



**Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo**

Facultad de Químico Farmacobiología

**Búsqueda de *Staphylococcus aureus* en queso
Fresco y Adobera de la región tierra caliente del
estado de Michoacán.**

TESIS

Para obtener el título como
Química Farmacobióloga

Presenta

Arizbeth Piña Lázaro

Director de tesis

M en C. Ricardo Jiovanni Soria Herrera

Co-director de tesis

M en C. Karla Gabriela Domínguez González



Morelia, Michoacán; Septiembre 2020

I. Agradecimientos

Doy gracias a Dios por guiarme y darme sabiduría para poder tomar las buenas decisiones que hoy me dan la satisfacción de poder lograr una meta más en mi vida.

A mis padres Virgilia Lázaro y Norberto Piña agradezco todo el apoyo incondicional, económico y sobre todo su paciencia y confianza que tuvieron hacia mí ayudándome así para poder lograr estar aquí.

Por cada consejo y cada palabra de aliento en esos momentos difíciles por los que pasamos, por celebrar conmigo los logros obtenidos en cada etapa de este proceso.

Por ser los pilares esenciales y darnos los mejores ejemplos a seguir, por esa fortaleza que nos demuestran simplemente por ser los mejores padres para mí.

Gracias a cada uno de mis hermanos Lebny Alfonso, Raybel, Ma. Ibel y Norberto por siempre estar al pendiente de cada momento de mi vida, por los consejos, las bromas, y las charlas que hacían menos difícil los días lejos de casa, haciéndome sentir que cada esfuerzo hecho por mis padres, por ellos y por mí valía la pena.

A todos mis familiares por sus ánimos y buenos deseos, a mis amigos y compañeros que hacían las clases y días de estudio más amenas, por todas esas risas que hacían olvidarse del estrés por un momento.

Gracias a mis maestros por todas las enseñanzas aprendidas, por enseñarme que siempre debemos estar preparándonos para cada situación, que la enseñanza no solo se da a la hora de clase y que si deseamos ser mejores cada día tenemos que poner un poco más de lo que pensamos que podemos, porque somos capaces de lograr cualquier objetivo que nos propongamos.

Gracias a mi asesor de tesis M en C. Ricardo Jiovanni Soria Herrera y a mi co-asesora M en C. Karla Gabriela Domínguez González por darme la oportunidad de poder realizar esta investigación bajo su asesoramiento, por cada enseñanza dentro y fuera del laboratorio.

Índice

I. Agradecimientos	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	V
Abreviaturas	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
1. Introducción	1
1.1 Producción de leche	1
1.2 Leche de vaca	3
1.3 Características de la leche	4
1.4 Composición nutricional de la leche	4
1.5 Productos lácteos	5
1.6 Queso	6
1.7 Clasificación del queso	7
1.8 Producción de queso en México	8
1.9 Proceso de elaboración del queso	10
2. Antecedentes	10
3. Género <i>Staphylococcus</i>	13
4. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
4.1 Pared celular	16
4.2 Enzimas y toxinas	17
4.2.1 Enterotoxinas	17
4.2.2 Toxinas exfoliativas	19
4.2.3 Hemolisinas	20
4.2.4 Toxina del síndrome del choque tóxico 1	20
5. Pruebas de identificación para <i>Staphylococcus aureus</i>	22
5.1 Tinción Gram	22
5.2 Agar manitol salado	22
5.3 Catalasa	22
5.4 Coagulasa	23
5.5 Termonucleasa	23
6. Justificación	24
7. Hipótesis	25
8. Objetivo general	25

8.1	Objetivos particulares	25
9.	Materiales y métodos	26
10.	Procedimiento de cada prueba.....	27
10.1	Recolección de las muestras	27
10.2	Preparación y dilución de las muestras.....	27
10.3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
10.3.1	Siembra en agar Baird-Parker.....	28
10.3.2	Siembra en agar manitol salado.....	28
10.3.3	Tinción Gram.....	28
10.3.4	Prueba de catalasa	28
10.3.5	Prueba de coagulasa.....	29
10.3.6	Prueba de termonucleasa.....	29
11.	Resultados y discusión.....	29
11.1	Resultados de la cuenta en agar Baird-Parker	29
11.2	Resultados de crecimiento positivo en agar manitol salado	32
11.3	Resultados de la prueba de catalasa y prueba de coagulasa	34
11.4	Resultados para la prueba de termonucleasa	35
12.	Conclusiones.....	38
13.	Bibliografía	39

Índice de figuras

Nº de figura	Descripción	Pág.
1	Pasos de elaboración del queso	10
2	Microscopia de barrido y tinción Gram	14
3	Agar Baird Parker y Agar Manitol Salado	15
4	Interacción proteína A e Inmunoglobulina	17
5	Estructura de la Enterotoxina A	19
6	Estructura de la Enterotoxina B	19
7	Estructura de la Toxina TSS-1	21
8	Diagrama de las pruebas realizadas durante el análisis	26
9	Diagrama de preparación de diluciones	27
10	Crecimiento y morfología de las colonias en Agar Baird-Parker	32
11	Crecimiento en Agar Manitol Salado	33
12	Resultados prueba Coagulasa y Catalasa	34
13	Resultados prueba Termonucleasa	35
14	Gráficas de comparación de Resultados	36

Índice de tablas

Nº Tabla	Descripción	Pág.
1	Producción mundial de leche de cada especie animal.	2
2	Características de la leche	4
3	Análisis bromatológico de la leche	4
4	Clasificación de quesos de acuerdo a su proceso	8
5	Unidades formadoras de colonia por cada gramo de queso Adobera	29
6	Unidades formadoras de colonia por cada gramo de queso Fresco	30
7	Número de colonias positivas en agar manitol salado para queso Adobera	32
8	Número de colonias positivas en agar manitol salado para queso Fresco	33
9	Colonias positivas para la prueba catalasa y coagulasa por empresa	34
10	Número de colonias positivas para prueba termonucleasa por empresa	35

Abreviaturas

CaCl₂	Cloruro de calcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
g	gramo
INPPAZ	Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso Molecular
RNA	Ácido ribonucleico
TRIS	Hidroximetil aminometano
TSST-1	Toxina-1 del Síndrome de Shock Tóxico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UHT	Ultra High Temperature (Temperatura ultra alta)
°C	Grados Celsius

Resumen

Staphylococcus aureus es considerado uno de los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, su capacidad para producir toxinas lo hace aún más relevante, el ser humano y algunos animales al ser portadores asintomáticos se convierten en una fuente de contaminación frecuente de los alimentos.

Es común que este microorganismo se encuentre contaminando los productos lácteos, como consecuencia del proceso de elaboración del queso y relacionado al manejo inadecuado de la materia prima, fabricación, almacenamiento y transporte; considerándoles como los principales riesgos de contaminación.

El queso posee un alto valor nutricional lo que lo convierte en un excelente medio para el crecimiento de microorganismos patógenos por lo que se considera de gran importancia conocer su calidad microbiológica.

En 2016 México se colocó en la décima posición a nivel mundial en la producción de queso y en octavo para su consumo de acuerdo a Angélica Espinoza, del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, el estado de Michoacán tiene una tradición muy larga en la elaboración de quesos, anualmente produce alrededor de 8.5 millones de toneladas de productos lácteos destacando la región de Tierra Caliente por su mayor producción de quesos frescos de diferentes características uno de ellos es el queso Adobera un queso elaborado con leche cruda de vaca y el queso Fresco de textura suave y consistencia firme.

El principal objetivo de este trabajo es cuantificar el contenido de *Staphylococcus aureus* en queso Fresco y Adobera, por lo que se recolectaron 30 muestras de cada tipo de queso elaborado en diferentes municipios de la región de tierra caliente del estado de Michoacán, se realizó el recuento en Agar Baird-Parker teniendo como resultado que los 2 tipos de queso analizados sobrepasan lo establecido en la NOM-243-SSA1-2010, a las colonias sugestivas se les practicaron pruebas confirmatorias para *Staphylococcus aureus*: tinción Gram, coagulasa, catalasa, termonucleasa entre otras.

Palabras clave. Calidad sanitaria, patógenos en alimentos, quesos artesanales.

Abstract

Staphylococcus aureus is considered one of the main microorganisms causing foodborne illness, its ability to produce toxins makes it even more relevant, humans and some animals being asymptomatic carriers, become a frequent source of food contamination.

Generally, this microorganism has its presence as contaminant in dairy products, in consequence, the use of raw materials, improper handling and inadequate manufacturing processes, storage and distribution, makes each of the cheese-making processes a health risk. Cheese has a high nutritional value which makes it an excellent environment for pathogenic microorganism growth.

In 2016 México placed itself in the tenth worldwide position in cheese production and the eighth for its consumption, the state of Michoacan has a very long tradition in cheese making, annually the production is around 8.5 million tons of dairy products highlighting the region of Tierra Caliente due to its greater production of fresh cheeses with different characteristics, one of them is Adobera cheese, made with raw cow's milk, another is the Fresh cheese characterized by a soft texture and firm consistency.

The main objective of this research is to quantify the content of *Staphylococcus aureus* in Fresco and Adobera cheese, so 30 samples of each type of cheese were collected in different municipalities of Tierra Caliente region from Michoacan state, the bacteria count was made in Baird-Parker Agar, resulting in an analyzed exceeding for the 2 types of cheese according to the provisions of NOM-243-SSA1-2010, the confirmatory tests for *Staphylococcus aureus*, Gram staining, coagulase, catalase, thermonuclease were performed on the characteristic colonies among other.

Key words. Handmade cheese, foodborne pathogens, food safety.

1. Introducción

Los animales son de gran importancia para los seres humanos ya que de estos se obtienen diversos beneficios, utilizando sus carnes, pieles, leche, huesos; etc. Como alimentos o como productos que sirven para trabajar y mejorar la calidad de vida de las personas, por lo que al paso del tiempo se ha buscado la forma de domesticar o mantener en cautiverio a los animales existentes como mamíferos, aves, peces, entre otros (Myers, 2006).

De acuerdo a los historiadores se cree que las ovejas y cabras fueron las primeras en ser domesticadas, aproximadamente entre los años 11,000 y 9,000 a. c. en las tierras de Mesopotamia (actual Irak), los Bovinos fueron los últimos animales importantes en ser domesticados hace 8,000 años, descubriéndose entonces la importancia nutritiva de la leche, por lo que se continua consumiendo leche de oveja, cabra, cierva, camella, búfala etc. (Myers, 2006).

1.1 Producción de leche

Cuando se utiliza la palabra leche sin especificar la especie del animal del que procede se refiere a leche de vaca, por lo que si la leche proviene de una hembra diferente a la vaca, esta debe contener la denominación “leche” seguida de la especie de la que proviene, ejemplo; leche de cabra, leche de oveja (Mallqui, 2014).

Se pueden encontrar varias definiciones para el término leche entre ellas destacan:

La leche es el producto íntegro y fresco de la secreción normal de la glándula mamaria de animales bovinos sanos, bien alimentados y en reposo, exenta de calostro, obtenida por uno o varios ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, que debe cumplir con los criterios microbiológicos y físicos establecidos (Pedraza & Duarte, 2009).

Desde el punto de vista dietético la leche es el alimento puro más completo, porque contiene aminoácidos esenciales, es rica en calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye en vitamina A y B1 (tiamina), los lípidos y la lactosa constituyen un importante aporte energético (Guerrero & Rodríguez, 2010).

La definición física dice que la leche es un líquido de color blanco opalescente característico debido a la refracción de la luz, cuando los rayos de luz inciden sobre las partículas coloidales de la leche en suspensión (UNAD, 2016).

La producción de leche procede en su mayoría de ganado vacuno, seguida por la producción de búfalos, cabras y ovejas, otros animales de los cuales se obtiene leche pero tienen un consumo menor por parte de la población son, los camellos, caballos, renos, yaks y burros (Bolaños, 2018). Esto depende de las regiones y países del mundo, ya que la presencia de estas especies es regulada en gran parte por la abundancia y tipo de alimentación, agua y el clima que se encuentra en cada zona. En todo el mundo alrededor de 150 millones de familias se dedican a la producción de leche, en gran parte de los países en desarrollo, la leche es producida por pequeños agricultores produciendo ganancias rápidas para estos lo que es una fuente importante de ingresos (FAO, 2019).

Tabla 1. Producción mundial de leche de cada especie animal.

Animales productores de leche	Porcentaje de producción
Vacas	83%
Búfala	13%
Cabra	1.3%
Oveja	0.8%
Camellos	0.3%
Otros	1.6%

Tomado y modificado de (Suárez & Martínez, 2018).

