



**Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo**

Facultad de Químico Farmacobiología

**Programa Institucional de
Maestría en Ciencias Biológicas**

**Tesis para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas**

**“Evaluación de la calidad microbiológica en queso
fresco y adobera, de la región Tierra Caliente del
estado de Michoacán”**

Presenta:

Q.F.B. Ricardo Giovanni Soria Herrera

Directores:

Dra. Berenice Yahuaca Juárez
Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés

Morelia Michoacán, Febrero 2020



El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Berenice Yahuaca Juárez, en el Laboratorio de Biotecnología “M.C. Víctor M. Rodríguez Alcocer” de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (QFB-UMSNH), en Co-dirección con el Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés, del Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN).

Índice general

Índice de figuras	vi
Índice de tablas.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Abreviaturas.....	x
1. Introducción general	1
1.1 Quesos frescos jóvenes.....	3
2. Justificación	6
3. Hipótesis	7
4. Objetivo general	7
4.1 Objetivos particulares.....	7
5. Capítulo 1. Calidad microbiológica y puntos de contaminación microbiana en el proceso de producción de quesos fresco y adobera en empresas michoacanas ubicadas en la región tierra caliente.....	8
5.1 Estado del arte.....	8
5.2 Microorganismos indicadores de calidad.....	9
5.3 Objetivo.....	11
5.4 Materiales y métodos.....	11
5.4.1 Diseño y análisis estadístico.....	12
5.4.2 Implementación de la guía de la norma NOM-251-SSA1-2009.....	12
5.5 Métodos de análisis para la determinación de la calidad microbiológica de los quesos fresco y adobera.	14
5.5.1 preparación de las diluciones	14
5.5.2 Recuento de mesófilos aerobios (BMA).....	14
5.5.3 Recuento de mohos y levaduras (MyL)	14
5.5.4 Recuento de bacterias coliformes totales y fecales por número más probable (NMP)	14
5.5.5 Recuento de bacterias coliformes fecales por cuenta en placa (CF).....	15
5.6 Resultados y discusión	15
5.6.1 Recuento de BMA en quesos fresco y adobera.....	16
5.6.2 Recuento de mohos y levaduras (MyL) en queso fresco y adobera.....	17
5.6.3 Recuento de bacterias coliformes totales y fecales por número más probable (NMP) en quesos fresco y adobera.	19
5.6.4 Recuento de bacterias coliformes fecales por cuenta en placa (CF) en quesos fresco y adobera.....	20

5.7 Conclusión	21
5.8 Referencias bibliográficas	22
6. Capítulo II. Presencia de microorganismos patógenos <i>Escherichia coli</i>, patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénicos, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Salmonella</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco y adobera.....	24
6.1 Estado del arte.....	24
6.1.1 <i>Escherichia coli</i>	25
6.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
6.1.3 <i>Salmonella</i> spp.....	27
6.1.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	27
6.2 Materiales y métodos	28
6.2.1 Aislamiento de <i>E. coli</i> en queso.....	28
6.2.2 Búsqueda de genes de patogenicidad de los patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénicos.....	28
6.2.3 Cuantificación de <i>S. aureus</i> en queso	30
6.2.4 Determinación de <i>Salmonella</i> en queso	30
6.2.5 Determinación de <i>L. monocytogenes</i> en queso	30
6.3 Resultados y discusión	31
6.3.1 Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	31
6.3.2 Búsqueda de patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénicos (PED).....	33
6.3.3 Cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en queso	34
6.3.4 Determinación de <i>Salmonella</i> en queso.	35
6.3.5 Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso.....	36
6.4 Conclusiones	38
6.5 Referencias bibliográficas	38
7. Capítulo III. Aislamiento e identificación molecular de micobacterias en queso fresco y adobera.	41
7.1 Estado del arte.....	41
7.2 Materiales y métodos	42
7.2.1 Aislamiento de micobacterias	42
7.2.2 Identificación de las especies de micobacterias por métodos moleculares	42
7.2.3 Identificación de micobacterias a nivel de género por PCR	43
7.2.4 Identificación de las especies de micobacterias no tuberculosas (MNT).....	44
7.2.5 Técnica de PRA (PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis).....	44
7.2.6 Secuenciación del gen <i>rpoB</i>	45
7.2.7 Secuenciación de la región v2 del gen <i>rrs</i>	45
7.3 Resultados y discusión	46

7.3.1 Identificación molecular de micobacterias.....	46
7.3.2 Identificación de MNT por la técnica de PRA.....	46
7.3.3 Identificación de MNT por secuenciación del gen <i>rpoB</i>	48
7.3.4 Identificación de MNT por secuenciación de la región <i>v2</i> del gen <i>rrs</i>	50
7.4 Conclusión	53
7.5 Referencias bibliográficas	53
8. Capítulo IV. Calidad microbiológica de los quesos fresco y adobera en función del proceso de producción y la zona o empresa productora.....	55
8.1 Estado del arte.....	55
8.2 Materiales y métodos	56
8.2.1 Análisis estadístico	56
8.2.2 Muestreo de superficies inertes	56
8.2.3 Muestreo de superficies vivas.....	57
8.2.4 Muestreo de agua potable	57
8.3 Resultados y discusión	58
8.3.1 BMA en el proceso de producción de quesos adobera y fresco.....	58
8.3.2 MyL en el proceso de producción de quesos adobera y fresco.....	61
8.3.3 Coliformes fecales por NMP en quesos adobera y fresco.....	64
8.3.4 <i>E. coli</i> por NMP en quesos adobera y fresco	68
8.4 Conclusión	71
8.5 Referencias bibliográficas	72
9. Conclusión general	73
10. Referencias bibliográficas complementarias	74

Índice de figuras

Número de figura	Título	Página
1	Zonas de producción pecuaria del estado de Michoacán.	2
2	Diagrama de flujo en la producción de queso adobera	3
3	Diagrama de flujo en la producción de queso fresco	4
4	Diagrama metodológico aplicado para cada una de las empresas productoras de queso fresco y adobera así como a las superficies de contacto.	13
5	PCR multiplex I para la identificación de EPEC, ETEC, EIEC y STEC.	33
6	PCR multiplex para EAEC y DAEC.	34
7	Técnica de PRA para las muestras de queso fresco	47
8	Técnica de PRA para las muestras de queso adobera	47
9	Amplificación del gen <i>rpoB</i>	48
10	Ejemplo de secuencia del gen <i>rpoB</i> analizado a través del programa Cromas 2.6.6 ©.	49
11	Ejemplo de secuencia del gen <i>rpoB</i> en formato FASTA	49
12	Ejemplo de resultado de similitudes significativas en BLAST.	49
13	Amplificación de la región V2 del gen <i>rrs</i> de las cepas de micobacterias aisladas de quesos fresco y adobera.	50
14	Ejemplo de secuencia de la región V2 del gen <i>rrs</i> en formato FASTA	51
15	Ejemplo de resultado de similitudes significativas en BLAST.	51
16	Análisis de componentes principales para BMA en queso adobera.	59
17	Análisis de componentes principales para BMA en queso fresco.	61
18	Análisis de componentes principales para MyL en queso adobera.	62
19	Análisis de componentes principales para MyL en queso fresco.	64
20	Análisis de componentes principales para CF por NMP en queso adobera	66
21	Análisis de componentes principales para CF por NMP en queso fresco	67
22	Análisis de componentes principales para <i>E. coli</i> por NMP en queso adobera	69
23	Análisis de componentes principales para <i>E. coli</i> por NMP en queso fresco	71

Índice de tablas

Número de tabla	Título	Página
1	Valores límite establecidos para cada microorganismo en quesos frescos en las normas Mexicanas.	5
2	Aplicación de la guía de buenas prácticas de higiene en las empresas productores de quesos.	16
3	Recuento de BMA en queso adobera y fresco.	17
4	Recuento de MyL en queso adobera y fresco.	18
5	Resultados obtenidos por la técnica de NMP para coliformes totales (CT) y fecales (CF) en queso fresco y adobera.	19
6	Recuento de CF por cuenta en placa de queso adobera y fresco.	21
7	Iniciadores utilizados para la identificación de patotipos de <i>E. coli</i> diarrogénicos.	29
8	Resultados obtenidos de <i>E. coli</i> por la técnica de NMP y aislamiento de cepas.	32
9	Recuento de <i>E. coli</i> en las dos variedades de queso por empresa.	33
10	Recuento de <i>S. aureus</i> en las dos variedades de queso por empresa.	34
11	Búsqueda intencionada de <i>Salmonella</i> spp. en quesos adobera y fresco.	36
12	Búsqueda intencionada de <i>Salmonella</i> spp. en superficies por empresa.	36
13	Búsqueda intencionada de <i>L. monocytogenes</i> en ambos tipos de queso.	37
14	Búsqueda intencionada de <i>L. monocytogenes</i> en superficies por empresa.	37
15	Iniciadores utilizados para la identificación de micobacterias.	43
16	Muestras analizadas con resultados positivos en la tinción para BAAR.	46
17	Patrones de restricción obtenidos en la técnica de PRA.	48
18	Especies de MNT identificadas a través de la amplificación del gen <i>rpoB</i> .	50
19	Especies de MNT identificadas a través de la amplificación del gen <i>rrs</i> .	51
20	Resultados de la identificación de MNT.	52
21	Recuento de BMA en queso adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.	58
22	Matriz de correlación múltiple para BMA en queso adobera.	58
23	Recuento de BMA en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa	60
24	Matriz de correlación múltiple para BMA en queso fresco.	60
25	Recuento de MyL en queso adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.	61
26	Matriz de correlación múltiple para MyL en queso adobera.	62
27	Recuento de MYL en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.	63
28	Matriz de correlación múltiple para MyL en queso fresco.	63
29	Recuento de CF por NMP en queso adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.	65
30	Análisis de correlación múltiple para CF en queso adobera por NMP.	65
31	Recuento de CF por NMP en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.	66
32	Matriz de correlación múltiple para CF en queso fresco por NMP.	67
33	Recuento de <i>E. coli</i> por NMP en queso adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.	68
34	Análisis de correlación múltiple para <i>E. coli</i> en queso adobera por NMP.	68
35	Recuento de <i>E. coli</i> por NMP en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.	70
36	Matriz de correlación múltiple para <i>E. coli</i> en queso fresco por NMP.	70

Resumen

El estado de Michoacán en México es una de las regiones más diversas en actividades agropecuarias, la región de tierra caliente ubicada al suroeste del estado, cuenta con una vasta producción de lácteos y de sus derivados; sin embargo, las características meteorológicas y de producción generan puntos críticos de contaminación en el producto, y es debido a esta situación que los objetivos de esta investigación fue evaluar la calidad microbiológica y la búsqueda de bacterias patógenas en quesos artesanales de tipo fresco y adobera. Para este estudio el área seleccionada fueron tres municipios en el estado de Michoacán, los cuales se encuentran en regiones productoras de queso. Se seleccionaron seis fábricas de queso artesanal, tres ubicadas en Buenavista, dos en Tepalcatepec y una en Apatzingán. En el periodo comprendido entre noviembre de 2018 y marzo de 2019, se colectaron 30 quesos frescos y 30 quesos adobera, cinco quesos frescos y cinco de adobera de cada fábrica. Todas las muestras colectadas se almacenaron en un recipiente frío a 4 °C y se transportaron al laboratorio. Para el procesamiento de las muestras se prepararon las diluciones de acuerdo a lo estipulado en la NOM-110-SSA1-1994, y se analizaron utilizando los procedimientos descritos en las normas oficiales mexicanas para recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA) NOM-092-SSA1-1994, la cuenta en mohos y levaduras (MyL) NOM-111-SSA1-1994, cuenta en placa de coliformes fecales (CF) NOM-113-SSA1-1994 y la NOM-210-SSA1-2014 en los apéndices A para determinar la presencia de *Salmonella* spp.; el apéndice B para el conteo de *Staphylococcus aureus*; el apéndice C para la determinación de *Listeria monocytogenes* y el apéndice H sobre los métodos para la cuenta de bacterias Coliformes Totales (CT), CF y *Escherichia coli* por la técnica de número más probable (NMP). Los resultados obtenidos demuestran la presencia de BMA en el 100% de las muestras de queso fresco y adobera con más de 100,000 UFC/g en el 90% de las muestras. El recuento de MyL mostró que para el queso adobera el 100% de las muestras excedieron el límite permitido en la normatividad mexicana mientras que para el queso fresco fue un 95%. Asimismo se encontró *S. aureus* con valores fuera de la norma (1000 UFC/g) en el 100% del queso adobera y en el 66.66% de los quesos frescos. Para el caso de los CF, los resultados indican que para el queso adobera el 93.4% de las muestras no cumple con lo establecido por la norma, en tanto que para el queso fresco un 66.7 % de las muestras se encuentran fuera de los límites permitidos, de las cepas de *E. coli* aisladas se determinó por métodos moleculares que ninguna posee genes de patogenicidad. La búsqueda intencionada de microorganismos patógenos reveló la presencia de una muestra positiva para *Salmonella* spp. en queso adobera, y una muestra de queso fresco contenía *Listeria monocytogenes*. Dos muestras de queso fresco y una de queso adobera contenían a *M. fortuitum*, mientras que una muestra de queso adobera contenía a *M. mageritense*. Los resultados de este estudio muestran que los quesos frescos y adobera producidos en la región de tierra caliente de Michoacán tienen mala calidad microbiológica y contienen bacterias patógenas asociadas con enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento térmico de la leche y las buenas prácticas de fabricación deben implementarse durante todo el proceso de producción para garantizar un producto seguro.

Palabras clave: Quesos artesanales, BPM, evaluación microbiológica, patógenos en alimentos, Micobacterias no tuberculosas.

Abstract

Hot land region is located in western central Mexico in the state of Michoacán's has a vast production of milk and dairy products, however the cheeses is not evaluated for microbiological quality and the occurrence of foodborne pathogens, therefore the aims of this study were (i) to assess the microbiological quality of fresh cheeses and adobera cheeses produce in six artisanal factories located in the hot land region of Michoacan Mexico and (ii) to evaluate the occurrence of human pathogens, *S. aureus*, *Salmonella* spp, *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Mycobacterium* spp. in the samples. Six different artisan cheese factories were selected, three were located in Buenavista, two in Tepalcatepec and one in Apatzingán. From November 2018 to March 2019, a total of 30 unpasteurized fresh cheeses and 30 unpasteurized adobera cheeses were collected. Five fresh cheeses and five adobera cheeses were collected from each one of the six artisanal factories. All samples collected were stored in a cold container at 4 °C and transported to the laboratory.. Each sample was tested for the presence of aerobic-mesophilic bacteria (AMB), total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC), Mold and Yeast (ML), *E. coli*, *Salmonella* spp, *S. aureus*, *L. monocytogenes* following the methods approved by the Mexican official guidelines NOM-110-SSA1-1994, NOM-092-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, and NOM-210-SSA1-2014. The results show the presence of AMB in all samples and 90% of the samples contained more than 100,000 CFU/g. For ML, a total of 100% and 95% samples of fresh and adobera cheeses, respectively, exceed the maximum limit allowed of 500 CFU/g. *S. aureus* was also found with values outside of guideline (1000 CFU/g) in 100% of adobera cheeses and in 66.66% of fresh cheeses. With respect to CF, a total of 93.4 % and 66.7% of samples of fresh and adobera cheeses were outside of guideline which established a maximum of 100 MPN/g. None of the *E. coli* strains isolated belonged to diarrheagenic pathotypes. *Salmonella* was identified in a sample of adobera cheese and one sample of fresh cheese was positive for *L. monocytogenes*. *M. fortuitum* was identified in two samples of fresh cheeses and in one sample of adobera cheeses, while that one sample of adobera cheese harbored *M. mageritense*. The results of this study show that fresh and adobera cheeses produced in the hot land region of Michoacán have poor microbiological quality and harbored pathogenic bacteria associated with diseases. Therefore, heat treatment for milk and good manufacturing practices should be implemented throughout the entire production process to ensure a safe product.

Key words: Artisan cheeses, GMP, Microbiological evaluation, pathogenic microorganisms
Nontuberculous mycobacteria.

Abreviaturas

ACP:	Análisis de Componentes Principales
BLAST:	Del inglés “ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ”
BMA:	Bacterias Mesofilas Aerobias
BPH:	Buenas Prácticas de Higiene
BPM:	Buenas Prácticas de Manufactura
°C:	Grado Centígrado
CF:	Coliformes Fecales
CLT:	Caldo Lauril Triptosa
CMT:	Complejo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
CT:	Coliformes Totales
ETA:	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
HACCP:	Del inglés “ <i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i> ”
MNT:	Micobacterias no tuberculosas
MyL:	Mohos y Levaduras
NMP:	Número más probable
PCR:	Del inglés “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PED:	Patotipos de <i>Escherichia coli</i> Diarreogénicos
PRA:	Del inglés “ <i>PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis</i> ”
UFC:	Unidad Formadora de colonia

1. Introducción general

El queso es uno de los alimentos de más amplio consumo a nivel internacional, debido principalmente a sus características sensoriales y nutritivas que difieren entre cada tipo de queso. Se estima que existen aproximadamente 2,000 variedades de quesos divididos en tres categorías principales: Maduros, Semi-maduros y frescos, sin embargo, en México se consumen preferentemente quesos frescos, los cuales se incluyen en una gran cantidad de platillos de la cocina mexicana (Valdemar Tlazola, 2012).

La gran variedad de quesos existente corresponde a la naturaleza de la leche, su procedencia a partir de distintas especies o razas y a las formas de preparación, las cuales están diferenciadas por las condiciones geográficas, climatológicas, económicas e históricas. En la actualidad estas condiciones han cambiado debido a los progresos tecnológicos de producción y transformación de los productos lácteos; sin embargo, muchos de los procesos continúan siendo artesanales dependiendo de la región donde se elaboran (Villegas de Gante *et al.*, 2016).

Todas las variedades de quesos naturales que se producen es posible clasificarlos en siete categorías básicas según su textura o grado de humedad y el tipo de corteza; ambos criterios se emplean para evaluarlos y determinar sus características básicas, resultando los siguientes grupos (Gonzalez Vivanco, 2002)

- A) Quesos frescos jóvenes
- B) Con corteza natural
- C) De corteza blanda y blanca
- D) Quesos semicurados o semiblandos
- E) De textura firme o dura
- F) Queso azul
- G) Quesos aromatizados

En México la producción de leche de bovino ocupa el tercer lugar en importancia económica dentro de los productos pecuarios con el 17.22 % del valor nacional, que de acuerdo con los datos de la SAGARPA en el 2018, corresponde a una producción de 12,008 millones de litros,

siendo los estados de Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Guanajuato, Veracruz, Puebla, México, Aguascalientes y Chiapas los de mayor volumen de producción (SIAP, 2018).

En 2016 México ocupó el séptimo lugar mundial en la producción de leche, con lo que de cada 100 litros de leche que se producen en el mundo tres litros son mexicanos. A partir de esta producción, la industria de elaboración de derivados y fermentos lácteos como yogurt, queso y crema alcanzó una producción de 751 mil 370 toneladas de productos lácteos, de los cuales específicamente se produjeron 245 mil toneladas de queso (SIAP, 2018).

En el estado de Michoacán la Delegación Estatal de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), a través del Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria, atiende por regiones a productores de bovinos, Caprinos, Cerdos, Pollos, y otras especies (Figura 1), siendo una de las principales actividades la producción de bovinos para engorda y producción de lácteos (COPLADEM, 2015).

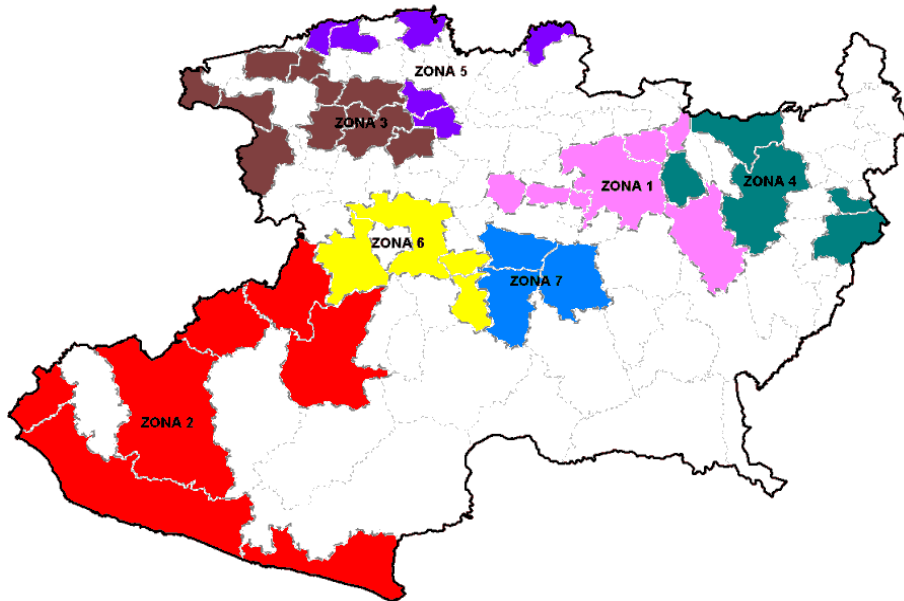


Figura 1. Zonas de producción pecuaria del estado de Michoacán.

Zona 1. Morelia (pollo, bovinos leche, cabras, manejo y envasado de miel), Zona 2. Apatzingán (bovinos doble propósito), Zona 3. Zamora (bovinos leche, manejo y envasado de miel), Zona 4. Hidalgo (manejo y envasado de miel), Zona 5. La Piedad (cerdos, bovinos doble propósito), Zona 6. Uruapan (bovinos leche), Zona 7. Tacámbaro (ovinos, manejo y envasado de miel. Tomado y modificado de (COPLADEM 2015.)

1.1 Quesos frescos jóvenes

Este tipo de quesos carecen de corteza, y muchos se emplean mayormente para cocinar antes que servirlos en una tabla de quesos. Los quesos frescos tienen periodos de vida de anaquel cortos y se sugiere mantenerlos en refrigeración para prolongar su vida útil. Son considerados quesos frescos: Canasto, **Fresco**, Panela, Ranchero, Sierra, Blanco, Enchilado, Adobado, Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Morral, **Adobera**, Cottage, Crema, Doble Crema, Petit Suisse, entre otros (Villegas de Gante & Huerta Benítez, 2014), sus principales características consisten en que son suaves, húmedos, a veces con textura de “mousse”, se consumen cuando tienen entre 1 y 15 días, antes de que empiece a formarse la corteza.

El proceso de elaboración inicia con el control de calidad de la leche y el uso de insumos como el cuajo, cloruro de calcio y cloruro de sodio, los cuales siguen el proceso descrito en las figuras 2 y 3.

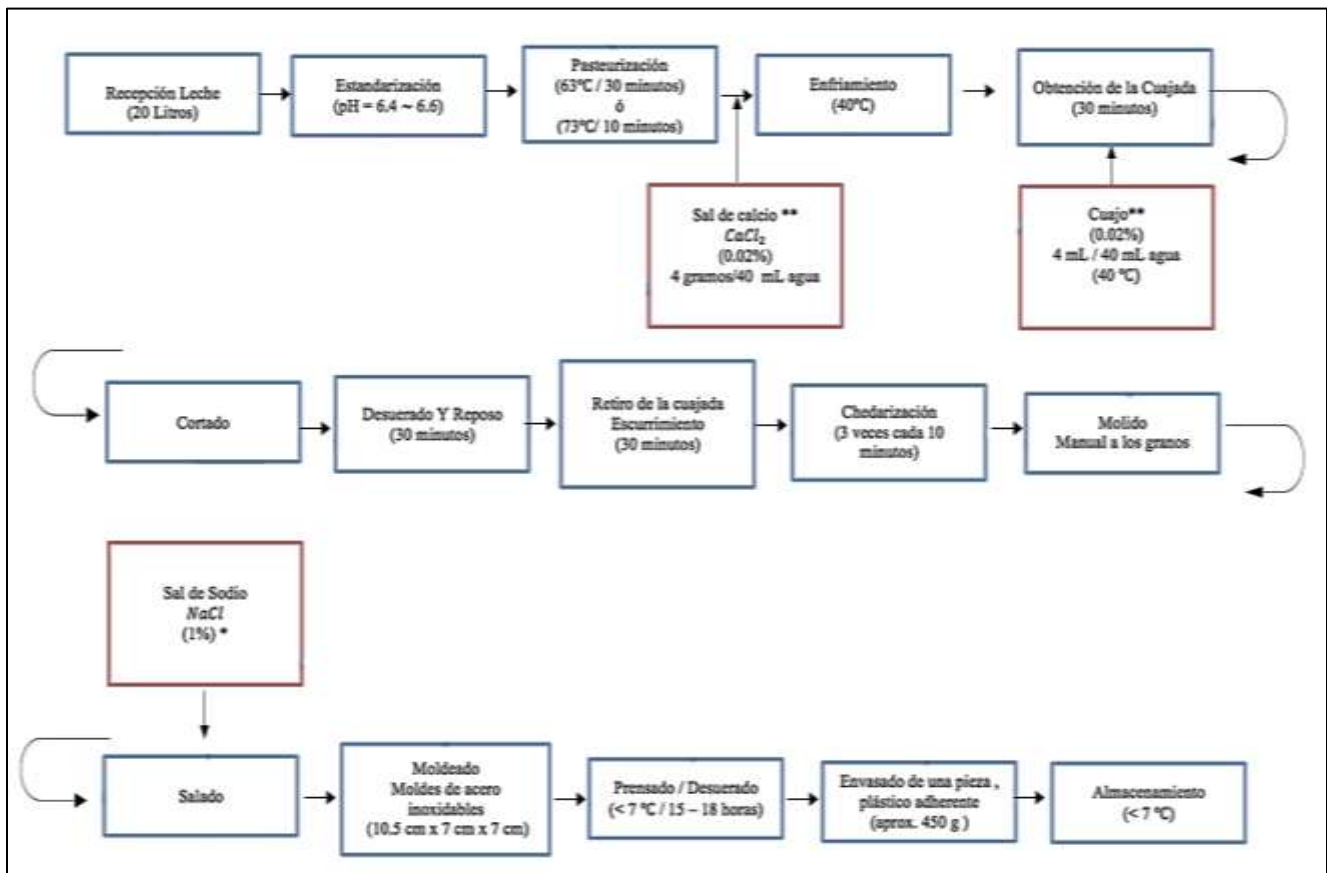


Figura 2. Diagrama de flujo en la producción de queso adobera.

