores como constituyentes antimicrobiales, entre los que se mencionan a la lactoferrina, congulinina y el sistema de lactoperoxidasa, que de manera individual o en conjunto pueden contribuir a la eliminación de microorganismos en la leche cruda. Las

bacteriocinas, también, inhiben el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Este compuesto es producido por algunos microorganismos que están presentes en la leche cruda y que causan efectos letales o bioestáticos sobre otros microorganismos.

Otro factor influyente en la ausencia de *E. coli* O157:H7, según Robinson, K. (42), es su difícil aislamiento, debido a la baja incidencia del patógeno en leche cruda.

No puede descartarse que la leche cruda es un vehículo de transmisión de este patógeno en el municipio de Chiquimula, ya que se necesitaría realizar estudios que contemplen el análisis de un número mayor de muestras, planteado en base a probabilidades y producción lechera para incrementar entonces la probabilidad de encontrar esta bacteria; sin embargo, en el municipio de Chiquimula, no existen estudios a cerca de la producción de leche artesanal.

## X. CONCLUSIONES

1. En las leches muestreadas en el municipio de Chiquimula, no hay presencia de *Escherichia coli* O157:H7.
2. Las leches artesanales analizadas provenientes del municipio de Chiquimula, no son aptas para el consumo humano por presentar *Escherichia coli*.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios complementarios que identifiquen otros tipos de *Escherichia coli* encontrada en las leches muestreadas.
2. Según los resultados obtenidos en esta investigación, es importante iniciar la implementación de otros estudios de control microbiológico de la leche en todo el departamento de Chiquimula.
3. Impartir capacitaciones sobre Buenas Prácticas de Manufactura al personal implicado en la producción y distribución de la leche en el municipio de Chiquimula.
4. Investigar la fuente de la cual proviene la *Escherichia coli* encontrada en las leches analizadas.

## XII. REFERENCIAS

1. Oquendo M. Incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico 2006. 76p.
2. Prado V, et al. *Escherichia coli*. Universidad de Chile 2006; 13: 167-180.
3. Michanie S. *Escherichia coli* O157:H7. Rev. de la Unión de la Industria Cárnica Argentina 2003; 17: 40-42.
4. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Mex 2002; 44:464-475.
5. Murray P, et al. Microbiología Médica. 4 Ed. España: Grafos S.A. 2002. 1250p. (p. 262-283)
6. Pelczar M, et al. Microbiología. Ant C, Zavala J, trad. 2 Ed. México: McGraw Hill. 1977. 895p. (p. 522-532)
7. Wu E. Generalidades de Diarrea Aguda infecciosa. Medwave 2002, 7p.
8. Margall N, et al. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Revista Española de Salud Pública 1997; 71:1-6.
9. Ellner R. Microbiología de la leche y productos lácteos. 1999; 2:37-42.
10. Franco L, et al. Determinación de *Escherichia coli* O157 a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales empleando dos sistemas de aislamiento. Universitas Scientiarum. 2001; 6:11-14.
11. Allerberger F, et al. Las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 y la leche sin pasteurizar. Euro Surveill 2001;6(10):147-151.

12. Reuben A, *et al.* Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp.* en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Revista Cielo* 2003; 53 (4): 1-7.
13. Figueroa C. 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. 2000.
14. Castañeda N. Identificación de *Escherichia coli* O157:H7 en verduras y frutas congeladas para exportación. 2000.
15. Matheu J. Prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en el Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social. 1999.
16. Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual (BAM). 8 Ed. Estados Unidos de América, 1995. 1080p. (p. 420-426)
17. USDA. Detection, Isolation, and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) from Meat Products. United States Department of Agriculture 2002. 13p.
18. Food and Drug Administration. Principios para establecimiento de criterios o patrones microbiológicos para alimentos. FAO/OPS/ICMSF Portugal. 1994. 12p.
19. Cano F, *et al.* Manual de Microbiología de Alimentos. Guatemala: Laboratorios INCAP OPS/INCAP/CONCYT. 1999. 120p.
20. Lancelle M, *et al.* Calidad microbiológica de leche cruda usada en queserías de la Provincia de Corrientes. Argentina: UNNE, 1994. 4p.
21. Boor K, *et al.* Microbiological and Chemical Quality of Raw milk in New York States. *Journal Dairy Sci*, 1998; 81:1743-1748.