En los países desarrollados casi toda la producción de leche proviene del ganado vacuno, mientras que en los países en desarrollo aproximadamente un tercio de su producción proviene de búfalos, cabras, camellos y ovejas. El bovino en África produce aproximadamente tres cuartos de toda la producción lechera, en Asia un 60% y en América Latina casi la totalidad de la producción (Suárez & Martínez, 2018).

La especie del animal lechero, su raza, edad y dieta, junto con el estado de lactancia, número de ordeños, número de pariciones, sistema agrícola, entorno físico y la estación del año, influye en el color, sabor y composición de la leche

lo que permite la producción de una gran variedad de productos lácteos (Zavala, 2005).

- **Leche de búfala:** Su característica más sobresaliente es su color blanco opaco, tiene un contenido mayor de materias grasas comparada con la leche de vaca, por su alto valor nutritivo es adecuada para la preparación de derivados lácteos (Patiño, 2009).
- **Leche de camella:** Tiene un sabor ligeramente más salado con respecto a la leche de vaca, es esencial en las regiones áridas de África por la aportación de proteínas y energía (Díaz, 2017).
- **Leche de oveja:** Posee un color blanco nacarado, mayor viscosidad, de digestión más rápida debido a su rendimiento su ingesta es mayor en quesos o yogurt (Busetti, 2019).
- **Leche de cabra:** Su composición es similar a la leche de vaca, contiene menos sodio pero mayor potasio, presenta menos intolerancia por las personas por su bajo contenido de lactosa, su consumo es como leche fluida o en quesos (Villalobos, 2005).
- **Leche de equino:** Tanto la leche de yegua y burra mantienen una composición similar, tienen un nivel relativamente bajo de proteínas, grasas y cenizas, son ricas en lactosa, su consumo preferentemente es fermentada (FAO, 2019).

1.2 Leche de vaca

La leche principalmente de vaca es un alimento de gran demanda por su alto valor nutricional, debido a sus componentes lo que la ha convertido en un alimento básico para la dieta de la mayoría de la población (Agudelo & Bedoya, 2005).

En México la leche de bovino alcanzó 8 mil 634 millones 923 mil litros al finalizar el tercer trimestre del año 2016, destacando los estados de Coahuila, Chihuahua, Jalisco y Guanajuato con un aumento en su producción a comparación del mismo periodo del 2015. Ocupando así el séptimo lugar en producción de leche a nivel mundial (SAGARPA, 2016).

1.3 Características de la leche

Tabla 2. Características de la leche

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	
Color	Líquido color blanco opalescente o ligeramente cremoso cuando posee niveles altos de grasa.
Olor	Ligeramente perceptible, considerado como característico.
Sabor	Poco dulce, neutro debido a la lactosa.
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	
Gravedad específica	1.028 - 1.034
Densidad	Leche normal: 1.032 g/mL Leche descremada: 1.0361 g/mL Leche aguada: 1.029 g/mL
pH	6.5 - 6.7
Acidez	0.15 – 0.16%
Viscosidad	Leche completa: 2.2 Leche descremada: 1.2

Tomado y modificado de (UNAD, 2016).

1.4 Composición nutricional de la leche

La leche es una importante fuente de energía para el humano, debido a que proporciona muchos de los nutrientes esenciales en la dieta como proteínas, grasas, vitaminas y minerales, estos componentes se encuentran en suspensión o emulsión.

Tabla 3. Análisis bromatológico de la leche

Elementos de la Leche	Porcentaje	Componentes Principales
Grasa saturadas	3,4%	Digliceridos, triglicéridos
Lípidos	0.05%	Lecitina, cefalina, esfingomielina.
Proteína	3,2%	Caseínas, albuminas.
Lactosa	4,7%	Azúcar de la leche.

Sales	0,72%	Calcio, magnesio, sodio, potasio, etc.
Agua	88,0%	
Enzimas		Lipasas, proteasas, reductasas, fosfatasas etc.
Vitaminas		A, D, E, K, C, B.
Pigmentos		Riboflavina, carotenos, xantofila.

Tomado y modificado de (Juárez, 2005).

Gracias a los avances tecnológicos la leche hoy en día es tratada y comercializada en diferentes presentaciones.

La leche por ser un alimento muy completo es muy perecedero, por lo que se ha buscado la manera de mantenerla viable durante el mayor tiempo posible, la pasteurización es un proceso que consiste en someter la leche a una temperatura de 72 °C durante 15 segundos, se debe conservar en frío después de su tratamiento (Picho, 2017).

Leche esterilizada que al estar envasada se coloca 4 minutos a una temperatura entre 140 y 150 °C eliminando todos los gérmenes y puede conservarse a temperatura ambiente durante más tiempo (Bello, et al, 2005)

Leche Ultra High Temperature (UHT) o Ultra Alta Temperatura (UAT) donde se somete el flujo de leche a 145 °C solo 2 segundos se logra una esterilización sin disminuir nutrientes. La leche es comercializada en diferentes estados físicos como leche líquida, condensada, evaporada o en polvo de acuerdo a su contenido nutricional la leche se clasifica en entera, semidescremada, descremada, fortificada, enriquecida o deslactosada (Sociedad Argentina de Nutrición, 2019).

1.5 Productos lácteos

A partir de que el hombre comenzó la práctica de la ganadería la leche se ha considerado como un alimento primordial, fuente de fortaleza y vida, gracias a que la leche era guardada para su transporte en recipientes y bolsas hechas de pieles y tripas de animales, se descubrieron diferentes productos resultantes de

la interacción de la leche con la piel y el calor, dichos productos se siguen fabricando y comercializando en la actualidad, el queso, las leches fermentadas y la mantequilla son ejemplos de estos productos (Bonet, et al, 2009).

Las leches fermentadas parecen tener origen en Asia, debido a que los nómadas transportaban la leche en sacos de piel de cabra que al contacto con la leche y el calor favorecían que las bacterias lácticas se multiplicaran fermentando la leche y esta coagulaba formando una masa semisólida. La mantequilla nace a partir de que los mismos pueblos comenzaron a separar la nata de la leche después de hervirla y batirla en las pieles de los animales (Quevedo & Dueñas, 2005).

1.6 Queso

El origen del queso no se encuentra muy bien definido debido a que existen mitos y leyendas que carecen de pruebas para confirmar su veracidad. Uno de ellos y el más antiguo narra que un mercader árabe al realizar un viaje largo por el desierto transportaba la leche en una bolsa fabricada con el estómago de un cordero, la interacción de la leche con el fermento del cuajo del estómago y las temperaturas elevadas del desierto dieron origen a la coagulación y fermentación de la leche, lo que hoy llamamos queso, convirtiéndose en uno de los primeros alimentos transformados (Ramírez, 2006).

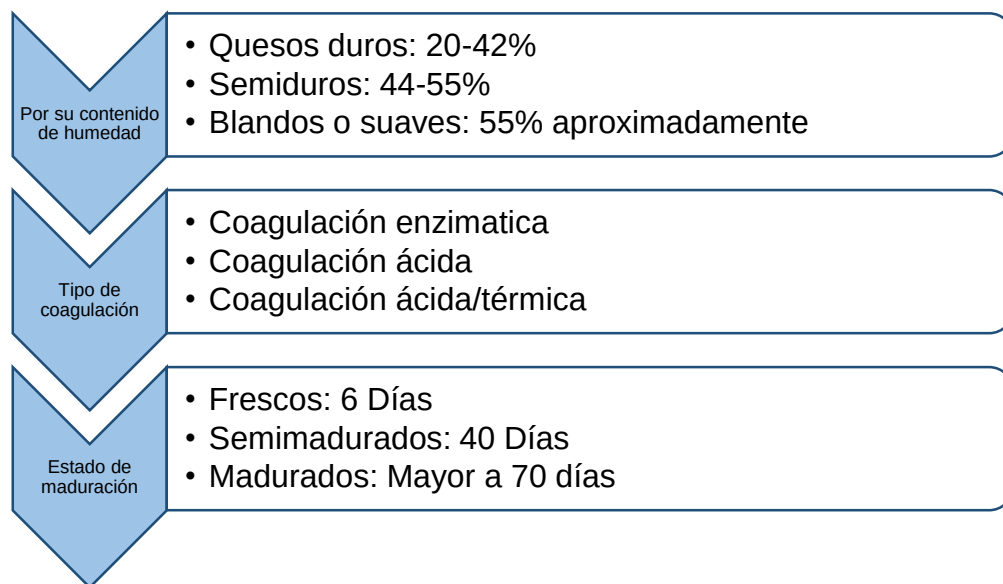
El documento más antiguo es un friso sumerio “Friso de la lechería” del tercer milenio a. c. que narra el ordeño y cuajado de la leche, a partir de este se encuentran muchos documentos que describen la elaboración y consumo de este producto, pero fue hasta el siglo XIX cuando comenzó la producción de queso a una escala mayor coincidiendo con el desarrollo de las ciudades y la revolución industrial (Lorenzo, 2009).

En América latina y en México la elaboración de queso comienza con la llegada de los españoles quienes introdujeron animales productores de leche, los monjes fueron los encargados de enseñar a los indígenas la elaboración del queso, con el paso del tiempo y el ingenio mexicano se dio origen a diferentes tipos de queso hoy conocidos mundialmente; queso Oaxaca, Panela, Adobera, Chihuahua, Fresco, Cotija entre otros. Se comenzaron a desarrollar varias regiones ganaderas y productoras de queso en todo el país (Reynosa, 2011).

El queso es uno de los productos más antiguos derivados de la leche esto lo hace un alimento muy completo ya que mantiene la mayoría de los nutrientes presentes en esta, es rico en proteínas, vitaminas, grasas y minerales. De acuerdo al *Codex Alimentarius* 2011 se entiende por queso a, “el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, obtenido mediante: coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada, leche parcialmente desnatada, nata, nata de suero o leche de mantequilla, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos.

1.7 Clasificación del queso

Existen en el mundo más de 2000 variedades de quesos aproximadamente de diferente consistencia, sabor, método de preparación y con características particulares que los pueden distinguir, por lo que se pueden clasificar de diferentes maneras.



Tomado y modificado de (Ramírez & Vélez, 2012).

Tabla 4. Clasificación de quesos de acuerdo a su proceso

FRESCOS	
Frescales	Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.
De pasta cocida	Oaxaca, Asadero, Mozzarella, De Morral, Adobera.
Acidificados	Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel
MADURADOS	
Madurados prensados de pasta dura	Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito
Madurados prensados	Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friesse, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergja, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsoe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack
Madurados con mohos	Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.
PROCESADOS	
Fundidos y para untar	Amarillo

Tomado de: (NOM-121-SSA1-1994)

1.8 Producción de queso en México

Aproximadamente un 10% de la producción total de leche en México es dedicado a la elaboración de productos lácteos, de la cual la mayor parte es utilizada para

la fabricación de quesos, en el año 2016 México se colocó en la décima posición a nivel mundial en la producción de queso y en octavo para su consumo. Existen alrededor de 40 tipos de quesos diferentes en el país, cada región se hace distinguir por el sabor, la forma y textura que caracterizan a sus quesos (Espinoza, 2016).

El estado de Michoacán tiene una tradición muy larga en la elaboración de quesos, anualmente produce alrededor de 8.5 millones de toneladas de productos lácteos donde destacan quesos como el Panela, Adobera, Ranchero, Fresco y Enchilado, Crema, Jocoque, Requesón entre otros productos (SEDRUA, 2019).

Se producen aproximadamente 3 millones 340 mil kilos de queso al año en el estado, destacando en la región de Tierra Caliente por su mayor producción los municipios de Cotija, Tepalcatepec y Apatzingán, por su clima en esta región se necesitan aproximadamente 9 litros de leche para la producción de un kilo de queso, mientras que en regiones con clima templado se requieren 10 litros. Tepalcatepec produce 3 mil 500 kilos aproximadamente de queso diario de los cuales el 80% se vende fresco, Apatzingán produce alrededor de 182 mil 500 kilos entre Adobera y Cotija, mientras que Cotija produce 1 millón 825 mil kilos al año de distintas variedades de queso (Cambio de Michoacán, 2014).

En Michoacán se destaca la producción de quesos frescos de diferentes características uno de ellos es el queso Adobera un queso elaborado con leche cruda de vaca, de pasta blanda y fácil de fundir su nombre deriva por la forma que posee similar a la de un ladrillo de adobe y el queso Fresco de textura suave y consistencia firme característico por no pasar por una maduración o un añejamiento (Zurita, 2012).