Tomado y modificado de (González Rosales & Chombo Morales, 2012)

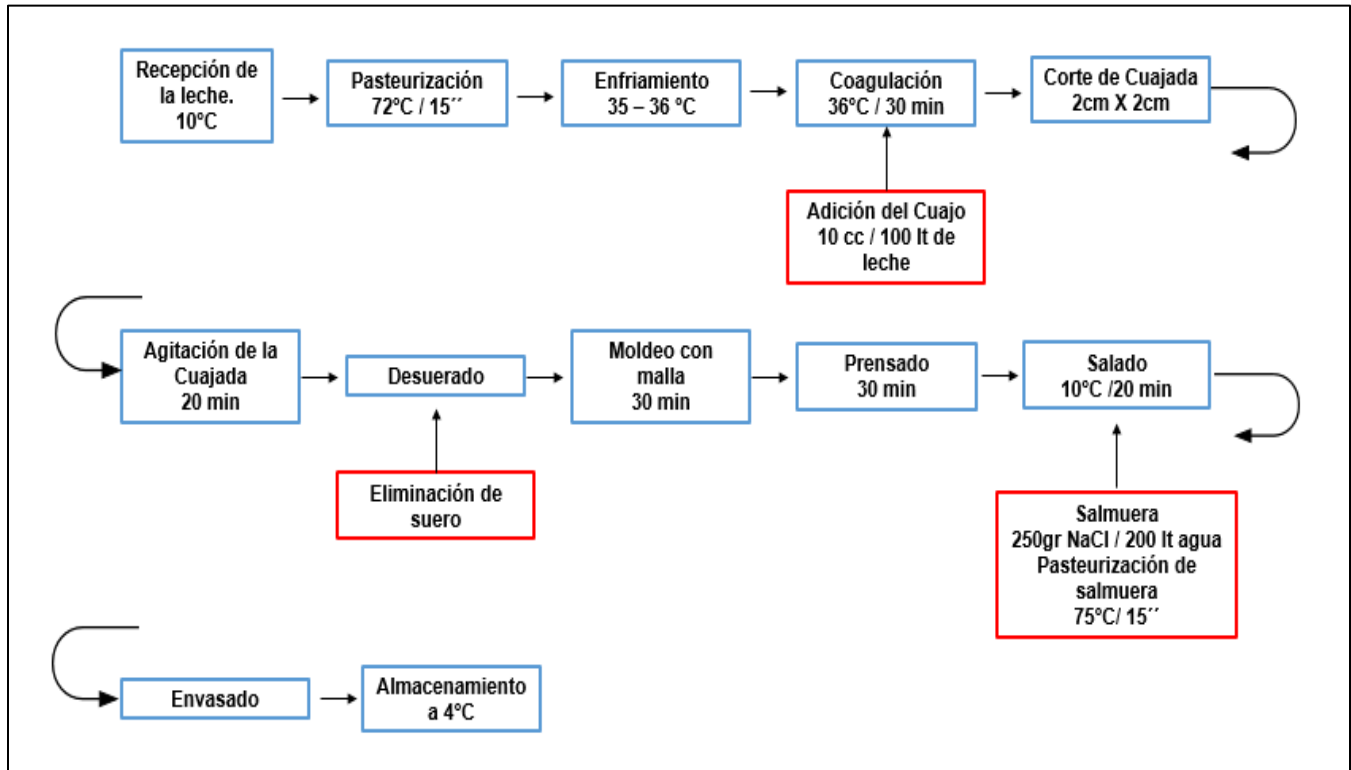


Figura 3. Diagrama de flujo en la producción de queso fresco.

Tomado y modificado de (Villegas de Gante *et al.*, 2014)

El *Codex Alimentarius* en su Codex Standard 283-1978 define al queso como un producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado en el cual la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche y sea obtenido mediante coagulación total o parcial de ésta por acción de coagulantes idóneos, con escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de la coagulación (FAO & OMS, 2005).

En las zonas urbanas de México el consumo de productos como leche pasteurizada, quesos industrializados, yogurt y crema ocupan las primeras posiciones de productos comercializados, sin embargo en las zonas rurales los principales productos lácteos consumidos continúan siendo los productos locales artesanales no pasteurizados (SEDECO, 2012).

De acuerdo con datos publicados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en 2018 los estados de Jalisco, Durango, Chihuahua, Coahuila, Hidalgo y Guanajuato fueron los principales

productores de leche, acumulando un 60.89 % del valor nacional de la leche; Michoacán ocupa el onceavo lugar con un 2.64 % de valor total de la producción.

En Michoacán, datos de la Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario (SEDRUA) estiman que la producción de leche es de alrededor de 300 millones de litros al año desde 2013 y se destina un diez por ciento a la producción de queso. En la región de Tepalcatepec se produce en promedio un millón 277 mil 500 kilos de queso al año, la región de Apatzingán produce 182 mil 500 kilos de diferentes quesos y la región Cotija un millón 825 mil kilos de queso (Cambio de Michoacán, 2014).

La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 establece las especificaciones sanitarias de los quesos frescos, madurados y procesados (Tabla 1), define a los quesos frescos como productos de alto contenido de humedad, sabor suave, que se caracterizan por no tener corteza y con un periodo de anaquel corto, por lo que necesita condiciones de refrigeración. A nivel industrial estas características marcan los parámetros que debe tener cualquier tipo de queso y su alteración es reflejo de una mala calidad microbiológica y por tanto un acortamiento en la vida de anaquel del producto. Es importante mencionar que la mayoría de las empresas de la región tierra caliente en Michoacán son de tipo artesanal y no utilizan los procesos de pasteurización, siendo uno de los factores más importantes para la presencia de microorganismos patógenos y la mala calidad microbiológica.

Tabla 1. Valores límites establecidos para cada microorganismo en quesos frescos en las normas mexicanas.

Microorganismo	Quesos Frescos
Bacterias Mesofilas Aerobias (UFC/g)	N/A
Mohos y Levaduras (UFC/g)	<500 ^a
Coliformes Totales (NMP/g)	N/A
Coliformes Fecales (NMP/g)	<100 ^b
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<100 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<1000 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente ^a
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente ^a
<i>Mycobacterium</i> sp.	N/A

NMP: Numero Más Probable, UFC: Unidades Formadoras de Colonias, N/A: (no existe valor límite para este indicador). ^aNOM-243-SSA1-2010 (Secretaría de Salud, 2010); ^bNOM-121-SSA1-1996 (Secretaría de Salud, 1996).

2. Justificación

Acorde con la FAO más de 6,000 millones de personas consumen leche y productos lácteos, convirtiendo a la industria láctea en una de las más relevantes a nivel mundial; en México es la tercera industria más importante dentro de la rama de los alimentos.

Los quesos, en sus distintas formas, texturas y sabores son una fuente importante de nutrientes para los humanos; sin embargo, estos productos pueden estar contaminados con microorganismos patógenos, convirtiéndose en un vehículo para las “Enfermedades Transmitidas por Alimentos” (ETA). La falta de medidas higiénico-sanitarias durante la cadena de producción, distribución, almacenamiento y venta de quesos, aunado al riesgo que implica que, en algunas regiones de México para la elaboración de distintos tipos de queso se utiliza leche sin pasteurizar provocando que el producto final esté contaminado con microorganismos patógenos, generando afectaciones en la salud pública y por consecuencia a la economía del país. La evaluación de la calidad microbiológica en la industria quesera permite determinar la carga microbiana del producto, predecir su vida de anaquel y evaluar los posibles puntos de contaminación.

Michoacán es un estado que posee una vasta cultura gastronómica, en sus distintas regiones se elaboran platillos icónicos del estado, una gran cantidad de estos platillos incluyen alguna variedad de queso; no obstante, su importancia, no existen estudios enfocados en evaluar la calidad microbiológica y la búsqueda de microorganismos patógenos en los quesos producidos en la región.

Los quesos fresco y adobera evaluados poseen un alto porcentaje de humedad y cuentan con una gran cantidad de nutrientes como carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales, siendo con ello favorable para el desarrollo y proliferación de microorganismos, es por ello que las condiciones de producción, almacenamiento y distribución deben ser manejadas en condiciones de higiene para reducir al máximo el riesgo de contaminación del producto.

3. Hipótesis

Los procesos de elaboración de los quesos adobera y fresco en la región de tierra caliente del estado de Michoacán son un factor importante para la presencia de microorganismos patógenos humanos de alto riesgo en producto terminado.

4. Objetivo general

Identificar los microorganismos patógenos de alto riesgo y evaluar la calidad microbiológica en quesos producidos en la región ganadera de tierra caliente en Michoacán.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar puntos de contaminación microbiológica en el proceso de producción de quesos fresco y adobera en empresas michoacanas ubicadas en la región tierra caliente.
- Evaluar la calidad microbiológica de los quesos fresco y adobera como producto terminado en empresas queseras de la región de tierra caliente en Michoacán.
- Determinar la presencia de los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*, en las muestras de queso fresco y adobera.
- Determinar la presencia de *E. coli* en las muestras de queso fresco y adobera e identificar molecularmente la presencia de genes de patogenicidad de los patotipos de *E. coli* diarreogénicos.
- Efectuar el aislamiento e identificación molecular de micobacterias en las muestras de queso fresco y adobera.
- Comparar la calidad microbiológica de los quesos fresco y adobera en función del proceso de producción y de la empresa productora.

5. Capítulo 1. Calidad microbiológica y puntos de contaminación microbiana en el proceso de producción de quesos fresco y adobera en empresas michoacanas ubicadas en la región tierra caliente.

En el capítulo se abordó el proceso para determinar la calidad microbiológica de los quesos fresco y adobera utilizando los parámetros Bacterias Mesófilos Aerobios (BMA), Mohos y Levaduras (MyL), Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF), para determinar cada parámetro se aplicaron los criterios establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-092-SSA1-1994, NOM-110-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994 y NOM-210-SSA1-2014); así mismo se abordó la aplicación de la Guía de Buenas Prácticas de Higiene (GBPH) de la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, aplicada en 4 de las empresas muestreadas y obteniendo el resultado en porcentajes de cumplimiento.

5.1 Estado del arte

La Organización Mundial de la Salud (OMS), a través del *Codex Alimentarius* establece que la higiene de los alimentos está dada por todas aquellas condiciones y medidas necesarias para asegurar la inocuidad y la aptitud de los alimentos en todas las fases de la cadena alimentaria (FAO, 2003).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define a un manipulador de alimentos como aquella persona que manipula, procesa o maneja alimentos envasados o no envasados, así como su equipo e implementos utilizados para la elaboración de alimentos o superficies que entren en contacto con el alimento y que por tanto se espera que cumplan con los requerimientos de higiene que garantice la inocuidad del alimento (FAO, 2011).

El *Codex Alimentarius* establece una serie de lineamientos a fin de garantizar la higiene de los alimentos a lo largo de la cadena de producción alimentaria, para ello utiliza los Principios Generales de Higiene de los Alimentos, ayudando a las industrias a implementar controles durante la producción de alimentos a través de las Buenas Prácticas de Manejo (BPM) o del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) (OIRSA, 2016).

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, establece los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que las empresas deben observar durante el proceso de

producción de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, así como de las materias primas a fin de evitar contaminación a lo largo del proceso. Cabe mencionar que como todas las normas oficiales es de observancia obligatoria.

La leche y los productos lácteos gozan de una alta aceptación entre la población mexicana debido a que proporcionan nutrientes esenciales en la dieta como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y ácido pantoténico; además, pueden contribuir considerablemente al aporte de proteínas, carbohidratos y grasas (Maza Pastrana, 2011).

Actualmente la globalización alimentaria permite la exportación e importación de productos alimentarios de cualquier parte del mundo; la industria de productos lácteos es una de las más grandes a nivel mundial ya que de acuerdo con la FAO, más de 6 mil millones de personas consumen leche y productos lácteos (FAO 2019).

Al interior de las glándulas mamarias del ganado bovino, la leche está en condiciones estériles, lo que implica que uno de los principales riesgos de contaminación de la leche es durante el proceso de ordeño, ya que la materia fecal, la tierra y las deficiencias en las condiciones de la ordeña, así como la presencia de infecciones como mastitis o tuberculosis bovina, son factores que favorecen la presencia de microorganismo patógenos; sin embargo, la aplicación de las buenas prácticas de ordeña, y el proceso de pasteurización estándar a 72 °C durante 15 segundos y la posterior refrigeración, son la estrategia adecuada para la obtención de una materia prima segura para la elaboración de los productos lácteos en condiciones inocuas (Galván Díaz, 2005).

La producción inocua de alimentos es un punto crítico en la salud pública, por lo que la falta de medidas higiénico-sanitarias durante la producción, elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos constituye un riesgo para la población. Según datos de La Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos de Norteamérica, México cuenta con 69 rechazos de importación de quesos, debido a contaminación microbiológica principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, y *Listeria monocytogenes* en quesos, como el Asadero, Panela, Cotija y Oaxaca (FDA, 2019).

5.2 Microorganismos indicadores de calidad

En México la determinación de la calidad microbiológica de cualquier alimento se encuentra regulada por las siguientes Normas Oficiales Mexicanas:

- Norma oficial mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma oficial mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma oficial mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- Norma oficial mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Estas normas establecen los procedimientos y las metodologías a seguir para cada una de las determinaciones, así como los parámetros de referencia para cada uno de los alimentos comercializados en México.

La calidad microbiológica de los alimentos es uno de los parámetros más importantes durante la producción y distribución de alimentos, estos indicadores son fundamentales para predecir la vida de anaquel de un alimento y el grado de contaminación al que se encuentra expuesto a lo largo de la cadena de producción, por lo cual se establecen límites y medidas que permitan asegurar que dicho alimento no causará daño a la población que lo consume.

Las **bacterias mesófilas aerobias (BMA)** son microorganismos que crecen a una temperatura de entre 30 a 37 °C, son aerobias en su metabolismo. El recuento de estos microorganismos no especifica género ni especie sino un conteo de la concentración bacteriana presente en el alimento y, dependiendo del tipo de alimento y sus características fisicoquímicas, son un reflejo de la calidad sanitaria, las condiciones del proceso y la inocuidad de las materias primas; el recuento de BMA es utilizado principalmente en productos frescos, refrigerados o congelados (Guidi Figueroa *et al.*, 2016).

Los **Mohos y Levaduras (MyL)** son organismos eucarióticos y heterótrofos, abundantes en la naturaleza, distribuidos a través del polvo y el aire. En la producción alimentaria estos

microorganismos pueden estar presentes desde la materia prima y permanecer a lo largo de toda la cadena de producción. Debido a su lento crecimiento los hongos se ven favorecidos en alimentos con bajo pH, altas concentraciones de sales o carbohidratos y porcentajes bajos de actividad de agua. Los hongos y levaduras poseen estructuras capaces de degradar moléculas complejas como lípidos, proteínas, pectina, lignina, polisacáridos, ácidos grasos, entre otros. La contaminación por estos microorganismos en los alimentos es comprometida ya que pueden producir micotoxinas, malos olores, cambio de color y degradación de estos (Camacho *et al.*, 2009).

Los microorganismos **Coliformes Totales (CT)** son bacilos Gram negativos, los cuales no son esporulados, crecen a una temperatura óptima de 35 ± 2 °C, producen ácido a partir de la fermentación de carbohidratos. Estos microorganismos son un indicador importante de contaminación microbiológica en agua y alimentos, ya que las bacterias de este grupo se encuentran normalmente en el intestino de humanos y animales de sangre caliente.

Por su parte, los **Coliformes Fecales (CF)** son microorganismos que fermentan la lactosa a temperaturas de 44.5 ± 0.2 °C; en este grupo abunda particularmente *Escherichia coli*, de tal forma que una prueba positiva que determina la presencia de coliformes fecales cuenta con hasta un 90 % de probabilidades de ser *E. coli* y es por tanto, un microorganismo que al estar presente en el intestino de los humanos, indica las condiciones de higiene durante la manipulación de los alimentos (Campuzano *et al.*, 2015).

5.3 Objetivo

Determinar la calidad microbiológica del queso fresco y adobera, elaborados en la región de tierra caliente del estado de Michoacán.

5.4 Materiales y métodos

Material de estudio. En el Estado de Michoacán, se seleccionaron 6 empresas productoras de queso fresco y queso adobera, las cuales fueron identificadas con las claves: E1, E2, E3, E4, E5 y E6. Las empresas E1, E2 y E3 se localizan en el municipio de Buenavista; E4 y E5 en Tepalcatepec y E6 en Apatzingán. Para identificar los tipos de queso se les asignó la clave AD al queso adobera y FR al queso fresco. En las seis empresas se llevó a cabo un muestreo aleatorio para la toma de los distintos quesos, para obtener las muestras en a las que se les realizaron los análisis descritos en la Figura 4.

5.4.1 Diseño y análisis estadístico

De cada una de las 6 empresas se tomaron 5 quesos de cada tipo, dando un total de 30 muestras de queso adobera y 30 de queso fresco. A los quesos muestreados se les determinó la calidad microbiológica y se realizó una comparación de medias utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y variación explicada (r^2), utilizando para ello el paquete estadístico JMP 6.0 de SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019.

5.4.2 Implementación de la guía de la norma NOM-251-SSA1-2009.

El objetivo y campo de aplicación de esta norma es establecer los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que deben observarse en cualquier empresa que realice procesos de elaboración de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios y sus materias primas a fin de evitar su contaminación a lo largo de su proceso. Es importante considerar que cualquier norma oficial mexicana es de observancia obligatoria para las personas físicas o morales.

La norma oficial mexicana NOM-251-SSA1-2009 cuenta con una guía de buenas prácticas de higiene (GBPH) para establecimientos de servicio de alimentos y bebidas que consta de 163 parámetros que aplican para todas las industrias y procesos productivos del área alimentaria; para el caso de las empresas que se dedican a la elaboración de queso aplican 122 parámetros (Secretaría de Salud, 2010).

En este cuestionario se evaluaron los 11 módulos de la norma, los cuales incluyen la infraestructura, equipos y utensilios, almacenamiento, envasado, servicios, controles, mantenimiento y limpieza, el control de plagas, salud e higiene del personal, transporte, documentaciones y registros.

Se aplicó el cuestionario a cuatro empresas dos ubicadas de la siguiente manera: dos en el municipio de Tepalcatepec y dos en el municipio de Buenavista. Utilizando la GBPH, los resultados obtenidos se muestran en el numeral 5.7 de este capítulo, mientras que los resultados obtenidos de las muestras de las distintas superficies que tienen contacto con el producto se presentan en el capítulo 4.

Diagrama metodológico

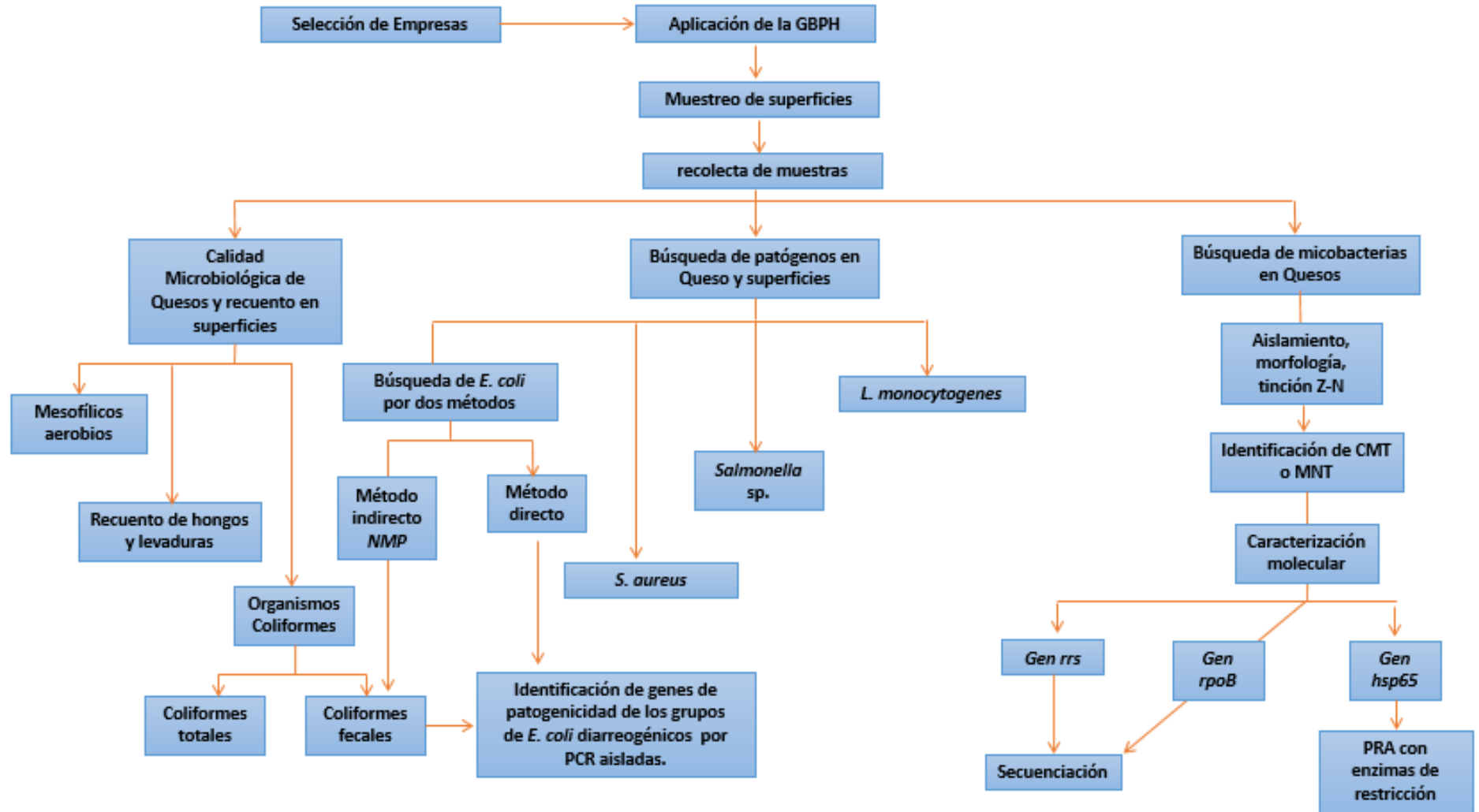


Figura 4. Diagrama metodológico aplicado para cada una de las empresas productoras de queso fresco y adobera así como a las superficies de contacto.

5.5 Métodos de análisis para la determinación de la calidad microbiológica de los quesos fresco y adobera.

5.5.1 preparación de las diluciones

Para el procesamiento de las muestras de queso, de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994, a cada muestra se le realizó una dilución primaria colocando 10 g de muestra o 10 mL del medio de transporte líquido Stuart en 90 mL de Caldo Lauril Triptosa (CLT) y licuando hasta homogenizar, se transfirió a un frasco dilutor estéril para obtener la dilución de 10^{-1} ; de esta dilución se tomaron 10 mL con pipeta estéril y se transfirieron a otro frasco dilutor con 90 mL de CLT, siguiendo esta secuencia hasta la dilución 10^{-4} .

5.5.2 Recuento de mesófilos aerobios (BMA)

Con base en la NOM-092-SSA1-1994 que establece el método para la cuenta de bacterias aeróbicas en placa, se tomó 1 mL de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} con una pipeta estéril y se transfirió a una placa de Petri estéril, a la cual se adicionaron 25 mL de agar cuenta estándar líquido a una temperatura de 45 ± 2 °C homogenizando el medio y la muestra, una vez solidificado se incubó a 37 ± 2 °C por 24 h. Se realizó el recuento de las placas y se reportó el número de colonias en UFC/g.