22. Blanco M, *et al.* Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia. Euro Journal Epidemiology 1996; 12:13-19.
23. Padhye NV, *et al.* *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. Journal Food Prot. 1992; 55: 555-565.
24. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Rev 1998, 11: 142-201.
25. Ratnam S, *et al.* Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. Journal of clinical microbiology. 1988; 26(10):2006-2011.
26. Hayes M, *et al.* Identification y Characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. Journal Dairy Sci. 2001; 84: 292-298.
27. Grauke L, *et al.* Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 2002; 68(5):2269-2277.
28. Barreto G, *et al.* Categorías enteropatógenas de *E.coli* en alimentos. Revista Productos Animales. 1999; 12: 87-90.
29. Adams, M.R., *et al.* Microbiología de los Alimentos. España, 1995; 130-133, 227-233.
30. Departamento de Programas para el Ambiente, República de Chile. Antecedentes sobre síndrome hemolítico urémico causado por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Circular No. 4B, 1996; 177: 1-3.
31. Rivero M, *et al.* *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome hemolítico urémico en Argentina. Medicina (Buenos Aires) 2004; 64: 352-356.
32. LeJeune J, *et al.* Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: Predominance and persistence of specific clonal types despite massive population turnover. Journal of Applied and Environmental Microbiology 2004; 70(1):377-384.

33. Shere J, *et al.* Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64(4): 1390-1399.
34. Wachsmuth K. *Escherichia coli* O157:H7 - Forjador de Cambios en la Inocuidad Alimenticia y las Tradiciones en el Mundo Industrializado. U.S Depto de Agriculture 2003, 2p.
35. Vasquez J. y Cabral A. La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. Publicación de la dirección de alimentación y nutrición de la FAO 2001; 28:1014.
36. Garland I., Kaspar C. *Escherichia coli* O157 : H7 Acid Tolerance and Survival in Apple Cider. *Journal of Food Protection*. 1994; 6: 460-464.
37. Emilfork M, *et al.* Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7. *Revista Chilena Pediátrica*, 1999. 2p.
38. Griffin P, *et al.* The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology Rev* 1991; 13:60-98.
39. Pearce M, *et al.* Distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70(10): 5737-5743
40. Calderón, A, *et al.* Indicadores de calidad de leche cruda en diferentes regiones de Colombia. *Rev. MVZ Córdoba* 2006; 11 (1): 725-737.
41. Huapaya B, *et al.* Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. *Revista Médica Exp* 2001; 18:1-2.
42. Robinson, R.K. 1987. *Microbiología Lactológica*, Vol. I. *Microbiología de la Leche*. Editorial Acribia, S.A. España.

43. Marzocca M, *et al.* Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. Revista Argentina de Microbiología 2006; 38:38-40.
44. Normas Para La Obtención De Licencia Sanitaria de Funcionamiento De Salas De Ordeño, Centros De Acopio y Medios De Transporte De Leche Cruda. Acuerdo Ministerial No. 427-2005. Oficina de Normas y Regulaciones, Unidad de Normas y Regulaciones, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.
45. Servicio de Información Municipal. Municipio de Chiquimula, Departamento de Chiquimula, Región III, Sub-región 3 (INAB). <http://www.inforpressca.com/chiquimula/demografía.php>, visitada el 8 de mayo del 2008.
46. Cámara de Productores de Leche de Guatemala. Situación Actual de la Ganadería Bovina de la pequeña Agricultura. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. Guatemala 2004. 26p.
47. MAGA. Censo Nacional Agropecuario. 2003. <http://www.ine.gob.gt/content/censagrop.htm>, visitada el 02 de octubre del 2006.
48. Comisión del Codex Alimentarius. CODEX CAC/CRP 57-2004. Disponible en: <http://www.fao.org>, visitada el 24 de octubre del 2007.
49. ANMAT. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos en alimentos. Disponible en [http://www.Anmat.gov.ar/alimentos/Guia de interpretacion resultados microbiologicos .pdf](http://www.Anmat.gov.ar/alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf), visitada el 12 de diciembre del 2,007.