1.9 Proceso de elaboración del queso.



Figura 1: Pasos en la elaboración del queso.

Tomado y modificado de (Méndez, 2016)

2. Antecedentes

La producción de quesos artesanales regularmente se lleva acabo con leche cruda la cuál es “leche recién ordeñada que no se ha pasteurizado o hervido”, el valor nutritivo de esta leche no se puede cuestionar, sin embargo, durante todo el proceso; ordeño, fabricación del queso y llegada al consumidor, surgen riesgos como: la multiplicación de microorganismos, contaminación con gérmenes patógenos, absorción de olores etc. Que hacen que la calidad higiénica del producto decaiga y por lo tanto represente un problema para la salud del consumidor (González, Molina, & Coca, 2010).

Dentro de los principales factores que afectan la calidad de un alimento, se encuentra la deficiente capacitación del personal acerca de las buenas prácticas de manufactura e higiene, destacando la falta de información técnica para el manejo tanto de la materia prima como del producto terminado colocándoles como principales factores de riesgo (Kopper, Schneider, Domínguez, & Gutiérrez, 2009).

La contaminación de la leche por microorganismos patógenos puede darse porque la leche proviene de un animal enfermo (mastitis), por contaminación durante o después del ordeño, almacenamiento y/o transporte. Entre estos microorganismos tenemos a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Brucella spp.*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. (González, Molina, & Coca, 2010).

En la actualidad se han incrementado las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), estas son causadas por el consumo de bebidas o alimentos contaminados por microorganismos patógenos para el humano o sustancias químicas, dicha contaminación se puede dar en cualquier etapa del proceso del alimento hasta su llegada al consumidor, lo que ha aumentado el interés en el consumo de alimentos denominados “inocuos”; es decir que no afecten la salud del consumidor. En el mundo se estima que alrededor de 600 millones de personas presentan enfermedades causadas por alimentos al año, de las cuales 420,000 mueren (OMS, 2015).

Las enfermedades gastrointestinales se consideran un problema mundial de salud pública. En México son una de las principales causas de consulta médica y morbilidad, afectan a lactantes, niños y ancianos principalmente, sin embargo se pueden presentar a cualquier edad su incidencia aumenta en época de calor (Elainy, 2016). En México se registraron 4,556 decesos causados por infecciones gastrointestinales de acuerdo a un estudio gubernamental efectuado en 2003. En 2008 el Instituto Mexicano del Seguro Social registro 2 millones 188 consultas por estas infecciones presentando mayor incidencia los estados de Michoacán, Guerrero, Jalisco, Chihuahua, Oaxaca y Coahuila (Hernández, Aguilera, & Castro, 2011).

El primero de Febrero de 2008 se informó al departamento de epidemiología de la región sanitaria departamental de Choluteca, Honduras; el ingreso al hospital de 39 personas entre un rango de edad de 1 a 43 años de los cuales 36 eran niños y 3 adultos procedentes de una guardería, presentaban síntomas como vómito, náuseas, dolor abdominal las cuales habían consumido los siguientes alimentos, queso, frijoles fritos, cuajada, tortillas, refresco de avena y agua, los resultados arrojaron positivo para *Staphylococcus aureus* en queso y cuajada de

los alimentos tomados de la guardería como los tomados de la bodega distribuidora (Mejía, et al, 2009).

El 27 de Noviembre de 2008, se presentaron 47 personas entre ellas; 37 niños de 2 a 6 años y 10 adultos al hospital de Hurlingham, provincia de Buenos Aires presentando síntomas como vómito y dolor abdominal, muy pocos presentaban diarrea todos coincidieron haber comido salpicón de ave en el comedor de un jardín de infantes, se tomaron muestras a los alimentos, a los manipuladores del comedor y pacientes, resultando positivos para *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico (Rivas & Manfredi, 2018).

Los datos recabados en el 2009 por el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) en Colombia, arrojaron 899 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, identificando el agente patógeno sólo para el 56%, donde en el 18,4% se confirmó la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positiva en las diferentes muestras, superficies biológicas y alimentos; en los cuales se encontraban queso, arroz, pollo y carne preparada (Riveros, 2011).

De acuerdo al Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis – Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (INPPAZ-OPS/OMS), en el transcurso del año 1993 al año 2000 se presentaron 191 brotes por intoxicación por *Staphylococcus aureus* en Latinoamérica y el Caribe, resultando 6,433 personas afectadas y 2 muertes. En Venezuela se presentaron 48 brotes de los cuales 40 involucraron al queso blanco fresco (Díaz & González, 2001).

En el año 2006 se reportaron 471 brotes en Cuba causados por alimentos, donde estudios microbiológicos señalan como microorganismo responsable a *Staphylococcus aureus* (Barreto, Sedrés, Rodríguez, & Guevara, 2010).

Gould y colaboradores entre 1998 y 2011 en un estudio retrospectivo analizaron brotes en Estados Unidos relacionados al consumo de quesos, donde se reportó un total de 90 brotes, de los cuales 38 brotes se asociaron a quesos no pasteurizados y el 40% de los brotes, fueron asociados a quesos no pasteurizados provenientes de México (Hernández, et al, 2016).

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos más importantes en el estudio de enfermedades transmitidas por los alimentos, ya que posee la capacidad de producir toxinas, causantes de intoxicación en la población se ha demostrado que existe un gran número de alimentos y productos idóneos donde se desarrolla este microorganismo; principalmente aquellos que sufren contacto con la piel del animal como lo son: la leche, productos lácteos, de pastelería, el huevo, carnes procesadas y la carne de pollo, a esto se le suma una contaminación pos-proceso debido a la inadecuada manipulación (Zendejas, Avalos, & Soto, 2014).

Díaz y González en 2001 estimaron que un importante número de cepas de *Staphylococcus aureus* producen alguna de las 7 enterotoxinas más conocidas siendo la A y D las más frecuentes, considerando que un alimento es de riesgo cuando se confirma la presencia de las enterotoxinas o bien se tiene una carga bacteriana igual o superior a 10^5 UFC/g. (Díaz & González, 2001).

La principal causa de contaminación es debido a que no se tiene un manejo adecuado de la materia prima al momento de la elaboración del producto, lo que representa un riesgo alto para la salud de los consumidores (Rodas, et al, 2016).

3. Género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* fue clasificado anteriormente en la familia *Micrococcaceae* al igual que los géneros *Stomatococcus*, *Planococcus* y *Micrococcus*, pero de acuerdo a estudios recientes se considera que presenta un mayor acercamiento con los géneros *Streptococcus* y *Bacillus*. Son cocos Gram-positivos de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, agrupados en pares, tétradas, cadenas cortas, pero predominando la agrupación de racimos de uvas; su nombre deriva del griego “*Staphyle*” que significa racimo de uvas. Son bacterias no esporuladas, inmóviles, sin cápsula, sin embargo; algunas cepas pueden desarrollar una cápsula de limo, son anaerobios facultativos y catalasa-positivos lo que los diferencia de los *Enterococcus* y *Streptococcus* (Cervantes, García, & Salazar, 2014).

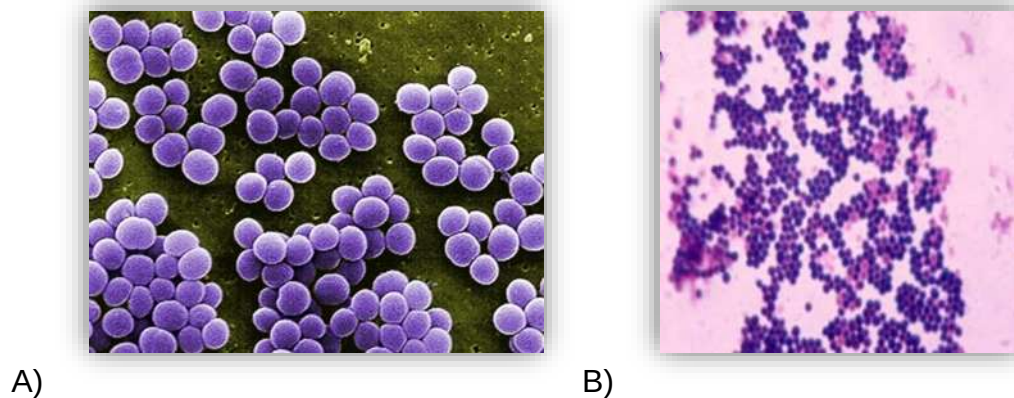


Figura 2: Microscopia de barrido y tinción Gram

A) Imagen de microscopia de barrido de una tinción de Gram para *Staphylococcus aureus*. **B)** Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus*. En ambas imágenes se pueden observar los cocos Gram-positivos en agrupación de racimos de uvas.

Tomado de: (Reynaga, 2017) y (Haney & Arduino, 2016)

Existen alrededor de 35 especies y 17 subespecies del género *Staphylococcus* presentes en humanos, animales o medioambientales, estos microorganismos poseen la capacidad de crecer en medios con alta concentración de sal y con una temperatura entre 18 °C a 40 °C. Dentro del género *Staphylococcus* las especies que más se aíslan de las infecciones en humanos, son: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus aureus* este último es el más conocido y virulento de las especies del género, diferenciándose de los demás por presentar la enzima coagulasa (Murray, Rosenthal, & Pfaüer, 2006).

Crece en diferentes tipos de agar como agar soya tripticasa, agar chocolate, agar nutritivo, agar infusión cerebro-corazón, agar sangre, agar sal y manitol, agar Baird-Parker, etc. Donde se pueden observar colonias blanquecinas, pequeñas, con bordes redondeados de forma circular, superficie convexa y lisa. En el caso de *Staphylococcus aureus*, en algunos tipos de agar produce un pigmento carotenoide de color dorado de donde deriva su nombre “aureus”, que hace referencia a la coloración dorada o amarilla (Reynaga, 2017).

4. *Staphylococcus aureus*

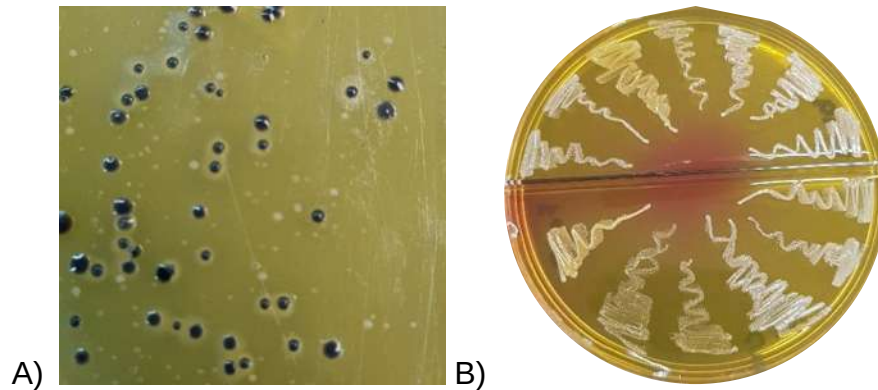


Figura 3: Agar Baird Parker (A) y Agar Manitol Salado (B)

A) Crecimiento positivo de colonias de *Staphylococcus aureus* en agar Baird Parker, donde se observan colonias negras con halo claro a su alrededor. **B)** Crecimiento positivo de colonias de *Staphylococcus aureus* en agar Manitol salado, donde se pueden observar colonias amarillas con viraje del medio de rosa a color amarillo.

Tomado de: (Soria, 2019)

Staphylococcus aureus Es la principal especie patógena de su género, se encuentra colonizando como microbiota habitual en varias partes del cuerpo humano: nariz, axilas, perineo, pliegues cutáneos y vagina por lo que provoca infecciones oportunistas (Koneman, et al, 2006).

Staphylococcus aureus se diferencia de las demás especies debido a que produce la enzima coagulasa, siendo las demás especies coagulasa negativos. Este microorganismo crece entre 6 y 46 °C teniendo como temperatura óptima entre 30 y 37 °C, un pH de entre 4 a 9,8 teniendo como óptimo un pH de 7, es muy resistente a varias condiciones adversas ya que puede sobrevivir a una temperatura de 60 °C durante un periodo de casi una hora y es mucho más resistente a algunos desinfectantes comunes que otros microorganismos. Crece fácilmente en medios generales, las colonias son cremosas de color amarillo dorado, es capaz de desarrollar beta-hemólisis en medio Gelosa Sangre (Gil, 2018).