5.5.3 Recuento de mohos y levaduras (MyL)

Considerando el método para la cuenta de mohos y levaduras en placa publicado en la NOM-111-SSA1-1994, con una pipeta estéril se tomó 1 mL de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} y se colocaron en una placa de Petri estéril, a la cual se adicionaron 25 mL de Agar Papa Dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10 % líquido a una temperatura de 45 ± 2 °C, homogenizando el medio y la muestra se dejó solidificar para posteriormente incubar a 25 ± 2 °C durante 5 días; se procedió a contar a partir del 3er y hasta el 5to día las colonias presentes en la mayor dilución. Se reportó el número contado en UFC de mohos o levaduras/g de muestra.

5.5.4 Recuento de bacterias coliformes totales y fecales por número más probable (NMP).

Con base en la NOM-210-SSA1-2014 en la cual se establece el método para la cuenta de bacterias coliformes por el método de Número más Probable (NMP), primero se realizó la

prueba presuntiva utilizando las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} inoculando en una serie de tres tubos de 16x100 mm con campana de Durham por triplicado con 10 mL de caldo lactosado, incubados a 35 ± 2 °C y verificados a las 24 h para observar si hay producción de gas retenido en la campana de Durham como indicativo de fermentación, lo cual indica una prueba positiva; en caso de no observarse producción de gas se incubaron hasta las 48 h para descartar. Para confirmar la presencia de CT, 100µL de cada uno de los tubos positivos en la prueba presuntiva se transfirieron a los tubos de 16x100 mm con campana de Durham que contenían 10 mL de Caldo Bilis Verde Brillante al 2 % incubando los tubos a 35 ± 2 °C, verificando la formación de gas a las 24 y 48 h como indicativo de una prueba positiva y el resultado se comparó con la tabla de la NOM-210-SSA1-2014, reportando el resultado como el NMP/g de CT.

Para confirmar la presencia de CF, se transfirieron 100µL a los tubos de 16x10 mm con campana de Durham que contenían 10 mL de caldo *E. coli* con 4 metilumbeliferil-B-D-glucurónido (MUG) incubados a 44.5 ± 0.5 °C, verificando la producción de gas como indicativo de prueba positiva a las 24 y 48 h y el resultado se comparó con la tabla de la NOM-210-SSA1-2014, reportando el resultado como el NMP/g de CF.

5.5.5 Recuento de bacterias coliformes fecales por cuenta en placa (CF).

Conforme a lo publicado en la NOM-113-SSA1-1994 en la que se establece el método para la cuenta de CF en placa, se tomó 1 mL de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} con una pipeta estéril y se transfirió a una placa de Petri estéril a la cual se adicionaron 25 mL de Agar Bilis Rojo Violeta líquido a una temperatura de 45 ± 2 °C, homogenizando el medio y la muestra y una vez solidificado se adicionó una segunda capa de agar a la placa para proporcionar el ambiente anaerobio propicio para la fermentación. La placa una vez solidificada, se incubó a 37 ± 2 °C por 24 h. Se realizó el recuento en las placas y se reportó el número en UFC/g.

5.6 Resultados y discusión

Considerando los resultados obtenidos de la aplicación de la GBPH, se observó que las empresas presentan un porcentaje de cumplimiento limitado con respecto a las medidas mínimas de higiene establecidas en la oficial NOM-251-SSA1-2009 (Tabla 2).

Tabla 2. Aplicación de la guía de buenas prácticas de higiene en las empresas productores de quesos.

Empresa	Ubicación	Porcentaje de cumplimiento (%)
E1	Buenvista Tomatlán, Buenvista	63.93
E2	La Ruana, Buenvista	56.55
E4	Centro, Tepalcatepec	73.77
E5	Centro, Tepalcatepec	80.32

Los resultados de la evaluación de las buenas prácticas de higiene a través de la aplicación de la guía de la norma NOM-251-SSA1-2009 por cada empresa (Tabla 2), evidencian diferencias en cuanto a la forma en que cada empresa productora de quesos aplica la guía en su proceso de producción. Se observó que las empresas que producen queso en el municipio de Tepalcatepec presentan el mayor porcentaje de cumplimiento de la norma (73.77 y 80.32 %) en sus procesos e instalaciones; sin embargo, estos resultados no reflejan el mismo comportamiento en el análisis microbiológico para determinar la calidad sanitaria de los quesos, descritos en el Capítulo IV.

5.6.1 Recuento de BMA en quesos fresco y adobera.

LA NOM-243-SSA1-2010 no establece regulaciones para la cantidad de BMA, ya que es considerado que dentro de este indicador se encuentra la presencia de bacterias ácido-lácticas, las cuales aportan texturas, olores y sabores al queso, sin embargo; los resultados obtenidos en el recuento de BMA en los quesos fresco y adobera (Tabla 3) presentan valores que van de 2,624 a 6,480,000 UFC/g que es un resultado similar a lo reportado en otros estudios en México y en otros países productores de queso (Cristóbal Delgado & Maurtua Torres, 2003).

La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) por sus siglas en inglés, establece en la 8ª edición de su compendio “Microorganismos en Alimentos”, que la leche no pasteurizada usada como materia prima para el queso, cuando es obtenida en condiciones altamente higiénicas puede contener hasta 10^4 UFC/g de BMA, sin embargo, en países en vías de desarrollo si las condiciones de higiene disminuyen, los niveles de BMA pueden aumentar significativamente (Swanson, 2011).

Tabla 3. Recuento de BMA en quesos adobera y fresco

Empresa	BMA en queso adobera UFC/g	Empresa	BMA en queso fresco UFC/g
E6	6,438,000 a	E5	4,632,000 a
E1	3,864,200 a	E3	2,404,200 a
E3	3,832,000 a	E1	3,401,280 a b
E5	2,343,200 a b	E6	2,758,400 b c
E4	864,400 b c	E2	118,240 b c
E2	612,600 c	E4	2,624 c

Valores obtenidos en la comparación queso fresco: R^2 0.75, queso adobera: R^2 0.71. BMA: Bacilos Mesófilos Aerobios; UFC: Unidades Formadoras de Colonias. a,b,c: grupos de similitud estadística de la comparación de medias por Tukey.

Los resultados del recuento de BMA para las diferentes empresas y quesos son altamente significativos ($P < 0.001$, R^2 0.75). Se presentan diferencias entre las empresas E6, E1 y E3 para el queso adobera con los valores de 3,832,000 a 6,438,000 UFC/g. La empresa E2 con los valores de 612,600. Así mismo, se pueden observar diferencias significativas (R^2 0.71, $P < 0.001$) para el queso fresco en las empresas E5, E3 con los valores mayores de 2,404,200 a 4,632,000 UFC/g con respecto a E4 con valores de 2,624 UFC/g.

Sánchez-Valdés y colaboradores en 2016 reportaron que, en queseras artesanales en el municipio de Zacazonapan, Estado de México, el queso fresco en promedio contenía hasta 1,000,000,000 UFC/g de BMA. Por su parte, Reséndiz y colaboradores en 2012 encontraron que en queso fresco artesanal en el municipio de Tuzuapan, Puebla una media de 10,000,000 UFC/g de BMA, lo que es muy similar a lo ya reportado en otros estudios; mientras que en este trabajo se obtuvieron valores menores, ya que en promedio tenemos 2,322,495 UFC/g de BMA para los quesos fresco y adobera (Sánchez-Valdés *et al.*, 2016), (Reséndiz *et al.*, 2012).

5.6.2 Recuento de mohos y levaduras (MyL) en quesos fresco y adobera.

La norma mexicana especifica que en los quesos fresco y adobera, el recuento de MyL debe ser inferior a las 500 UFC/g. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio (Tabla 4), solo una empresa cumple con lo establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010, el resto sobrepasan el límite máximo. Esta diferencia entre las empresas para MyL es significativa

($P < 0.001$, $R^2 0.77$) para el queso adobera, siendo las empresas E1 y E5 las del recuento más bajo con 366 y 760 UFC/g, incrementándose en E2, E4, y E3 con 2,160, 2,300 y 3,920 UFC/g, respectivamente. La empresa E6 tuvo el valor más alto de 80,800 UFC/g. Con respecto al queso fresco se observó una diferencia significativa ($P < 0.001$, $R^2 0.78$) en el recuento de MyL, las empresas con valores más bajos fueron E1, E2 y E6 (1,200, 8,600 y 11,200 UFC/g respectivamente). Con respecto a las empresas E3, E4 y E5 presentaron valores de 29,400, 33,000 y 96,400 UFC/g respectivamente.

Tabla 4. Recuento de MyL en quesos adobera y fresco

Empresa	MyL en queso adobera UFC/g	Empresa	MyL en queso fresco UFC/g
E6	80,800 a	E5	96,400 a
E3	3,920 b	E4	33,000 a
E4	2,300 b	E3	29,400 a
E2	2,160 b	E6	11,200 b
E5	760 c	E2	8,600 b
E1	366 c	E1	1,200 b

Valores obtenidos en la comparación queso fresco: $R^2 0.77$, queso adobera: $R^2 0.78$; BMA: Bacilos Mesófilos Aerobios; UFC: Unidad Formadora de Colonia. a, b, c: grupos de similitud estadística de la comparación de medias por Tukey.

Los MyL presentes en alimentos más allá de los límites establecidos en la normatividad (500 UFC/g) se suelen asociar con una exposición a fuentes de contaminación objetables durante el proceso de producción, así mismo las cifras elevadas de MyL son un indicativo de alimentos faltos de frescura (Fernández-Escartín, 2008).

Estudios similares realizados en quesos frescos como el de González-Montiel & Fernández Melitón en 2015, reportan un promedio de 1,000 UFC/g de MyL, por parte de Jiménez-Vera y colaboradores en el 2010 reportaron una media de 1,000,000 UFC/g de MyL en queso poro artesanal, en comparación con estos estudios el resultado obtenido en la presente investigación muestra una media de 22,162 UFC/g de MyL, siendo solo una de las empresas la que cumplió este parámetro de calidad; sin embargo, el promedio es similar con lo reportado en otros estudios.

5.6.3 Recuento de bacterias coliformes totales y fecales por número más probable (NMP) en queso fresco y adobera.

En general las muestras de queso mostraron una alta carga de coliformes tanto totales (CT) como fecales (CF) (Tabla 6). Es importante mencionar que en México la una Norma Oficial no considera a los CT, además, la sensibilidad de la técnica (NMP) utilizada para tal fin llega a un máximo de 1100 NMP/g; en este sentido, los resultados presentados solo son un parámetro semi-cuantitativo de la presencia de estos microorganismos, los cuales se correlacionan con los coliformes fecales (Camacho *et al.* 2009).

Tabla 5. Resultados obtenidos por la técnica de NMP para coliformes totales (CT) y fecales (CF) en quesos fresco y adobera.

MUESTRA	CT NMP/g	CF NMP/g	MUESTRA	CT NMP/g	CF NMP/g	MUESTRA	CT NMP/g	CF NMP/g
E1 MUESTRA AD01	>1100	>1100	E2 MUESTRA AD06	>1100	>1100	E3 MUESTRA AD11	>1100	>1100
E1 MUESTRA AD02	>1100	>1100	E2 MUESTRA AD07	>1100	>1100	E3 MUESTRA AD12	>1100	>1100
E1 MUESTRA AD03	>1100	>1100	E2 MUESTRA AD08	>1100	>1100	E3 MUESTRA AD13	>1100	>1100
E1 MUESTRA AD04	>1100	>1100	E2 MUESTRA AD09	>1100	>1100	E3 MUESTRA AD14	>1100	>1100
E1 MUESTRA AD05	>1100	>1100	E2 MUESTRA AD10	>1100	>1100	E3 MUESTRA AD15	>1100	>1100
E1 MUESTRA FR01	>1100	>1100	E2 MUESTRA FR06	460	460	E3 MUESTRA FR11	240	240
E1 MUESTRA FR02	460	460	E2 MUESTRA FR07	44	36	E3 MUESTRA FR12	460	460
E1 MUESTRA FR03	>1100	>1100	E2 MUESTRA FR08	460	460	E3 MUESTRA FR13	240	240
E1 MUESTRA FR04	>1100	>1100	E2 MUESTRA FR09	210	210	E3 MUESTRA FR14	>1100	240
E1 MUESTRA FR05	290	210	E2 MUESTRA FR10	1100	>1100	E3 MUESTRA FR15	460	460
E4 MUESTRA AD16	>1100	>1100	E5 MUESTRA AD21	>1100	>1100	E6 MUESTRA AD26	>1100	>1100
E4 MUESTRA AD17	>1100	>1100	E5 MUESTRA AD22	>1100	>1100	E6 MUESTRA AD27	>1100	>1100
E4 MUESTRA AD18	>1100	>1100	E5 MUESTRA AD23	95	39	E6 MUESTRA AD28	95	>1100
E4 MUESTRA AD19	>1100	>1100	E5 MUESTRA AD24	95	95	E6 MUESTRA AD29	95	>1100
E4 MUESTRA AD20	>1100	>1100	E5 MUESTRA AD25	>1100	>1100	E6 MUESTRA AD30	1100	>1100
E4 MUESTRA FR16	>1100	>1100	E5 MUESTRA FR21	75	75	E6 MUESTRA FR26	>1100	75
E4 MUESTRA FR17	>1100	>1100	E5 MUESTRA FR22	23	23	E6 MUESTRA FR27	93	23
E4 MUESTRA FR18	460	460	E5 MUESTRA FR23	15	15	E6 MUESTRA FR28	36	15
E4 MUESTRA FR19	240	21	E5 MUESTRA FR24	150	28	E6 MUESTRA FR29	150	16
E4 MUESTRA FR20	>1100	>1100	E5 MUESTRA FR25	43	43	E6 MUESTRA FR30	93	43

Valores obtenidos en la comparación queso fresco: R² 0.35, queso adobera: R² 0.39. NMP: Número Más Probable; AD: queso Adobera, FR: queso Fresco.

Para el caso de los CF debido a la técnica utilizada, la normatividad permite la presencia de estos microorganismos por debajo de las 100 UFC/g. Los resultados indican que para el queso adobera el 93.4 % de las muestras no cumple con lo establecido por la Norma, en tanto que

para el queso fresco un 66.7 % de las muestras se encuentra fuera de los límites permitidos (Tabla 6).

El análisis estadístico para los CF por el NMP mostró que en el queso adobera tiene diferencias significativas ($P < 0.047$, $R^2 = 0.35$); sin embargo, una vez realizada la comparación de medias por el método de Tukey se demostró que no existe tal diferencia; el mismo caso se presenta con el queso fresco donde muestran diferencias significativas estadísticamente ($P < 0.025$, $R^2 = 0.39$) descartadas por el método de Tukey.

Los microorganismos incluidos en el grupo de coliformes son residentes habituales de los intestinos de animales y humanos, cuando dichos microorganismos llegan a los alimentos suelen multiplicarse adquiriendo un significado como indicador de malas prácticas de higiene durante la cadena de producción (Maldonado & Llanca 2008).

Los resultados de los quesos aquí analizados son más bajos con respecto a los encontrados por Díaz-Rivero en 2001, quien reportó la presencia de CT y CF en muestras de queso blando utilizando la técnica de NMP con valores > 1100 NMP/g en el 97.22 % y 87.5 % de las muestras, respectivamente (Díaz-Rivero & González de García, 2001).

5.6.4 Recuento de bacterias coliformes fecales por cuenta en placa (CF) en queso fresco y adobera.

Para la cuenta de bacterias CF para los dos tipos de quesos, la norma NOM-243-SSA1-2010 indica que el recuento debe estar por debajo de las 100 UFC/g. Con base en los resultados obtenidos para el queso fresco (Tabla 5), únicamente la empresa E5 se ubica en los límites establecidos por la Norma Mexicana con una media de 80 UFC/g, el resto de las empresas para los dos tipos de queso están por encima de lo estipulado.

Tabla 6. Recuento de CF por cuenta en placa de quesos adobera y fresco.

Empresa	CF en queso adobera UFC/g	Empresa	CF en queso fresco UFC/g
E6	24,264,000 a	E4	3,664,000 a
E1	3,396,800 b	E3	303,200 a b
E3	2,004,000 b c	E1	48,940 b c
E2	761,200 c d	E6	40,114 c
E5	456,000 d	E2	1,579 c
E4	129,200 e	E5	80 d

Valores obtenidos en la comparación de medias de queso fresco: R^2 0.90 y queso adobera: R^2 0.87; BMA: Bacilos Mesófilos Aerobios; UFC: Unidades Formadoras de Colonias. a,b,c,d,e: grupos de similitud estadística de la comparación de medias por Tukey.

Con respecto a los resultados mostrados en la Tabla 5, los valores de CF para el queso adobera presentan diferencias altamente significativas ($P < 0.001$, $R^2 = 0.90$) entre las empresas E4, E5 y E2 con valores de 129,200, 456,000 y 761,200 UFC/g respectivamente, siendo los primeros dos los valores más bajos con relación a este parámetro. Para el caso del queso fresco también se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$, $R^2 = 0.87$) entre las empresas, siendo los más bajos en CF la E5 y E2 con valores de 80 y 1,579 UFC/g respectivamente, en tanto que la E4 (3,664,000 UFC/g) fue la más alta.

Estudios similares para quesos frescos como el de Sánchez-Valdez y colaboradores en 2016 reportaron valores de hasta 1,000,000,000 UFC/g de CF en quesos obtenidos de pequeñas empresas artesanales del municipio de Zacazonapan en el estado de México. Ruíz-Pérez en 2017 identificó la presencia de CF con valores por encima de 100 UFC/g y hasta 1000 UFC/g de CF en queso costeño artesanal en Córdoba, Colombia. Los resultados derivados de la presente investigación son similares a lo indicado en los estudios previamente descritos, ya que se detectó la presencia de CF con un máximo de 24,264,000 de UFC/g y una media en la totalidad de las muestras de 2,922,426 UFC/g de CF. La presencia de CF en quesos está asociada con malas prácticas de higiene y a la falta del proceso de pasteurización de la materia prima (Sánchez-Valdés *et al.*, 2016; Ruíz-Pérez *et al.*, 2015).

5.7 Conclusión

El estado de Michoacán cuenta con una industria artesanal importante en elaboración de productos lácteos y derivados, la producción de queso es una actividad económica relevante en la región de tierra caliente, sin embargo, la mayoría de estos productores no utilizan el

proceso de pasteurización de la leche, lo cual es un factor importante para eliminar la contaminación microbiológica del producto.

La falta de la implementación de las BPH durante el proceso de elaboración de los quesos, así como el uso de leche no pasteurizada, impactan directamente incrementando en los valores de los microorganismos indicadores de calidad (BMA, MyL, CT y CF), estos efectos pueden ser reducidos a niveles aceptados por la normatividad mexicana aplicando las medidas preventivas que reduzcan la carga microbiana evitando la presencia de microorganismo patógenos.

5.8 Referencias bibliográficas

- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. In UNAM (Ed.), *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos* (Vol. 2). http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf
- Campuzano, S., Mejía Flórez, D., Madero Ibarra, C., & Pabón Sánchez, P. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *NOVA*, 13(23), 81–92.
- COFEPRIS. (2009). Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. *Diario Oficial de La Federación*, 1–33. <http://www.cofepris.gob.mx/Paginas/Inicio.aspx>
- Díaz-Rivero, C., & González de García, B. (2001). *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 2(3).
- FAO. (2011). Procesos para la elaboración de productos Lácteos. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura (FAO)*, 3, 38.
- FAO. (2013). Norma de grupo para el queso no madurado, incluido el queso fresco. CODEX STAN 221-2001. *Codex Standard Enmiendas*, 1–5.
- FAO. (2019). *Portal lacteo*. <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/es/>
- FDA. (2019). *Import Alert 12-10*. https://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_9.html
- Fernandez-Escartín, E. (2008). *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. (UAQ (ed.); 2da ed.).
- Galván Díaz, M. del P. (2005). Proceso básico de la leche y el queso. *Revista Digital Universitaria*, 6(9), 2–17. <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art87/int87.htm%0A>
- González Montiel, L., & Fernández Melitón, F. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña Microbiological profile of aro cheese consumed in Oaxaca, Mexico *Autor de correspondencia | Corresponding Autores | Authors. *Revista Brazilian of Food Technology*, 18(3), 250–257. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.7514>
- Guidi Figueroa, A., León Maldonado, W., Rivera, N. F., & Muñoz, J. G. (2016). Implementación

del método alternativo Petrifilm para determinar coliformes y bacterias aerobias mesófilas en la industria de lácteos “Pairumani” y el laboratorio “Lidiveco” del SENASAG. *Boliviano de Ciencias*, 11(35), 58–65

- Jiménez-Vera, R., González-Cortés, N., Magaña-Contreras, A., Lizcano-Cruz, A., & Cabrera-Pérez, E. (2010). Aislamiento De Bacterias Lácticas Y Levaduras De Queso De Poro Artesanal. *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos - Mexico*.
- Maldonado, R., & Llanca, L. (2008). Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el Municipio Girardot, Estado Aragua, Venezuela. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 18(4), 431–436.
- Maza Pastrana, M. (2011). *El libro blanco de la leche y productos lácteos*. CANILEC.
- OIRSA. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP* (pp. 1–66). [https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf](https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/Manual%20de%20análisis%20de%20peligros%20y%20puntos%20críticos%20de%20control%20-%20HACCP.pdf)
- Reséndiz, M. R., Hernández, Z. J. S., Ramírez, H. R., & Pérez, A. R. (2012). El Queso Fresco Artesanal De La Canasta Basica Y Su Calidad Sanitaria En Tuzupán, Mexico. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 2, 253–255. <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam>
- Ruíz-Pérez, R. A., Menco-Morales, N. Y., & Chams-Chams, L. M. (2015). Valoración microbiológica de queso costeño artesanal y evaluación higiénico-locativa de expendios en Córdoba, Colombia. *Rev. Salud Pública*, 19(3), 311–317. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n3.54853>
- Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A., & Estrada-Flores, J. G. (2016). Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Pública de México*, 58(4), 461–467. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i4.8027>
- Secretaría de Salud. (1994a). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios, Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. *Diario Oficial de La Federación*, 1–5. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
- Secretaría de Salud. (1994b). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. *Diario Oficial de La Federación*, 5. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- Secretaría de Salud. (1994c). Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. *Diario Oficial de La Federación*, 1–16. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>
- Secretaría de Salud. (2015). Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. *Diario Oficial de La Federación*, 1–96. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015
- Swanson, K. M. (2011). Milk and Dairy Products. In *Microorganisms in Foods 8* (pp. 305–327). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9374-8_23

6. Capítulo II. Presencia de microorganismos patógenos *Escherichia coli*, patotipos de *E. coli* diarreogénicas, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en queso fresco y adobera.

El Capítulo II hace referencia al proceso utilizado para la determinación de patógenos presentes en los quesos fresco y adobera utilizando los apéndices A, B, C y H de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, así como los procedimientos descritos para la búsqueda de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes*. En primer lugar, se muestra el estado del arte en referencia a los microorganismos mencionados, destacando la importancia de estos como factores de transmisión de enfermedades convirtiéndose en un problema de salud pública. Posteriormente se describe la metodología utilizada y finalmente la presentación de resultados y discusión.

6.1 Estado del arte

A nivel mundial, las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son un grave problema de salud pública, se producen por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con agentes químicos o biológicos que pueden afectar la salud de los consumidores. Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETAs, la mayoría infecciones ocasionadas por agentes biológicos (bacterias, hongos, toxinas, virus, parásitos y priones); los síntomas pueden ser pasajeros o severos, dependiendo del agente presente en el alimento y del estado de salud del consumidor (Kopper *et al.*, 2009).

Históricamente la leche sin pasteurizar y los productos lácteos, han sido los principales vehículos asociados a brotes alimentarios en el mundo. Durante el período del 2007-2012 en Estados Unidos de Norteamérica se reportaron 81 brotes asociados al consumo de leche sin pasteurizar; además, de 1998 a 2011 se reportaron 90 brotes de ETAs por el consumo de quesos, 13 (14 %) se asociaron con consumo de quesos elaborados con leche sin pasteurizar provenientes de México (Mungai *et al.*, 2015).

En México, las enfermedades diarreicas ocupan los primeros lugares entre las causas de morbilidad, siendo los niños menores de 5 años la población más susceptible, esta situación genera el 20 % de la demanda en los servicios de salud y el 10 % de las hospitalizaciones pediátricas. En el año 2010, la Secretaría de Salud reportó un total de 3,165 muertes por

enfermedad diarreica aguda asociada principalmente a fiebre tifoidea, Shigelosis, Salmonelosis, generando una tasa de mortalidad de 2.9 por cada 100,000 habitantes (DGE, 2016).

Un estudio realizado en la Universidad del Sur de California describe que, tanto la leche de origen animal como sus derivados pueden contener microorganismos patógenos para los humanos como son *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* o su toxina, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* o algunas especies del género *Mycobacterium*, resaltando la importancia de los procesos de pasteurización y de las buenas prácticas de manufactura para generar alimentos seguros para el consumidor (Leendom, 2006).

En el estudio realizado por Torres-Vitela y col. (2012) sobre la incidencia de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y toxina estafilocócica en quesos panela y adobera en mercados de la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México, se demuestra que de las 200 muestras analizadas, el 46 % fueron positivas para al menos uno de los patógenos evaluados; esto se puede correlacionar con la fabricación de quesos en algunos lugares de México donde se utiliza leche sin pasteurizar, ya que los productores consideran que la biota presente en la leche cruda les confiere a los quesos aromas y texturas especiales al producto terminado. En otro estudio publicado por Guzmán-Hernández y col. (2016), se hizo la búsqueda de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos no pasteurizados de una zona tropical del Golfo de México, en dicho estudio se analizaron 52 muestras y se identificó a *B. abortus* (11 %), *L. monocytogenes* (2 %), *Salmonella* serogrupo E (4 %), *Staphylococcus aureus* (36 %) y de estas últimas, el 17 % eran cepas productoras de enterotoxinas (Torres-Vitela *et al.*, 2012).

6.1.1 *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son cepas fermentadoras de lactosa y producen indol. Colonizan el tracto gastrointestinal de animales y humanos desde su nacimiento, donde se considera parte de la biota intestinal y son en su mayoría inofensivas, sin embargo, existen cepas patógenas las cuales pueden ocasionar cuadros infecciosos siendo el más común la diarrea (Farfán-García *et al.*, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su página electrónica, el 7 de febrero de 2018 publicó un artículo con datos y cifras de *E. coli*, donde menciona que la mayoría de las cepas de este microorganismo son inofensivas, sin embargo, la presencia de patotipos diarreogénicos como la *E. coli* O157:H7 productora de toxina Shiga, puede ocasionar síntomas que van desde calambres y diarrea hasta fiebre, vómito, colitis hemorrágica y en un 10 % de los casos, Síndrome Urémico Hemolítico, que presenta una tasa de mortalidad del 3 al 5 % de los casos alrededor del mundo (OMS, 2018a).

Se conocen seis patotipos diarreogénicos de *E. coli* capaces de causar enfermedades intestinales: *E. coli* enteropatógena (EPEC); *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC); también conocida como *E. coli* productora de verocitotoxina, que incluye a los subgrupos de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteroadherente difusa (DAEC) (Vidal *et al.*, 2007).

6.1.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo que cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia, es uno de los microorganismos más frecuentes en intoxicaciones alimentarias, es ubicuo y puede estar presente en las vías aéreas, piel y mucosas de humanos y animales, por lo que si durante la elaboración de alimentos no se toman las medidas de higiene durante el proceso y la materia prima contiene dicho patógeno, el producto puede resultar contaminado (Jordá *et al.*, 2012).

La mastitis bovina es una de las infecciones más comunes en ganado lechero, con lo cual, al momento de la ordeña se pueden encontrar altos niveles de *S. aureus*, que en condiciones favorables pueden producir enterotoxinas termoestables, que al momento de ser ingeridas pueden ocasionar náuseas, vómitos y diarrea (Da Silva *et al.*, 2000).

De acuerdo con Díaz-Rivero (2001) se estima que un número importante de cepas de *S. aureus* produce alguna de las siete enterotoxinas más conocidas, siendo las más frecuentes la A y la D, y considera que un alimento es de riesgo cuando se confirma la presencia de las enterotoxinas o se tiene una carga bacteriana igual o superior a 10^5 UFC/g. Los síntomas debidos a la intoxicación por toxina estafilocócica van desde náusea, diarrea, vómito, dolor de

cabeza, disnea y pueden llegar al síndrome de shock tóxico; afecta principalmente a niños y ancianos y las muertes debidos a la toxina son raras (Díaz-Rivero & González de García, 2001).

6.1.3 *Salmonella spp.*

Salmonella son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos y fermentadores de lactosa; es uno de los microorganismos causantes de diarrea más frecuentemente encontrados en infecciones, de acuerdo con los datos publicados por la OMS, *Salmonella* es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas y su gravedad dependerá del estado inmunológico del paciente (Miranda *et al.*, 2009).

Salmonella es un microorganismo resistente a ambientes adversos, de los cuales se han descrito más de 2500 serotipos, los cuales están presentes en una gran cantidad de animales domésticos y silvestres y se han descrito brotes en todo el mundo asociados al consumo de alimentos mal preparados o con deficientes procesos de producción, siendo *Salmonella enterica* serovar typhimurium, Enteritidis y Newport, los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial (González Pedraza *et al.*, 2014).

Los alimentos insalubres producen anualmente 550 millones de casos clínicos en el mundo, 220 millones son ocasionados en niños menores de 5 años; es por ello que la OMS recomienda la vigilancia de la cadena de producción hasta su elaboración y preparación de alimentos, tanto en establecimientos como en los hogares (OMS, 2018b).

6.1.4 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es uno de los patógenos alimentarios más importantes en el mundo, es capaz de transmitirse por los alimentos gracias a su alta supervivencia en ambientes ácidos, salinos y particularmente a temperaturas de congelación. Este microorganismo ha sido implicado en brotes asociados al consumo de alimentos cárnicos, lácteos y vegetales. Los productos más susceptibles de contener *L. monocytogenes* son aquellos que se refrigeran o que se consumen en fresco (Tzoc-Ramírez & Pineda, 2010).

La listeriosis es una infección que se puede presentar en pacientes con diversas condiciones, principalmente en los inmunocomprometidos, como aquellos que padecen VIH, cáncer o enfermedades autoinmunes, también es común en los extremos de la edad, mujeres embarazadas, pacientes con enfermedades crónico-degenerativas y en adicción a drogas, teniendo una incidencia anual de 0.3 % y alcanzando en brotes hasta el 5 % por cada 100,000 habitantes. Esta infección es grave y puede provocar abortos espontáneos, muerte neonatal e infecciones a nivel de sistema nervioso central (OMS, 2019).

Países como Estados Unidos y Canadá tienen normatividades aplicadas a la “cero tolerancias” para *L. monocytogenes*. La Unión Europea, Japón y México cuentan con normatividad aplicada a productos cárnicos, lácteos y sus derivados, así como en vegetales para consumo en fresco, ya que productos como los lácteos no pasteurizados y vegetales congelados son los principales vehículos de transmisión (De Curtis *et al.*, 2002)

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Aislamiento de *E. coli* en queso

Para la selección e identificación de *E. coli* en las muestras de queso, se utilizaron tubos de la prueba confirmatoria de NMP para CF, para lo cual, de los caldos EC/MUG positivos, se tomó una asada que se inoculó en agar Mac Conkey; las placas fueron incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h; de cada placa se seleccionaron 5 colonias con morfología compatible con *E. coli*. Estas colonias se caracterizaron utilizando pruebas bioquímicas (Agar Triple azúcar Hierro, Agar Hierro Lisina, Agar Citrato, Agar Movilidad Indol Ornitina y Caldo Rojo de Metilo) para su identificación, de acuerdo con lo establecido en la NOM-210-SSA1-2014. Posteriormente, las cepas se conservaron en viales de 1.5 mL con agar Mueller-Hinton a temperatura ambiente, para la búsqueda de genes de patogenicidad de los grupos diarreogénicos de *E. coli* por métodos moleculares.

6.2.2 Búsqueda de genes de patogenicidad de los patotipos de *E. coli* diarreogénicos.

La búsqueda de 11 genes de patogenicidad para la identificación de los 6 patotipos de *E. coli* diarreogénicos (PED) se realizó con dos PCRs multiplex: La PCR multiplex I que amplifica 7

genes (*lt*, *st*, *bfpA*, *eaeA*, *ial*, *stx1* y *stx2*) pertenecientes a los PED de ETEC, EPEC, EIEC y STEC (López Saucedo *et al.*, 2003) y La PCR multiplex II que amplifica a los genes *aap*, *aggR*, *aatA* y *afaC*, que permiten la identificación de los patotipos de EAEC y DAEC (Patzí-Vargas *et al.*, 2015).

Para la mezcla de reacción de la PCR, el volumen final fue de 25 µL; incluyendo 2 µL del lisado bacteriano y 23 µL de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción consistió en: 2 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl a pH= 8.4, 50 mM de KCl, 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 0.5 U de *Taq* polimerasa (invitrogen), 13.4 µL de agua desionizada estéril, 3.5 µL de la mezcla de los iniciadores (Tabla 7). El programa para cada PCR fue de un ciclo a 50 °C/2 min, 95 °C/5 min, 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: 95 °C/45 s, T_m/45 s y 72 °C/45 s; posteriormente, se llevó a cabo un ciclo final a 72 °C durante 10 min (López-Saucedo 2003; Patzi-Vargas 2013). Los productos de reacción se observaron bajo luz UV después de un corrimiento electroforético a 80 Volts/60 min en un gel de agarosa al 2.5 %, el cual se tiñó con bromuro de etidio (0.1 µg/µL).

Tabla 7. Iniciadores utilizados para la identificación de patotipos de *E. coli* diarreogénicos.

PCR	Secuencias de los Iniciadores (5'- 3')	PDE	Gen que Amplifica	Tamaño del amplicón (pb)	Concentración en la mezcla de reacción (pMol)
Multiplex I ^a Tm 50 °C	F:GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC R:CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT	ETEC	<i>lt</i> ; toxina termolábil	450	5.0
	F: ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T R:CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT	ETEC	<i>st</i> ; toxina termoestable	190	6.47
	F:AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R:GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	EPEC	<i>bfpA</i> ; gen estructural del pili	324	2.5
	F:GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC R:CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	EPEC/ STEC	<i>eaeA</i> ; gen estructural de la intimina	384	3.88
	F:CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G R:AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	STEC	<i>stx1</i> ; toxina Shiga1	150	3.88
	F:GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC R:TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	STEC	<i>stx2</i> ; toxina Shiga 2	255	2.5
	F:GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA R:GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	EIEC	<i>ial</i> ; locus asociado al plásmido pIN	650	10.25
Multiplex II ^b Tm 55.5 °C	F: CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG R: AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC	EAEC	<i>aap</i> ; dispersina/proteína antiagregativa	310	10
	F: CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA R: AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG	EAEC	<i>aggR</i> ; activador transcripcional AggR	457	15
	F: CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT R: CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	EAEC	<i>aatA</i> ; auto transportador TolC	629	20
	F: GGCTTTTCTGCTGAACT R: CGGTCTCATAATCATGTCC	DAEC	<i>afaC</i> ; adhesina afimbrial	809	3.5

Tm: Temperatura de alineamiento.

^aLópez-Saucedo 2003. ^bPatzí-Vargas 2013.

6.2.3 Cuantificación de *S. aureus* en queso

Para la cuantificación en queso de *S. aureus* se tomó un inóculo de 0.1 mL de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} y se inoculó en agar Baird Parker; se homogenizó en el medio de cultivo con un asa de vidrio en L estéril. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C por 48 h, transcurrido el periodo se contaron las placas y se seleccionaron 5 colonias con morfología presuntiva de *S. aureus*, se les realizaron las pruebas de identificación fenotípica (catalasa, coagulasa, tinción de Gram, manitol y termonucleasa). El resultado se expresó en UFC/g de la muestra de acuerdo con lo establecido en el apéndice B de la NOM-210-SSA1-2014.

6.2.4 Determinación de *Salmonella* en queso

Para determinar la presencia de *Salmonella* en queso se realizó un pre-enriquecimiento tomando 25 g del queso homogenizado en licuadora estéril con 225 mL de agua peptonada a pH neutro y se transfirió a un matraz estéril en el cual se dejó reposar 1 h ajustando el pH a 6.8 ± 0.2 e incubando a 35 ± 2 °C por 24 h. A partir del cultivo pre-enriquecido se tomó 0.5 mL y se transfirió a un tubo de 16x100 con 10 mL de caldo Vassiliadis-Rappaport; los tubos se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 h, para posteriormente inocularlos en Agar Hektoen y Agar *Salmonella-Shigella*. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 h. Posterior a la incubación se seleccionaron colonias presuntivas de *Salmonella* spp., las cuales se inocularon en pruebas bioquímicas (Agar Triple azúcar Hierro, Agar Hierro Lisina), estableciendo un patrón bioquímico y comparando con la literatura. Los resultados se expresaron conforme al apéndice A de la NOM-210-SSA1-2014.

6.2.5 Determinación de *L. monocytogenes* en queso

Para la determinación de *L. monocytogenes* en queso, se realizaron dos pre-enriquecimientos, en el primario se colocaron 25 g de la muestra con 225 mL de Caldo Fraser a una concentración de 27.5 g/L, se licuaron y se colocaron en un matraz estéril incubándose a 30 ± 2 °C por 24 h. En la segunda fase del enriquecimiento, trascurridas las 24 h se transfirió 0.1 mL del cultivo a un tubo de 16x100 con caldo Fraser a concentración completa y se incubó a 37 ± 2 °C por 48 h. Trascorrida la incubación se inocularon en placas Petri con agar Oxford a 30 ± 2 °C por 24 y 48 h. Para la identificación de *L. monocytogenes* se seleccionaron colonias presuntivas y se

transfirieron a agar soya tripticaseina incubadas a 30 ± 2 °C por 24 h, a estas colonias se les realizó la tinción Gram, la prueba de movilidad en agar sulfuro indol movilidad (SIM), Catalasa, hemolisis en sangre de carnero al 5 % y una prueba de CAMP (*Cristie, Atkins, Munch-Petersen*). Los resultados se reportaron en ausencia o presencia de *Listeria monocytogenes* en 25 g de queso de acuerdo con lo establecido en el apéndice C de la NOM-210-SSA1-2014.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Aislamiento e identificación de *E. coli*

El resultado obtenido de acuerdo con lo estipulado en la normatividad mexicana para *E. coli* (<100 NMP/g), fueron valores fuera del rango permitido en el 27 % de muestras de queso fresco y en el 23 % de muestras en queso adobera.

De las muestras positivas en el aislamiento de *E. coli* se aisló e identificó en el 57 % para el queso fresco y en el 60 % del queso adobera (Tabla 8).

Del total de muestras de ambos quesos se obtuvieron 135 cepas de *E. coli* caracterizadas fenotípicamente y conservadas en viales para la búsqueda de genes de patogenicidad de los PED.

“Evaluación de la calidad microbiológica en queso fresco y adobera, de la región de tierra caliente del estado de Michoacán”

Tabla 8. Resultados obtenidos de *E. coli* por la técnica de NMP y aislamiento de cepas

MUESTRA	<i>E. coli</i> NMP	Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	MUESTRA	<i>E. coli</i> NMP	Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	MUESTRA	<i>E. coli</i> NMP	Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>
E1 MUESTRA AD01	150	POSITIVO	E2 MUESTRA AD06	11	NEGATIVO	E3 MUESTRA AD11	460	POSITIVO
E1 MUESTRA AD02	1100	POSITIVO	E2 MUESTRA AD07	28	POSITIVO	E3 MUESTRA AD12	20	POSITIVO
E1 MUESTRA AD03	21	POSITIVO	E2 MUESTRA AD08	120	POSITIVO	E3 MUESTRA AD13	9.4	POSITIVO
E1 MUESTRA AD04	27	POSITIVO	E2 MUESTRA AD09	3.8	NEGATIVO	E3 MUESTRA AD14	20	POSITIVO
E1 MUESTRA AD05	75	POSITIVO	E2 MUESTRA AD10	0	NEGATIVO	E3 MUESTRA AD15	20	POSITIVO
E1 MUESTRA FR01	43	POSITIVO	E2 MUESTRA FR06	150	POSITIVO	E3 MUESTRA FR11	240	POSITIVO
E1 MUESTRA FR02	75	POSITIVO	E2 MUESTRA FR07	15	POSITIVO	E3 MUESTRA FR12	460	POSITIVO
E1 MUESTRA FR03	21	POSITIVO	E2 MUESTRA FR08	23	POSITIVO	E3 MUESTRA FR13	240	POSITIVO
E1 MUESTRA FR04	93	POSITIVO	E2 MUESTRA FR09	43	POSITIVO	E3 MUESTRA FR14	240	POSITIVO
E1 MUESTRA FR05	150	POSITIVO	E2 MUESTRA FR10	0	POSITIVO	E3 MUESTRA FR15	460	POSITIVO
E4 MUESTRA AD16	0	NEGATIVO	E5 MUESTRA AD21	6	NEGATIVO	E6 MUESTRA AD26	28	POSITIVO
E4 MUESTRA AD17	39	NEGATIVO	E5 MUESTRA AD22	36	NEGATIVO	E6 MUESTRA AD27	150	POSITIVO
E4 MUESTRA AD18	43	NEGATIVO	E5 MUESTRA AD23	75	POSITIVO	E6 MUESTRA AD28	20	POSITIVO
E4 MUESTRA AD19	75	POSITIVO	E5 MUESTRA AD24	95	NEGATIVO	E6 MUESTRA AD29	29	NEGATIVO
E4 MUESTRA AD20	3	NEGATIVO	E5 MUESTRA AD25	>1100	POSITIVO	E6 MUESTRA AD30	290	NEGATIVO
E4 MUESTRA FR16	150	POSITIVO	E5 MUESTRA FR21	0	NEGATIVO	E6 MUESTRA FR26	21	POSITIVO
E4 MUESTRA FR17	15	POSITIVO	E5 MUESTRA FR22	0	NEGATIVO	E6 MUESTRA FR27	3.6	NEGATIVO
E4 MUESTRA FR18	0	NEGATIVO	E5 MUESTRA FR23	3.6	NEGATIVO	E6 MUESTRA FR28	0	NEGATIVO
E4 MUESTRA FR19	7.3	NEGATIVO	E5 MUESTRA FR24	0	NEGATIVO	E6 MUESTRA FR29	3.6	NEGATIVO
E4 MUESTRA FR20	15	POSITIVO	E5 MUESTRA FR25	3.6	NEGATIVO	E6 MUESTRA FR30	0	NEGATIVO

El análisis de los datos para la determinación de *E. coli* por la técnica de NMP del queso fresco mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.001$, $R^2 = 0.79$) entre la empresa E3 comparada con el resto de las empresas (Tabla 9). Para el queso adobera, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre las empresas ($p < 0.061$, $R^2 = 0.12$).

Tabla 9. Recuento de *E. coli* en las dos variedades de queso por empresa

Empresa	<i>E. coli</i> por NMP en queso adobera UFC/g	Empresa	<i>E. coli</i> por NMP en queso fresco UFC/g
E1	274 a	E3	328 a
E5	262 a	E1	76 b
E3	106 a	E2	46 b
E6	103 a	E4	37 b
E2	33 a	E6	6 b
E4	32 a	E5	2 b

Valores obtenidos en la comparación queso fresco: R^2 0.79, queso adobera: R^2 0.12; UFC: Unidades Formadoras de Colonias. a, b: grupos de similitud estadística de la comparación de medias por Tukey.

6.3.2 Búsqueda de patotipos de *E. coli* diarreogénicos (PED).

Las cepas de *E. coli* aisladas de quesos fueron caracterizadas por dos PCR multiplex que identifican loci característicos de los PED. La PCR multiplex I amplifica a los genes *eaeA* y *bfpA* característicos de EPEC, *st* y *lt* de ETEC, *ial* de EIEC, *stx1* y *stx2* de STEC. La PCR multiplex II que amplifica a los genes *afaC*, *aggR*, *aap* y *aatA*; estos genes permiten la identificación de los patotipos DAEC y EAEC. De las 135 muestras analizadas por los dos tipos de PCR multiplex, ninguna de las cepas de *E. coli* aisladas contenía genes de algún PED (Figuras 5 y 6).

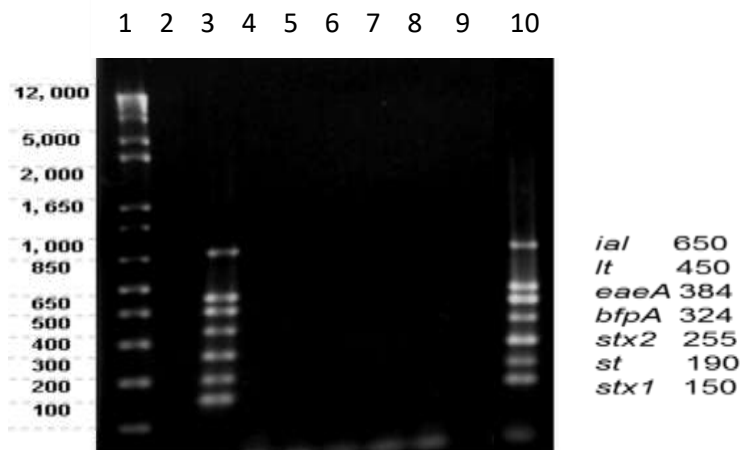


Figura 5. PCR multiplex I para la identificación de EPEC, ETEC, EIEC y STEC. Carril 1: Marcador de 1 Kb plus, carril 2: testigo negativo, Carril 3 y 10 testigo positivo donde se muestra la amplificación de los genes *ial*, *lt*, *eaeA*, *bfpA*, *stx2*, *st* y *stx1*, Carriles 4-9: muestras problemas.

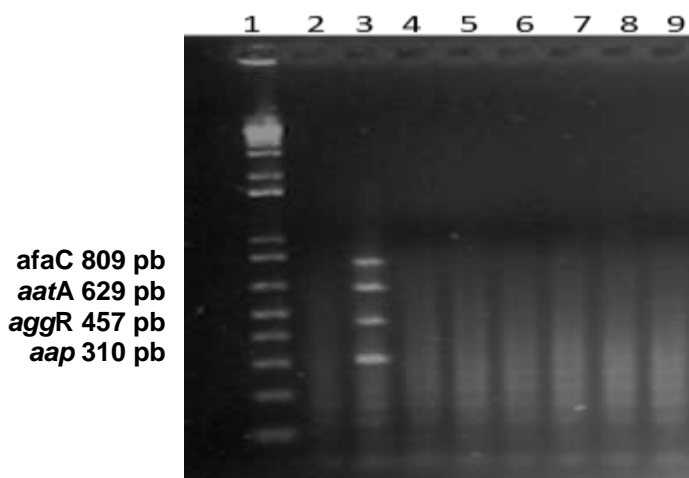


Figura 6. PCR multiplex para EAEC y DAEC. Carril 1: Marcador de 1 Kb plus, carril 2: testigo negativo, Carril 3 testigo positivo donde se muestra la amplificación de los genes característicos de EAEC y EDEC (*afaC*, *aatA*, *aggR* y *aap*). Carriles 4-9: muestras problema.

6.3.3 Cuantificación de *Staphylococcus aureus* en queso

Para la cuenta de *S. aureus* en los dos tipos de queso la normativa indica que el resultado debe estar por debajo de las 1000 UFC/g; de acuerdo con los resultados obtenidos se observa que solamente las empresas 5 y 6 en el caso del queso fresco, cuentan con valores acordes a lo indicado en la Norma mexicana (1000 UFC/g) (Tabla 10).

Tabla 10. Recuento de *S. aureus* en las dos variedades de queso por empresa

Empresa	<i>S. aureus</i> en queso adobera UFC/g	Empresa	<i>S. aureus</i> en queso fresco UFC/g
E6	400,000 a	E4	1,120,000 a
E5	392,000 a	E3	91,200 a
E4	328,000 a	E1	25,000 a
E1	74,000 b	E2	8,000 b
E2	40,000 b	E6	612 b
E3	7,200 c	E5	100 b

Valores obtenidos en la comparación queso fresco: R^2 0.90, queso adobera: R^2 0.79; UFC: Unidades Formadoras de Colonias. a, b, c: grupos de similitud estadística por comparación de medias de Tukey.

Posterior al recuento se obtuvieron 300 cepas aisladas de las placas de agar Baird Parker, las cuales se inocularon en agar sal y manitol. Las cepas que presentaron un viraje de color al amarillo indicaron la fermentación del manitol por lo que se les hizo una tinción Gram y se inocularon en el plasma para determinar la coagulasa y en agar para la determinación de la termonucleasa. De las 300 cepas obtenidas se identificaron como *Staphylococcus aureus* 167 cepas.

Los resultados de un ANOVA mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$, $R^2 = 0.90$) entre las empresas E4, E5 y E6 para el queso adobera, siendo las primeras dos las que presentan valores más altos en relación a la presencia de *S. aureus*, E1 y E2 con valores intermedios y E3 con los valores más bajos (Tabla 10). En referencia al queso fresco existen diferencias altamente significativas ($P < 0.001$, $R^2 = 0.79$) entre las empresas formando solamente dos grupos, el de los más bajos E5, E2 y E6 con respecto a los de lecturas más altas que fueron E1, E3 y E4 (Tabla 10).

Con los resultados obtenidos de *S. aureus* a partir de los quesos listos para su consumo, se puede demostrar el riesgo que existe al consumirlos ya que la presencia de este patógeno es capaz de producir una de las enterotoxinas alimentarias más potentes y que puede estar presente al momento de la ordeña en la mastitis bovina. (Díaz-Rivero & González de García, 2001).

6.3.4 Determinación de *Salmonella* en queso.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de la búsqueda intencionada de *Salmonella* spp. en queso fresco y adobera, en la cual se observa la presencia de *Salmonella* solamente en el queso adobera (empresa E2), implicando una falta al cumplimiento de la normatividad representando un riesgo sanitario para la población que consume estos productos.

Tabla 11. Búsqueda intencionada de *Salmonella* spp. en quesos adobera y fresco.

Muestra	E1	E2	E3	E4	E5	E6
<i>Salmonella</i> en queso adobera	Ausente en 25g.	Presente	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.
<i>Salmonella</i> en queso fresco	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.