S. aureus, produce una intoxicación en el ser humano debido al consumo de alimentos contaminados ya que algunas cepas presentan la producción de una toxina emética altamente resistente al calor, la toxina se forma en el alimento por lo que al ser ingerido el tiempo de incubación es muy corto aproximadamente 3 horas o menos para que se presenten los síntomas característicos que pueden

ser: náuseas acompañadas de vómito intenso, diarrea y dolor abdominal; esto puede llegar a consecuencias más graves como shock, hipotermia, hipotensión si no se trata correctamente (Jordá, Marucci, Guida, Pires, & Manfredi, 2012).

De acuerdo a Jablonskin y colaboradores en el año 2001, comentan que el FDA establece que la cantidad de *Staphylococcus aureus* en el que se encuentren 10^5 UFC/g de alimento provocara intoxicaciones y que un nanogramo de la toxina por gramo de alimento es suficiente para causar los síntomas asociados a la intoxicación (Bohdana, Necidová, & Janstova, 2012).

La patogenicidad del microorganismo depende de varios factores. *Staphylococcus aureus* presenta las siguientes características:

4.1 Pared celular

Está compuesta de una capa gruesa de peptidoglicano que se encarga de la resistencia osmótica y rigidez de la pared celular, esto ayuda a desencadenar el proceso de inflamación activando el complemento, lo que atrae a leucocitos polimorfonucleares estimulando la elaboración de anticuerpos opsonizantes, presentando así actividad muy parecida a las endotoxinas de Gram negativos, existen cepas con muchos receptores para fibronectina que suelen ser más invasores y pueden adherirse más fácilmente; posee una proteína denominada proteína A que se adhiere a las moléculas de inmunoglobulina G lo que la hace funcionar como un factor de virulencia (Seija, 2008).

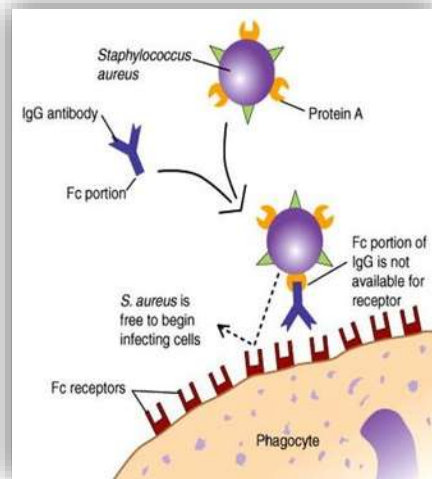


Figura 4: Interacción proteína A e Inmunoglobulina. Unión de la proteína A de *Staphylococcus aureus* con la inmunoglobulina G en su porción Fc evitando así ser opsonizado y fagocitado.

Tomado de (Serrano, 2011).

4.2 Enzimas y toxinas

Las enzimas que produce *Staphylococcus aureus* facilitan el avance de la infección a los demás tejidos cercanos, entre estas enzimas tenemos a las hialuronidasas, lipasas y proteasas, que pueden dañar los tejidos. Algunos ejemplos de estas son: coagulasa, haciéndolo más invulnerable a la fagocitosis; catalasa, bloqueando las técnicas de ingestión de los polimorfonucleares; estafiloquinasas, facilitan la diseminación a los tejidos debido a que degradan la fibrina; entre otras (Seija, 2008).

Las toxinas son proteínas exocelulares ricas en aminoácidos hidrofílicos, clasificadas en 3 grupos: Las enterotoxinas presentes en *Staphylococcus aureus* están denominadas de la A hasta la E, H e I, estas son las causantes de las infecciones por alimentos, considerado hasta el 2005 como el grupo más extenso, conjuntamente actúan con la toxina del síndrome del shock tóxico-1 (TSST-1) y las toxinas exfoliativas ETA y ETB (Fernández, 2008).

4.2.1 Enterotoxinas

Son proteínas de cadena simple compuestas por altas cantidades de tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, con PM entre 28,000 y 35,000 daltons,

aunque algunas cepas no producen enterotoxinas, otras pueden producir más de un serotipo de estas (López, 2014).

Las enterotoxinas tienen gran capacidad para inducir el vómito. Hasta el año 2005, se han identificado 18 enterotoxinas con serología diferente, en las que tenemos la A, B, C (contando C con 5 variantes), D, E, G, H, I (G, H, I, con variantes antigénicas), J, K, L, M, N, O, P, Q, R y U son muy resistentes a la acción de las proteasas por lo que le permite al microorganismo entrar fácilmente al tracto digestivo, así como muy termoestables. Estas enterotoxinas actúan ligándose a las cadenas β de los linfocitos T que se encuentran en el intestino, así mismo; afectan los centros nerviosos del intestino, mandando la señal al centro emético de la médula, la capacidad de inducir el vómito es lo que las diferencia de otras toxinas (Mendoza, 2005).

Cinco son las enterotoxinas más importantes debido a que causan alrededor del 95% de las intoxicaciones alimentarias, éstas son codificadas por genes que están unidos por elementos adjuntos como profagos, plásmidos, clúster de genes, cassette cromosómicos e islas de patogenicidad (Ovares, 2015).

La enterotoxina A fue la primera descubierta por Casman y Bergdoll en 1960 desde ahí se nombraron en orden cronológico a su descubrimiento, la enterotoxina A es la más frecuente que se encuentra causando intoxicación alimentaria, es altamente potente; una cantidad mínima de 100 ng puede causar sintomatología de la intoxicación debido a que los monocitos y plaquetas son altamente vulnerables a esta toxina. Esta enterotoxina, está codificada por el gen “sea” que se encuentra en bacteriófagos polimórficos el cual lo inserta en la bacteria comportándose como parte del genoma (Zendejas, Avalos, & Soto, 2014).

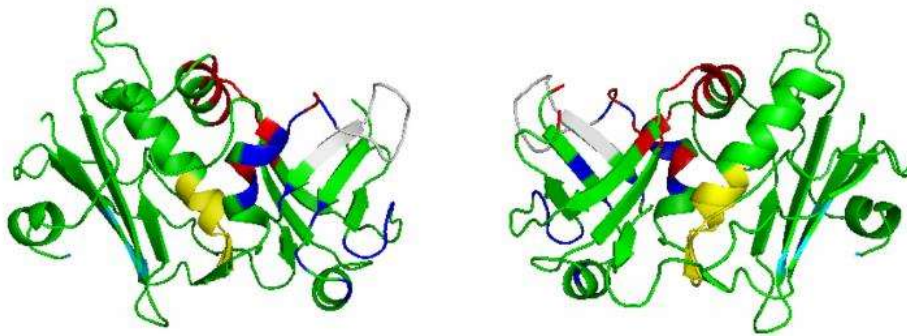


Figura 5: Estructura de la Enterotoxina A

Representación tridimensional de la estructura molecular de la enterotoxina A.

Tomado de (Spaulding, y otros, 2013)

Fue en 1973, cuando se registraron los primeros brotes de intoxicación causados por la enterotoxina B el gen “seb”, que está ubicado en cromosomas o plásmidos dependiendo de la cepa, el gen “sec” se codifica en una isla de patogenicidad y el “see” por un fago defectuoso (Ovares, 2015).

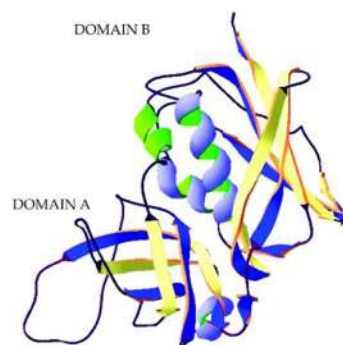


Figura 6: Estructura de la Enterotoxina B

Estructura molecular de la enterotoxina B con 2 dominios desiguales compuestos por cadenas β y helices α .

Tomado de (Janik, Ceremuga, Saluk, & Bijak, 2019).

4.2.2 Toxinas exfoliativas

Están compuestas por 2 proteínas ET-A y ET-B que, aunque tienen muchas diferencias sus actividades son similares, la proteína ET-A es termoestable con gen cromosómico, por su parte; la proteína ET-B es termolábil de origen plasmídico, estas toxinas producen el estafilocócico de la piel escaldada ya que deshacen la matriz de mucopolisacáridos de la epidermis (Koneman, et al, 2006).

4.2.3 Hemolisinas

Tienen la capacidad de lisar hematíes y otras células.

La alfa-hemolisina posee un gen plasmídico y cromosómico, al entrar al cuerpo se une a la célula ya sea por la ayuda de colesterol o por medio de receptores formando un poro que es el encargado de la lisis, es citotóxica principalmente para células inmunológicas, su principal función es convertir en nutrientes el tejido del huésped (Sánchez, 2012).

La beta-hemolisina se encarga de hidrolizar la esfingomielina de la membrana lo que ayuda a la permeabilidad y como consecuencia la pérdida continua de la carga de la superficie celular, se demostró que actúa en linfocitos principalmente linfocitos T proliferativos y neutrófilos (Camussone & Calvino, 2013).

La delta-hemolisina se caracteriza por su mecanismo de detergente produciendo hidrólisis en eritrocitos mientras que gamma-hemolisina afecta macrófagos y neutrófilos de mamífero (Bustos, Hamdan, & Gutiérrez, 2006).

La toxina Panton-Valentine (PVL) se encarga de formar poros, es una homóloga de la hemolisina-gamma, puede unirse a cualquier tipo de hemolisina y puede ser fácilmente transferible a otras cepas (Cervantes, García, & Salazar, 2014).

4.2.4 Toxina del síndrome del choque tóxico 1

Es la responsable de causar el síndrome de shock tóxico, que es una enfermedad sistémica aguda con una alta probabilidad de muerte; fue nombrado así en 1978 por Todd, los principales síntomas son: hipotensión súbita, fiebre alta, y eritrodermia macular difusa; puede producir un fallo multiorgánico sistémico (Ciriano, Vicente, Olagorta, Belloc, & García, 2013).

El gen TSST se ubica a nivel cromosómico que puede estar contenido en un transposón o un elemento análogo, esta toxina se une a los receptores de las células provocando una activación del 20% de estas células lo que da lugar a una inflamación elevada por la liberación intensiva de citosinas (Rojo, Martín, De Juan, & Torres, 2011).

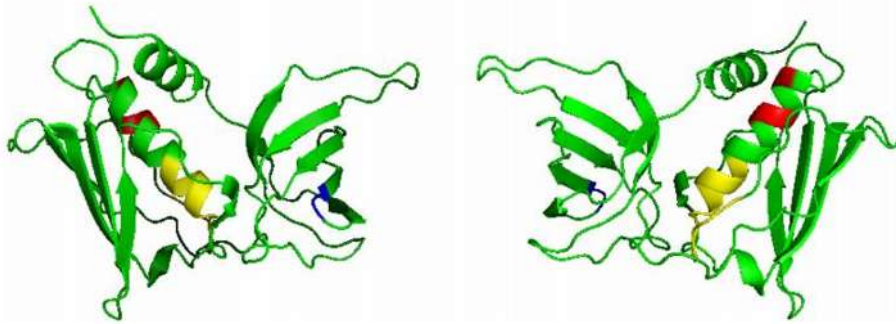


Figura 7: Estructura de la Toxina TSS-1

Proteína de la toxina TSS-1 que causa el síndrome del choque tóxico, aislada de un estafilococo.

Tomado de (Spaulding, et al, 2013)

A causa de las enfermedades transmitidas por los alimentos, gran parte de la población mundial se ve afectada debido al consumo de alimentos fabricados con medidas de higiene inadecuadas, por lo que en la actualidad, se ha puesto mucho interés en la inocuidad de los alimentos para el consumo humano, ya que esto incluye medidas que garantizan una manipulación segura e higiénica del producto desde su elaboración y hasta la salida en el mercado (OMS, 2015).

Al ser *Staphylococcus aureus* uno de los patógenos importantes en las enfermedades de transmisión por alimentos, se ha buscado la forma de identificarlo en diferentes tipos de alimentos, los más comunes contaminados por este microorganismo son los derivados lácteos. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos APENDICE B NORMATIVO; Establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *Staphylococcus aureus* en alimentos para consumo humano, mientras que la 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; nos indica la cantidad aceptable del microorganismo *Staphylococcus aureus* en los diferentes productos lácteos.

5. Pruebas de identificación para *Staphylococcus aureus*

5.1 Tinción de Gram

Técnica que se utiliza para clasificar a las bacterias en 2 grupos según la composición de su pared.