En los resultados de análisis de superficies (Tabla 12) para la búsqueda intencionada de *Salmonella* spp. se obtuvo un resultado positivo para la empresa E2 en una herramienta, pala de madera utilizada para separar el cuajo durante la producción. Las herramientas de madera están restringidas en la industria alimentaria debido a que a pesar de las medidas higiénicas no se puede garantizar la inocuidad de esta. El resultado positivo de *Salmonella* en la misma empresa tanto en la herramienta como en el queso corrobora la contaminación cruzada de este instrumento generando una constante fuente de contaminación de los quesos al interior de la empresa.

Tabla 12. Búsqueda intencionada de *Salmonella* spp. en superficies por empresa

Muestra	E1	E2	E4	E5
<i>Salmonella</i> en herramienta	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella</i> en tanque	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella</i> en mesa	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella</i> en manos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella</i> en agua	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

6.3.5 Determinación de *Listeria monocytogenes* en queso

Los resultados sobre la determinación de *L. monocytogenes* se presentan en la Tabla 13, donde se observa en una muestra de queso fresco de la empresa E5, la presencia de una cepa identificada fenotípicamente que corresponde a *Listeria monocytogenes*.

La búsqueda intencionada de *L. monocytogenes* en superficies mostró la presencia de tres cepas en las muestras del tanque de leche en las empresas E1, E4 y E5 (Tabla 14), este hecho sugiere la posibilidad de formación de biopelículas en el acero inoxidable de los tanques ya que las biopelículas constan de comunidades de microorganismos viables y no viables protegidos por sustancias poliméricas extracelulares que les proporcionan una gran resistencia y con ello propagar la contaminación en el queso (Navia *et al.*, 2010).

Tabla 13. Búsqueda intencionada de *L. monocytogenes* en ambos tipos de queso

Muestra	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Listeria en queso adobera	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.
Listeria en queso fresco	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Ausente en 25g.	Presente	Ausente en 25g.

La presencia de *L. monocytogenes* en una superficie crítica como los tanques de almacenamiento de leche, indica que los procesos de limpieza y desinfección son deficientes, convirtiéndose en una fuente de contaminación constante para los productos que se elaboran en estas empresas (Schöbitz *et al.* 2009).

Tabla 14. Búsqueda intencionada de *L. monocytogenes* en superficies por empresa

Muestra	E1	E2	E4	E5
Listeria en herramienta	Ausente.	Ausente.	Ausente.	Ausente.
Listeria en tanque	Presente	Ausente.	Presente	Presente
Listeria en mesa	Ausente.	Ausente.	Ausente.	Ausente.
Listeria en manos	Ausente.	Ausente.	Ausente.	Ausente.
Listeria en agua	Ausente.	Ausente.	Ausente.	Ausente.

6.4 Conclusiones

La búsqueda intencionada de patógenos en las muestras de queso adobera y queso fresco reveló la presencia de los patógenos *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, los cuales no son tolerados por la normatividad mexicana, *S. aureus* se observó en concentraciones que supera 1000 UFC/g. lo que sugieren la presencia de enterotoxinas y en el caso de *Escherichia coli*, aun cuando no se encontraron PED, la sola presencia de este microorganismo indica contaminación fecal humana o animal en los dos tipos de quesos, lo cual representa un riesgo para la población que los consume.

Las tres cepas de *Listeria monocytogenes* obtenidas de las muestras de tanques de producción y la cepa de *Salmonella* spp. aislada de una pala de madera, indican que las superficies son fuentes de contaminación constante durante el proceso de producción ya que en estas empresas se aisló una cepa de *Listeria monocytogenes* y una cepa de *Salmonella* spp.

6.5 Referencias bibliográficas

- Castellanos Merchán, A. N., Gómez Pineda, L. M., Cárdenas Parra, A. K., González Neiza, N. C., Otálora Rodríguez, M. C., & Sánchez Neira, Y. (2018). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las américas, 2007-2016. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 56.
- Da Silva, W. P., Destro, M. T., Landgraf, M., & Franco, B. D. G. M. (2000). Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(2), 103–106.
- De Curtis, M. L., Franceschi, O., & De Castro, N. (2002). *Listeria Monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52, 182–198. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00217-0>
- DGE, Dirección General de Epidemiología (2016). Información relevante: Enfermedades diarreicas agudas. SINAVE, 1–3. http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/58092/EDA_2016_SE_05.pdf
- Díaz-Rivero, C., & González de García, B. (2001). *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 2(3).
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>
- Gonzalez Pedraza, J., Pereira Sanandres, N., Soto Varela, Z., Hernández Aguirre, E., & Villareal Camacho, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73–94. <https://doi.org/10.14482/sun.30.1.4316>

- Jordá, G. B., Marucci, R. S., Guida, A. M., Pires, P. S., & Manfredi, E. A. (2012). Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 110–104. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213024208009>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. In *Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación*. <http://www.fao.org/docrep/pdf/011/i0480s/i0480s.pdf>
- Leedom, J. M. (2006). Milk of Nonhuman Origin and Infectious Diseases in Humans. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 610–615.
- López-Saucedo, C., Cerna, J. F., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F. R., Torres, J., Tarr, P. I., & Estrada-Garcia, T. (2003). Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 127–131.
- Navia, D. P., Villada, H. S., & Mosquera, S. A. (2010). Las Biopelículas en la industria de alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(2), 118–128.
- Miranda, J. M., Mondragon, A. C., Martinez, B., Guarddon, M., & Rodriguez, J. A. (2009). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of Food Protection*, 72(5), 966–971. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.966>
- Mungai, E. A., Barton Behravesh, C. ., & Hannah Gould, L. (2015). Increased Outbreaks Associated with Nonpasteurized Milk, United States, 2007-2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), 119–121. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140447>
- OMS. (2018a). *E. coli*, Datos y cifras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- OMS. (2018b). *Salmonella (no tifoidea)* Datos y Cifras. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- OMS. (2019). *Inocuidad de los alimentos*, Datos y Cifras. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- Patzi-Vargas, S., Zaidi, M. B., Perez-Martinez, I., León-Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D., & Estrada-Garcia, T. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003510>
- Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* UN PELIGRO LATENTE PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Agro sur*, 37(1), 1-8. doi:10.4206/agrosur.2009.v37n1-01
- Torres-Vitela, M. R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C. A., Garay-Martinez, L. E., Navarro-Hidalgo, V., & Villarruel-López, A. (2012). Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* o157:h7, and staphylococcal enterotoxin in two types of mexican fresh cheeses. *Journal of Food Protection*, 75(1), 79–84.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-258>

- Tzoc Ramírez, E., & Pineda, S. (2010). Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos , artesanales Y hortalizas. *Revista Ciencia y Tecnología UNAH.*, 7, 35–46.
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Publica de Mexico*, 49(5), 376–386. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342007000500008>.

7. Capítulo III. Aislamiento e identificación molecular de micobacterias en quesos fresco y adobera.

7.1 Estado del arte

La tuberculosis es una de las infecciones más agresivas que han acompañado al ser humano a lo largo de su historia, según datos de la OMS casi un tercio de la población mundial está infectada de tuberculosis, las grandes cifras de incidencia se deben principalmente a 3 factores, las migraciones masivas, el VIH y la aparición de cepas multifarmacorresistentes (OMS, 2019).

Las micobacteriosis siguen siendo un riesgo importante para los humanos ya que el contacto con animales enfermos y el consumo de productos lácteos no pasteurizados y cárnicos mal cocinados son un foco latente de la infección (López-Valencia, 2018).

De acuerdo con datos de la Dirección de Campañas Zoonositarias de la SADER a través del SENASICA la aplicación de la Norma NOM-031-ZOO-1995 reporta al mes de abril de 2019 que en México se tiene un avance del 85.77 % del territorio en fase de erradicación de tuberculosis bovina. El estado de Michoacán cuenta con un área al norte del estado bajo control, con una incidencia del 1.98 % y la zona sur del estado se encuentra en erradicación con una incidencia menor al 0.5 %, situación que continúa en vigilancia permanente para tratar de reducir aún más la incidencia y mitigar los riesgos asociados a este tipo de microorganismo.

Por otro lado, en los últimos años se ha observado el incremento de casos de micobacteriosis causada por micobacterias no tuberculosas (MNT), de las cuales actualmente se tienen descritas aproximadamente 174 especies, algunas que son microorganismos patógenos, otras ambientales, saprofitas y oportunistas. En la actualidad este tipo de micobacterias ha cobrado gran relevancia debido a que varias especies han sido reconocidas como patógenos emergentes, generando infecciones en distintos sitios anatómicos, siendo las más importantes la enfermedad pulmonar crónica, las infecciones de huesos, articulaciones y tendones, así como la micobacteriosis intestinal asociada a alimentos (González-y-Merchand *et al.*, 2018).

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Aislamiento de micobacterias

Para realizar el aislamiento de micobacterias se tomaron 30 mL de la dilución 10^{-1} y se colocaron en 3 tubos falcón de 10 mL con tapa rosca estéril; se centrifugó a 3,000 rpm durante 20 min.; se decantó el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió con 10 mL de agua estéril y 3.5 mL de Cloruro de Cetil Piridinio (CPC) al 1 % y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente; transcurrido ese tiempo se eliminó el CPC centrifugando nuevamente durante 20 min; el precipitado se lavó con 15 mL de PBS para posteriormente centrifugar y desechar el sobrenadante.

La pastilla formada se re-suspendió con 1 mL de caldo Dubos y con un asa esterilizada se tomó un inóculo de la suspensión y se trasladó a placas de agar Middelbrok 7H10 modificado y adicionado con Polimixina B (40 U/mL), Anfotericina B (4 $\mu\text{g/mL}$), Ácido Nalidíxico (16 $\mu\text{g/mL}$), Trimetoprim (4 $\mu\text{g/mL}$), Azlociclina (4 $\mu\text{g/mL}$) (PANTA), Cicloheximida (500 $\mu\text{g/mL}$) y con y sin piruvato al 0.4 %, el inóculo se distribuyó por cuadrantes.

Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C verificando el crecimiento cada día durante la primera semana y después cada semana durante 2 meses; las colonias presuntivas de ser micobacterias se seleccionaron y se resembraron en medio Löwenstein Jensen. Una vez que el crecimiento se observó, a la colonia se le hizo la tinción de Ziehl-Neelsen para confirmar la presencia de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR).

7.2.2 Identificación de las especies de micobacterias por métodos moleculares

A partir de las cepas aisladas en medio Löwenstein Jensen se tomó una asada y se resuspendió en 100 μL de agua desionizada estéril (Milli-Q System, Millipore), la suspensión se llevó a baño maría donde se mantuvo en ebullición durante 5 min, inmediatamente se trasladó a un baño de hielo durante 10 min, se centrifugó a temperatura ambiente a 13,600 xg durante 5 min; el sobrenadante se recuperó en un microvial estéril de 1.5 mL y se utilizó como molde para realizar los ensayos de PCR.

7.2.3 Identificación de micobacterias a nivel de género por PCR

Para llevar a cabo la identificación de género por PCR, se utilizó una mezcla de reacción donde el volumen final de cada una de las reacciones fue de 25 µL, que incluyeron 3 µL del lisado bacteriano y 22 µL de la mezcla de reacción. Todas las mezclas contenían una concentración final de: 20 µM de Tris-HCl a pH= 8.4, 50 µM de KCl, 1.5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs y 0.75 U de *Taq* polimerasa. Para la determinación de género se utilizó un pool de reacción que contenía 0.4 µM de cada uno de los iniciadores RAC1 y RAC8 (Tabla 15), los cuales amplifican un fragmento que va desde los últimos 99 codones del gen *murA* a la posición 357 del gen *rrs*, cuyo tamaño puede variar de 900 a 1500 pb, dependiendo de la especie micobacteriana. (González y Merchand *et al.*, 1997). Una vez que se comprobó que el microorganismo aislado pertenecía al género *Mycobacterium*, se realizó una segunda PCR que contenía 0.4 µM de cada uno de los iniciadores MTB-F y MTB-R, que amplifican un fragmento del gen *rrs* de 488 pb, exclusivo de las especies de micobacterias del CMT (Tabla 15) (Cobos-Marin *et al.*, 2003).

Para la amplificación se utilizó un termociclador marca Eppendorf Mastercycler® con el programa de amplificación para ambas PCRs consistente en un primer ciclo a 95 °C/5 min, seguido de 36 ciclos bajo las siguientes condiciones: 95 °C/30 s, 55 °C/1 min y 72 °C/2 min, seguido por una extensión final de 1 ciclo a 72 °C/10 min. Los productos de la reacción se observaron bajo la luz ultravioleta después de haber sido sometidos a un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2.5 % y teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/µL).

Tabla 15. Iniciadores utilizados para la identificación de micobacterias

Iniciadores y secuencias (5'–3') ^a	Identifica	Región amplificada	Tamaño del amplicón (pb)
RAC1: TCGATGATCACCGAGAACGTGTTC RAC8: CACTGGTGCCTCCCGTAGG	Género <i>Mycobacterium</i>	<i>murA-rrs</i>	900-1500
MTB-F: CGGGTATGCTGTTAGGCGACG MTB-R: CCACCACAAGACATGCATG	Complejo CMT	<i>rrs</i>	488
TB11: ACCAACGATGGTGTGTCCAT TB12: CTTGTCTGAACCGCATACCCT	MNT	<i>hsp65</i>	439
MycoF: GAAGGGTGAGACCGAGCTGAC MycoR: GCTGGGTGATCATCGAGTACGG	MNT	<i>rpoB</i>	723

Cobos-Marín *et al.*, 2003. Telenti *et al.*, 1993; Adékambi *et al.*, 2003.

7.2.4 Identificación de las especies de micobacterias no tuberculosas (MNT)

La identificación de las MNT se realizó con tres marcadores moleculares: el gen *hsp65* que se analizó mediante la técnica del análisis de los patrones de restricción (PRA, del inglés “PCR-restriction enzyme pattern analysis”) (Telenti *et al.*, 1993); el gen *rpoB*, que se secuenció como describe Adékambi *et al.* (2003) y el gen *rrs* como lo describe Kischner *et al.* (1993) y del cual se utilizó la región V2 para la identificación de las MNT.

7.2.5 Técnica de PRA (PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis)

Se realizó la amplificación de un fragmento del gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico de 65 KDa, con los iniciadores Tb11 y Tb12. Las condiciones de la mezcla de reacción fueron las siguientes: 1.25 U de *Taq* polimerasa, 200 mM de Tris-HCl a pH= 8.4, 500 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 10 pM de cada uno de los iniciadores (Seraing, Belgium) y 5 μL del lisado micobacteriano, la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 μL con agua libre de nucleasas. Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador Eppendorf Mastercycler® y se sometieron al siguiente programa de amplificación: un primer ciclo de 95 °C/5 min, seguido de 45 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 94 °C/60 s, 60 °C/60 s y 72 °C/60s, un ciclo final de 72 °C/10 min, la reacción se comprobó mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2.5 %; en cada pozo se colocaron 5 μL de producto de amplificación y se corrió a 80 Volts/ 60 min. Una vez que se comprobó la amplificación del gen *hsp65*, se realizó una restricción utilizando las enzimas de *BstEII* y *HaeIII* por separado. Las condiciones para la restricción con la enzima *BstEII* fueron las siguientes: se adicionaron 17 μL del producto de la PCR del gen *hsp65* a una mezcla contenía 0.2 U de enzima, 2 μL del regulador de la enzima (10 X), la mezcla se incubó a 60 °C durante 3 h. La digestión con la enzima *HaeIII* se preparó de la siguiente forma: 17 μL del producto de la PCR del gen *hsp65*, 0.2 U de la enzima *HaeIII*, 2 μL del regulador de la enzima (10X), esta mezcla se colocó a 37 °C durante 3 h. Después de la digestión, los patrones de restricción se examinaron en un gel de agarosa al 3% corriendo a 80 Volts/60 min; en cada pozo se colocaron 10 μL del producto de amplificación, el tamaño de las bandas obtenidas fueron analizados en la base de datos disponibles en el sitio PRASITE, “Identification des mycobacteries” (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

7.2.6 Secuenciación del gen *rpoB*

Se realizó la amplificación de un fragmento de 723 pb del gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa con los iniciadores MycoF y MycoR (Tabla 15) este fragmento es específico para cada una de las especies de micobacterias. Las condiciones de la mezcla de reacción fueron las siguientes: 1U de la enzima elongasa (Invitrogen), 5 μ L regulador A, 5 μ L regulador B, 200 μ M de dNTPs, 10 mM de cada uno de los iniciadores MycoF/MycoR (Eugentec, Seraing, Belgium) y 2 μ L de DNA. La mezcla se llevó a un volumen final de 50 μ L con agua libre de nucleasas. Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador *Thermal cycler* y la amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo a 95 °C/60 s, seguido de 35 ciclos de amplificación que incluyen 94 °C/30 s, 64 °C/30 s y 68 °C/90 s y un ciclo final de 68 °C/5 min.

7.2.7 Secuenciación de la región v2 del gen *rrs*

La especie micobacteriana identificada se confirmó, secuenciando la región V2 del gen *rrs* (Kirschner *et al.*, 1993). Las condiciones de la mezcla de reacción fueron las siguientes: 5 μ L del regulador A, 5 μ L del regulador B, cada uno de los iniciadores RAC1 y RAC8 a una concentración de 20 μ M, dNTPs a 200 μ M (Invitrogen), 5 μ L de DNA bacteriano y 1U de la enzima elongasa (Invitrogen), la mezcla se llevó a un volumen final de 50 μ L con agua libre de nucleasas. El programa de amplificación se realizó de la siguiente forma: un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C/5 min, seguido de 36 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94 °C/60 s, 58 °C/60 s, 68 °C/120 s y un ciclo final a 68 °C/10 min.

Los amplicones tanto del gen *rpoB* y como del gen *rrs* se purificaron utilizando el “QIAquick PCR purification kit” (Quiagen) y los productos se secuenciaron en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES IZTACALA-UNAM. La secuenciación automática se realizó en el secuenciador “ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems” (Perkin-Elmer), con los iniciadores MycoR (para el gen *rpoB*) y RAC8 (para la región V2 del gen *rrs*). Finalmente, las secuencias obtenidas se compararon por BLAST con la base de datos disponible en el sitio del “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI).

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Identificación molecular de micobacterias

Los resultados del aislamiento de cepas de BAAR se muestran en la Tabla 16, donde se observa el queso adobera con 12 % de las muestras positivas a la tinción de Zielh-Neelsen, mientras que para el queso fresco se aislaron BAAR en el 26 % de las muestras.

Tabla 16. Muestras analizadas con resultados positivos en la tinción para BAAR

MUESTRA	Tinción Zielh-Neelsen
AD06	BAAR +
FR07	BAAR +
FR08	BAAR +
FR14	BAAR +
FR15	BAAR +
AD16	BAAR +
AD19	BAAR +
FR22	BAAR +
FR24	BAAR +
AD29	BAAR +
FR26	BAAR +
FR30	BAAR +

Las 12 cepas BAAR se llevaron a los ensayos moleculares para determinar su género y especie. El resultado evidenció la presencia de cuatro cepas de micobacterias, dos en queso adobera (AD7 y AD21) y dos en queso fresco (FR6 y FR26). Con los ensayos moleculares se determinó que las cepas positivas no pertenecen al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que se procedió a identificarlas mediante la búsqueda de los genes *hsp65*, *rpoB* y la región V2 del gen *rrs*.

7.3.2 Identificación de MNT por la técnica de PRA

Para determinar la especie de las MNT aisladas se utilizó la técnica de PRA, primero se amplificó un fragmento del gen *hsp65* que consta de 439 pb mediante PCR, el resultado obtenido muestra las bandas correspondientes al gen *hsp65* (Figuras 7A y 8A), el segundo paso de la técnica consistió en la restricción del amplicón con las enzimas BstEII y HaeIII. Después de realizar la electroforesis de la restricción (Figura 7B y 8B), el patrón de restricción

obtenido se comparó mediante la búsqueda en el sitio Web de Praside (<http://app.chuv.ch/praside/index.html>) y en el artículo de estandarización de la técnica (Chimara *et al.*, 2008). Los patrones obtenidos y las especies micobacterianas identificadas se muestran en la Tabla 17.

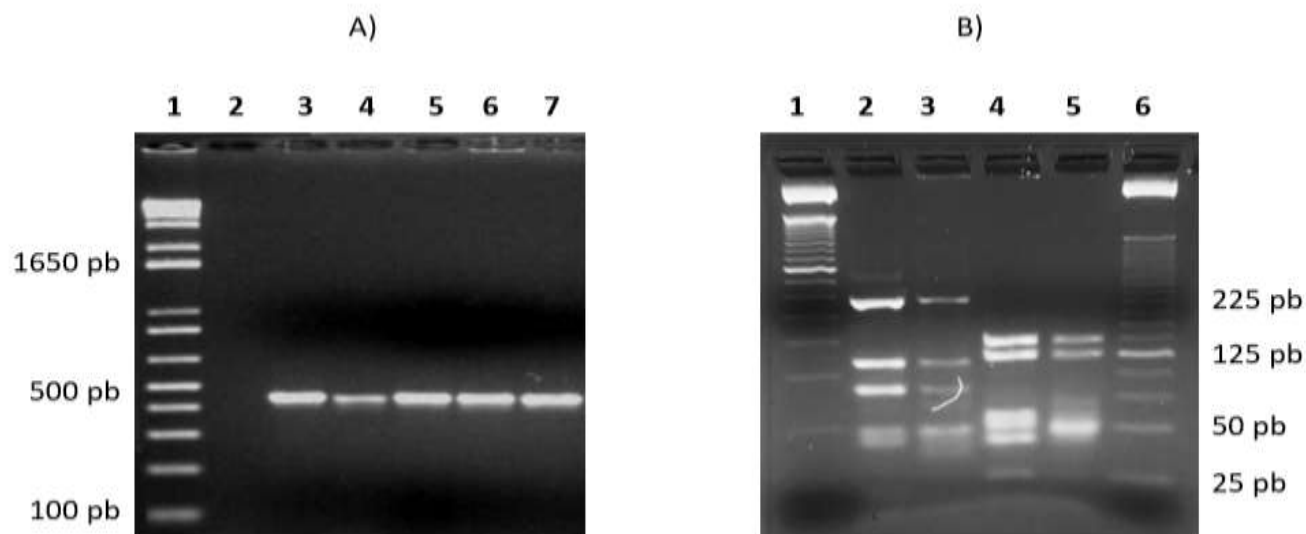


Figura 7. Técnica de PRA para las muestras de queso fresco: A) Amplificación de un fragmento del gen *hsp65*. Carril 1, marcador de tamaño de 1 Kb plus; carril 2, control negativo; carril 3, control positivo (DNA de *M. tuberculosis* CDC1551); carril 4-7 muestras de MNT. B) PCR de Restricción enzimática del gen *hsp65* con BstEII y HaeIII. Carril 1: marcador de tamaño de 1 Kp plus; Carril 6: marcador de tamaño de 25 pb. Restricción con BstEII: carril 2 muestra FR6; carril 3, muestra FR26. Restricción con HaeIII: carril 4, muestra FR6; carril 5, muestra FR26.

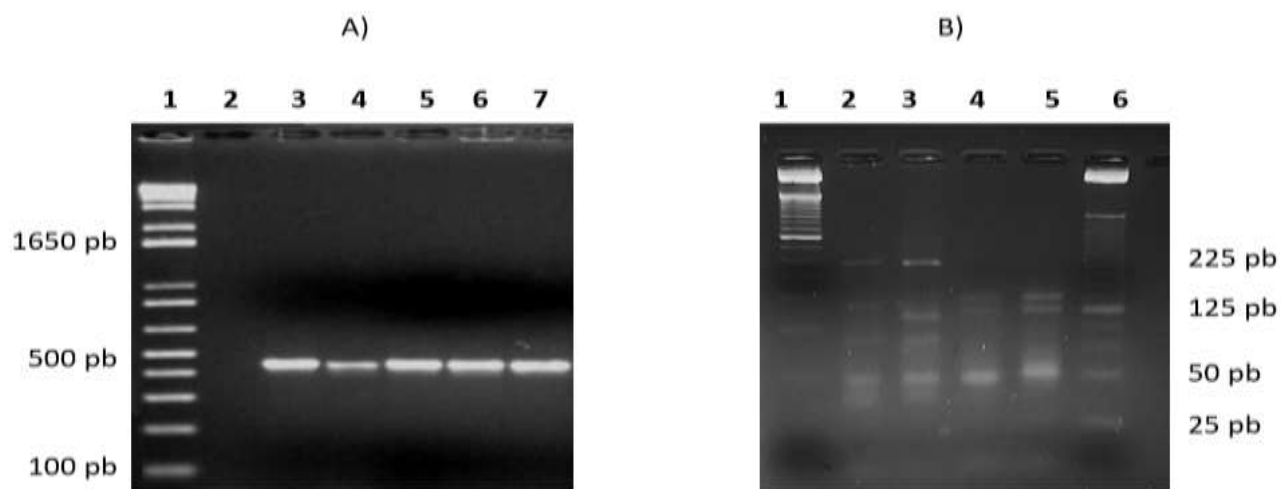


Figura 8. Técnica de PRA para las muestras de queso adobera. A) Amplificación de un fragmento del gen *hsp65*. Carril 1, marcador de tamaño de 1 Kb plus; carril 2, control negativo; carril 3, control positivo (DNA de *M. tuberculosis* CDC1551); carril 4-7 muestras de MNT. B) PCR de Restricción enzimática del gen *hsp65* con BstEII y HaeIII. Carril 1: marcador de tamaño de 1 Kp plus; Carril 6: marcador de tamaño de 25 pb. Restricción con BstEII: carril 2 muestra AD7; carril 3, muestra AD21. Restricción con HaeIII: carril 4, muestra AD7; carril 5, muestra AD21.

Tabla 17. Patrones de restricción obtenidos en la técnica de PRA.

Cepa	Patrones de Restricción		Especies de MNT identificadas
	Enzima BstEII	Enzima HaeIII	
AD7	235, 120, 85	145, 120, 60, 55	<i>M. fortuitum</i>
AD21	235, 120, 85	145, 120, 60, 55	<i>M. fortuitum</i>
FR6	235, 130, 85	145, 125, 60	<i>M. mageritense</i> / <i>M. goodii</i>
FR26	235, 120, 85	145, 120, 60, 55	<i>M. fortuitum</i>

De acuerdo con los resultados observados en la Tabla 17, obtuvimos que las cepas AD/, AD21 y FR26 corresponden a *M. fortuitum*; por otro lado la cepa FR6 no pudo ser diferencia por su patrón de bandeado utilizando esta técnica molecular; sin embargo los resultados son comparados con las otras dos técnicas en la Tabla 20 llegando a una identificación de *M. mageritense*.

7.3.3 Identificación de MNT por secuenciación del gen *rpoB*.

La segunda técnica utilizada para la identificación de las especies micobacterianas fue la secuenciación del gen *rpoB*, donde se amplificó un fragmento del gen de 723 pb, utilizando los indicadores denominados Myco R y Myco F. Los productos amplificados pueden observarse en la figura 9. Una vez amplificado se purificó el fragmento y se envió a secuenciación a la Universidad Nacional Autónoma de México.

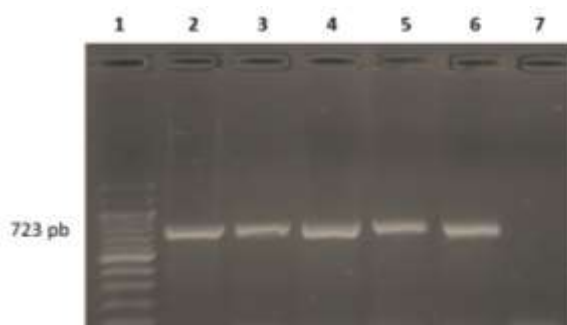


Figura 7. Amplificación del gen *rpoB*. Carril 1, marcador de tamaño de 1 Kb plus; carril 2, control positivo (DNA de *M. tuberculosis* CDC1551); carril 3, muestra AD7; carril 4, muestra AD21; carril 5, muestra FR6; carril 6, muestra FR26; carril 7, control negativo.

Las secuencias obtenidas a partir de la amplificación del gen *rpoB* se analizaron utilizando el software Chromas 2.6.6 © cómo se puede observar en la figura 10.

“Evaluación de la calidad microbiológica en queso fresco y adobera, de la región de tierra caliente del estado de Michoacán”

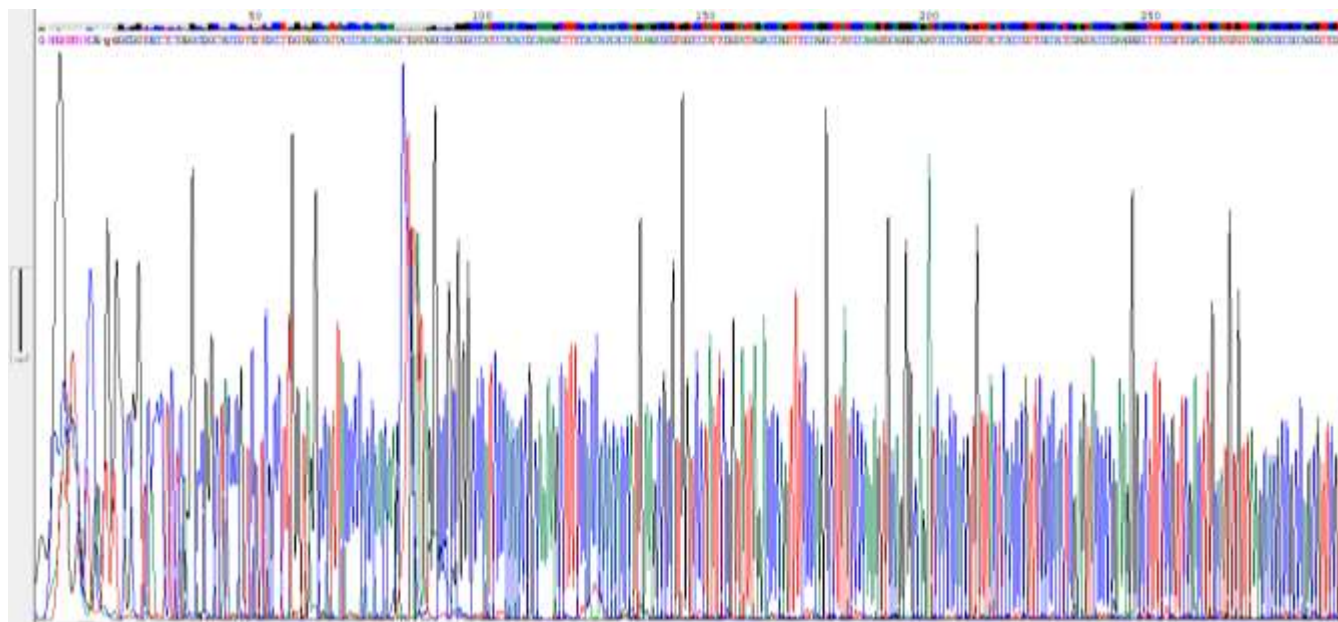


Figura 8. Ejemplo de Secuencia del gen *rpoB* analizado a través del programa Chromas 2.6.6 ©.

La secuencia obtenida se pasó al formato FASTA para analizarlo a través del sitio web de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en su sección Nucleotide BLAST; se insertó la secuencia como la observada en la Figura 11, obteniendo un resultado de similitudes significativas (Figura 12), identificando así la especie de las cepas obtenidas.

```
GCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTTCTGTGACACCTCGCTGAAGGTGCCCAcGGtGAGTCCGGGAA
GGTCATCGGCATCCGCGTGTTCCTCTCGGAGGACGACGACGAGCTGCCCGCCGGTGTCAACGAGCTGGTCCGCGTCTACGTG
GCCAGAAGCGCAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTCGCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTTCATCGGCAAGATCTCGCG
GTCGAGGACATGCCGTTCTCGCCGATGGCNCSSCGGTGACATCATCTGAACACCCACGGTGTGCCGCGTCNTATGAAGAT
```

Figura 9. Ejemplo de Secuencia del gen *rpoB* en formato FASTA

Sequences producing significant alignments

Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium fortuitum strain ATCC 49403T RpoB (rpoB) gene, complete cds	588	588	99%	6e-164	99.08%	AY147173.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium sp. MHSD11 partial rpoB gene, strain MHSD11	582	582	98%	3e-162	99.07%	AM421403.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium fortuitum strain AFP-000SM8 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	553	553	93%	2e-153	99.02%	JX294398.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium fortuitum strain garg RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	579	579	98%	3e-161	98.76%	KC242461.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium fortuitum strain NTM 316 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	573	573	97%	2e-158	98.75%	KY660565.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium fortuitum strain SD 31A beta subunit of RNA polymerase (rpoB) gene, partial cds	577	577	99%	1e-160	98.46%	KU240544.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium fortuitum strain RW 14 beta subunit of RNA polymerase (rpoB) gene, partial cds	577	577	99%	1e-160	98.46%	KU240543.1

Figura 10. Ejemplo de resultado de similitudes significativas en BLAST.

De acuerdo con los resultados obtenidos de cada cepa secuenciada de MNT, en la Tabla 18 se presentan los porcentajes más altos de identidad para cada una de las cepas, por lo que con base en estos resultados se destacan 3 cepas de *M. fortuitum* y 1 cepa de *M. mageritense*.

Los porcentajes observados en esta tabla muestran concordancia por arriba del 97 % con excepción de la cepa FR26 que fue de menos del 93 %; sin embargo, se confirma el género y la especie de las cepas encontradas al contrastar todos los resultados en la Tabla 20.

Tabla 18. Especies de MNT identificadas a través de la amplificación del gen *rpoB*.

CEPA	Cepa Identificada por amplificación del gen <i>rpoB</i>
AD7	<i>M. fortuitum</i> 99.33 % / <i>M. senegalense</i> 97.72 % / <i>M. farcinogenes</i> 97.71 %
AD21	<i>M. fortuitum</i> 99.08 % / <i>M. farcinogenes</i> 97.85 % / <i>M. senegalense</i> 97.82 %
FR6	<i>M. mageritense</i> 98.87 % / <i>M. porcinum</i> 96.33 % / <i>M. wolinskyi</i> 96.05 %
FR26	<i>M. fortuitum</i> 92.13 % / <i>M. conceptionense</i> 90.45 % / <i>M. farcinogenes</i> 90.45 %

7.3.4 Identificación de MNT por secuenciación de la región v2 del gen *rrs*

En el tercer método se amplificó la región V2 del gen *rrs* usando para ello los iniciadores RAC1 y RAC8, con lo que se obtuvieron amplificaciones de entre 900 y 1500 pb, como los observados en la Figura 13, los fragmentos amplificados se purificaron y se secuenciaron.

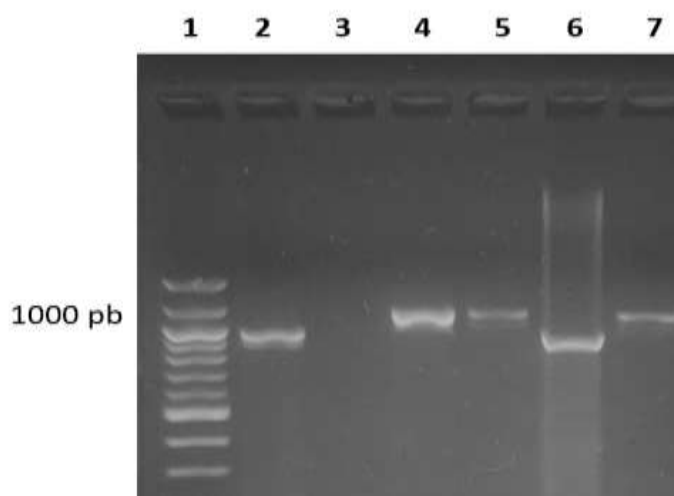


Figura 11. Amplificación de la región V2 del gen *rrs* de las cepas de micobacterias aisladas del queso fresco y adobera. Carril 1, marcador de 100 pb, carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carril 4, muestra AD7; carril 5, muestra AD21; carril 6, muestra FR6; carril 7, muestra FR26.

“Evaluación de la calidad microbiológica en queso fresco y adobera, de la región de tierra caliente del estado de Michoacán”

Una vez obtenida la secuencia se localizó la región V2 del gen *rrs* el cual consta de 139 nucleótidos y se obtuvo la secuencia complementaria como en el ejemplo de la Figura 14; la sección obtenida se comparó por BLAST Nucleotide y se obtuvieron los resultados de similitud de alineación como en el ejemplo de la Figura 15.

```

TTTTTCTGATT CGAATTC TGCCGGGTTTG TCCCGGGGTTT TTTGTTTGGAGAGTTTGATCCTGGGCTCAGGA
CGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGG TGATC TGCCCTGCACCTTGGGATAAGCTGGGAAACTGGGTCATAATC
CGAATATGACCACGGCGCTKATGGTGTGTGGTGGAAAGCTTTGCCGGTGTGGGATGGGCGCCGCCCTA
TCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGTGACCGCC
    
```

Figura 12. Ejemplo de Secuencia de la región V2 del gen *rrs* en formato FASTA

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Mycolicibacterium fortuitum subsp. fortuitum strain 1924 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	7e-65	100.00%	MN251914.1
Mycolicibacterium fortuitum strain S6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	7e-65	100.00%	MN093797.1
Mycolicibacterium fortuitum strain MD2.9F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	7e-65	100.00%	MN038323.1
Mycobacterium sp. strain ArASM169 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	7e-65	100.00%	MH378892.1
Mycolicibacterium fortuitum subsp. acetamidolyticum strain ArASM191 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	7e-65	100.00%	MH378890.1
Mycolicibacterium fortuitum strain MYC140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	257	257	100%	7e-65	100.00%	MK090483.1

Figura 13. Ejemplo de resultado de similitudes significativas en BLAST.

Los resultados de la alineación de las secuencias en la base de datos de BLAST se observan en la Tabla 19 en la que se muestran altos porcentajes de alineación para 3 cepas identificadas como *M. fortuitum* y 1 cepa de *M. mageritense*.

Tabla 19. Especies de MNT identificadas a través de la amplificación del gen *rrs*

CEPA	Cepa Identificada por amplificación de la región V2 del gen <i>rrs</i>
AD7	<i>M. fortuitum</i> 100 %
AD21	<i>M. fortuitum</i> 100 %
FR6	<i>M. mageritense</i> 98.56 % / <i>M. poriferae</i> 98.56 % / <i>Mycobacterium sp.</i> 98.56 %
FR26	<i>M. fortuitum</i> 100 % / <i>M. gilvum</i> 100 %

El resultado final de la identificación de las cepas de MNT llevadas a cabo por la amplificación y la purificación de los tres genes el *rpoB*, la fracción V2 del gen *rrs* y el gen *hsp65*, los cuales se verificaron en las bases de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y la página del Instituto Pasteur para la técnica de PRA (Prasite), con las secuencias alineadas se identificó la especie de las 4 cepas, siendo 3 cepas de *M. fortuitum* y una cepa de *M. mageritense* (tabla 20).

Tabla 20. Resultados de la identificación de MNT

Identificación de micobacterias obtenidas de queso fresco y adobera.				
CEPA	Técnica de PRA	Gen <i>rpoB</i>	Región V2 del gen <i>rrs</i>	Especie Identificada
AD7	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
AD21	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
FR6	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>
FR26	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>

Con base en los resultados obtenidos de la identificación de las cepas de MNT de crecimiento rápido presentes en los quesos, se ha reportado la presencia de *Mycobacterium fortuitum* en infecciones como abscesos, osteomielitis traumática, celulitis, mastitis, peritonitis, infecciones relacionadas con catéteres intravenosos, infecciones intestinales, de la piel y tejidos blandos, en pacientes post-traumáticos y en pacientes inmunocomprometidos (García-Martos & García-Aguado, 2012), (Rivera-Olivero *et al.*, 2006), (Alcaide & Esteban, 2010).

Así mismo, *Mycobacterium mageritense* que es una MNT de crecimiento rápido, se ha reportado en infecciones asociadas a cateterismo, sinusitis, endocarditis asociado a dispositivos, implantes mamarios, infecciones pulmonares en pacientes inmunocomprometidos y parotiditis. (Gordon Huth *et al.*, 2011), (Okabe *et al.*, 2018), (Tützer *et al.*, 2018).

Es de suma importancia considerar que en el caso del queso adobera es sometido a un proceso de cocción para su consumo, reduciendo el riesgo de adquirir un microorganismo patógeno con las micobacterias; sin embargo, el queso fresco no se somete a procesos de cocción ni de refrigeración ya que su almacenamiento es a temperatura ambiente y en estas condiciones este tipo de patógenos pueden permanecer viables hasta su consumo y afectar a personas susceptibles.

7.4 Conclusión

La presencia de MNT en los quesos de la zona de tierra caliente son un riesgo importante para la población que los consume, debido a que la mayoría de estos productos se consumen en fresco. Se ha reportado que la principal ruta de entrada de *M. avium* en pacientes con VIH/SIDA es a través del tracto gastrointestinal por medio de alimentos.

7.5 Referencias bibliográficas

- Adékambi, T., Colson, P., & Drancourt, M. (2003). rpoB-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5699–5708. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5699-5708.2003>
- Alcaide, F., & Esteban, J. (2010). Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 1), 46–50. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70008-2](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70008-2)
- Chimara, E., Ferrazoli, L., Ueky, S. Y. M., Martins, M. C., Durham, A. M., Arbeit, R. D., & Leão, S. C. (2008). Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiology*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-48>
- Cobos-Marín, L., Montes-Vargas, J., Rivera-Gutierrez, S., Licea-Navarro, A., González-Y-Merchand, J. A., & Estrada-García, I. (2003). A novel multiplex-PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* in clinical isolates of both veterinary and human origin. *Epidemiology and Infection*, 130(3), 485–490. <https://doi.org/10.1017/S095026880300829X>
- García-Martos, P., & García-Agudo, L. (2012). Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.017>
- González-Y-Merchand, J. A., Aguilar-Ayala, D. A., Cerna-Cortés, J. F., Helguera-Repetto, A. C., & Rivera-Gutierrez, S. (2018). Micobacterias no tuberculosas: Su papel en el ambiente y su relación con el ser humano. In *La Tuberculosis en México* (pp. 263–312). Universidad Autónoma de Baja California.
- Gordon Huth, R., Brown-Elliott, B. A., & Wallace, R. J. (2011). *Mycobacterium mageritense* Pulmonary Disease in Patient with Compromised Immune System. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 556–558. <https://doi.org/10.1128/AAC.00402-06>
- Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U., Meier, A., Wrede, A., Kiekenbeck, M., Bange, F. C., & Bottger, E. C. (1993). Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(11), 2882–2889. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.11.2882-2889.1993>
- López-Valencia, G. (2018). Epidemiología de la tuberculosis en México. In *La Tuberculosis en México* (pp. 219–238). Universidad Autónoma de Baja California.
- Okabe, T., Sasahara, T., Suzuki, J., Onishi, T., Komura, M., Hagiwara, S., Suzuki, H., &

- Morisawa, Y. (2018). *Mycobacterium mageritense* Parotitis in an Immunocompetent Adult. *Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 28–32. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0692-y>
- OMS. (2019). *Tuberculosis, Datos y Cifras*. 17 de Octubre de 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- Rivera-Olivero, I. A., Guevara, A., Escalona, A., Oliver, M., Pérez-Alfonzo, R., Piquero, J., Zerpa, O., & De Waard, J. H. (2006). Infecciones en tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia. ¿Cuánto vale la belleza? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(5), 302–306. <https://doi.org/10.1157/13089664>
- SAGAR. (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). *Diario Oficial de La Federación*, 38–65. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203453/NOM-031-ZOO-1995_080396_Ori.pdf
- Talenti, A., Marchesi, F., Blaz, M., Bally, F., Böttger, E. C., & Bodmer, T. (1993). Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Clinical Microbiology*, 31(2), 175–178.
- Tützer, S., Posse, T., Paul, R., Monteserin, J., Pérez, H., & Kaufman, S. (2018). Endocarditis infecciosa por *Mycobacterium mageritense* asociada a dispositivo cardíaco electrónico. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.008>

8. Capítulo IV. Calidad microbiológica de los quesos fresco y adobera en función del proceso de producción y la zona o empresa productora.

8.1 Estado del arte

Los mercados nacionales e internacionales en la actualidad están orientando la demanda hacia los productos que cumplen con normas estrictas, en cuanto a sanidad, calidad e inocuidad; las innumerables crisis alimentarias que se han generado debido al consumo de alimentos contaminados han sensibilizado a los consumidores sobre la necesidad de producir y consumir alimentos seguros para la población (Díaz & Uría, 2005).

El Codex Alimentarius establece una serie de lineamientos a fin de garantizar la higiene de los alimentos, a lo largo de toda la cadena de producción alimentaria, para ello utiliza los Principios Generales de Higiene de los Alimentos, ayudando a las industrias a implementar controles durante la producción de alimentos a través de las BPM o del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) (OIRSA, 2016).

Las distintas legislaciones sanitarias que aplican Buenas Prácticas de Manufactura concuerdan en que para su aplicación se tienen al menos ocho planes de acción:

- Agua potable
- Limpieza y desinfección
- Manejo de Plagas
- Manejo de residuos
- Mantenimiento de instalaciones y equipos
- Capacitación al personal
- Proveedores
- Trazabilidad

En estos ocho planes de acción se cubren prácticamente todos los procesos de producción alimentaria y se implementan a través de los POES (Programas Operativos de Sanitización Estándar) y se registran en las bitácoras correspondientes. La implementación de estos sistemas implica un esfuerzo adicional para que los productos se generen en condiciones

inocuas, lo cual es indispensable en las condiciones actuales de los mercados nacionales e internacionales (Roman, 2007).

La Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 (Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios), es de observancia obligatoria para las personas físicas o morales que se dedican al proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, destinados a los consumidores en territorio nacional e incluye las sanciones que se aplicarán a las empresas o personas que producen alimentos y no realicen la aplicación de las buenas prácticas de higiene.

8.2 Materiales y métodos

Cuatro de las empresas muestreadas participaron en un muestreo que consistió en la toma de muestra de superficies vivas e inertes, agua y la aplicación de la Guía de Buenas Prácticas de Higiene (GBPH).

En cada empresa se tomaron muestras en 3 superficies inertes (herramienta, mesa y tanque), 1 superficie viva (manos de trabajador) y agua de la red potable aplicando los mismos análisis microbiológicos que a los quesos descritos en la Figura 4.

8.2.1 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos fueron sometidos a un análisis de correlación múltiple y un análisis de componentes principales (ACP) complementados con pruebas post hoc de análisis de varianza. La referencia principal para comparar las superficies fueron los microorganismos obtenidos de cada queso.

8.2.2 Muestreo de superficies inertes

El muestreo de superficies inertes consideró tres superficies: una herramienta (cuchillo, pala, entre otros), la mesa utilizada en el proceso y el tanque de acero utilizado en la recepción de la leche.

Para la toma de muestras se utilizó el sistema de bolsas Whirl-Pak® con esponja estéril, a la cual, previo a la toma de muestra se le adicionaron 20 mL de medio líquido Stuart para transporte; esto con el fin de humedecer la esponja y frotarla sobre la superficie definida por una ventana de papel aluminio estéril de 10x10 cm. Al final de este proceso la esponja se

regresó a la bolsa y se cerró herméticamente, rotulando con el nombre de la empresa, la hora, la fecha y el tipo de muestra obtenida. Las muestras se mantuvieron en una hielera con geles de refrigeración para transportarlas al laboratorio, donde se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

8.2.3 Muestreo de superficies vivas

Para el muestreo de superficies vivas se solicitó a un trabajador de la empresa, el cual estuviera procesando queso, permitiera tomarle una muestra de su mano utilizando el sistema de bolsas Whirl-Pak® con esponja estéril a la cual previa a la toma de muestra se le adicionaron 20 mL de medio líquido Stuart para transporte, esto con el fin de humedecer la esponja y frotarla sobre la superficie total de la mano, entre los dedos y las uñas. Al final de este proceso la esponja se regresó a la bolsa y se cerró herméticamente rotulando con el nombre del trabajador, la hora, la fecha y la empresa donde labora. Las muestras se mantuvieron en una hielera con geles de refrigeración para transportarlas al laboratorio, donde se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

8.2.4 Muestreo de agua potable

Para el muestreo del agua potable que utilizan las empresas para diversas funciones, se tomó la muestra de la llave más próxima al área de producción; para ello se hizo un proceso de desinfección con alcohol al 70 %, frotando con un algodón y dejando secar al aire. Una vez realizado este proceso se procedió a abrir la llave y se dejó salir agua por un minuto para drenar el agua de la tubería y obtener muestra del reservorio utilizando el sistema de bolsas Whirl-Pak®, se tomaron 500 mL de muestra y la bolsa se cerró con su propio mecanismo, se rotuló con la fecha, hora y empresa muestreada y se mantuvieron en una hielera con geles de refrigeración para transportarlas al laboratorio, donde se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. Los resultados del análisis microbiológico de las superficies se describen en cada uno de los apartados descritos por cada determinación microbiológica.

8.3 Resultados y discusión

8.3.1 BMA en el proceso de producción de quesos adobera y fresco

Los resultados obtenidos en el muestreo de superficies observados en la Tabla 21, comparados con la media del BMA en queso adobera muestran resultados variados siendo la empresa E2 con valores más altos de entre 3 y 5 log₁₀ en sus parámetros; para analizarlos se llevó a efecto un análisis de correlación múltiple y sobre esta matriz un análisis de componentes principales.

Tabla 21. Recuento de BMA en queso adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.

Empresa	BMA adobera UFC/mL	BMA herramienta UFC/mL	BMA mesa UFC/mL	BMA tanque UFC/mL	BMA manos UFC/mL	agua UFC/mL
E1	3,864,200	260	1,580	6,400	360	27,600
E2	610,200	556,000	484,000	504,000	6,100	90,800
E4	864,400	165,000	4,600	26,800	146	11,500
E5	612,600	490	400	636,000	120	10,080

El análisis de correlación múltiple (Tabla 22), mostró una correlación entre el promedio de BMA del queso adobera con el resultado obtenido en el tanque (0.6475), así mismo hay una fuerte correlación (0.9572, 0.9501 y 0.9071) entre la cantidad de microorganismos de las herramientas y la mesa, las manos y el agua, y finalmente está estrechamente relacionada la contaminación de las manos con el agua (0.9849). Estas correlaciones muestran el origen de los microorganismos contaminantes en el producto terminado durante las diferentes fases de su elaboración.