Bacterias Gram positivas, poseen en su pared celular una capa gruesa de peptidoglicano y polímeros, no cuentan con membrana celular externa, el colorante primario azul violeta que tiene afinidad con el peptidoglicano y el lugol agregado posteriormente, forman un complejo azul violeta-yodo que impide que sufran una decoloración por lo que se observan al microscopio de color azul oscuro a morado. Las bacterias Gram negativas, sufren una decoloración después del colorante azul-violeta, ya que su pared celular es más delgada en la proporción de peptidoglicanos y lipoproteínas que son destruidas durante la decoloración, estas bacterias son teñidas con el colorante secundario safranina y se observan al microscopio de un tono rosa a rojo (López et al, 2014).

5.2 Agar manitol salado

Medio sólido para aislar principalmente *Staphylococcus aureus* por su capacidad de fermentar el manitol, contiene extracto de carne para la obtención de nutrientes y una concentración de 7.5% de cloruro de sodio, se considera selectivo por su gran contenido de sal, que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas. Es un medio diferencial por el carbohidrato manitol y el indicador de pH rojo de fenol. Al fermentar el manitol se generan productos ácidos, lo que conduce al viraje del medio; las colonias, así como el medio debajo de ellas en tonalidad amarillo indican la presencia de *Staphylococcus aureus*. Las bacterias incapaces de utilizar el manitol, usan como nutrientes los extractos y peptonas de carne así como la tripteína, por lo que se visualizan en tonalidad rosa tenue o fuerte, el medio sobre el que crecen puede quedar del mismo color u observarse un tono fucsia (DIFCO, 2009).

5.3 Catalasa

La catalasa, es una enzima que poseen los microorganismos para hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, debido a que este es tóxico para las bacterias. Su principal función es diferenciar entre el género *Streptococcus*,

Enterococcus y *Staphylococcus*, siendo este último el único catalasa positivo. La prueba resulta ser positiva cuando al interactuar el microorganismos con el peróxido de hidrógeno se observa rápidamente el desprendimiento de burbujas por la acción de producción de oxígeno (Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010).

5.4 Coagulasa

Permite diferenciar las especies de *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* es coagulasa positivo mientras que *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* son coagulasa negativos. La prueba consiste en detectar la enzima coagulasa en el microorganismo, en el caso de *Staphylococcus aureus*, posee 2 tipos de coagulasa, una coagulasa ligada que se encuentra incorporada a la pared celular llamada factor reactivo de la coagulasa o factor de aglutinación la cual opera sobre el fibrinógeno formando grumos o un coágulo al inocular la cepa en plasma. El segundo tipo de coagulasa llamada coagulasa libre o exocoagulasa, actúa por la activación de un factor el cual se liga a la coagulasa reaccionando con el fibrinógeno formando el grumo o coágulo de fibrina. La formación del coágulo confirma la presencia de la enzima coagulasa (Seija, 2002).

5.5 Termonucleasa

Procedimiento para detectar la enzima desoxirribonucleasa, ésta es capaz de hidrolizar al DNA o RNA en las uniones fosfodiester de la posición 5' por un mecanismo dependiente de calcio. Es una enzima de característica globular utilizada para detectar de manera indirecta la presencia de *Staphylococcus aureus* en grandes cantidades, se relaciona con la posible producción de enterotoxinas junto con la prueba coagulasa, por lo que son utilizadas para identificar cepas productoras de enterotoxinas de este microorganismo (Peralta, Oloarte, & López, 2013).

6. Justificación

En México se tiene una legislación deficiente con respecto a la venta de productos en mercados ambulantes, estos son conservados en condiciones no favorables, adicionando que; la mayoría de empresas fabricantes de productos lácteos artesanales, no cumplen con las medidas sanitarias durante la obtención de materia prima, producción, almacenamiento y transporte del producto terminado y destacando que los quesos artesanales son elaborados con leche cruda o bronca. La suma de lo anterior implica que la mayoría de estos productos se encuentren fuera de normas sanitarias para diferentes microorganismos patógenos, teniendo como consecuencia la afectación en diferentes grados, de la salud de los consumidores.

La gastronomía mexicana tiene una amplia variedad de platillos, incluyendo entre sus principales ingredientes alguna variedad de queso. Los dueños de establecimientos dedicados a este rubro, optan por elegir quesos elaborados artesanalmente, preferidos por los consumidores por sus características organolépticas, tradición y bajo costo. Así; este trabajo tiene como finalidad saber si dos variedades de quesos se encuentran o no aptos para su consumo.

Al ser *Staphylococcus aureus* uno de los patógenos más comunes implicados en intoxicaciones por alimentos entre la población, se tiene un gran interés en conocer la calidad con respecto a éste patógeno, de los quesos artesanales de diferentes empresas, ubicadas en una de las regiones de mayor producción de queso Fresco y Adobera del estado de Michoacán.

7. Hipótesis

Los quesos Frescos y Adobera elaborados en la región de Tierra caliente del estado de Michoacán tienen cifras de *Staphylococcus aureus* por fuera de lo establecido en la normatividad mexicana, debido a factores como la falta de medidas higiénicas en su proceso de elaboración.

8. Objetivo general

Cuantificar el contenido de *Staphylococcus aureus* presente en muestras de queso Fresco y Adobera recolectadas en los establecimientos de producción en la región de tierra caliente del estado de Michoacán.

8.1 Objetivos particulares

- Aislar y cuantificar la presencia de *Staphylococcus aureus* en queso Fresco y Adobera apegándose a la normativa mexicana vigente.
- Realizar pruebas confirmatorias para la identificación de género y especie de *Staphylococcus aureus* de las cepas aisladas.
- Realizar la prueba de termonucleasa como una confirmación de especie y para estimar la presencia de *Staphylococcus aureus* productor de enterotoxina.

9. Materiales y métodos

Se recolectaron 30 muestras de queso Fresco artesanal y 30 muestras de queso Adobera artesanal en seis empresas productoras, ubicadas en los municipios de Tepalcatepec, Buenavista y Apatzingán de la constitución pertenecientes a la región de Tierra caliente del estado de Michoacán.

Diagrama de trabajo

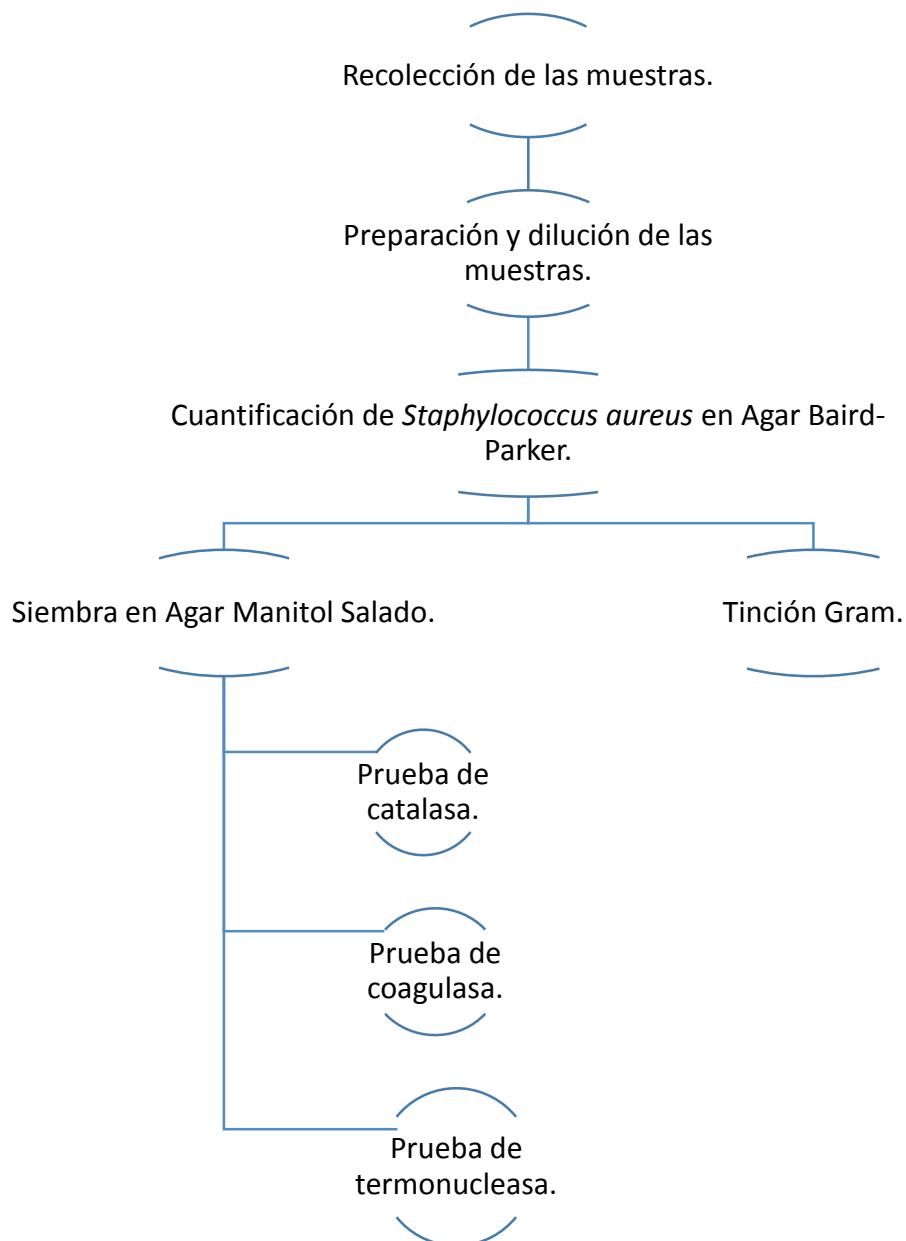


Figura 8: Diagrama de las pruebas realizadas durante el análisis.

10. Procedimiento de cada prueba

10.1 Recolección de las muestras

Las muestras fueron recolectadas en los lugares de fabricación de los quesos, se tomaron 5 muestras de cada queso por empresa, recolectando 30 muestras de queso Fresco y 30 muestras de queso Adobera. Las muestras se transportaron en hieleras con geles de refrigeración hasta el laboratorio, posterior; se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento no excediendo un máximo de 48 horas.

10.2 Preparación y dilución de las muestras

Se preparó agua peptonada en 4 frascos dilutores con tapón de rosca y baquelita con 90 mL cada uno, repitiendo esta serie para cada muestra. Se esterilizó 15 lb, 121 °C por 15 min. Para la dilución primaria: se pesó en recipiente estéril (vaso de licuadora) 10 g de muestra y se colocó el volumen de agua peptonada estéril de uno de los frascos dilutores previamente atemperado. Se licuó durante 2 min, se regresó la mezcla a la botella de dilución; la solución homogénea resultante corresponde a la dilución 10^{-1} , se agitó la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba hacia abajo en un ángulo de 30 grados, de esta dilución se tomó 10 mL y se transfirieron a otro frasco dilutor con 90 mL de agua peptonada, se repitió este paso hasta la dilución 10^{-4} .

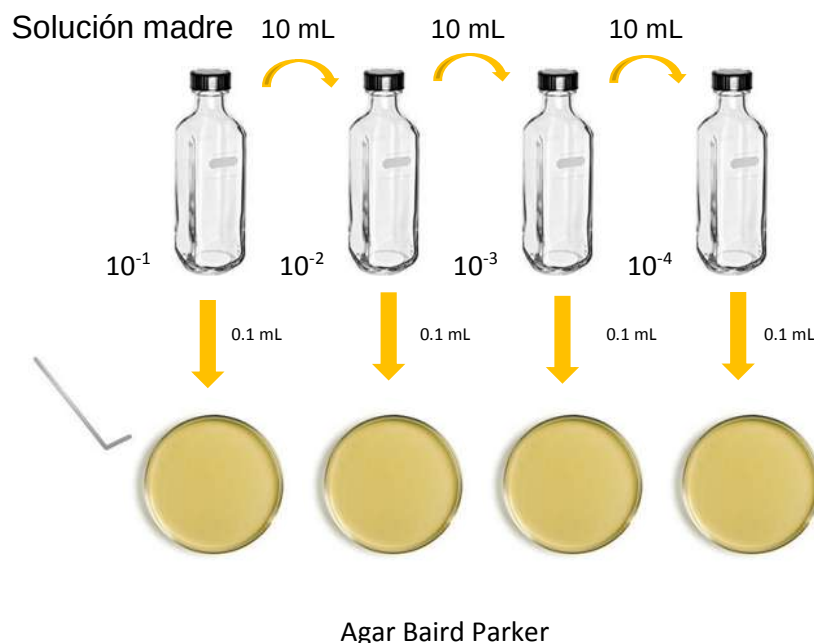


Figura 9: Diagrama de preparación de diluciones.