Tabla 22. Matriz de correlación múltiple para BMA en queso adobera. Valores expresados con el índice de correlación de Pearson

CORRELACIÓN MÚLTIPLE QUESO ADOBERA	PROMEDIO BMA ADOBERA	BMA HERRAMIENTA	BMA MESA	BMA TANQUE	BMA MANOS	BMA EN AGUA
PROMEDIO BMA ADOBERA	1					
BMA HERRAMIENTA	-0.4722	1				
BMA MESA	-0.3688	0.9572	1			
BMA TANQUE	-0.6475	0.2875	0.4287	1		
BMA MANOS	-0.3335	0.9501	0.9993	0.4132	1	
BMA EN AGUA	-0.1653	0.9071	0.9777	0.3137	0.9849	1

El análisis de componentes principales describe el conjunto de las variables de las superficies y la media de BMA obtenida del queso, en el comportamiento linealizado de las variables que se encuentran correlacionadas; así, en la figura 16 se ilustra cómo las BMA en agua, en herramientas, manos y mesa, tienen un efecto importante de contaminación en la empresa E2, ubicándose como la empresa de mayor problema en dichas variables; por otro lado BMA del tanque presenta un comportamiento distinto, ya que su efecto es en otro sentido mayormente en la contaminación del tanque, propio de la empresa E5. El resto de las empresas no manifiestan efectos de contaminación diferentes más allá de un incremento en el gradiente en la media de BMA en el queso, siendo mayor en la empresa 1 y menor en la empresa 5. Es importante mencionar que este gradiente es dependiente del valor promedio en el queso que en general, involucra los efectos del proceso en su totalidad, por esta razón, en dicho gradiente, aun cuando hubo mayores cantidades de BMA en la empresa E2, no es la de mayor grado de contaminación por BMA, lugar que le corresponde a E5, probablemente por los contaminantes en el tanque.

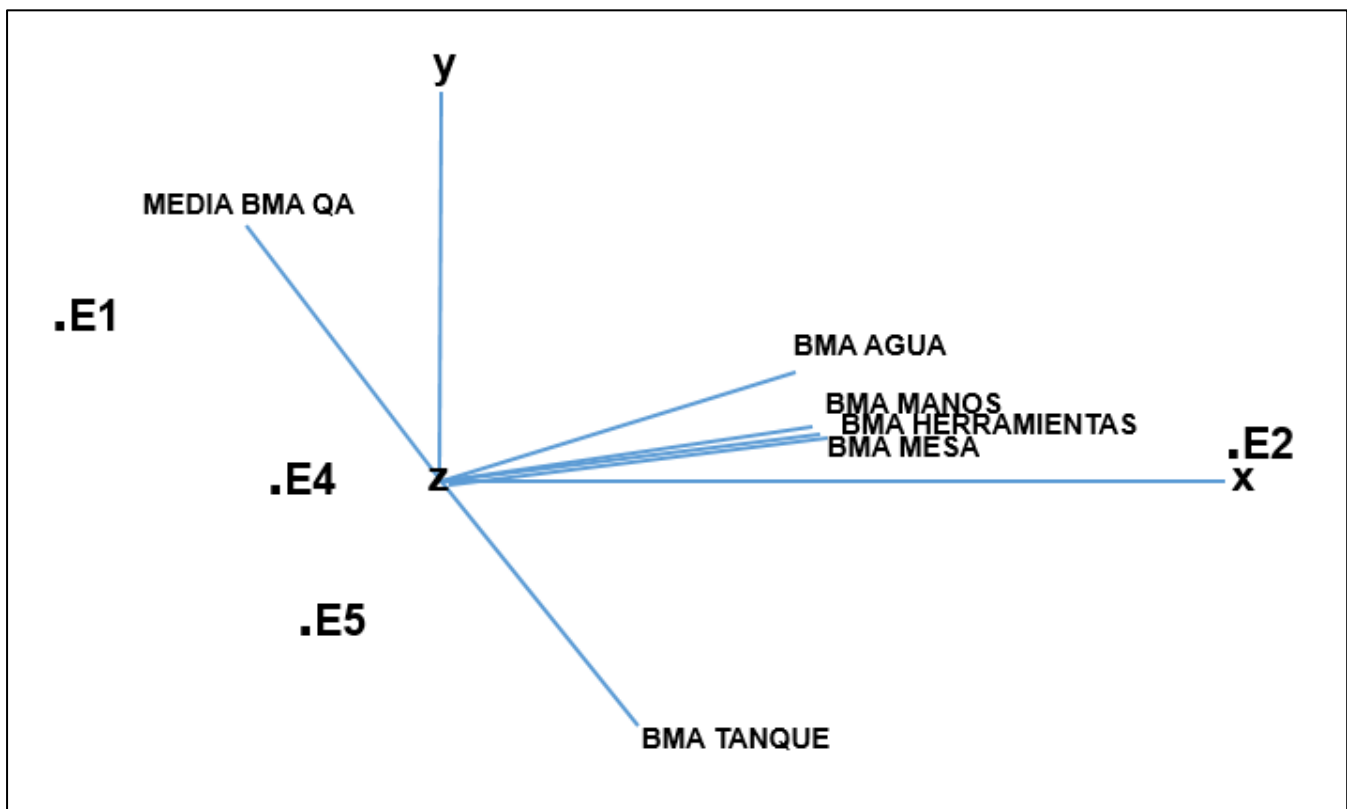


Figura 14. Análisis de componentes principales para BMA en queso adobera.

La variación explicada en el componente principal 1 (x) fue del 71 %, y de 92.66 % en el componente 2 (y), representando con ello un análisis confiable, en el que se puede observar

que los factores evaluados, no tienen un efecto directo sobre la media de BMA encontrada en el queso y que la contaminación del queso proviene de otras variables no incluidas en este análisis.

Los resultados obtenidos de la comparación del queso fresco en función de las superficies se muestran en la Tabla 23, donde se observa que las empresas E1 y E5 presentan hasta $6 \log^{10}$ como media de BMA, por el contrario, las superficies con mayor cantidad de BMA se presentan en la E2, lo que indica una mayor falta de medidas de higiene en las herramientas y superficies en las que se elabora el queso.

Tabla 23. Recuento de BMA en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa

Empresa	media BMA fresco UFC/g	BMA herramienta UFC/mL	BMA mesa UFC/mL	BMA tanque UFC/mL	BMA manos UFC/mL	BMA agua UFC/mL
E1	3,401,280	260	1,580	6,400	360	27,600
E2	118,240	556,000	484,000	504,000	6,100	90,800
E4	2,624	165,000	4,600	26,800	146	11,500
E5	4,632,000	490	400	636,000	120	10,080

Para el queso fresco las correlaciones múltiples (Tabla 24) muestran que el mayor impacto sobre el promedio de las BMA del queso fresco está asociado a las herramientas (0.7622); las BMA de manos, mesa y agua tienen una alta correlación (0.9572, 0.9501 y 0.9071), en tanto que la contaminación asociada al tanque no está relacionada con ninguna otra variable.

Tabla 24. Matriz de correlación múltiple para BMA en queso fresco

	Media de BMA queso fresco UFC/g	BMA Herramienta UFC/mL	BMA Manos UFC/mL	BMA Mesa UFC/mL	BMA Tanque UFC/mL	BMA Agua UFC/mL
promedio BMA queso fresco	1					
BMA herramienta	-0.7622	1				
BMA mesa	-0.5534	0.9572	1			
BMA tanque	0.2795	0.2875	0.4287	1		
BMA manos	-0.5419	0.9501	0.9993	0.4132	1	
BMA en agua	-0.5020	0.9071	0.9777	0.3137	0.9849	1

Lo anterior se puede apreciar en la Figura 17, donde el análisis de componentes principales muestra que el tanque efectivamente tiene una baja relación con las demás variables al ubicarse en una dirección distinta. Todo el conjunto, en resumen, presenta una variación explicada en dos componentes del 95.09 %.

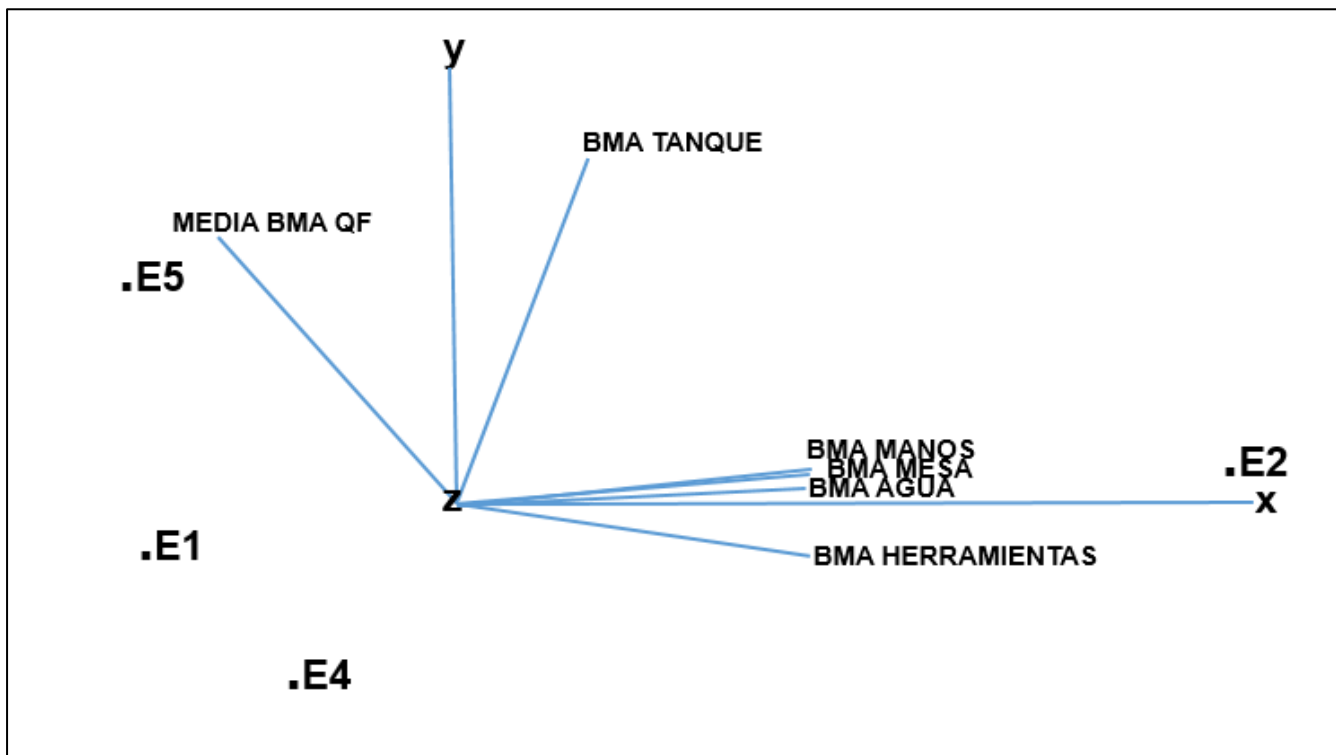


Figura 15. Análisis de componentes principales para BMA en queso fresco.

8.3.2 MyL en el proceso de producción de quesos adobera y fresco

En la Tabla 25 se presentan los resultados del muestreo de superficies y agua. Debido a que no existe una normatividad que establezca límites sobre MyL, se realizó un análisis estadístico que correlacionara MyL de las superficies con la media de dicho parámetro en el queso y con ello determinar su relación con la incidencia y por consecuencia contaminación del producto.

Tabla 25. Recuento de MyL en queso Adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa

Empresa	MyL Adobera UFC/g	MyL Herramienta UFC/mL	MyL Tanque UFC/mL	MyL Manos UFC/mL	MyL mesa UFC/mL
E1	234,600	2,600	30	80	280
E2	288,000	10,400	29,300	990	700
E4	31,820	300	620	50	720
E5	25,600	0	42,000	0	0

La correlación múltiple del queso adobera para mohos y levaduras (Tabla 26), muestra una alta correlación entre el promedio obtenido en MyL en el queso adobera con herramientas y manos (0.8504 y 0.7387); A su vez, herramientas y manos se correlacionan altamente entre sí (0.9827), siendo estas variables las de mayor responsabilidad en los valores finales del producto terminado.

Tabla 26. Matriz de correlación múltiple para MyL en queso adobera

	Promedio MyL queso adobera UFC/g	MyL Herramienta UFC/mL	MyL Tanque UFC/mL	MyL Manos UFC/mL	MyL Mesa UFC/mL
Promedio MyL queso adobera	1				
MyL Herramienta	0.8504	1			
MyL Tanque	-0.1039	0.2144	1		
MyL Manos	0.7387	0.9827	0.2969	1	
MyL Mesa	0.3071	0.5064	-0.437	0.5552	1

En la figura 18, el gráfico obtenido en el análisis de componentes principales muestra las correlaciones mencionadas anteriormente, y que las variables herramientas y manos indican un efecto pronunciado sobre la media de mohos y levaduras; por otro lado, las variables tanque y mesa muestran direcciones diferentes en la distribución indicando que las empresas E1 y E4 tienen una mayor relación con la contaminación en mesa, mientras que E5 lo tiene con el tanque. La variación explicada fue del 87 %.

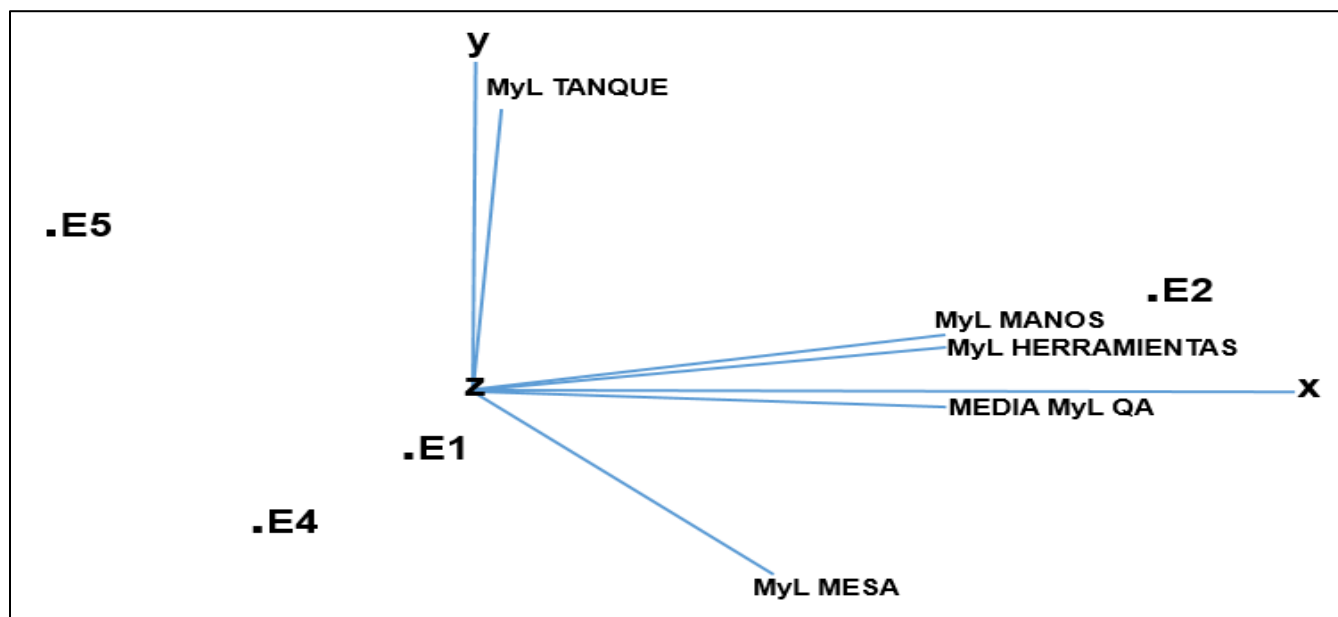


Figura 16. Análisis de componentes principales para MyL en queso adobera.

A continuación, se presentarán los resultados que indican las correlaciones encontradas en MyL para el queso fresco.

La tabla 27 presenta los resultados de la comparación de MyL en queso fresco, así como en las superficies estudiadas, observando que las empresas E4 y E5 presentan hasta 6 Log10 de MyL y en cuanto a las superficies el tanque y las herramientas de la empresa E2, así como el tanque de la empresa E5 son las que representan una mayor fuente de contaminación.

Tabla 27. Recuento de MYL en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa

Empresa	Media MyL queso fresco UFC/g	MyL Herramienta UFC/mL	MyL Tanque UFC/mL	MyL Manos UFC/mL	MyL Mesa UFC/mL
E1	51,160	2,600	30	80	280
E2	22,448	10,400	29,300	990	700
E4	1,792,000	300	620	50	720
E5	6,080,000	0	42,000	0	0

En el queso fresco hay una alta correlación de MyL entre manos y herramientas (0.9827) mostrados en la Tabla 28, mientras que el promedio obtenido del queso fresco tiene mayor relación con el tanque y la mesa (0.6343 y 0.6898) que con el resto de las variables y destacándose la E5.

Tabla 28. Matriz de correlación múltiple para MyL en queso fresco

	Promedio MyL queso fresco UFC/g	MyL Herramienta UFC/mL	MyL Tanque UFC/mL	MyL Manos UFC/mL	MyL Mesa UFC/mL
Promedio MyL queso fresco	1				
MyL Herramienta	-0.614	1			
MyL Tanque	0.6343	0.2144	1		
MyL Manos	-0.5195	0.9827	0.2969	1	
MyL Mesa	-0.6898	0.5064	-0.437	0.5552	1

El análisis de componentes principales (figura19), muestra la relación entre variables y empresas pudiendo notarse que la contaminación en mesas es mayor en las empresas E1 y E4, mientras que el tanque es el de mayor efecto para E5. La empresa E2 es la de mayor contaminación por efecto de manos y herramientas.

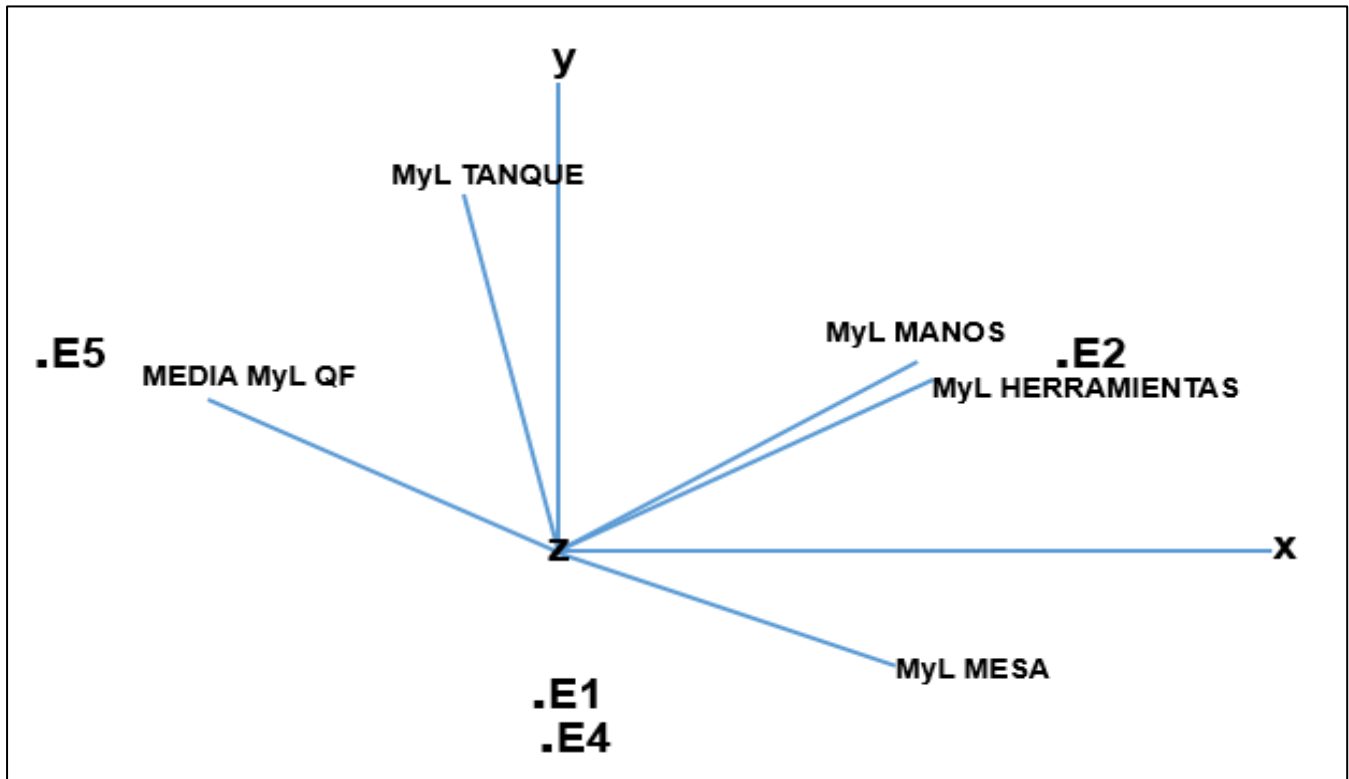


Figura 17. Análisis de componentes principales para MyL en queso fresco.

8.3.3 Coliformes fecales por NMP en quesos adobera y fresco

Queso adobera

Los resultados obtenidos del análisis de superficies para CF por la técnica de NMP comparados contra el queso adobera muestran un valor con el máximo detectable por esta técnica (1100 UFC/g) de acuerdo con la NOM-210-SSA1-2009. Las empresas mayormente comprometidas por la presencia de CF fueron E1 y E2 indicando una alta contaminación del producto. Por su parte, las empresas E4 y E5 de forma general presentan una menor incidencia de CF con respecto a las empresas anteriormente mencionadas (Tabla 29). Sin embargo, E4 en producto terminado es igual que E1 y E2, ya que la empresa E4 tiene una fuerte carga de CF en las manos de los trabajadores asociadas a la falta de medidas higiénicas.

Tabla 29. Recuento de CF por NMP en queso adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.

Empresa	CF NMP queso adobera UFC/g	CF NMP Herramienta UFC/mL	CF NMP Manos UFC/mL	CF NMP Mesa UFC/mL	CF NMP Tanque UFC/mL	CF NMP Agua UFC/mL
E1	1,100	23	1,100	43	1,100	1,100
E2	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100
E4	1,100	460	1,100	23	21	3.6
E5	686.8	3.6	460	1100	23	0

El análisis de correlación múltiple en lo referente al queso adobera (Tabla 30) muestra que las manos de los trabajadores se correlacionan altamente (1) con la calidad del queso en lo referente a CF impactando totalmente sobre la calidad sanitaria del producto terminado; también existe una correlación absoluta entre la incidencia de CF en el agua de las empresas y los CF presentes en el tanque de almacenamiento de la leche utilizada como materia prima para la producción de queso.

Tabla 30. Análisis de correlación múltiple para CF en queso adobera por NMP

	Media de CF NMP queso adobera UFC/g	CF NMP Herramienta UFC/mL	CF NMP Manos UFC/mL	CF NMP Mesa UFC/mL	CF NMP Tanque UFC/mL	CF NMP Agua UFC/mL
Media de CF NMP queso adobera	1					
CF NMP Herramienta	0.5097	1				
CF NMP Manos	1	0.5097	1			
CF NMP Mesa	-0.5773	0.3439	-0.5773	1		
CF NMP Tanque	0.5763	0.3698	0.5763	0.0103	1	
CF NMP Agua	0.5792	0.3711	0.5792	0.0077	1	1

El gráfico de componentes principales (figura 20) permite apreciar las correlaciones anteriores, es destacable que las empresas E1 y E4 se ven principalmente contaminadas por CF por las manos de los trabajadores involucrados en el proceso de producción; mientras que el agua, el tanque de almacenamiento de la leche y las herramientas representan mayor problema para la empresa E2. La empresa E5 fue la que tuvo el menor problema debido a este tipo de contaminación. La variación explicada en dos componentes fue del 85.22 %.

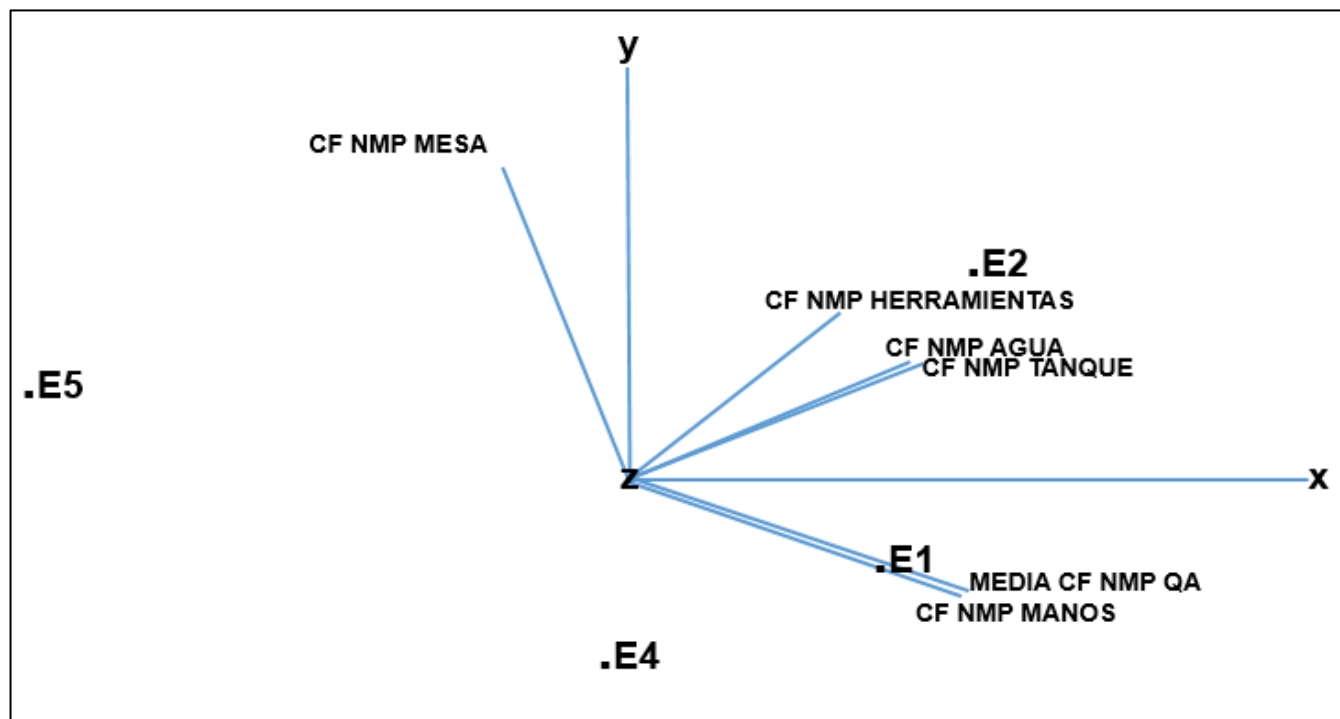


Figura 18. Análisis de componentes principales para CF por NMP en queso adobera

Queso fresco

Los resultados obtenidos de la comparación entre el queso fresco versus las superficies para los CF por NMP se muestran en la Tabla 31, donde se puede observar que las empresas E1, E2 y E4 cuentan con valores por encima de lo estipulado en la NOM-210-SSA1-2009 (100 UFC/g), por el contrario la empresa E5 para CF cumple el parámetro y cuenta con valores aceptables en las superficies excepto en la mesa de elaboración del producto, lo que es un punto crítico en la producción del queso.

Tabla 31. Recuento de CF por NMP en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.

Empresa	CF NMP UFC/g	CF NMP Herramienta UFC/mL	CF NMP Manos UFC/mL	CF NMP Mesa UFC/mL	CF NMP Tanque UFC/mL	CF NMP Agua UFC/mL
E1	794	1,100	1,100	43	1,100	1,100
E2	453	1,100	1,100	1,100	1,100	1,100
E4	756.2	460	1,100	23	21	3.6
E5	36.8	3.6	460	1,100	23	0

El análisis de correlación múltiple para coliformes fecales por NMP en queso fresco (Tabla 32), presentó una relación directa entre la contaminación presente en el tanque y la del agua (1); las herramientas también tienen alta correlación con las manos de los trabajadores, el tanque y el agua (0.8257, 0.9369 y 0.9381).

Tabla 32. Matriz de correlación múltiple para CF en queso fresco por NMP.

	Media de CF NMP queso fresco UFC/g	CF NMP Herramienta UFC/mL	CF NMP Manos UFC/mL	CF NMP Mesa UFC/mL	CF NMP Tanque UFC/mL	CF NMP Agua UFC/mL
Media de CF NMP queso fresco	1					
CF NMP Herramienta	0.6425	1				
CF NMP Manos	0.9002	0.8257	1			
CF NMP Mesa	-0.8728	-0.2399	-0.5773	1		
CF NMP Tanque	0.3729	0.9369	0.5763	0.0103	1	
CF NMP Agua	0.3759	0.9381	0.5792	0.0077	1	1

En el gráfico del análisis de componentes principales (Figura 21) se aprecia que la contaminación del agua y el tanque de almacenamiento de la leche influyen directamente sobre la contaminación en la empresa E2. Cabe mencionar que en estos análisis la sensibilidad de la técnica de NMP, presenta un resultado máximo de hasta 1,100 CF/g, lo que favorece las correlaciones entre las superficies y el queso.

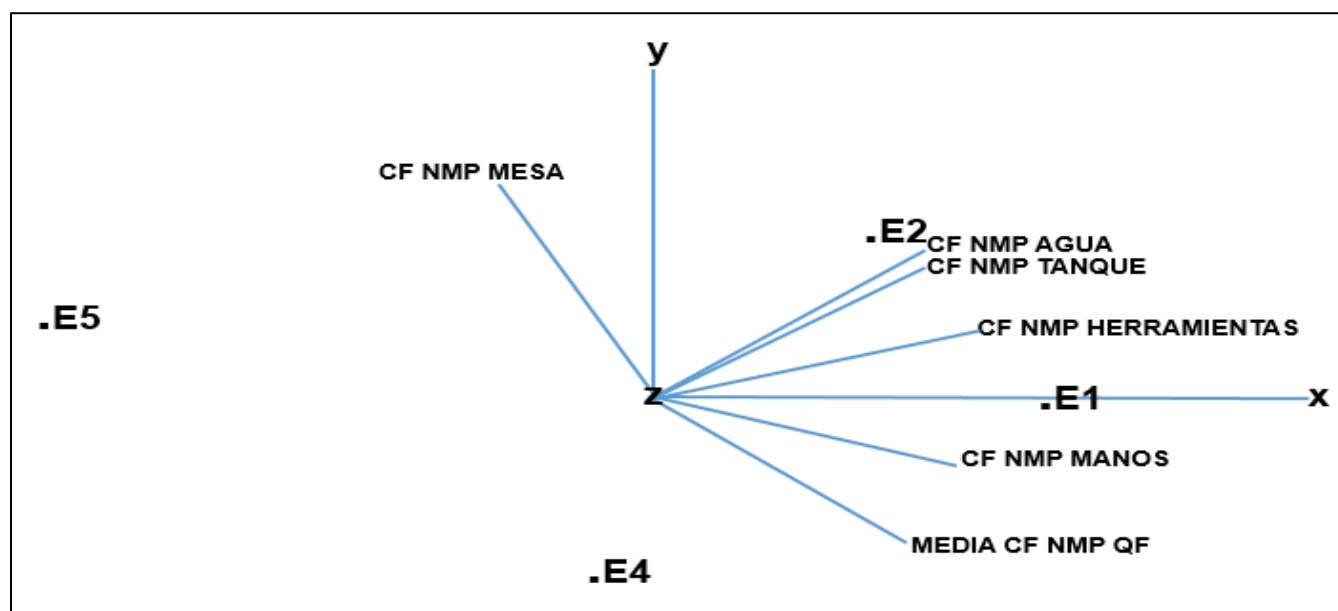


Figura 19. Análisis de componentes principales para CF por NMP en queso fresco

8.3.4 *E. coli* por NMP en quesos adobera y fresco

Queso adobera

La determinación de *E. coli* por la técnica de NMP para el queso adobera (Tabla 33), no mostró diferencias significativas entre las empresas ($p < 0.061$, $R^2 = 0.1$). Sin embargo, los resultados obtenidos en el conteo de *E. coli* por la técnica de NMP demuestra una correlación importante entre las manos de los trabajadores y las herramientas (0.9994), y por otro lado el tanque está directamente correlacionado con el agua para el aporte de este microorganismo patógeno en el producto terminado.

Tabla 33. Recuento de *E. coli* por NMP en queso adobera versus superficies vivas, inertes y agua por empresa

Empresa	Media de <i>E. coli</i> NMP queso adobera UFC/g	<i>E. coli</i> NMP Herramienta UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Manos UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Mesa UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Tanque UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Agua UFC/mL
E1	274.6	0	0	0	15	75
E2	32.56	28	43	0	0	3.8
E4	32	460	1100	3.6	0	0
E5	262.4	0	23	43	0	0

En la Tabla 34 se presenta el análisis de correlación múltiple para *E. coli*. La incidencia de este microorganismo en el queso adobera se correlaciona directamente con las manos de los trabajadores, la herramienta, el tanque y el agua (0.9988 y 0.9994), este comportamiento se observa particularmente para las empresas E1 y E4.

Tabla 34. Análisis de correlación múltiple para *E. coli* en queso adobera por NMP

	Media de <i>E. coli</i> NMP queso adobera UFC/g	<i>E. coli</i> NMP Herramienta UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Manos UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Mesa UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Tanque UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Agua UFC/mL
<i>E. coli</i> NMP queso adobera	1					
<i>E. coli</i> NMP Herramienta	-0.6250	1				
<i>E. coli</i> NMP Manos	-0.6011	0.9994	1			
<i>E. coli</i> NMP Mesa	0.5114	-0.2838	-0.2545	1		
<i>E. coli</i> NMP Tanque	0.6068	-0.3603	-0.3604	-0.3704	1	
<i>E. coli</i> NMP Agua	0.5869	-0.3804	-0.3819	-0.3954	0.9988	1

El análisis de componentes principales (Figura 22) para CF, muestra que las variables impactan diferente en las 4 empresas. Estos resultados denotan que cada empresa tiene un manejo diferente del producto, particularmente es importante destacar los diferentes grados de aplicación de las buenas prácticas de higiene con el fin de evitar contaminación por este microorganismo.

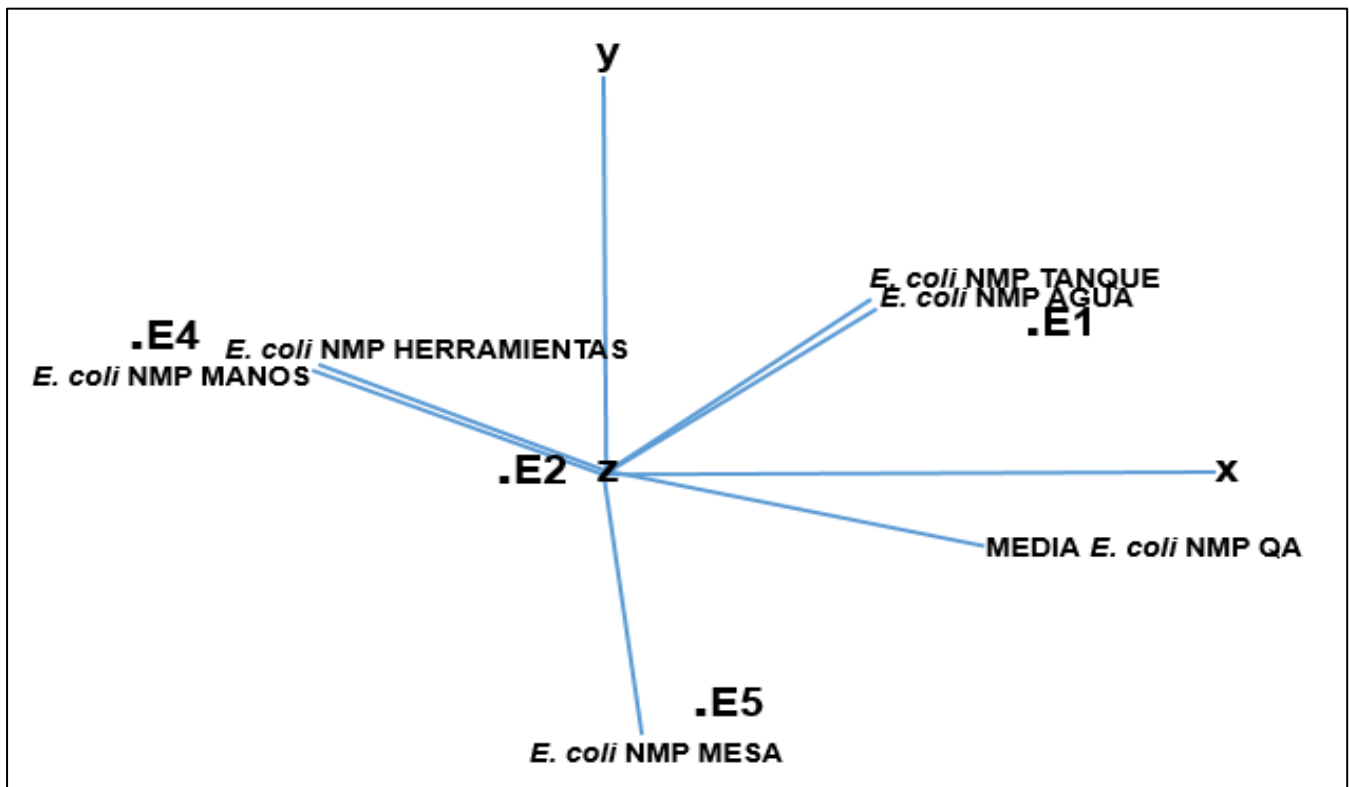


Figura 20. Análisis de componentes principales para *E. coli* por NMP en queso adobera

Queso fresco

Los resultados obtenidos de la comparación del queso fresco para *E. coli* por NMP con las superficies se muestran en la tabla 35, donde se puede observar que todas las empresas cumplen con el parámetro de la norma NOM-210-SSA1-2009 (100 UFC/g) sin embargo se puede observar que en la E4 las manos de los trabajadores cuentan con la presencia de CF lo cual se asocia a la falta de lavado de manos.

Tabla 35. Recuento de *E. coli* por NMP en queso fresco versus superficies vivas, inertes y agua por empresa.

EMPRESA	MEDIA DE <i>E. coli</i> NMP queso fresco UFC/g	<i>E. coli</i> NMP Herramienta UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Manos UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Mesa UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Tanque UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Agua UFC/mL
E1	76.4	0	0	0	15	75
E2	46.2	28	43	0	0	3.8
E4	37.46	460	1100	3.6	0	0
E5	1.44	0	23	43	0	0

Para el caso del queso fresco, el resultado de *E. coli* se correlaciona con las manos de los trabajadores, la mesa, el tanque y el agua con valores altos de correlación entre estas superficies (0.7973, 0.7784 y 0.8680), pero de formas distintas con cada empresa, así, en la empresa E5 son las mesas de trabajo el mayor problema; para la empresa E4 son las manos y las herramientas las principales fuentes de contaminación y el tanque de agua para la empresa E1 (Tabla 36).

Tabla 36. Matriz de correlación múltiple para *E. coli* en queso fresco por NMP

	MEDIA de <i>E. coli</i> NMP queso fresco UFC/g	<i>E. coli</i> NMP Herramienta UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Manos UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Mesa UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Tanque UFC/mL	<i>E. coli</i> NMP Agua UFC/mL
Media de <i>E. coli</i> NMP queso fresco	1					
<i>E. coli</i> NMP Herramienta	-0.5640	1				
<i>E. coli</i> NMP Manos	-0.0772	0.9994	1			
<i>E. coli</i> NMP Mesa	-0.8680	-0.2838	-0.2545	1		
<i>E. coli</i> NMP Tanque	0.7784	-0.3603	-0.3604	-0.3704	1	
<i>E. coli</i> NMP Agua	0.7973	-0.3804	-0.3819	-0.3819	0.9988	1

Lo anterior puede apreciarse en el gráfico de componentes principales (Figura 23), con una variación explicada en los dos primeros componentes principales de 91.55 %.

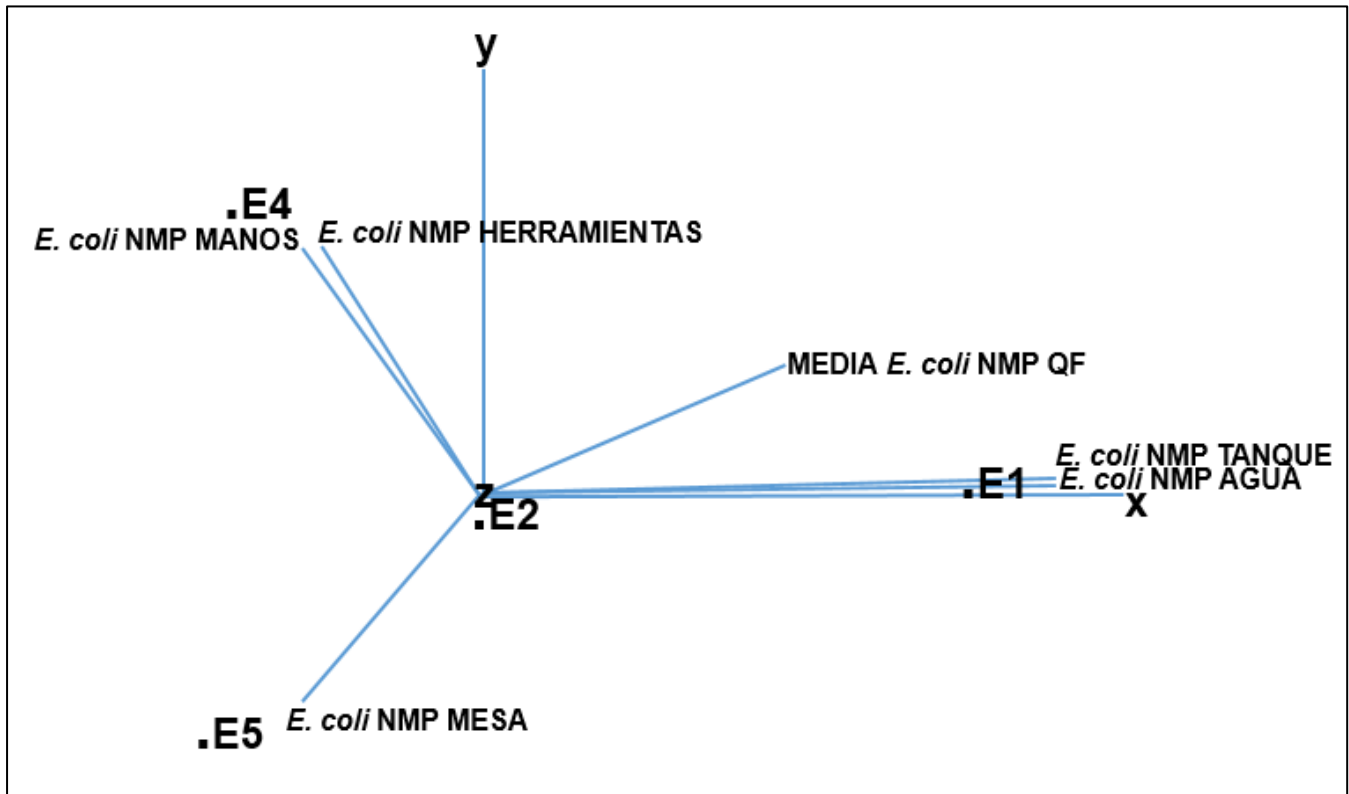


Figura 23. Análisis de componentes principales para *E. coli* por NMP en queso fresco

Al igual que los CF la normatividad permite hasta 100 UFC/g o mL, de *E. coli* presente en este tipo de alimentos; sin embargo, se observa que en el queso adobera hay detección positiva en el 23.3 % de muestras con un aislamiento confirmado e identificado en el 60 % de las muestras. En el queso fresco se encontró un 26.6 % de muestras positivas con un aislamiento confirmado en el 56.6 % de las muestras.

8.4 Conclusión

La incidencia de microorganismos indicadores de contaminación y la presencia de microorganismos patógenos en las superficies y el agua utilizada por las empresas durante el proceso de producción, demuestra una falta en la aplicación de medidas higiénico-sanitarias en los procesos de limpieza y desinfección del material y herramientas, lo cual es una fuente de contaminación constante que no permite la elaboración del queso en condiciones inocuas.

La aplicación de las buenas prácticas de higiene y manufactura son las medidas necesarias para que estas empresas puedan mejorar considerablemente la calidad de sus productos y evitar la presencia de microorganismos patógenos en los quesos.

8.5 Referencias bibliográficas

- COFEPRIS. (2009). Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. *Diario Oficial de La Federación*, 1–33. <http://www.cofepris.gob.mx/Paginas/Inicio.aspx>
- COFEPRIS. (2015). *Guía de buenas prácticas de higiene en establecimientos de servicio de alimentos y bebidas*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/158493/Gu_a_de_buenas_pr_cticas_de_higiene_en_establecimientos_de_servicios_de_alimentos_y_bebidas.pdf
- Diaz, A., & Uría, R. (2009). *Buenas Prácticas de Manufactura, Una guía para pequeños y medianos agroempresarios*. <http://orton.catie.ac.cr/reprodoc/A5294e/A5294e.pdf>
- OIRSA. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP* (pp. 1–66). [https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf](https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/Manual%20de%20an%C3%A1lisis%20de%20peligros%20y%20puntos%20cr%C3%ADticos%20de%20control%20-%20HACCP.pdf)
- OMS-FAO. (2005). Codex Alimentarius. Alimentos producidos orgánicamente. *Codex Alimentarius*, 2, 74. <http://www.codexalimentarius.net>
- Roman, M. (2007). Buenas Prácticas de Manufactura. Planes de higiene y sistema de análisis de de control para la pequeña y mediana empresa quesera. *Cuaderno Tecnológico*, 1–36. <https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/cuadernotecnologico2.pdf>
- SIAP. (2018). Atlas Agroalimentario 2012-2018. In *Sevicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)* (Vol. 1). https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018

9. Conclusiones generales

- La producción de queso fresco y queso adobera en el estado de Michoacán es una importante actividad económica en la región de tierra caliente, sin embargo, estos quesos tienen mala calidad microbiológica ya que presentan al menos uno de los parámetros por fuera de lo permitido en las normas mexicanas.
- La presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli* en el producto listo para consumo es un riesgo importante para la población que los consume.
- Las micobacterias identificadas por métodos moleculares son patógenos emergentes que nos muestran que el consumo en fresco del queso genera un importante riesgo para la población susceptible.
- La aplicación de las buenas prácticas de higiene durante la producción, así como el control de factores como el ordeño, transporte y almacenamiento de la leche como materia prima del queso, son medidas que pueden reducir considerablemente la contaminación del producto terminado. Se sugiere fuertemente elaborar el queso con leche pasteurizada.
- Los resultados de este estudio muestran que los quesos frescos y adobera producidos en la región de tierra caliente de Michoacán tienen mala calidad microbiológica y contienen bacterias patógenas asociadas con enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento térmico de la leche y las buenas prácticas de fabricación deben implementarse durante todo el proceso de producción para garantizar un producto seguro.

10. Referencias bibliográficas complementarias

- Cambio de Michoacán. (2014, June 18). *Quesos michoacanos con sabor y tradición*. <http://www.cambiodemichoacan.com.mx/nota-227051>
- COPLADEM. (2015). *Plan de desarrollo integral del estado de Michoacán*. [http://publicadorlaip.michoacan.gob.mx/itdif/2014/71/Programa Sectorial de Desarrollo Rural 2012-2015.pdf](http://publicadorlaip.michoacan.gob.mx/itdif/2014/71/Programa%20Sectorial%20de%20Desarrollo%20Rural%202012-2015.pdf)
- González Rosales, G. L., & Chombo Morales, M. P. (2014). *Comparación de los atributos de textura entre quesos adobera comerciales elaborados con leche pasteurizada y sin pasteurizar*.
- Gonzalez Vivanco, P. (2002). *El queso y su ilustre familia, Los quesos artesanos aragoneses*. Institución “Fernando El Catolico.”
- OMS-FAO. (2005). *Codex Alimentarius*. Alimentos producidos orgánicamente. *Codex Alimentarius*, 2, 74. <http://www.codexalimentarius.net>
- Secretaría de Salud. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. *Diario Oficial de La Federación*, 1–128. <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>
- SEDECO. (2012). Análisis del Sector Lácteo en México. *Secretaria de Economía*, 1–29. http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf
- SIAP. (2018). Atlas Agroalimentario 2012-2018. In *Sevicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)* (Vol. 1). https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Valdemar Tlazola, M. A. (2012). *Tipos de quesos que se consumen en el centro del país*. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro.”
- Villegas de gante, A., Cervantes Escoto, F., Cesín Vargas, A., Espinoza Ortega, A., Hernández Montes, A., Santos Moreno, A., & Martínez Campos, A. R. (2014). Reseña Bibliográfica. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 12(1), 257–260.
- Villegas de Gante, A., & Huerta Benítez, R. (2014). Naturaleza, evolución, contrastes e implicaciones de las imitaciones de quesos mexicanos genuinos. *Estudios Sociales: Revista de Investigación Científica*, 45, 1–22.
- Villegas de Gante, A., Santos Moreno, A., & Cervantes Escoto, F. (2016). Los quesos mexicanos tradicionales. *Universidad Autónoma Chapingo*, March, 220. <https://books.google.com/books?id=P7-OAAAACAAJ&pgis=1>