Tomado de (NOM-110-SSA1-1994).

10.3 Recuento de *Staphylococcus aureus*

10.3.1 Siembra en agar Baird-Parker

De las diluciones preparadas 10^{-1} a la 10^{-4} se tomó 0.1 mL para ser inoculados en placas de Petri con Agar Baird-Parker se homogenizó en la superficie con asas de vidrio estériles en forma de L, se dejó absorber el inóculo por completo en el agar. La incubación se llevó a temperatura de 35 ± 2 °C por 48 h posterior, se realizó el conteo de las colonias en cada placa y seleccionando 5 colonias con características correspondientes a la morfología de *Staphylococcus aureus*. Colonias negras o grises oscuras con halo claro al rededor.

10.3.2 Siembra en agar manitol salado

Las 5 colonias seleccionadas se sembraron por estría simple en Agar Manitol Salado con asa bacteriológica estéril, se colocó en incubación a 35 ± 2 °C por 48 h. Colonias presuntivas de *Staphylococcus aureus* presentan como característica colonias amarillas con cambio de color del medio de rosa al amarillo.

10.3.3 Tinción Gram

Se realizó el frotis en un portaobjetos sellándolo con flama, se agregó cristal violeta HYCEL durante 1 min y posteriormente se lavó con agua destilada para cubrir con lugol durante 1 min, se lavó nuevamente con agua destilada, se realizó una decoloración con alcohol-acetona 1:1 HYCEL y se lavó con agua destilada, se cubrió con safranina por 30 s y se lavó nuevamente con agua destilada, se dejó secar y se observó al microscopio. Al microscopio se buscan cocos Gram positivos en conformación de racimos de uva con afinidad tintorial violeta que corresponden al Género *Staphylococcus*.

10.3.4 Prueba de catalasa

En un portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% se suspendió la bacteria con ayuda de una astilla de madera en la gota de peróxido. Una prueba de catalasa positiva se observa como la formación inmediata de burbujeo debido a la producción de oxígeno por la descomposición del peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima catalasa presente.

10.3.5 Prueba de coagulasa

En tubos estériles se colocó 0.5 mL de plasma humano y con asa estéril se inoculó la colonia del microorganismo en el tubo, se dejó en incubación a 35 ± 2 °C y se revisó a las 4 h, la formación de un coágulo da una prueba positiva para la presencia de la enzima coagulasa.

10.3.6 Prueba de termonucleasa

Se preparó 100 mL de agar DNAsa de los cuales se tomaron 2 mL para adicionar a 128 mL de Hidroximetil aminometano (TRIS) el cual se preparó con 0.8 g de TRIS en 130 mL de agua con pH 9, 0.05 M y se descartaron 2 mL para obtener los 128 mL requeridos, se agregó 0.1 mL de CaCl_2 0.01 M más 0.925 g de NaCl, 0.78 g de agar y 0.65 mL de azul de toluidina se calentó para disolver completamente y se esterilizó 15 lb, 121 °C por 15 min, se dejó enfriar. Se vertió en placas estériles, una vez sólido el medio se hicieron orificios de aproximadamente 4 mm retirando el agar. Las cepas problema, se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 h. Posterior, se llevaron a baño maría por 15 min, se dejó atemperar y se agregó 3 gotas del caldo crecido en los orificios de la placa, se incubó a 35 ± 2 °C por 24 h. Una prueba positiva se observa con la presencia de un halo color rosa alrededor del orificio, indicando la presencia de la enzima termonucleasa.

11. Resultados y discusión

11.1 Resultados de la cuenta en agar Baird-Parker

Tabla 5. Unidades formadoras de colonia por cada gramo de queso Adobera.

	Muestra	UFC/g		Muestra	UFC/g
E1	Muestra AD01	5 log ₁₀	E4	Muestra AD16	4 log ₁₀
	Muestra AD02	4 log ₁₀		Muestra AD17	4 log ₁₀
	Muestra AD03	4 log ₁₀		Muestra AD18	5 log ₁₀
	Muestra AD04	4 log ₁₀		Muestra AD19	4 log ₁₀
	Muestra AD05	4 log ₁₀		Muestra AD20	5 log ₁₀
E2	Muestra AD06	4 log ₁₀	E5	Muestra AD21	4 log ₁₀
	Muestra AD07	4 log ₁₀		Muestra AD22	5 log ₁₀
	Muestra AD08	4 log ₁₀		Muestra AD23	5 log ₁₀
	Muestra AD09	4 log ₁₀		Muestra AD24	5 log ₁₀
	Muestra AD10	4 log ₁₀		Muestra AD25	5 log ₁₀
	Muestra AD11	2 log ₁₀		Muestra AD26	5 log ₁₀

E3	Muestra AD12	3 log10	E6	Muestra AD27	5 log10
	Muestra AD13	2 log10		Muestra AD28	5 log10
	Muestra AD14	2 log10		Muestra AD29	5 log10
	Muestra AD15	2 log10		Muestra AD30	5 log10

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Se establece como límite máximo permitido para el microorganismo *Staphylococcus aureus* 3 log10 UFC/g.

En la **tabla 5** se muestran los resultados de UFC/g de las muestras de quesos Adobera donde se observa que solamente un 13.33% de las muestras cumplen con lo establecido en la NOM-243-SSA1-2010 y el 86.66% se encuentran fuera del límite permitido.

Fueron un total de 4 muestras las que se encontraron dentro de los límites permitidos, dichas muestras pertenecen a la empresa número 3 (E3).

La media obtenida de las muestras con respecto a éste microorganismo fue de 4.1 log10 UFC/g. Comparando los resultados con los reportados por González y Franco en 2015, donde analizó la microbiota en queso de Aro comercializado en Oaxaca; México, en un queso fresco de características similares al queso Adobera obtuvieron una media de 5.76 log10 UFC/g. Según los datos reportados por Díaz y González en 2001 en queso blanco fresco en Mérida; Venezuela, en 41.67% se alcanzaron conteos mayores a 3 log10 UFC/g y un 8.34% presentó conteos superiores a los 5 log10 UFC/g. Idarraga y colaboradores en 2017, reportaron en queso cuajada una media de 6.45 log10 UFC/g en Salento, y 6.161 log10 UFC/g en Armenia; Colombia. Castro y colaboradores en 2011 reportaron en queso Oaxaca en el estado de México una media de 9.0 log10 UFC/g lo que nos indica que el queso Adobera analizado en este trabajo presenta conteos bajos en comparación de otros tipos de queso de México y de otros países.

Tabla 6. Unidades formadoras de colonia por cada gramo de queso Fresco

	Muestra	UFC/g		Muestra	UFC/g
E1	Muestra FR01	4 log10	E4	Muestra FR16	5 log10
	Muestra FR02	4 log10		Muestra FR17	5 log10
	Muestra FR03	3 log10		Muestra FR18	5 log10
	Muestra FR04	4 log10		Muestra FR19	5 log10

	Muestra FR05	4 log10		Muestra FR20	5 log10
E2	Muestra FR06	1 log10	E5	Muestra FR21	1 log10
	Muestra FR07	4 log10		Muestra FR22	1 log10
	Muestra FR08	4 log10		Muestra FR23	1 log10
	Muestra FR09	4 log10		Muestra FR24	4 log10
	Muestra FR10	4 log10		Muestra FR25	1 log10
E3	Muestra FR11	3 log10	E6	Muestra FR26	2 log10
	Muestra FR12	3 log10		Muestra FR27	1 log10
	Muestra FR13	3 log10		Muestra FR28	1 log10
	Muestra FR14	5 log10		Muestra FR29	1 log10
	Muestra FR15	4 log10		Muestra FR30	1 log10

La **tabla 6** contiene los resultados para UFC/g de las muestras de quesos Fresco donde un 36.66% de las muestras se encuentran dentro del límite permitido en la NOM-243-SSA1-2010 y el 63.33% restante está fuera del límite.

En el caso de queso fresco todas las muestras de la empresa 6 (E6), 4 muestras de la empresa 5 (E5), 1 muestra de la empresa 1 (E1) y 1 muestra de la empresa 2 (E2), se encontraron dentro de lo establecido en la norma.

Tomando en cuenta las 60 muestras analizadas un 75% se encuentra por encima del límite máximo permitido, siendo en su mayoría muestras pertenecientes al queso Adobera.

Solís y colaboradores en 2013, reportaron 7.77 Log10 UFC/g en quesos producidos en el municipio de Tepalcatepec, Michoacán; Gutiérrez y colaboradores en 2015 reportaron un rango de 0.00 a 6.99 Log10 UFC/g en queso blanco artesanal en Lara, Venezuela; Ortiz Estrada en 2014 reportó un rango de 3.99 a 6.35 UFC/g en queso chihuahua de Cd. Cuauhtémoc y Cd. Delicias, Chihuahua; los reportados por Valero y colaboradores en 2012 en queso fresco artesanal de Zulia, Venezuela de 5 log10 UFC/g, De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se obtuvo una media de 3.1 log10 UFC/g para el queso Fresco, lo que nos indica que presenta un conteo menor en comparación a los quesos de otros estados y países.

Realizando una comparación de los 2 tipos de queso analizados en este estudio donde la media obtenida es de; 4.1 log10 UFC/g para queso Adobera y 3.1 log10 UFC/g para queso Fresco, se observa que el queso Adobera presenta cantidades superiores de *Staphylococcus aureus* en comparación al queso Fresco.

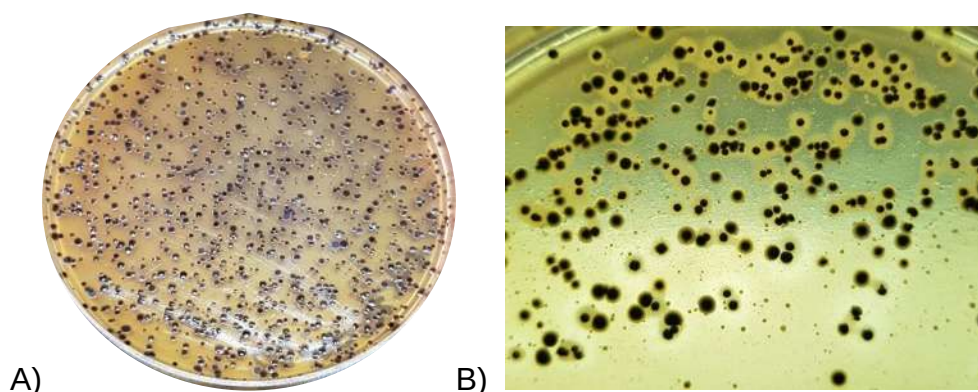


Figura 10: Crecimiento y morfología de las colonias en Agar Baird Parker
Fotografías tomadas durante el proceso de análisis, **A)** muestra el crecimiento en una dilución 10^{-2} . **B)** colonias características de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird Parker, colonias negras con halo claro.

11.2 Resultados de crecimiento positivo en agar manitol salado

Tabla 7. Número de colonias positivas en agar manitol salado para queso Adobera

Muestra	Agar manitol salado	Número de colonias	Agar manitol salado
AD01	5 positivas	AD16	4 positivas
AD02	5 positivas	AD17	3 positivas
AD03	5 positivas	AD18	5 positivas
AD04	5 positivas	AD19	5 positivas
AD05	5 positivas	AD20	5 positivas
AD06	2 positivas	AD21	5 positivas
AD07	4 positivas	AD22	5 positivas
AD08	4 positivas	AD23	5 positivas
AD09	5 positivas	AD24	5 positivas
AD10	5 positivas	AD25	5 positivas
AD11	5 positivas	AD26	5 positivas
AD12	5 positivas	AD27	5 positivas
AD13	5 positivas	AD28	5 positivas
AD14	5 positivas	AD29	5 positivas
AD15	5 positivas	AD30	5 positivas

Se sembraron un total de 150 colonias posibles de *Staphylococcus aureus*, de las cuales en queso Adobera **tabla 7** un 94,66% resultaron positivas y el resto 5,33% fueron negativas.

Tabla 8. Número de colonias positivas en agar manitol salado para queso Fresco

Número de colonias	Agar manitol salado	Número de colonias	Agar manitol salado
FR01	5 positivas	FR16	5 positivas
FR02	5 positivas	FR17	5 positivas
FR03	5 positivas	FR18	5 positivas
FR04	5 positivas	FR19	5 positivas
FR05	5 positivas	FR20	5 positivas
FR06	0 positivas	FR21	0 positivas
FR07	5 positivas	FR22	0 positivas
FR08	5 positivas	FR23	0 positivas
FR09	5 positivas	FR24	1 positivas
FR10	5 positivas	FR25	0 positivas
FR11	4 positivas	FR26	4 positivas
FR12	4 positivas	FR27	0 positivas
FR13	4 positivas	FR28	3 positivas
FR14	5 positivas	FR29	0 positivas
FR15	5 positivas	FR30	1 positivas

En el caso de las 150 colonias sembradas de las muestras de quesos Fresco **tabla 8** un 67,33% resulto positivas y el 32,66% restante fueron negativas.

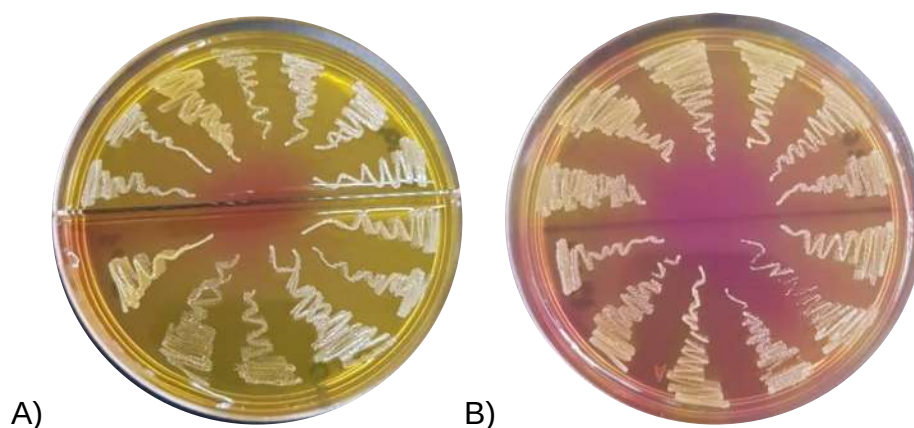


Figura 11: Crecimiento en Agar Manitol Salado

- A)** Crecimiento positivo para *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol salado pasadas 48 h a 35 ± 2 °C. **B)** Comienzo de viraje del medio de color rosa a un color amarillo transcurridas 14 h a 35 ± 2 °C.

11.3 Resultados de la prueba de catalasa y prueba de coagulasa

Tabla 9. Colonias positivas para la prueba catalasa y coagulasa por empresa

Empresa	Tipo de queso	Prueba catalasa	Prueba coagulasa
Empresa 1	25 Adobera	50 positivas	50 positivas
	25 Fresco	0 negativas	0 negativas
Empresa 2	20 Adobera	40 positivas	40 positivas
	20 Fresco	0 negativas	0 negativas
Empresa 3	25 Adobera	46 positivas	46 positivas
	22 Fresco	1 negativa	1 negativa
Empresa 4	22 Adobera	47 positivas	47 positivas
	25 Fresco	0 negativas	0 negativas
Empresa 5	25 Adobera	21 positivas	21 positivas
	1 Fresco	5 negativas	5 negativas
Empresa 6	25 Adobera	31 positivas	31 positivas
	8 Fresco	2 negativas	2 negativas

Se realizó la prueba catalasa y la prueba coagulasa a 243 cepas en total 142 cepas pertenecientes a quesos Adobera y 101 cepas de quesos Fresco. En la **tabla 9** se muestran las cepas a las que se les practicaron las pruebas agrupadas con el número de la empresa donde pertenecen las muestras. En el cual un 96,70% del total de las cepas resultaron positivas para ambas pruebas y solo un 3,29% resultaron negativas (tabla 9).

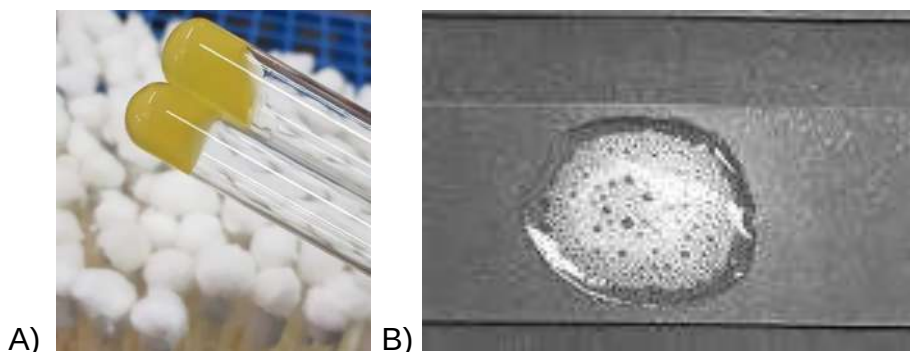


Figura 12: Resultados prueba Coagulasa y Catalasa.

A) Prueba positiva, formación del coágulo en plasma de humano debido a la presencia de la enzima coagulasa. **B)** Prueba positiva para catalasa, se observa la formación de burbujas por la presencia de la enzima.

11.4 Resultados para la prueba de termonucleasa

Tabla 10. Número de colonias positivas para prueba termonucleasa por empresa.

Empresa	Prueba termonucleasa
Empresa 1	42 positivas 8 negativas
Empresa 2	40 positivas 0 negativas
Empresa 3	41 positivas 5 negativas
Empresa 4	40 positivas 7 negativas
Empresa 5	20 positivas 1 negativa
Empresa 6	30 positivas 1 negativa

La prueba de termonucleasa se le realizó a las 235 cepas que resultaron positivas a todas las pruebas anteriores de las cuales el 90,63% de estas resultaron positivas y el 9,36% restante fueron negativas. La **tabla 10** muestra las cepas positivas por cada empresa a la que pertenecen las muestras.

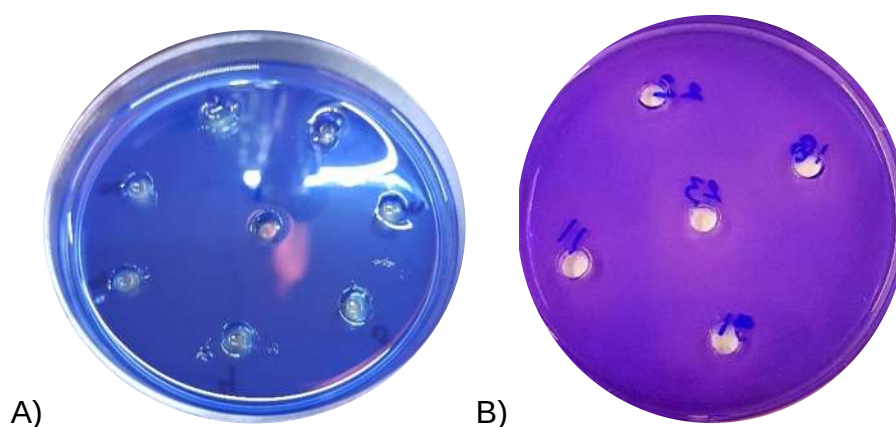


Figura 13: Resultados prueba Termonucleasa

- A)** Color inicial del medio para la prueba de termonucleasa con azul de toluidina. **B)** Prueba positiva, observación de halo color rosa alrededor del orificio donde se sembró el microorganismo.



Figura 14: Gráficas de comparación de Resultados

Gráficos de comparación por empresa que expresan el porcentaje de muestras confirmadas como *Staphylococcus aureus* al termino del análisis realizado.

En la mayoría de las empresas se identificó *Staphylococcus aureus* en porcentajes altos, haciendo la comparación con los obtenidos por Rodas-Pazmiño y colaboradores en 2013, donde encontraron un 100% en quesos artesanales comercializados en la ciudad de Milagro, Ecuador; 100% por Aranda y colaboradores en 2015, en queso artesanal en Trujillo, Perú; un 97% por Herrera y Santos en 2015, en queso doble crema artesanal en Pamplona, Colombia; un 69.44% por Díaz y González en 2001, en quesos frescos en Mérida, Venezuela; un 80% por Luján y colaboradores en 2006, en queso Fresco artesanal en Lima, Perú; un 36% por Guzmán y colaboradores en 2016, en queso comercializado en Tabasco, México y 26,6% por Díaz-Galindo en 2016,

en queso comercializado en Toluca, México. La empresa 1, 2, 3 y 4 presentaron porcentajes similares entre 80 y 84% mientras que la empresa 6 un 60% y solamente la empresa 5 resultó con 40%, lo que nos indica que la mayoría de los comercios tienen una baja calidad sanitaria ya que presentan porcentajes superiores a los encontrados en quesos elaborados en otros estados del país, pero se parecen a los porcentajes encontrados en la mayoría de los quesos en diferentes países y regiones. Aunque la presencia de *Staphylococcus aureus* se relaciona directamente con la contaminación inicial de la leche bronca no se puede identificar la causa exacta de donde se adquiere la contaminación de los quesos debido a que son muchos los factores que intervienen, las empresas reciben leche de diferentes proveedores que terminan siendo mezcladas, la manipulación del producto por diferentes personas, los utensilios utilizados son muy diversos, el transporte, la vida de anaquel etc.

12. Conclusiones

1. De acuerdo a los resultados obtenidos un alto porcentaje (75%) de las 60 muestras, presentan contaminación por *Staphylococcus aureus*. Lo que se relaciona directamente con una mala calidad de los quesos elaborados artesanalmente en las empresas muestreadas de la zona de tierra caliente de Michoacán.
2. Las muestras con mayor contaminación pertenecen a quesos Adobera presentando un porcentaje y una carga microbiana mayor a las de quesos Fresco.
3. Uno de los factores importantes por lo que fue encontrada ésta contaminación aunado a la elaboración de los quesos con leche cruda, es que el almacenamiento del producto es deficiente, lo que se pudo constatar al recolectar las muestras. Los productos se encontraban sin refrigeración, tomando en cuenta que la región de producción se caracteriza por su clima cálido, lo que favorece la proliferación de microorganismos patógenos.
4. Debido a las altas cargas microbianas que presentaron las muestras, los productos representan un alto riesgo para la salud de los consumidores, ya que este microorganismo puede causar desde una infección hasta una intoxicación a causa de las toxinas que produce.
5. La presencia de coagulasa y termonucleasa se han relacionado con la producción de enterotoxinas. Al finalizar este estudio, se encontró que un 90,63% de las cepas presentaron termonucleasa y coagulasa lo que puede representar un alto riesgo de intoxicación, sin embargo; la presencia de enterotoxinas debe ser confirmada por un método directo.

13. Bibliografía

- Agudelo, D. A., & Bedoya, O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 38-42.
- Barreto, G., Sedrés, M., Rodríguez, H., & Guevara, G. (2010). *Revista Electrónica de Veterinaria*. Obtenido de <https://studylib.es/doc/3931162/>
- Bello, L. J., Lizeldi, E., González, V., Manzo, S., Nochebuena, P., Quiñones, R., & Vázquez, S. (2005). Productos lácteos: La ruta de la metamorfosis. *Revista Digital Universitaria UNAM*.
- Blog Agares. (06 de Diciembre de 2016). *Blog Agares*. Obtenido de <http://blogagares.blogspot.com/2016/12/medios-de-cultivo.html>
- Bohdana, J., Necidová, L., & Janstova, B. (2012). Comparando el crecimiento de *S. aureus* y la producción de enterotoxina C estafilocócica en leche de oveja y cabra. *Revista de Microbiología, Biotecnología y ciencias de la comida*, 758-768.
- Bolaños, D. (2018). *Universidad Autónoma del Estado de México*. Obtenido de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/94895/TESIS%20DANIELA%20DI%20AZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bonet, B., Dalmau, J., Gil, I., Gil, P., Juárez, M., Matía, P., & Ortega, R. M. (2009). *Libro blanco de los lácteos*. Obtenido de <http://www.lacteosinsustituibles.es/p/archivos/pdf/LibroBlanco.pdf>
- Buseti, M. (2019). *Sitio Argentino de producción animal*. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_leche/26-pampinta.pdf
- Bustos, J. A., Hamdan, A., & Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomed*, 287-305.
- Cambio de Michoacán. (2014). *Cambio de Michoacán*. Obtenido de <http://www.cambiodemichoacan.com.mx/nota-227051>
- Camussone, M., & Calvino, F. (2013). *Revista Argentina de Microbiología*. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-factores-virulencia-staphylococcus-aureus-asociados-S0325754113700117>
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología Clínica y medicina de laboratorio*, 28-40.
- Ciriano, E. E., Vicente, F., Olagorta, S., Belloc, S. J., & García, J. J. (2013). *Síndrome del shock tóxico:clínica y diagnóstico*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medcri/ti-2013/ti133h.pdf>
- Díaz, C., & González, B. (2001). *Revista Salud Pública y Nutrición*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2001/spn013e.pdf>
- Díaz, E. (2017). *Universidad Autónoma de Barcelona*. Obtenido de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/457356/edm1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Díaz, G. E. (Enero de 2016). *Universidad Autónoma del Estado de México UAEM*. Obtenido de Detección de *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA en quesos frescos artesanales comercializados en mercados populares en el valle de toluca:
<http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/58793>
- DIFCO. (2009). *Agar Manitol Salado*. Obtenido de http://f-soria.es/Inform_soria/Difco%20Fichas%20tecnicas/PLACAS%20DIFCO%20Y%20CROMOGENICAS%20BD/FT%20MANNITOL%20SALT%20AGAR.pdf
- E&O Laboratorios. (2016). *EO Labs*. Obtenido de <http://linsrv104.linuxcontrolpanel.co.uk/~eolabs/product/pp1420-baird-parker-agar/>
- Elainy, D. (2016). *Padecimientos Gastrointestinales en México*. Obtenido de <http://dorinaelainy.wixsite.com/terapeutafisico#!Padecimientos-Gastrointestinales-en-M%C3%A9xico/l8qnw/56cb8f460cf26bd1d3ea702f>
- Espinoza, A. (2016). *Inforural*. Obtenido de <https://www.inforural.com.mx/mexico-decimo-lugar-e-produccion-queso/>
- FAO. (2019). *ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA*. Obtenido de <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- Fernández, A., García, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). *Procedimientos en microbiología clínica*. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Fernández, V. (2008). *Centro de vigilancia sanitaria veterinaria (VISAVET)*. Obtenido de <https://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2008/04/02/88074>
- Gil, M. (2018). *Staphylococcus aureus: características, morfología, patogenia*. Obtenido de <https://www.lifeder.com/staphylococcus-aureus/>
- González, G., Molina, R., & Coca, B. (2010). *Calidad de la leche cruda*. Obtenido de https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHECRUDA.pdf
- González, M. L., & Franco, F. M. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*, 250-257.
- Guerrero, J., & Rodríguez, P. A. (2010). *Características físico-química de la leche y su variación. Estudio de caso, empresa de lácteos El Colonial, león Nicaragua*. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/1399/1/tnq04g934.pdf>
- Guzmán, H. R., Hernández, V. R., Morales, E. A., Fernández, R. E., López, M. A., & Contreras, R. A. (2016). Aislamiento e identificación de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos no pasteurizados de una zona tropical del golfo de México. *Revista Científica*, 324-331.
- Haney, J., & Arduino, J. M. (2016). *PIXNIO Staphylococcus aureus*. Obtenido de <https://pixnio.com/es/ciencia/imagenes-microscopia/staphylococcus-aureus-es/altas-ampliacion-10000x-tension-staphylococcus-aureus-bacterias>

- Hernández, C., Aguilera, M. G., & Castro, G. (2011). *Situación de las enfermedades gastrointestinales en México*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei114f.pdf>
- Hernández, R. L., Hernandez, R. M., Morales, A. I., Fernández, E., López, A., & Contreras, A. (2016). *Revista científica, FCV-LUZ*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/313821033_Aislamiento_e_identificacion_de_Brucella_spp_Listeria_monocytogenes_Salmonella_spp_y_Staphylococcus_aureus_en_quesos_frescos_no_pasteurizados_de_una_zona_tropical_del_Golfo_de_Mexico
- Janik, E., Ceremuga, M., Saluk, J., & Bijak, M. (2019). *Puerta de la investigación*. Obtenido de https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-Staphylococcal-enterotoxin-B-The-crystal-structure-of-protein-PDB-3SEB_fig1_331621080
- Jordá, G., Marucci, R., Guida, A., Pires, P., & Manfredi, E. (2012). Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 101-104.
- Juárez, W. A. (2005). *Universidad de San Carlos de Guatemala facultad de medicina veterinaria y zootecnia*. Obtenido de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_0965.pdf
- Koneman, E. W., Winn, C., Allen, S., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., & Janda, W. (2006). *Koneman diagnóstico microbiológico texto y atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Kopper, G., Schneider, G., Domínguez, S., & Gutiérrez, W. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. Obtenido de <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/bitstream/handle/123456789/671/M000381.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- López, E. M. (2014). *EcuRed Enterotoxinas*. Obtenido de <https://www.ecured.cu/index.php?title=Enterotoxinas&oldid=2285564>
- López, J. L., Hernández, D. M., Colín, C., Ortega, P., Cerón, G., & Franco, C. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigacion en discapacidad*, 10-18.
- Lorenzo, M. (2009). *Diseño del envase de queso rallado Quesimple. Nuevo concepto en envases desmenuzados o granulados*. Obtenido de https://www.palermo.edu/dyc/pgraduacion/archivos_bajada/mejores_pg/delorenzo.pdf
- Mallqui, L. A. (2014). *Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos*. Obtenido de <https://luisartica.files.wordpress.com/2011/11/metodos-de-analisis-de-leche-2014.pdf>
- Manterola, H. (s.f.). *Manejo nutricional y composicion de la leche*. Obtenido de www.uchile.cl/documentos/nutricion-del-rebano-lecheropara-la-produccion-de-solidos_58311_5.pdf%2Bycd%3D2yhl%3Desyct%3Dclnkygl%3Dco+&cd=13&hl=es&ct=cInk&gl=mx
- Mejía, M. R., Murillo, A. S., Suazo, I., Campos, J. C., Rodríguez, E., Espinal, O., & Avelar, G. (2009). *Brote por Staphylococcus aureus en una guardería infantil en Choluteca, Honduras*. Obtenido de <http://65.182.2.244/RMH/pdf/2009/pdf/Vol77-2-2009-4.pdf>

- Méndez, A. D. (2016). *Universidad Autónoma del Estado de México*. Obtenido de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/64146/secme-38014.pdf;jsessionid=98E37E93DB4EFA2A7C1E50A24935F8B6?sequence=1>
- Mendoza, J. M. (2005). *Universidad de Oviedo*. Obtenido de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/4806/1/tesis%20fueyo.pdf>
- Murray, R. P., Rosenthal, S. K., & Pfaüer, A. M. (2006). *Microbiología Médica*. Madrid, España: Elsevier.
- Myers, M. L. (2006). *ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO*. Obtenido de <https://www.insst.es/documents/94886/161971/Cap%C3%ADtulo+70.+Ganader%C3%ADa+y+cr%C3%ADa+de+animales>
- NOM-121-SSA1-1994. (s.f.). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS*. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>
- OMS. (2015). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200047/WHO_FOS_15.02_spa.pdf;jsessionid=2D9BF754FD378D09FA3E24147C5D20BA?sequence=1
- Ovares, N. V. (2015). *Importancia de las enterotoxinas producidas por Staphylococcus aureus en alimentos. Diferentes métodos de detección e identificación*. Obtenido de <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3133/1/39230.pdf>
- Patiño, M. (2009). *Leche de bufala VS Leche de vaca*. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/razas_de_bufalos/53-leche.pdf
- Pedraza, J., & Duarte, S. (2009). *Diseño y aplicación de un programa de buenas prácticas de ordeño para mejorar la calidad higiénica de la leche en hatos de la sabana de Bogotá*. Obtenido de <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2017/07/T13.09-D931d.pdf>
- Peralta, A. M., Oloarte, R. A., & López, J. M. (2013). *Pruebas bioquímicas y medios de cultivo 2*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/rebecaoloarte/pruebas-bioquimicas-46069493>
- Picho, J. (2017). *Microbiología de Alimentos, Universidad San Francisco de Quito*. Obtenido de https://www.academia.edu/33185499/LECHE_PASTEURIZADA.pdf
- Productos lácteos, i. (10 de 2012). *Queso, yogur y otras leches fermentadas*. Obtenido de http://www.lacteosinsustituibles.es/p/archivos/pdf/monografia_queso_yogur_otraslechfermentadas.pdf
- Quevedo, E., & Dueñas, M. (2005). *Escuela Superior Politécnica del Litoral*. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3687/1/6214.pdf>
- Ramírez, C., & Vélez, J. F. (2012). *Quesos frescos : propiedades métodos de determinación y factores que afectan su calidad*. Obtenido de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>
- Ramírez, L. (2006). *La leyenda del queso*. Obtenido de http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/21946/articulo_3.pdf?sequence=2&isAllowed=y

- Remache, N. X. (2006). *Facultad de ciencias pecuarias*. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/912/1/27T060.pdf>
- Reynaga, E. A. (2017). *Prevalencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina CC398 en un área con un alta densidad de granjas de cerdos*. Obtenido de https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2017/hdl_10803_455001/ears1de1.pdf
- Reynosa, Y. (2011). *Comparacion de la composicion quimica en 10 marcas de queso panela*. Obtenido de <http://repositorio.uaaen.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/463/61734s.pdf?sequence=1>
- Rivas, M., & Manfredi, E. A. (2018). *Revista Rgentina de Microbiología*. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-brote-intoxicacion-alimentaria-un-jardin-S0325754118301251>
- Riveros, J. C. (2011). *Instituto Nacional de Salud*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>
- Rodas, K., Pazmiño, B., Rodas, E., Cagua, L., Núñez, P., Coello, R., . . . Ayol, L. (2016). Presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos comercializados en la ciudad de Milagro, Octubre- Noviembre 2013. *CUMBRES*, 25-29.
- Rodríguez, P., & Arenas, R. (Junio de 2018). *Hans Christian Gram y su tinción*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Rojo, A., Martín, G., De Juan, M., & Torres, C. (2011). *Síndrome del shock tóxico estafilocócico en un niño de 5 años*. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-sindrome-shock-toxico-estafilococico-un-S0213005X11000644>
- SAGARPA, S. (2016). *Panorama de la lechería en México*. Obtenido de http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Septiembre2016.pdf
- Sánchez, C. A. (2012). Patogenia Molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evidencia Médica en Investigación en Salud*, 79-84.
- SEDRUA. (2019). *Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario*. Obtenido de <http://sedrua.michoacan.gob.mx/4670-2/>
- Seija, V. (2002). *COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>
- Seija, V. (2008). *Etiopatogenia Microbiológica*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Serrano, A. E. (2011). *Estafilococos*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/Xideral/curso-de-microbiologa-11-estafilococos>
- Sociedad Argentina de Nutrición. (2019). *Sociedad Argentina de Nutrición*. Obtenido de http://www.sanutricion.org.ar/files/upload/files/lacteos_y_derivados.pdf
- Solís, m. A., Martínez, L. R., Solorio, S. J., Estrada, F. J., Avilés, N. F., Gutiérrez, I. A., & Castelán, O. O. (2013). CARACTERÍSTICAS DEL QUESO TEPEQUE DE LA TIERRA CALIENTE DE

MICHOACÁN: UN QUESO PRODUCIDO EN UN SISTEMA SILVOPASTORIL INTENSIVO. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 201-214.

Soria, H. R. (2019). *LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA*.

Spaulding, R. A., Salgado, W., Kohler, L. P., Hoswill, R. A., Leung, D. Y., & Schlievert, P. M. (2013). Exotoxinas de superantígenos estafilocócicos y estreptocócicos. *Sociedad Americana de Microbiología*, 422-427.

Suárez, V., & Martínez, G. (2018). *Lechería Caprina: producción, manejo, sanidad, calidad de leche y productos*. Obtenido de https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_lecheria_caprina.pdf

UNAD. (2016). *Definición, composición, estructura y propiedades de la leche*. Obtenido de http://infolactea.com/wp-content/uploads/2016/01/301105_LECTURA_Revision_de_Presaberes.pdf

UNAM. (20 de 09 de 2019). *Productos lácteos*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Composicionlecheygrasa_1694.pdf

Villalobos, A. (2005). *Agronomía Mesoamericana*. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/437/43716214.pdf>

Zavala, J. (2005). *Dirección General de promoción agraria*. Obtenido de [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/7AE7E7AB111562710525797D00789424/\\$FILE/Aspectosnutricionalesytecnol%C3%B3gicosdelaleche.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/7AE7E7AB111562710525797D00789424/$FILE/Aspectosnutricionalesytecnol%C3%B3gicosdelaleche.pdf)

Zendejas, G. S., Avalos, H., & Soto, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista biomédica*, 129-143.

Zurita, R. (2012). *Diccionario de la gastronomía Mexicana*. Obtenido de https://laroussecocina.mx/palabra/?s=queso+fresco&post_type=palabra&vista=diccionario